

ΠΡΑΚΤΙΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΑΡΑΚΕΤΑΜΟΛΗΣ ΣΕ ΑΝΑΒΡΑΖΟΝΤΑ ΔΙΣΚΙΑ

Σκεύη – αντιδραστήρια-όργανα

Φίλτρα σύριγγας Millipore (0.22 μm)

Σύριγγες ινσουλίνης

Μικροσύριγγα ακριβείας Hamilton 250 μL

Ογκομετρική φιάλη

Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες ή eppendorfs

Ακετονιτρίλιο HPLC grade

Υπερκαθαρό νερό - HPLC grade

Πρότυπη ουσία: παρακεταμόλη, 99,9 %

Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης (Ultimate 3000, Dionex) που περιλαμβάνει αντλία παλινδρόμησης τεσσάρων διαλυτών Ultimate 3000 Pump (Pump LPG-3400 A), θερμοστατούμενο χώρο Column Compartment (TCC-3100) και ανιχνευτή PhotoDiode Array UV-Vis (PDA 3000) από Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA.

Στήλη αντίστροφης φάσης Acclaim 120 C18 (Dionex), μέγεθος κόκκων 3 μm , μήκους 150 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm

Τα σκεύη θα πρέπει να είναι πολύ καθαρά, γεγονός που εξασφαλίζεται με τον περιοδικό καθαρισμό τους με 2% διχρωμικό κάλιο (όταν διαπιστωθεί ότι υπάρχουν προσμίξεις στα αναλυόμενα πρότυπα). Καθημερινά πλένονται με ακετονιτρίλιο ή υπερκαθαρό νερό ή μείγμα αυτών ανάλογα με το προηγούμενο περιεχόμενό τους.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο χρόνος ανάσχεσης t_R (min) αποτελεί το κριτήριο ταυτοποίησης των ουσιών που αναλύονται χρωματογραφικά, διότι για σταθερές παραμέτρους ανάλυσης (υλικό πλήρωσης και διαστάσεις στήλης, ταχύτητα ροής κινητής φάσης, θερμοκρασία και σύσταση του συστήματος έκλουσης) ο χρόνος ανάσχεσης είναι σταθερός και χαρακτηρίζει την εκλούμενη ουσία. Το μέγιστο ύψος της χρωματογραφικής κορυφής της αναλυόμενης ουσίας ή το εμβαδόν αυτής (αυτό υπολογίζουμε από τα χρωματογραφήματα) χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της, διότι αυτά είναι ανάλογα της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του αναλύτη στα δείγματα γίνεται με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς που παρασκευάζεται ενίοντας πρότυπα διαλύματα της καθαρής ουσίας

Παράμετροι της ανάλυσης

Τύπος και διαστάσεις στήλης: Στήλη αντίστροφης φάσης Acclaim 120 C18 (Dionex), μέγεθος κόκκων 3 μm, μήκους 150 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm

Παράμετροι Έκλουσης:

Σύστημα έκλουσης: **Ισοκρατική έκλουση (δες σημείωση 1)** με κινητή φάση 75% v/v ακετονιτρίλιο : 25% v/v νερό, **pH 3,5 (οξίνιση με κιτρικό οξύ) (δες σημείωση 2)**

Πίεση κινητής φάσης: 200-3000 psi

Ταχύτητα ροής κινητής φάσης: 0,7 mL/min

Θερμοκρασία έκλουσης: 21 °C

Χρόνος έκλουσης: 10 min

Ενέσιμη ποσότητα δείγματος: 20 μL (χρησιμοποιείται βρόγχος ανάλυσης χωρητικότητας 20 μL)

Καταγραφή απορρόφησης: στα 210 nm επί 10 min

ΣΗΜΕΙΩΣΗ

Σε μια χρωματογραφική ανάλυση οι παράμετροι έκλουσης καθώς και ο τύπος και οι διαστάσεις της στήλης πρέπει να ορίζονται επακριβώς για να είναι επαναλήψιμη μια χρωματογραφική ανάλυση !!!!

5.2. ΠΟΡΕΙΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ : Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων- καμπύλη αναφοράς

Ζυγίζουμε σε αναλυτικό ζυγό, διαλύουμε στην κινητή φάση και μεταφέρουμε σε 7 ογκομετρικές φιάλες των 250 mL συμπληρώνοντας μέχρι την χαραγή, κατάλληλη ποσότητα προτύπου παρακεταμόλης ώστε να προκύψουν 7 πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης από 0-334 μg/mL παρακεταμόλης.

Εισάγουμε με ένεση >20 μL κάθε προτύπου στη στήλη. Μετρούμε την απορρόφηση στα 210nm επί 10 min. Εντοπίζουμε την κορυφή της παρακεταμόλης σε κάθε χρωματογράφημα, την ολοκληρώνουμε και καταγράφουμε το εμβαδόν της για κάθε συγκέντρωση προτύπου. Κατασκευάζουμε την καμπύλη αναφοράς, εμβαδού κορυφής/[παρακεταμόλης].

Προσοχή. Χρειάζεται μεγάλη προσοχή στην καθαριότητα της μικροσύριγγας Hamilton. Η σύριγγα εκπλένεται επανειλημμένα με απεσταγμένο νερό και με πρότυπο διάλυμα ή δείγμα που πρόκειται να μετρηθεί. Προσοχή να αποφεύγονται οι φυσαλίδες κατά την εισαγωγή του δείγματος.

5.3. ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ :

Αναλύσαμε πρότυπη ουσία παρακεταμόλης καθαρότητας 99,9 % με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης [ισοκρατική ανάλυση σε στήλη Acclaim 120 C18 (Dionex), θερμοκρασία 21 °C, με ταχύτητα ροής κινητής φάσης 0,7 mL/min και με κινητή φάση 75% v/v Ακετονιτρίλιο (σχετικά άπολος διαλύτης):25% v/v νερό (πολικός διαλύτης), και λάβαμε μία μόνο κορυφή με χρόνο έκλουσης **3,54 min** ???. Τρέξαμε στη συνέχεια υπό τις ίδιες συνθήκες πρότυπα της ίδιας ουσίας και λήφθηκαν τα παρακάτω δεδομένα

Αριθμός Προτύπου	Συγκέντρωση παρακεταμόλης (μg/mL)	Εμβαδόν κορυφής (mAU*min)
Πρότυπο 1	0	0
Πρότυπο 2	41,67	18,37
Πρότυπο 3	62,5	32,15
Πρότυπο 4	83,33	48,1
Πρότυπο 5	125	92,89
Πρότυπο 6	166,7	137,31
Πρότυπο 7	333,8	270

«Τρέξαμε» το άγνωστο δείγμα Παρακεταμόλης και ο χρόνος έκλουσης ήταν $t_R = \dots\dots\dots$

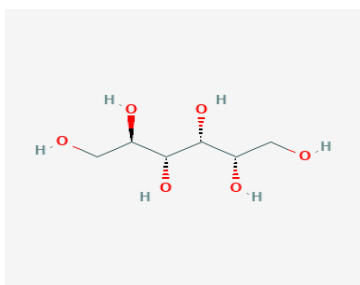
Ολοκλήρωσαμε το εμβαδόν της κορυφής της και ήταν $\dots\dots\dots$ (mAU * min).

Κλείσιμο συστήματος

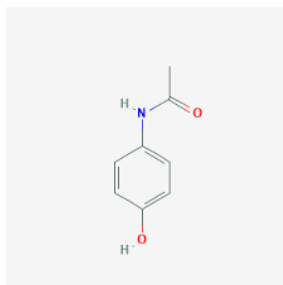
Ξεπλένουμε το σύστημα έγχυσης εγχέοντας μέσω της βαλβίδας τουλάχιστον 5 φορές x 100 mL υπερκάθαρου νερού. Πατάμε το πλήκτρο Flow (τη σταγονίτσα επάνω στο menu) ρυθμίζοντας αρχικά τη σύσταση της κινητής φάσης σε 90% v/v ακετονιτρίλιο:10 v/v % νερό (επί 25 min τουλάχιστον) προκειμένου να πλυθεί η στήλη. Πατάμε στη συνέχεια Stop Flow ((το κόκκινο τετράγωνο επάνω στο menu), οπότε σταματάει η ροή του διαλύτη και αποσυνδέουμε όλα τα συστήματα του HPLC ενεργοποιώντας το disconnect all. ΚΛΕΙΝΟΥΜΕ ΤΟΝ ΔΙΑΚΟΠΤΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΠΡΙΖΟΥ ΤΟΥ HPLC. Απορρίπτουμε πριν φύγουμε όλα τα απόβλητα καταλλήλως.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ - ΑΣΚΗΣΕΙΣ

