



## ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

3ο - 4ο εξάμηνο



Ομάδα :	Υποομάδα :	Ημερομηνία:
---------	------------	-------------

No	Όνοματεπώνυμο φοιτητή
1	
2	
3	
4	

### Διδάσκοντες

Αικατερίνη Μαρκοπούλου, Αναπλ. Καθηγήτρια Φαρμ. Ανάλυσης  
Κωνσταντίνος Ζαχαρής, Επικ. Καθηγητής Φαρμ. Ανάλυσης

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Φαρμακευτικής

Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης - Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2019-2020

## Πρόλογος

Οι σημειώσεις των εργαστηριακών ασκήσεων Φαρμακευτικής Ανάλυσης αναφέρονται στους φοιτητές του 3<sup>ου</sup> και 4<sup>ου</sup> εξαμήνου του Τμήματος Φαρμακευτικής και αποβλέπουν στην σύντομη ενημέρωση και εξοικείωσή τους με το αντικείμενο. Ο ρόλος της Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης είναι καθοριστικός και έχει συμβάλει στα μέγιστα, τόσο στην έρευνα, όσο και στην εξέλιξη της τεχνολογίας των Φαρμακευτικών Επιστημών.

Η ύλη των σημειώσεων αποτελείται δομικά από το **Εισαγωγικό** και το **Πειραματικό μέρος**. Στην εισαγωγή παρουσιάζονται οι θεωρητικές αρχές τόσο της φασματοφωτομετρίας υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)<sup>1</sup> όσο της χρωματογραφίας υγρού (HPLC), οι οποίες αποτελούν τις βασικές αναλυτικές τεχνικές ενός εργαστηρίου φαρμακευτικής ανάλυσης.

Το πειραματικό μέρος περιλαμβάνει, εν συντομία, το θεωρητικό υπόβαθρο της άσκησης καθώς και την πειραματική διαδικασία, βήμα προς βήμα, όπου ο φοιτητής καλείται να εκτελέσει και να αναγράφει τα αποτελέσματα του πειράματος.

Επιθυμία μας είναι η ύλη των εργαστηριακών ασκήσεων που περιγράφονται εδώ να βοηθήσουν τους φοιτητές μας να κατανοήσουν τις βασικές αρχές της Φαρμακευτικής Ανάλυσης τόσο στη θεωρία όσο και στην πράξη ώστε να μπορούν να ανταποκριθούν επάξια στις ανάγκες ενός Αναλυτικού Εργαστηρίου.

**Οι Διδάσκοντες**

---

<sup>1</sup> Ως κύρια βιβλιογραφική πηγή για τη συγγραφή του θεωρητικού μέρους των σημειώσεων της φασματοφωτομετρίας υπεριώδους-ορατού χρησιμοποιήθηκε το βιβλίο της Φαρμακευτικής Ανάλυσης I (Ιωάννης Κουντουρέλλης, Επίτιμος Καθηγητής Φαρμακευτικής Ανάλυσης)



## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η Φαρμακευτική Ανάλυση είναι ο κλάδος της Φαρμακευτικής Επιστήμης που έχει σαν αντικείμενο έρευνας την ανάπτυξη και εφαρμογή αναλυτικών μεθόδων για το ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων που έχουν θεραπευτικές ή καλλυντικές ιδιότητες.

Τα κυριότερα αντικείμενα μελέτης της είναι:

- Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός καθώς και η ανάλυση της δομής των δραστικών ενώσεων (φαρμακευτικά δραστικές ενώσεις, active pharmaceutical ingredient, API) σε φαρμακευτικά σκευάσματα, βιολογικά δείγματα και δρόγες που αναφέρονται στις διεθνείς φαρμακοποιίες με ενόργανες μεθόδους ανάλυσης.
- Η εκτίμηση της ποιότητας των αμιγών φαρμάκων, των φαρμακευτικών ουσιών, των φαρμακομορφών και καλλυντικών από χημικής πλευράς.
- Η εύρεση και ο προσδιορισμός των φαρμακευτικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους σε βιολογικά δείγματα.
- Οι διαδικασίες απομόνωσης των δραστικών ενώσεων από φυσικά προϊόντα.
- Η ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων που διασφαλίζουν την ποιότητα των φαρμακευτικών σκευασμάτων π.χ. έλεγχος της παρουσίας προσμίξεων (impurities), των οποίων οι συγκεντρώσεις θα πρέπει να βρίσκονται κάτω από το επιτρεπτό όριο όπως ορίζονται από την εκάστοτε νομοθεσία.
- Η συσχέτιση χημικής δομής και φάσματος με σκοπό την ταυτοποίηση του φαρμάκου.
- Ο έλεγχος ομοιομορφίας περιεκτικότητας (content/dosage uniformity) της δραστικής ουσίας σε κάθε φαρμακευτικό σκεύασμα.

Σχεδόν κάθε φυσικοχημική ιδιότητα ενός χημικού συστατικού (στοιχείου, ιόντος ή ενώσεως), της οποίας το μέγεθος είναι συνάρτηση της μάζας ή της συγκέντρωσης του συστατικού αυτού, μπορεί ν' αποτελέσει τη βάση μιας τεχνικής προσδιορισμού του. Όλες λοιπόν οι αναλυτικές τεχνικές συσχετίζουν τη μέτρηση μιας φυσικής ιδιότητας ή παραμέτρου με τη συγκέντρωση (ποσότητα) του προσδιοριζόμενου συστατικού.

Θεωρητικά και κυρίως για ιστορικούς λόγους η Φαρμακευτική Ανάλυση μπορεί να διαχωριστεί σε δύο κλάδους. Στις κλασικές (σταθμικές και ογκομετρικές) και στις ενόργανες τεχνικές που ονομάζονται και φυσικοχημικές. Η ενόργανη χημική ανάλυση διαφέρει από τη κλασική στο τρόπο υπολογισμού της ποσότητας μιας δραστικής ουσίας. Έτσι, στις ενόργανες μεθόδους ανάλυσης, η ποσότητα της ένωσης υπολογίζεται με βάση τη μέτρηση μιας φυσικοχημικής της ιδιότητας, ενώ στις κλασικές μεθόδους ο προσδιορισμός της γίνεται συνήθως με βάση τη μάζας. Οι σπουδαιότερες Ενόργανες τεχνικές ανάλυσης αναφέρονται στον Πίνακα 1, και ταξινομούνται σύμφωνα με το μετρούμενο μέγεθος.

Παρόλο που οι ενόργανες μέθοδοι ανάλυσης υπερτερούν στην ευαισθησία, ταχύτητα, τη δυνατότητα χρήσης μικροποσοτήτων ή τη δυνατότητα επαναπόκτησης των δειγμάτων, παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα όπως:

- Απαιτούνται ακόμα πρότυπα διαλύματα για τη βαθμονόμηση των οργάνων ή για την κατασκευή καμπύλων αναφοράς εφόσον πρόκειται να κάνουμε ποσοτικούς προσδιορισμούς.
- Υστερούν ως προς την ακρίβεια.
- Το κόστος των οργάνων είναι αρκετά υψηλό
- Απαιτείται συνεχής συντήρηση των οργάνων

## ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΕΝΟΡΓΑΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

ΤΕΧΝΙΚΗ	ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗ ΦΥΣΙΚΗ ΙΔΙΟΤΗΤΑ
<b>Οπτικές τεχνικές</b>	
Φλογοφωτομετρία	εκπεμπόμενη ακτινοβολία
Φθορισμομετρία (ακτινών-Χ, υπεριώδους, ορατού)	εκπεμπόμενη ακτινοβολία
Φασματοφωτομετρία απορρόφησης υπεριώδους	απορροφούμενη ακτινοβολία
Φασματοφωτομετρία απορρόφησης ορατού	απορροφούμενη ακτινοβολία
Φασματοφωτομετρία απορρόφησης υπερύθρου	απορροφούμενη ακτινοβολία
Φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης	απορροφούμενη ακτινοβολία
Φασματοφωτομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού	απορροφούμενη ακτινοβολία
Φασματοσκοπία Raman	σκεδαζόμενη ακτινοβολία
Θολωσιμετρία	σκεδαζόμενη ακτινοβολία
Νεφελομετρία	σκεδαζόμενη ακτινοβολία
Πολωσιμετρία	στροφή επιπέδου πολωμένου φωτός
Διαθλασιμετρία	δείκτης διάθλασης
<b>Ηλεκτροχημικές τεχνικές</b>	
Ποτενσιομετρία	δυναμικό
Κουλομετρία	ηλεκτρικό φορτίο
Πολαρογραφία	ένταση ρεύματος
Αμπερομετρία	ένταση ρεύματος
Αγωγιμομετρία	αγωγιμότητα
<b>Ραδιοχημικές τεχνικές</b>	
Ραδιοχημική ανάλυση με ενεργοποίηση και ισοτοπικής αραίωσης	εκπεμπόμενη ακτινοβολία α, β, γ
<b>Διάφορες τεχνικές</b>	
Φασματοσκοπία μαζών	λόγος μάζας προς φορτίο

## 2. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ (UV-Vis)

### 2.1 Η φύση της ακτινοβολούμενης ενέργειας

Το ορατό φως είναι μια μορφή ενέργειας που περιγράφεται αρχικά με δύο θεωρίες. Τη θεωρία των κυμάτων (wave theory) και εκείνη των σωματιδίων (corpuscular theory). Με καμία όμως θεωρία δεν μπόρεσαν να εξηγηθούν όλες οι ιδιότητες του φωτός επειδή μερικά φαινόμενα γίνονταν κατανοητά με τη μία ή την άλλη θεωρία. Μόλις το 1900 με τη θεωρία της κβαντομηχανικής (quantum theory) εξηγήθηκαν πλήρως ορισμένα φαινόμενα. Με τη θεωρία αυτή δεχόμαστε πως η υλική ενέργεια μπορεί να μετατρέπεται σε ενέργεια ακτινοβολίας μόνο κατά στοιχειώδη ποσά ορισμένου μεγέθους ή «κατά κβαντικές μονάδες».