1. Να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς της παρακεταμόλης.
 2. Με βάση το χρωματογράφημα που λάβατε μπορείτε να αποφανθείτε εάν περιέχεται παρακεταμόλη στα δείγματα που αναλύθηκαν; Πώς θα μπορούσατε να βεβαιωθείτε για την παρουσία παρακεταμόλης;
 3. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, τις μετρήσεις σας και από την καμπύλη αναφοράς που κάνατε να υπολογίσετε τη συγκέντρωση της παρακεταμόλης στο άγνωστο δείγμα σε μg/ml.
- Εάν το δείγμα Α προήλθε μετά από διάλυση 250 mg του αναβράζοντος δισκίου σε τελικό όγκο 500 mL, ποια η % w/w περιεκτικότητα του δισκίου σε παρακεταμόλη.
4. Τα δισκία που αναλύσαμε περιείχε δύο κύριες ουσίες την δραστική παρακεταμόλη και το έκδοχο σορβιτόλη. Με βάση τη δομή των δύο αυτών ουσιών παρακάτω μπορείτε να προβλέψετε και να δικαιολογήσετε τη σχετική σειρά έκλουσης αυτών;



ΣΟΡΒΙΤΟΛΗ



ΠΑΡΑΚΕΤΑΜΟΛΗ

5. Εάν το ίδιο δισκίο το αναλύσετε με χρωματογραφία κανονικής φάσης, πρόκειται να αλλάξει η σχετική σειρά έκλουσης των κορυφών; Δικαιολογήστε.

6. Αλλάζοντας τη σύσταση της κινητής φάσης από 75% v/v MeCN: 25% v/v H₂O σε 56% v/v MeCN: 44% v/v H₂O πως αναμένεται να μεταβληθεί ο χρόνος έκλουσης της κορυφής της παρακεταμόλης; Πως εξηγείται αυτή η μετατόπιση του χρόνου έκλουσης;

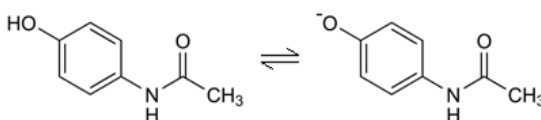
Σημείωση 1

Σε μία χρωματογραφική ανάλυση εφαρμόζονται κυρίως δύο διαφορετικές τεχνικές έκλουσης: η ισοκρατική έκλουση (isocratic elution) και η βαθμιδωτή έκλουση (gradient elution). Στην ισοκρατική έκλουση η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση καθ'όλη τη διάρκεια της ανάλυσης, ενώ στη βαθμιδωτή έκλουση η σύσταση της κινητής φάσης έχει προγραμματιστεί να μεταβάλλεται κατά την ανάλυση είτε γραμμικά (linear gradient), είτε σε διακριτά βήματα (step gradient)

Στην άσκηση μας ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕ ΙΣΟΚΡΑΤΙΚΗ ΕΚΛΟΥΣΗ.

Σημείωση 2

Paracetamol



Θέλουμε να μην είναι ιονισμένη η παρακεταμόλη και να αλληλεπιδρά αποκλειστικά με άπολες αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση (οπότε θα έχουμε μονή και συμμετρική κορυφή με εμφανή κατανομή κατά Gauss).

Αυτό επιτυγχάνεται έχοντας το pH του νερού σε pH 3,5 (οξίνιση με κιτρικό οξύ).

Αλλιώς τότε η κορυφή της θα έχει ουρά ή μπορεί και να εμφανίζεται ακόμα και ως διπλή κορυφή.....(κάτι που εμφανίζεται στην άσκηση μας...διότι δεν οξινίσαμε το pH του νερού).

Αναλύσαμε το μίγμα των ενώσεων A,B και C με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης HPLC και πήραμε το παρακάτω χρωματογράφημα. Αντιστοιχήσετε τις κορυφές με τις χημικές ενώσεις.