Οι μονάδες αυτές που χαρακτηρίζονται με τον όρο κβάντα ή φωτόνια καθώς επίσης και οι μονάδες της ακτινοβολούμενης ενέργειας μπορούν να έχουν συγχρόνως ιδιότητες κυμάτων και σωματιδίων. Πάντως οι θεμελιώδεις νόμοι της κβαντομηχανικής, βάσει των οποίων περιγράφονται οι διάφορες ακτινοβολίες είναι νόμοι πιθανοτήτων και όχι νόμοι βεβαιότητας.

Αν υποθέσουμε πως η διάδοση του φωτός πραγματοποιείται υπό μορφή κυμάτων, τα δυο πεδία που δημιουργούνται, το ηλεκτρικό και το μαγνητικό διαδίδονται σε επίπεδα τα οποία είναι κάθετα μεταξύ τους. Έτσι προκύπτει ο όρος **ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία**. Το ορατό φως αποτελεί μόνο ένα μικρό μέρος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, το οποίο εκτείνεται από την περιοχή των κοσμικών ακτίνων μέχρι την περιοχή των ραδιοκυμάτων.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με ευρεία εφαρμογή στη Φαρμακευτική Ανάλυση είναι η εξής:

- **Ακτίνες Χ (X-ray)** ( $\nu = 10^{17}$  Hz),
- **Υπεριώδης (Ultraviolet, UV)** ( $\nu = 10^{15}$  Hz)
- **Ορατή (Visible, Vis)** ( $\nu = 10^{14}$  Hz)
- **Υπέρυθρη (Infrared, IR)** ( $\nu = 10^{13}$  Hz)
- **Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (nuclear magnetic resonance, NMR)** ( $\nu=10^7$  Hz).

$\lambda$ (m)	$\nu$ (Hz)	Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία
$10^{-7}$	$10^{15}$	Υπεριώδη
$10^{-6}$	$10^{14}$	Ορατή
$10^{-5}$	$10^{13}$	Υπέρυθρη

Τα επιμέρους χρώματα του ορατού φωτός αντιστοιχούν σε ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες ενός ορισμένου μήκους κύματος. Έτσι το φως της ημέρας είναι δέσμες ακτινοβολιών διαφορετικού μήκους κύματος. Μια δέσμη ακτινοβολίας ενός ορισμένου μήκους κύματος καλείται **μονοχρωματική** και απομονώνεται με τη βοήθεια πρίσματος.

Γενικά, μια κύμανση μπορεί να χαρακτηριστεί με τρία διαφορετικά μεγέθη όπως:

- το **μήκος κύματος ( $\lambda$ )**, το οποίο αντιστοιχεί στην απόσταση (παράλληλη με τη διάδοση του κύματος) μεταξύ δύο διαδοχικών κορυφών του κύματος.
- ο **αριθμός κύματος ( $\bar{\nu}$ )**, ο οποίος αναφέρεται σε πόσα μήκη κύματος αντιστοιχούν σε ένα εκατοστό (cm) δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu \cdot n}{c}$$

όπου  $\nu$  = συχνότητα,  
 $n$  = δείκτης διάθλασης  
 $c$  = ταχύτητα του φωτός στο κενό

- η **συχνότητα ( $\nu$ )** η οποία αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυμάτων (wavelength units) που διέρχεται από ένα δεδομένο σημείο στη μονάδα του χρόνου (sec). Οι μονάδες μέτρησης της συχνότητας  $\nu$  είναι κύκλοι ανά δευτερόλεπτο (cps ή Hertz, Hz). Η συχνότητα  $\nu$  μπορεί επίσης να εκφραστεί και από την εξίσωση:

$$\nu = \frac{c}{\lambda \cdot n}$$

όπου  $c$  = ταχύτητα του φωτός στο κενό,  
 $n$  = δείκτης διάθλασης  
 $\lambda$  = μήκος κύματος

Η ταχύτητα του φωτός  $c$  στο κενό ισούται με  $c = 2,977 \times 10^{10}$  cm/sec, ενώ ο δείκτης διάθλασης στο κενό είναι ίσος με τη μονάδα ( $n = 1$ ). Με βάση την παραπάνω εξίσωση, η συχνότητα  $\nu$  εκφράζει τον αριθμό μηκών κύματος που αντιστοιχεί σε μια απόσταση  $2,977 \times 10^8$  m. Επίσης, όπως προκύπτει από την παραπάνω εξίσωση η ταχύτητα του φωτός ή οποιαδήποτε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία εξαρτάται από το μέσο διάδοσής της. Καθώς η ακτινοβολία διαπερνά το μέσο η συχνότητά της παραμένει σταθερή, ενώ αντίθετα μεταβάλλεται το μήκος κύματος της.

Για να κατανοήσουμε πως μια ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αντιδρά με την ύλη, είναι ανάγκη να αναφερθούμε και στη σωματιδιακή φύση της ακτινοβολίας. Τα σωματίδια του φωτός που καλούνται **φωτόνια** περιέχουν ενέργεια. Η ποσότητα της ενέργειας που περιέχει κάθε φωτόνιο είναι ανάλογη της συχνότητας της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Η παρακάτω εξίσωση δίνει τη μαθηματική σχέση μεταξύ ενέργειας και συχνότητας.

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda \cdot n}$$

όπου  $h$  = σταθερά του Planck ( $6,624 \times 10^{-27}$  erg/sec ή  $6.624 \times 10^{-34}$  J/sec)  
 $E$  = η ενέργεια της ακτινοβολίας (erg, joules, cal)  
 $\nu$  = η συχνότητα της ακτινοβολίας (Hz)  
 $c$  = η ταχύτητα του φωτός  
 $\lambda$  = μήκος κύματος της ακτινοβολίας

Είναι σημαντικό να προσέξουμε είναι ότι, όπως προκύπτει από τις παραπάνω εξισώσεις, **αύξηση της ενέργειας ανά φωτόνιο συνεπάγεται αύξηση της τιμής της συχνότητας, οπότε έχουμε ελάττωση της τιμής του μήκους κύματος**. Από την άλλη πλευρά, **ελάττωση της ενέργειας ανά φωτόνιο συνεπάγεται ελάττωση της τιμής της συχνότητας, άρα αύξηση στην τιμή του μήκους κύματος**. Δηλαδή, ένα φωτόνιο με μεγάλη συχνότητα (και κατ' ανάγκη με μικρό μήκος κύματος) περιέχει περισσότερη ενέργεια συγκριτικά με ένα άλλο φωτόνιο που έχει μικρή συχνότητα και μεγάλο μήκος κύματος.

Επίσης, διευκρινίζεται ότι η ένταση μιας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας είναι ανάλογη του αριθμού των φωτονίων που περιέχει και ανεξάρτητη από την ενέργεια κάθε φωτονίου.

## 2.2 Ενέργεια Ηλεκτρομαγνητικής Ακτινοβολίας, φάσματα υπεριώδους – ορατού (UV-VIS)

Όταν μια ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία προσπέσει σε μια ένωση τότε μέρος της ενέργειας που περικλείει μεταβιβάζεται στην ένωση. Ως συνέπεια αυτού, μεγάλος αριθμός ατόμων ή μορίων μεταβαίνουν από τη **βασική** κατάσταση στη **διεγερμένη**. Σύμφωνα με την κβαντομηχανική θεωρία, η διεγερμένη κατάσταση ενός ατόμου ή μορίου ορίζεται επακριβώς, συνεπώς και η ποσότητα ενέργειας που προσλαμβάνεται είναι καθορισμένη. Το ποσό της ενέργειας παρέχεται από φωτόνια ορισμένου μήκους κύματος  $\lambda$ , οπότε η τιμή αυτή είναι χαρακτηριστική για κάθε ουσία. Σύμφωνα με τα παραπάνω προκύπτει η εξίσωση:



όπου  $M$  = δέκτης ενέργειας, και  $M^*$  = δέκτης στη διεγερμένη κατάσταση

Οι μονοατομικές ενώσεις που συνήθως βρίσκονται σε αέρια κατάσταση μεταβαίνουν από τη βασική στη διεγερμένη κατάσταση με μεταπήδηση των ηλεκτρονίων από τη μία στοιβάδα σε άλλη, με δαπάνη ενέργειας της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Στην περίπτωση όμως των μορίων, δε συμβαίνουν μόνο ηλεκτρονικές διεγέρσεις. Και αυτό διότι οι ηλεκτρονικές διεγέρσεις που καταγράφονται στα φάσματα απορρόφησης, συνοδεύονται από επί μέρους διεγέρσεις δόνησης και περιστροφής. Όλες αυτές τις διεγέρσεις ανεξάρτητα από το είδος τους είναι κβαντισμένες. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι η απορρόφηση ενέργειας από ένα μόριο είναι πολυπλοκότερο φαινόμενο απ' ότι η απορρόφηση ενέργειας από ένα άτομο.

Συνεπώς, τα φάσματα απορρόφησης των μορίων ή μοριακών ιόντων είναι φάσματα ταινιών, γιατί πολλές διεγέρσεις ευρισκόμενες ενεργειακά πολύ κοντά, μαζί με διάφορες επιδράσεις του διαλύτη αλληλοκαλύπτονται. Συνεπώς δεν είναι δυνατόν να ξεχωρίσουν οι διεγέρσεις και να δώσουν γραμμικό φάσμα.

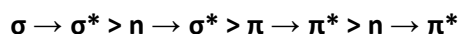
Είναι γνωστό ότι ο αριθμός των ηλεκτρονίων σε κάθε στοιβάδα είναι απόλυτα καθορισμένος. Η πιθανή θέση του ηλεκτρονίου στην τροχιά του περιγράφεται με μαθηματικές εξισώσεις που ονομάζονται τροχιακά. Στα φαρμακευτικά μόρια και εν γένει στις οργανικές ενώσεις υπάρχουν τέσσερα είδη ηλεκτρονίων.

- Ηλεκτρόνια που βρίσκονται στις εσωτερικές στιβάδες και απαιτούν μεγάλα ποσά ενέργειας για να μεταπηδήσουν σε τροχιά μεγαλύτερης ενέργειας. Επομένως δεν απορροφούν στην περιοχή υπεριώδους – ορατού.



- Ηλεκτρόνια που συμμετέχουν σε  $\sigma$  δεσμούς. Αυτά απαιτούν ικανό ποσό ενέργειας για να μεταβούν στη διεγερμένη κατάσταση  $\sigma^*$  και απορροφούν στην περιοχή του άπω υπεριώδους.
- Ηλεκτρόνια  $\pi$  που συμμετέχουν σε διπλούς ή τριπλούς δεσμούς και απορροφούν στην περιοχή υπεριώδους-ορατού.
- Ηλεκτρόνια  $n$  του μονήρους ζεύγους που βρίσκονται στην εξωτερική στιβάδα. Μεταβαίνουν στη διεγερμένη κατάσταση  $\pi^*$  και απορροφούν στην περιοχή του υπεριώδους.

Στη Φασματοφωτομετρία υπεριώδους ενδιαφέρον έχουν οι διεγέρσεις των  $\pi$  και  $n$  ηλεκτρονίων. Οι ηλεκτρονιακές διεγέρσεις που γίνονται με την απορρόφηση ακτινοβολίας, δίνονται με τη σειρά της μεγαλύτερης προς τη μικρότερη απαιτούμενη ενέργεια για την πραγματοποίησή τους.



Οι διεγέρσεις  $n \rightarrow \pi^*$  απαιτούν μικρότερη ενέργεια από εκείνη που απαιτείται για τη διέγερση  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ , οπότε και η διέγερση  $n \rightarrow \pi^*$  προκαλείται από απορρόφηση ακτινοβολίας μικρότερης συχνότητας ή μεγαλύτερου μήκους κύματος. Η μετάπτωση  $\pi \rightarrow \pi^*$  γίνεται από ενώσεις που έχουν  $\pi$ -δεσμό. Η ισχύς αυτού του δεσμού είναι μικρότερη του  $\sigma$  δεσμού, γι' αυτό και το αιθυλένιο απορροφά σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με το αιθάνιο (160 και 140 nm αντίστοιχα). Η μετάπτωση  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  γίνεται στις ενώσεις που έχουν μόνο  $\sigma$  μοριακά τροχιακά, όπως είναι οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες. Οι μεταπτώσεις  $n \rightarrow \pi^*$  και  $\eta \rightarrow \sigma^*$  οφείλονται στην ανύψωση ενός  $\eta$  αδεσμικού ηλεκτρονίου στο αντιδεσμικό  $\pi^*$  ή  $\sigma^*$  τροχιακό. Η πρώτη διέγερση εμφανίζεται στα 280 nm και έχει ασθενή ένταση.

Τα φάσματα UV-Vis είναι ιδιαίτερα σημαντικά στη μελέτη της δομής των οργανικών ενώσεων, ιδιαίτερα αν λάβουμε υπόψη μας ότι κατάλληλοι δομικοί συσχετισμοί τέτοιων στοιχείων σε ένα μόριο, επηρεάζουν την ενεργειακή του κατάσταση και προκαλούν χαρακτηριστικές απορροφήσεις. Για παράδειγμα, σε συζυγικά συστήματα όπως  $C=C-C=C$  ή  $C=C-C=O$  η απορρόφηση  $\pi \rightarrow \pi^*$  μετατοπίζεται προς μεγαλύτερη μήκη κύματος σε σύγκριση με την απορρόφηση ακόρεστων μη συζυγικών συστημάτων με το ίδιο πλήθος πολλαπλών δεσμών. Η αύξηση της συζυγίας, μετατοπίζει το μέγιστο της απορρόφησης προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, λόγω περισσότερων δομών συντονισμού.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για τη λήψη φασμάτων UV-Vis δεν πρέπει να απορροφούν στην περιοχή υπεριώδους διότι θα παρεμβάλλουν στο φάσμα απορρόφησης της μελετούμενης ένωσης.

### 2.3 Ορολογία

Οι περισσότερες φαρμακευτικές ενώσεις δίνουν απορροφήσεις στην περιοχή του υπεριώδους ορατού επειδή περιέχουν χαρακτηριστικές ομάδες στο μόριό τους. Η μέγιστη απορρόφηση ενός μορίου που αναφέρεται σε ορισμένο μήκος κύματος ( $\lambda_{max}$ ) καθώς και το σχήμα της ταινίας απορρόφησης μερικές φορές είναι χαρακτηριστικά μιας συγκεκριμένης ομάδας. Έτσι στη φασματοσκοπία χρησιμοποιείται ειδική ορολογία για να περιγράψουν τα χαρακτηριστικά του φάσματος σε σχέση με συγκεκριμένες χημικές ομάδες εντός του μορίου που καλούνται χρωμοφόρες.

**Χρωμοφόρα ομάδα:** είναι μια χημική ομάδα που είναι υπεύθυνη για την απορρόφηση μιας ουσίας στην περιοχή υπεριώδους ορατού. Συνήθως, η ομάδα αυτή περιέχει τουλάχιστον έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς π.χ. φαινυλική.

- **Αυξόχρωμη ομάδα:** αυξόχρωμη είναι μια χημική ομάδα που μόνη της δεν έχει μεγάλη ένταση απορρόφησης αλλά όταν βρίσκεται κοντά σε μια χρωμοφόρο ομάδα ή η μέγιστη απορρόφηση ( $\lambda_{\max}$ ) μετατοπίζεται σε μεγαλύτερη μήκη κύματος ή αυξάνει η ένταση απορρόφησης ή συμβαίνουν και οι δύο προαναφερθείσες περιπτώσεις π.χ. υδροξυλικές αμινικές ομάδες όταν είναι υποκατάστατες σε φαινυλική μερίδα.
- **Βαθυχρωμία:** χαρακτηρίζεται το φαινόμενο κατά το οποίο μια ταινία απορρόφησης μετατοπίζεται σε μεγαλύτερη μήκη κύματος. Βαθυχρωμία συνήθως παρατηρείται όταν προστίθενται και άλλες αυξόχρωμες ομάδες στο μόριο της μελετούμενης ένωσης ή όταν χρησιμοποιείται διαφορετικός διαλύτης ο οποίος αλληλεπιδρά με το μόριό της αλλάζοντας την πολικότητα και κατ' επέκταση τις δομές συντονισμού της. Η βαθυχρωμία ονομάζεται και κόκκινη μετατόπιση επειδή το  $\lambda_{\max}$  μετατοπίζεται προς την περιοχή του υπέρυθρου στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.
- **Υψιχρωμία:** καλείται η μετατόπιση της απορρόφησης προς μικρότερα μήκη κύματος. Συνήθως, οφείλεται στις επιδράσεις του διαλύτη. Η υψιχρωμία ονομάζεται και μπλε μετατόπιση.
- **Υπερχρωμισμός:** είναι η αύξηση της έντασης απορρόφησης, δηλαδή η αύξηση της τιμής του  $E_{\max}$  ή  $A^1_1$ .
- **Υποχρωμισμός:** είναι η ελάττωση της έντασης απορρόφησης, δηλαδή η ελάττωση της τιμής του  $E_{\max}$  ή  $A^1_1$ .

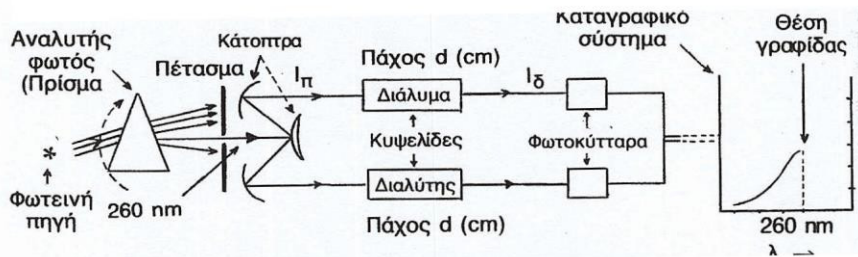
## 2.4 Οργανολογία Φασματοφωτομετρίας Υπεριώδους-ορατού

Για τη λήψη φάσματος υπεριώδους ορατού χρησιμοποιούνται ειδικά όργανα: τα φασματοφωτόμετρα και τα φωτόμετρα.

Στα φασματοφωτόμετρα (συνήθως διπλής δέσμης) η ουσία με μορφή διαλύματος σε κατάλληλο διαλύτη τοποθετείται σε κυψελίδα καθορισμένου πάχους (συνήθως 1 cm), ενώ σε μια άλλη κυψελίδα τοποθετείται μόνο διαλύτης. Κατάλληλη φωτεινή πηγή (λυχνία Hg ή δευτερίου D<sub>2</sub> για την περιοχή υπεριώδους και λυχνία βολφραμίου W για την περιοχή του ορατού) στέλνει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σε πρίσμα ή περιθλαστικό φράγμα, το οποίο την αναλύει σε μονοχρωματικές δέσμες. Διάφραγμα με λεπτή σχισμή (μονοχρωμάτορας) παρεμβάλλεται κατάλληλα και επιτρέπει τη διέλευση μια μόνο μονοχρωματικής δέσμης, η οποία ανακλάται σε κυρτό κάτοπτρο προς δύο ισοδύναμες δέσμες. Αυτές ανακλώμενες κατάλληλα διέρχονται από τις δύο κυψελίδες και στη συνέχεια με κατάλληλα φωτοκύτταρα προσδιορίζεται η έντασή τους. Όταν απορροφά μόνο ο διαλύτης, οι δύο δέσμες διέρχονται από τις δύο κυψελίδες με την ίδια ένταση και συνεπώς καταγράφεται μηδενική απορρόφηση στο αντίστοιχο μήκος κύματος. Όταν αρχίζει να απορροφά και η ουσία, η δέσμη που διέρχεται από το διάλυμα έχει μικρότερη ένταση και αποτυπώνεται η αντίστοιχη απορρόφηση.

Για τη λήψη φάσματος, το πρίσμα περιστρέφεται ισοσταχώς ως προς καθορισμένο άξονα, με συνέπεια να κατευθύνονται, προς τη σχισμή του πετάσματος, μονοχρωματικές δέσμες με διαρκώς μεταβαλλόμενο μήκος κύματος. Έτσι αποτυπώνεται σε κατάλληλα βαθμολογημένο χαρτί ή σε ηλεκτρονικό υπολογιστή το μήκος

κύματος με την αντίστοιχη απορρόφηση. Παρακάτω δίνεται σχηματικά η διάταξη ενός φασματοφωτομέτρου διπλής δέσμης:



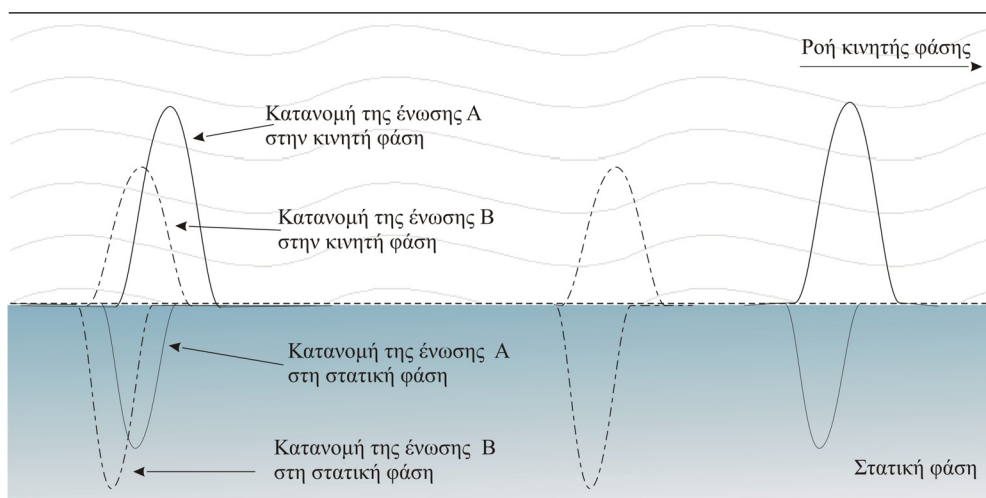
### Διάταξη φασματοφωτόμετρου UV-Vis

Σχήμα 1. Διάταξη φασματοφωτομέτρου

## 3. Χρωματογραφία υγρού υψηλής πίεσης (HPLC)

### 3.1 Γενικά για τη Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία αποτελεί, ενδεχομένως, τη μοναδική αναλυτική τεχνική, η οποία αναπτύχθηκε στις αρχές του προηγούμενου αιώνα (από το Ρώσο βοτανολόγο M. Tswett το 1903) και η οποία χρησιμοποιείται έως και σήμερα σ' ένα τόσο ευρύ πεδίο εφαρμογών. Βασίζεται στο διαχωρισμό που επιτυγχάνεται, λόγω της διαφορετικής αλληλεπίδρασης των ενώσεων ενός μίγματος, με δυο μη αναμειγνυόμενες φάσεις (**στατική** και **κινητή** φάση).



Σχήμα 2. Διαχωρισμός μίγματος των ενώσεων A και B.

Στο παραπάνω σχήμα απεικονίζεται ο διαχωρισμός μίγματος δυο ενώσεων A και B. Οι καμπύλες δηλώνουν την κατανομή τύπου Gauss των μορίων της ένωσης A και B ανάμεσα στη στατική και στην κινητή φάση (θεωρία πλακών). Οι ελκτικές δυνάμεις αλληλεπίδρασης των μορίων της ένωσης B με τη στατική φάση είναι μεγαλύτερες

από εκείνες με την κινητή φάση. Επομένως, η ένωση Β συγκρατείται πιο ισχυρά στη στατική φάση και εκλύεται από τη στήλη σε μεγαλύτερο χρόνο. Το αντίθετο συμβαίνει με τα μόρια της ένωσης Α τα οποία αλληλεπιδρούν ελκτικά σε μικρότερο βαθμό με τη στατική φάση και εξέρχονται από τη χρωματογραφική στήλη σε μικρότερο χρόνο. Στην ουσία επιτυγχάνεται διαφορετική κατανομή των προσδιοριζόμενων συστατικών μεταξύ των δύο φάσεων και βασίζεται στις διαφορές που υπάρχουν σε ορισμένες ιδιότητες των συστατικών αυτών όπως είναι η λιποφιλικότητα, η πολικότητα, το ηλεκτρικό φορτίο (για τυχόν φορτισμένες ενώσεις) και το μέγεθος των μορίων. Οι δυνάμεις αυτές μπορεί να είναι δυνάμεις van der Waals, διπολικές έλξεις, δεσμοί υδρογόνου, ηλεκτροστατικοί δεσμοί ή και ομοιοπολικοί δεσμοί.

Ο **συντελεστής κατανομής** υπολογίζεται με τον λόγο  $K = \frac{C_S}{C_M}$ , όπου  $C_S$  και  $C_M$  είναι οι συγκεντρώσεις της ουσίας στην στατική και στην κινητή φάση, αντίστοιχα.

Η τεχνική της χρωματογραφίας ταξινομείται στην **αέρια**, **υγρή** και χρωματογραφία **υπερκρίσιμου ρευστού**, ανάλογα με τη φυσική κατάσταση της κινητής φάσης (αέριο, υγρό ή υπερκρίσιμο ρευστό). Η πιο ευρέως διαδεδομένη τεχνική που χρησιμοποιείται στην Φαρμακευτική Ανάλυση είναι η **χρωματογραφία υγρού** (liquid chromatography, LC).

Με κριτήριο το μηχανισμό διαχωρισμού, οι χρωματογραφικές τεχνικές διακρίνονται στη:

- χρωματογραφία **προσρόφησης** (adsorption chromatography)
- χρωματογραφία **κατανομής** (partition chromatography)
- χρωματογραφία **ιονανταλλαγής** (ion-exchange chromatography)
- χρωματογραφία **αποκλεισμού μεγέθους** (size exclusion chromatography)
- χρωματογραφία **συγγενείας** (affinity chromatography)

Η χρωματογραφία υγρού υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) ή υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), όπως χαρακτηρίζεται πολλές φορές, αποτελεί σήμερα μια από τις πιο διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού με πλήθος εφαρμογών σε διάφορες επιστήμες. Η δημοτικότητα της οφείλεται κυρίως στην ευαισθησία της, στην εύκολη προσαρμογή σε ποσοτικούς προσδιορισμούς, στην καταλληλότητά της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων ενώσεων αλλά και την εύκολη προσαρμοστικότητά της σε προσδιορισμούς ενώσεων διαφόρων μεγεθών από ξεκινούν από τα κατιόντα/ανιόντα και φτάνουν μέχρι πεπτίδια και πρωτεΐνες. Λόγω αυτού, βρίσκει ιδιαίτερη εφαρμογή σε πολλούς τομείς διαφόρων επιστημών, όπως η φαρμακευτική, ιατρική, περιβάλλον, τρόφιμα, κα.

### 3.2 Οργανολογία

Η βασική **οργανολογία** ενός αναλυτικού συστήματος HPLC εικονίζεται στο παρακάτω σχήμα και περιλαμβάνει τα εξής κύρια τμήματα:

- **Περιέκτης διαλυτών της κινητής φάσης**

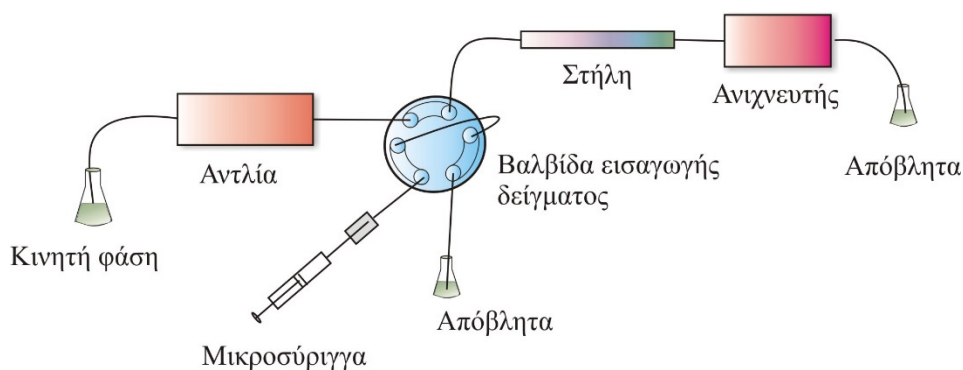
Οι περιέκτες (συνήθως γυάλινοι) χρησιμοποιούνται για την αποθήκευση της κινητής φάσης. Συχνά σε

αυτούς προσαρμόζονται διάφορες διατάξεις για την απομάκρυνση των διαλυμένων αερίων (συνήθως  $O_2$ ,  $N_2$ ) που βρίσκονται στην κινητή φάση προς αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων στο σύστημα ροής (στήλη, ανιχνευτή κτλ). Βέβαια, στις σύγχρονες HPLC διατάξεις, η απαέρωση της κινητής φάσης γίνεται σε εν-ροή συνθήκες με χρήση αυτόματων απαερωτών κενού (on-line degasser) οι οποίοι παρεμβάλλονται μεταξύ των περιεκτών και της αντλίας. Μια από τις προϋποθέσεις της κινητής φάσης είναι ότι θα πρέπει να είναι διηθημένη με κενό, μέσω μικροπορώδους φίλτρου, διαδικασία η οποία απομακρύνει αιωρούμενα σωματίδια και αέρια.

➤ **Αντλία υψηλής πίεσης (high pressure pump)**

Ο ρόλος της αντλίας υψηλής πίεσης είναι να εξασφαλίζει για συνεχή ροή της κινητής φάσης προς την αναλυτική στήλη χωρίς παλμούς ροής. Ο συνηθέστερος τύπος είναι οι παλινδρομικές αντλίες (reciprocating pumps) οι οποίες περιλαμβάνουν δυο μηχανικά έμβολα τα οποία κινούνται παλινδρομικά, ενώ η αντοχή τους στην ανάπτυξη πιέσεων είναι συνήθως 400 bar. Βέβαια, τα τελευταία χρόνια διατίθενται στο εμπόριο και αντλίες υπερυψηλής πίεσης οι οποίες υποστηρίζουν πιέσεις μέχρι 1000 bar. Οι αντλίες παρέχουν τη δυνατότητα επιλογής της **ταχύτητας ροής** (volumetric flow rate,  $mL\ min^{-1}$ ) της κινητής φάσης, η οποία κυμαίνεται συνήθως από 0.1 έως 10  $mL\ min^{-1}$ . Επίσης, είναι εξοπλισμένες με μανόμετρο για τον έλεγχο της πίεσης.

Σημαντική λειτουργία της αντλίας είναι ότι, παρέχει τη δυνατότητα της προγραμματισμένης ανάμιξης, δυο έως τεσσάρων κινητών φάσεων (διαφορετικής σύστασης), κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού (gradient elution) όπου επιτυγχάνεται αλλαγή των ιδιοτήτων της κινητής φάσης (π.χ. πολικότητα). Σκοπός αυτού είναι αφενός η αύξηση της απόδοσης διαχωρισμού και αφετέρου η ελάττωση του χρόνου ανάλυσης. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι οι κινητές φάσεις που θα χρησιμοποιηθούν να αναμιγνύονται πλήρως μεταξύ τους σε όλες τις αναλογίες.

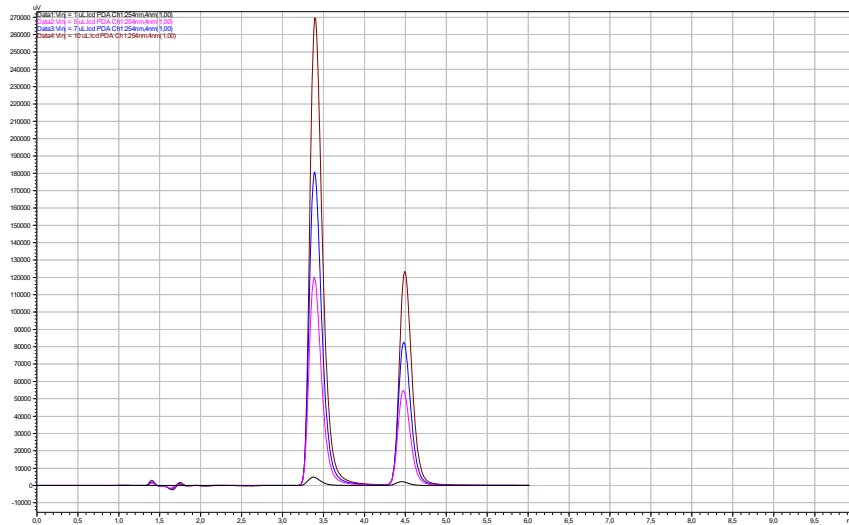


**Σχήμα 3.** Τυπική διάταξη ενός συστήματος χρωματογραφίας υγρού

➤ **Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος (injection valve)**

Η εισαγωγή του, προς ανάλυση, δείγματος επιτυγχάνεται μέσω της βαλβίδας εισαγωγής του δείγματος ή βαλβίδας έγχυσης (injection valve). Η εισαγωγή του υγρού δείγματος μπορεί να γίνει από τον αναλυτή

με τη βοήθεια μικροσύριγγας, ενώ στις πλήρως αυτοματοποιημένες διατάξεις, η βαλβίδα αυτή αποτελεί τμήμα του αυτόματου δειγματολήπτη. Βασικό πλεονέκτημα της έγχυσης του δείγματος μέσω βαλβίδας είναι δεν διακόπτεται η ροή της κινητής φάσης κατά την εισαγωγή του δείγματος. Ο εγχυόμενος όγκος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μέγεθος της στήλης και συνήθως κυμαίνεται από 1 έως και 200  $\mu\text{L}$ . Είναι προφανές ότι ένταση των λαμβανόμενων σημάτων είναι αναλογική του εγχυόμενου όγκου, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



**Σχήμα 4.** Μελέτη του εγχυόμενου όγκου ( $V_{inj} = 1, 5, 7$  και  $10 \mu\text{L}$ ) στη χρωματογραφία υγρού

Όπως και στην περίπτωση της κινητής φάσης, το δείγμα θα πρέπει να είναι απαλλαγμένο από αιωρούμενα σωματίδια και γι' αυτό συνήθως διηθείται με τη βοήθεια μικροπορώδους φίλτρου.

#### ➤ **Αναλυτική Στήλη (analytical column)**

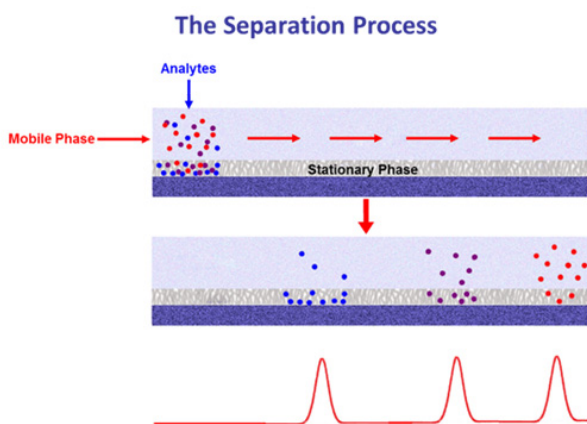
Η αναλυτική στήλη περιέχει τη στατική φάση στην οποία πραγματοποιούνται οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί. Πρόκειται για ένα σωλήνα λεπτής διαμέτρου, συνήθως από ανοξείδωτο χάλυβα, με μήκος από 5 έως 30 cm. Η εσωτερική διάμετρος κυμαίνεται, ως επί το πλείστον, από 2.1 έως 10 mm ενώ το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης από 1.7 έως 10  $\mu\text{m}$ . Η πλειοψηφία των HPLC εφαρμογών, απαιτεί αυστηρό έλεγχο της θερμοκρασίας της στήλης. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται θερμοστάτες στηλών (column oven) οι οποίοι παρέχουν τη δυνατότητα θερμοστάτισης από 4 έως 80  $^{\circ}\text{C}$ .

#### ➤ **Ανιχνευτής (detector)**

Ο ανιχνευτής αποτελεί το τελευταίο, κατά σειρά, τμήμα στο οποίο επιτυγχάνεται η ανίχνευση των προσδιοριζόμενων ενώσεων μετά το διαχωρισμό τους. Η πλειοψηφία των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία υγρού περιλαμβάνει κυψελίδα συνεχούς ροής μέσα από την οποία διέρχεται η κινητή φάση. Η επιλογή του είδους ανίχνευσης εξαρτάται κυρίως από τις ιδιότητες των ενώσεων, την επιθυμητή ευαισθησία και την εκλεκτικότητα του προσδιορισμού. Οι κυριότεροι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην συγκεκριμένη τεχνική είναι:

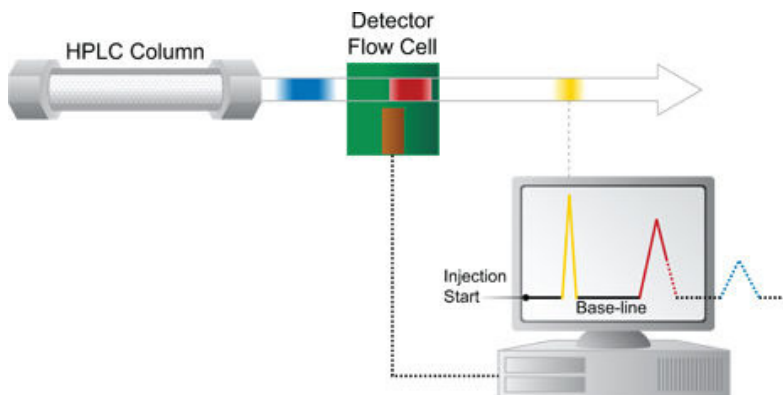
- ✓ φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού (UV-Vis spectrophotometric detector)
- ✓ φθορισμομετρικός ανιχνευτής (fluorescence detector)
- ✓ δείκτη διάθλασης (refractive index detector, RID)
- ✓ ηλεκτροχημικός ανιχνευτής (Electrochemical detector)
- ✓ εξατμιστικός ανιχνευτής σκέδασης ακτινοβολίας (evaporative light scattering detector, ELSD)
- ✓ ανιχνευτής φορτισμένου αερολύματος ακίδας (charged aerosol detector, CAD)
- ✓ φασματόμετρο μάζας (mass spectrometric detector, MS)
- ✓ ανιχνευτής πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance, NMR)

Ο διαχωρισμός και η ανίχνευση ενός μίγματος τριών ενώσεων Α, Β και Γ εικονίζονται στα παρακάτω σχήμα 5. Αρχικά, το μίγμα εισάγεται στην στήλη μέσω της βαλβίδας έγχυσης. Οι ταχύτητες μετακίνησης των μορίων της



**Σχήμα 5.** Σχηματική περιγραφή του διαχωρισμού τριών ενώσεων

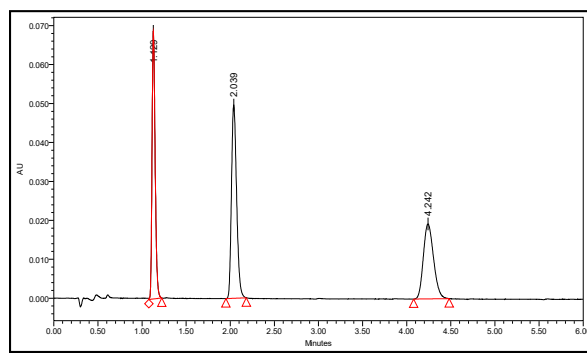
κάθε ένωσης διαφοροποιούνται λόγω της διαφορετικής κατανομής τους μεταξύ της κινητής και στατικής φάσης. Συνεπώς, τα μόρια της ένωσης Α (κόκκινο χρώμα) κατανομούνται περισσότερο στην κινητή φάση και κινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα από εκείνα των ενώσεων Β (μωβ χρώμα) και Γ (μπλε χρώμα). Μετά το διαχωρισμό τους, τα μόρια της κάθε ένωσης διέρχονται με την μορφή ζωνών από την κυψελίδα συνεχούς ροής ενός φασματοφωτομετρικού ανιχνευτή και καταγράφονται με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή.



**Σχήμα 6.** Σχηματική αναπαράσταση ανίχνευσης τριών ενώσεων μετά το διαχωρισμό

Η λαμβανόμενη γραφική παράσταση ονομάζεται **χρωματογράφημα (chromatogram)**. Ο άξονας x αντιπροσωπεύει, συνήθως, τον χρόνο της ανάλυσης (από τη στιγμή της εισαγωγής του δείγματος), ενώ ο άξονας

γ το μετρούμενο μέγεθος, που στην προκειμένη περίπτωση είναι απορρόφηση (absorbance unit, AU). Το λαμβανόμενο σήμα είναι οι καλούμενες **χρωματογραφικές κορυφές** (chromatographic peaks), κωδωνοειδούς σχήματος και στην ιδανική περίπτωση πρόκειται για συμμετρικές διασπορές των μορίων γύρω από μια μέση τιμή (κατανομές Gauss). Στην ουσία, κάθε κορυφή αντιπροσωπεύει διαφορετική ένωση. Η οριζόντια γραμμή που βρίσκεται στο κάτω μέρος του χρωματογραφήματος και αντιστοιχεί στο μηδενικό σήμα του ανιχνευτή ονομάζεται **βασική γραμμή (baseline)**.



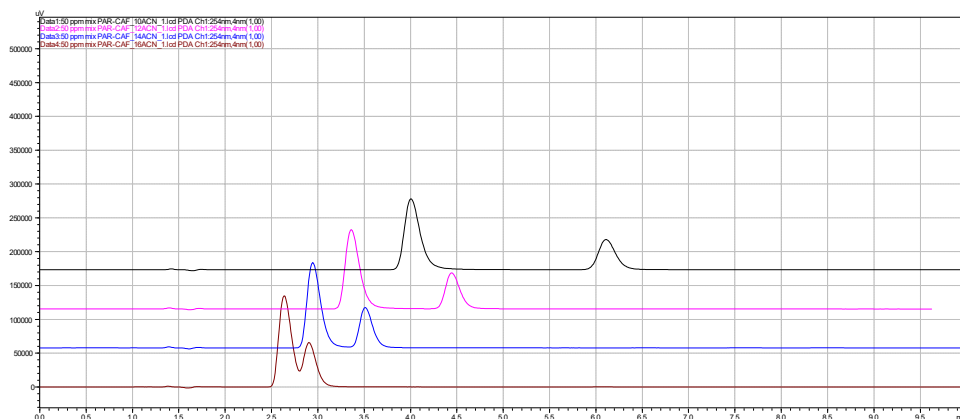
**Σχήμα 7.** Τυπικό χρωματογράφημα διαχωρισμού τριών ενώσεων

### 3.3 Στατική και κινητή φάση

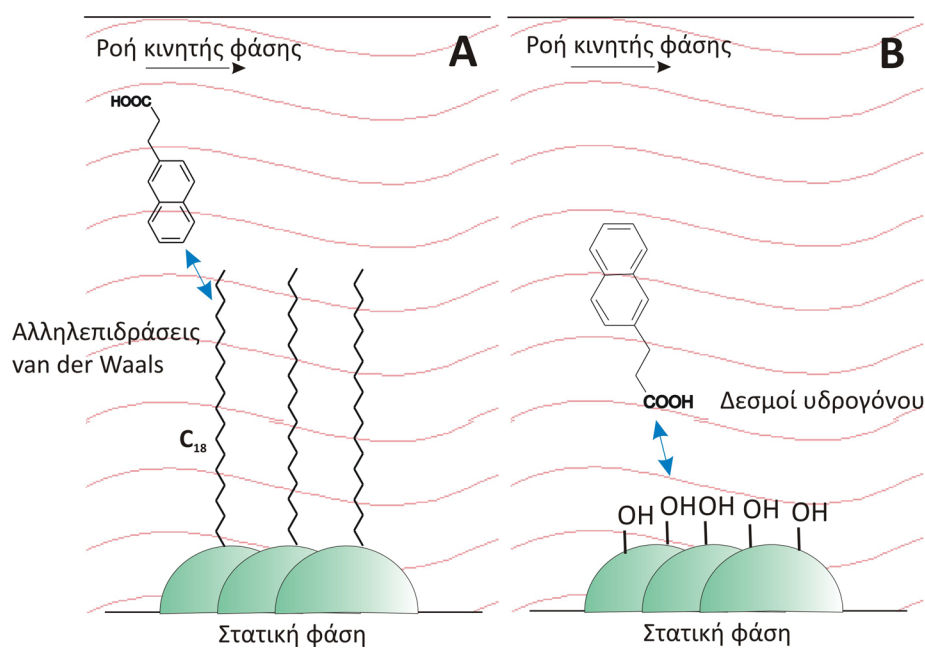
Στη χρωματογραφία υγρού, το είδος της στατικής αλλά και της κινητής φάσης παίζουν καθοριστικό ρόλο στο διαχωρισμό των ενώσεων. Ανάλογα με την πολικότητα της στατικής και της κινητής φάσης, η χρωματογραφία υγρού διακρίνεται σε δυο είδη: τη **χρωματογραφία αντίστροφης φάσης** (reversed phase liquid chromatography, RP-HPLC) και τη **χρωματογραφία κανονικής φάσης** (normal phase liquid chromatography, NP-HPLC).

Στη χρωματογραφία **αντίστροφης φάσης** ο μηχανισμός συγκράτησης βασίζεται κυρίως στις ελκτικές δυνάμεις van der Waals μεταξύ του λιπόφιλου τμήματος της ένωσης και της στατικής φάσης (σχήμα 9Α). Στην περίπτωση αυτή, η στατική φάση αποτελείται συνήθως από τηγμένο οξείδιο του πυριτίου ( $\text{SiO}_2$ ) (ή πηκτή πυριτίας) μετά από κατάλληλη χημική τροποποίηση της επιφάνειάς του με διάφορες υδρόφοβες χημικές ομάδες, όπως π.χ. δεκαοκτύλιο,  $\text{C}_{18}$ ,  $\text{C}_8$ , φαινύλιο,  $\text{C}_4$ ) προσδίδοντάς την άπολο χαρακτήρα. Από την άλλη πλευρά, η κινητή φάση είναι σχετικά πολική και αποτελείται, κυρίως, από μίγματα νερού ή υδατικών ρυθμιστικών διαλυμάτων με οργανικούς διαλύτες, μικρότερης πολικότητας του νερού, όπως μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, ισοπροπανόλη, τετραϋδροφουράνιο, κ.ά. Η μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης (δηλαδή αύξηση του ποσοστού του οργανικού διαλύτη), έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της κατανομή των μορίων της ένωσης, προς την κινητή φάση, δηλαδή μείωση των ελκτικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της ένωσης και της στατικής φάσης. Έτσι στην περίπτωση αυτή, η ένωση εξέρχεται γρήγορα από τη στήλη. Για παράδειγμα, στο παρακάτω σχήμα 8 εικονίζεται ο διαχωρισμός δύο ενώσεων (παρακαταμόλη και καφεΐνη) όπου το ποσοστό του ακετονιτρίλιου στην κινητή φάση αυξάνεται βαθμιαία από 10 έως 16 %. Όπως παρατηρείται, η αύξηση του ποσοστού έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης καθώς και τη μείωση του χρόνου ανάλυσης. Από την άλλη πλευρά, η αύξηση της πολικότητας της κινητής, με αύξηση του ποσοστού της υδατικού διαλύματος, επιφέρει το αντίθετο φαινόμενο.





**Σχήμα 8.** Μελέτη του ποσοστού του ακετονιτριλίου της κινητής φάσης ( $\varphi_{(ACN)} = 10, 12, 14$  και  $16\%$  v/v) στο διαχωρισμό παρακεταμόλης και καφεΐνης με χρωματογραφία υγρού



**Σχήμα 9.** Αλληλεπιδράσεις της στατικής φάσης με μια ένωση στην χρωματογραφία A) αντίστροφης φάσης και B) κανονικής φάσης

Ένα από τα μειονεκτήματα των σηλών με βάση την πηκτή πυριτίας είναι η αντοχή του υλικού, η οποία περιορίζεται σε τιμές pH της κινητής φάσης από 2 έως 8. Τα τελευταία χρόνια όμως είναι διαθέσιμες και στατικές φάσεις από οργανικά πολυμερή οι οποίες είναι ανθεκτικές σε τιμές pH από 1 έως 12.

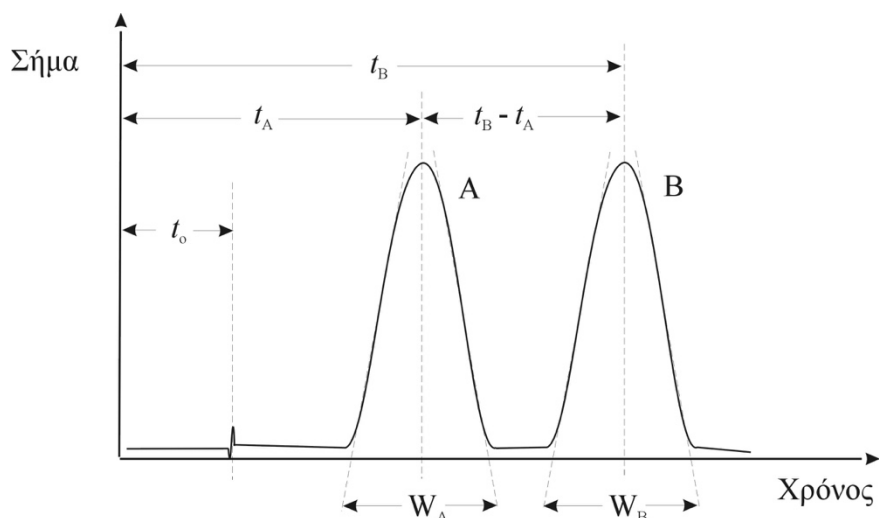
Στην περίπτωση της χρωματογραφίας **κανονικής φάσης** ο μηχανισμός συγκράτησης βασίζεται κυρίως στους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των σιλανο-ομάδων της στατικής φάσης και των πολικών ομάδων της ένωσης (σχήμα 9B). Εκτός της πηκτής πυριτίας, ως στατική φάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί οξείδιο του αργιλίου, τιτανίου ή ζirkονίου. Στον συγκεκριμένο τύπο χρωματογραφίας, η κινητή φάση είναι μη πολική, η οποία αποτελείται κυρίως από μίγματα εξάνιου, επτανίου, χλωροφορμίου με οργανικούς διαλύτες όπως

ισοπροπανόλη, αιθανόλη, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, οξικός αιθυλεστέρας κ.ά. Αύξηση του πολικού χαρακτήρα της κινητής φάσης, οδηγεί στην μετατόπιση της κατανομής των μορίων της πολικής ένωσης προς την κινητή φάση, και συνεπώς η ένωση εκλύεται σε σύντομο χρόνο. Αντίθετα, τα μόρια της ένωσης αλληλεπιδρούν περισσότερο με τη στατική όταν μειώνεται η πολικότητα της κινητής φάσης.

### 3.4 Χρωματογραφικοί παράμετροι

Ο χρόνος που απαιτείται ώστε ένα μη συγκρατούμενο μόριο να διατρέξει από το σημείο έγχυσης του δείγματος μέχρι τον ανιχνευτή (συμπεριλαμβανομένου της στήλης) ονομάζεται **νεκρός χρόνος**  $t_0$  (min). Ο χρόνος αυτός είναι ο ίδιος για όλες τις αναλυόμενες ενώσεις σε συγκεκριμένη ταχύτητα ροής. Αντίθετα, ο χρόνος που απαιτείται για την έκλυση μιας ένωσης στο μέγιστο της συγκέντρωσης της (μέγιστο της κορυφής) ονομάζεται **χρόνος συγκράτησης ή ανάσχεσης**  $t_R$  (min). Βέβαια, ο «καθαρός» χρόνος παραμονής της στη στατική φάση δίνεται από τη διαφορά ( $t_R - t_0$ ). Αξίζει να σημειωθεί ότι, ο χρόνος συγκράτησης μιας ένωσης είναι σταθερός υπό καθορισμένες χρωματογραφικές συνθήκες και αποτελεί στοιχείο ταυτοποίησης της ένωσης.

Κατά αντιστοιχία των παραπάνω, ο όγκος της κινητής φάσης που απαιτείται για τη μέτρηση του νεκρού χρόνου  $t_0$ , ονομάζεται **νεκρός όγκος**  $V_0$  (void or dead volume) (mL) ενώ για την έκλυση της ένωσης ονομάζεται **όγκος συγκράτησης ή ανάσχεσης**  $V_R$  (mL). Και στις δυο περιπτώσεις, οι όγκοι  $V_0$  και  $V_R$  ισούνται με το γινόμενο της ταχύτητας ροής επί του αντίστοιχου χρόνου  $t_0$  ή  $t_R$ , όταν η ταχύτητα ροής είναι σταθερή.



**Σχήμα 10.** Διαχωρισμός δυο ενώσεων A και B στην υγρή χρωματογραφία

Μια άλλη χρωματογραφική παράμετρος αφορά τον **παράγοντα συγκράτησης ή χωρητικότητας** ( $k'$ ) ο οποίος εκπροσωπεί το μέτρο κατανομής της ένωσης στην στατική φάση και στην κινητή φάση και δίνεται από την παρακάτω μαθηματική έκφραση:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0}$$

Ο παράγοντας εκλεκτικότητας  $\alpha$  (selectivity factor) μιας αναλυτικής στήλης για δυο ενώσεις A και B, ορίζεται ως

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t_{R(A)} - t_o}{t_{R(B)} - t_o}$$

όπου  $k'_A$  και  $k'_B$  είναι οι παράγοντες συγκράτησης των ενώσεων. Αν θεωρήσουμε ότι η ένωση B είναι η ισχυρότερα συγκρατούμενη ένωση, τότε ο παράγοντας εκλεκτικότητας είναι πάντα μεγαλύτερος της μονάδας.

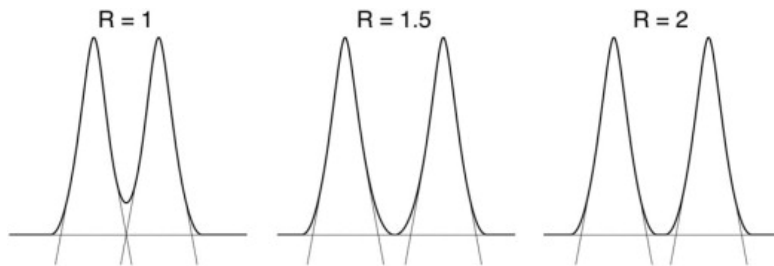
Σημαντική παράμετρος που αντιπροσωπεύει την απόδοση ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού είναι η **διαχωριστική ικανότητα**,  $R_s$ , (resolution). Η διαχωριστική ικανότητα μεταξύ δυο ενώσεων A και B ορίζεται ως η απόσταση μεταξύ των μεγίστων των κορυφών των ενώσεων συγκρινόμενη με το μέσο όρο του εύρους κάθε κορυφής:

$$R_s = 2 \frac{t_B - t_A}{W_A + W_B}$$

όπου  $t_A$  και  $t_B$  είναι οι χρόνοι συγκράτησης και  $W_A$  και  $W_B$  είναι το εύρος των κορυφών των ενώσεων A και B (σχήμα 10). Επίσης, η διακριτική ικανότητα διαχωρισμού δυο ενώσεων, συνδέεται και με τους παράγοντες εκλεκτικότητας, αποτελεσματικότητας και χωρητικότητας του συστήματος σύμφωνα με την παρακάτω σχέση.

$$R_s = \frac{1}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) (\sqrt{N}) \left( \frac{\bar{k}'}{1 + \bar{k}'} \right)$$

όπου  $\alpha$  είναι η εκλεκτικότητα του διαχωρισμού,  $\bar{k}'$ , ο μέσος όρος των παραγόντων χωρητικότητας των ενώσεων A και B και  $N$  είναι ο αριθμός των θεωρητικών πλακών της στήλης όταν είναι παρόμοια για τις δυο ενώσεις. Για τιμές του  $R_s$  μεγαλύτερες του 1,5, θεωρείται ότι επιτυγχάνεται πλήρης διαχωρισμός των ενώσεων.



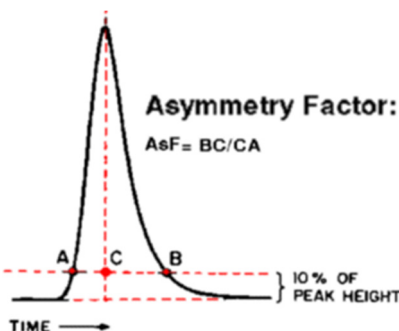
**Σχήμα 11.** Διαχωρισμός δυο ενώσεων με μεταβολή της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης.

Η **αποτελεσματικότητα** (efficiency) της στήλης εκφράζεται με τον αριθμό των θεωρητικών πλακών,  $N$ , ο οποίος δίνεται από τον τύπο της παρακάτω εξίσωσης (μέθοδος 4σ).

$$R_s = 16 \cdot \left( \frac{t_R}{W} \right)^2$$

Τέλος, η **ασυμμετρία κορυφών,  $A_s$  (peak asymmetry)** είναι μια από τις βασικές παραμέτρους ελέγχου των κορυφών που αναφέρεται στη φαρμακοποιία και υπεισέρχεται στα **κριτήρια καταλληλότητας** (system suitability test, SST) μιας μεθόδου ανάλυσης. Υποδηλώνει την συμμετρία της κορυφής δηλαδή αν σχηματίζουν «μέτωπο» (peak fronting) ή «ουρά» (peak tailing) και δίνεται από τη σχέση:

$$\text{Asymmetry factor} = \frac{BC}{AC}$$

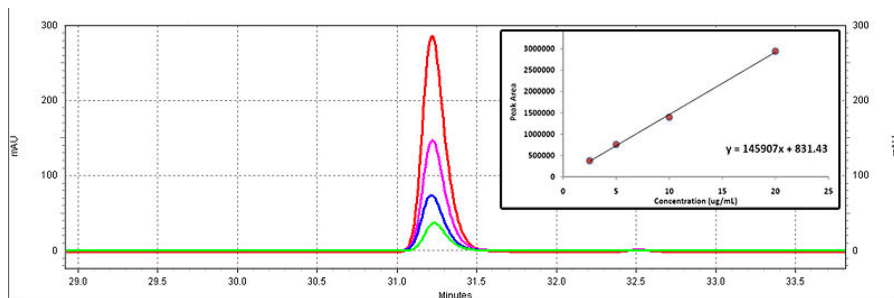


**Σχήμα 12.** Υπολογισμός του παράγοντα ασυμμετρίας κορυφής

Στην ιδανική περίπτωση ο παράγοντας  $A_s$  κυμαίνεται από 0,95 – 1,15. Τιμές εκτός του εύρους υποδηλώνουν, πολλές φορές, υπερφόρτωση της στήλης, αποικοδόμηση του δείγματος κ.ά γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε σφάλματα στην εμβοδομέτρηση (ολοκλήρωση) της κορυφής.

### 3.5 Ποσοτικοποίηση

Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με μια HPLC μέθοδο, όπως και οποιασδήποτε άλλης αναλυτικής μεθόδου, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα στάδια. Συνήθως, πριν την ανάλυση των αγνώστων δειγμάτων πραγματοποιείται η βαθμονόμηση της μεθόδου, η οποία επιτυγχάνεται με την ανάλυση μιας σειράς προτύπων διαλυμάτων των ενώσεων, κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Όπως συμβαίνει και στις άλλες αναλυτικές τεχνικές, έτσι και στην χρωματογραφία υγρού, το μέγεθος της λαμβανόμενης κορυφής (εμβαδό ή ύψος κορυφής) μιας ένωσης είναι ανάλογη της συγκέντρωσής της. Μετά την ανάλυση μια σειράς προτύπων διαλυμάτων/μιγμάτων των ενώσεων κατασκευάζεται η **καμπύλη αναφοράς ή βαθμονόμησης** (calibration curve) όπως εικονίζεται στο σχήμα 13. Θέτοντας ως  $y$ , το μετρούμενο εμβαδό κορυφής της ένωσης του άγνωστου δείγματος, στην καμπύλη αναφοράς, υπολογίζεται η άγνωστη συγκέντρωση  $x$  της ένωσης στο δείγμα.



**Σχήμα 13.** Κατασκευή καμπύλη αναφοράς

Σε περιπτώσεις όπου δεν υπάρχουν συστηματικά σφάλματα (systematic errors) η ποσοτικοποίηση μπορεί να επιτευχθεί και με την βοήθεια ενός μόνο προτύπου. Στην ουσία πρόκειται για μια καμπύλη βαθμονόμησης δυο σημείων (ενός προτύπου ( $x_i, y_i$ ) και της αρχής των αξόνων). Ο συγκεκριμένος τρόπος ποσοτικοποίησης χρησιμοποιείται κατά κόρου στη φαρμακοποιία για την ανάλυση είτε των δραστικών ενώσεων (assay) σε σκευάσματα ή διαφόρων προσμίξεων (impurities).



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 1<sup>η</sup>

Μελέτη φάσματος UV του βενζολίου – Μεταβολές φάσματος απορρόφησης με μεταβολή του εύρους σχισμής του μονοχρωμάτορα

### 1. Εισαγωγή

Το βενζόλιο δεν χρησιμοποιείται ως φάρμακο, διότι είναι τοξικό, αλλά είναι η μητρική ένωση των περισσότερων φαρμάκων. Το βενζόλιο παραχωρεί τρεις ταινίες απορρόφησης στην περιοχή του υπεριώδους που ονομάζεται  $E_1$  184 nm ( $E_{\max}$  60.000),  $E_2$  204 nm ( $E_{\max} > 900$ ) και βενζοειδής B 254 nm ( $E_{\max}$  200). Οι παραπάνω απορροφήσεις που οφείλονται σε διεγερμένες καταστάσεις  $\pi \rightarrow \pi^*$  ηλεκτρονίων μέσα στο βενζολικό πυρήνα μπορούν να θεωρηθούν πολύπλοκες.

Θεωρητικά, θα ανέμενε κανείς τέσσερις ισοδύναμες ηλεκτρονικές διεγέρσεις, που θα παραχωρούσαν μια μόνο ταινία απορρόφησης. Στην πράξη, όμως, επειδή εντός του αρωματικού δακτυλίου λαμβάνουν χώρα φαινόμενα απώθησης ηλεκτρονίων – ηλεκτρονίων σε συνάρτηση πάντοτε με την σχετική συμμετρία του μορίου, οι πραγματικές ενεργειακές καταστάσεις των ηλεκτρονίων εμφανίζονται τροποποιημένες.

Όμως τα έξι ηλεκτρόνια ισομερώς κατανεμημένα στο ίδιο επίπεδο του εξαμελούς δακτυλίου προσδίδουν στο σύστημα σταθερότητα σε σύγκριση με άλλα συζυγή τριένια. Συνεπώς, εξαιτίας της ιδιάζουσας ενεργειακής κατάστασης του βενζολίου, η ουσία παρουσιάζει ελαττωμένη τάση διέγερσης των  $\pi$  ηλεκτρονίων. Από τις τρεις ταινίες απορρόφησης οι δύο πρώτες 184, 204 nm ονομάζονται **πρωταρχικές** και η τρίτη 254 nm **δευτερεύουσα**. Η πρώτη, 184 nm, θεωρείται **ευνοούμενη** απορρόφηση, γι αυτό χαρακτηρίζεται από μεγάλη τιμή μοριακού συντελεστή απορρόφησης, ενώ οι υπόλοιπες (204, 254 nm) είναι **απαγορευμένες** και με μικρή τιμή μοριακού συντελεστή απορρόφησης. Μάλιστα, η τελευταία 254 nm αναδύεται από τη διατάραξη της συμμετρίας του βενζολίου εξαιτίας της κάμψης των δεσμών. Με ένα μέτριο φασματοφωτόμετρο η πρώτη ταινία απορρόφησης 184 nm δεν καταγράφεται κανονικά επειδή βρίσκεται στα όρια της περιοχής άπω υπεριώδους – υπεριώδους.

#### ➤ Πρωταρχική ταινία απορρόφησης E2 204 nm

Έχει σημασία όσον αφορά την ευαισθησία της μεθόδου και τους ποσοτικούς προσδιορισμούς, με την προϋπόθεση ότι λαμβάνει χώρα μετατόπισής της σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (225-230 nm), διότι σε χαμηλά μήκη κύματος μπορεί να υπάρχουν παρεμβολές από το διαλύτη ή και διέγερση του μοριακού οξυγόνου που είναι διαλυμένο σε μεγάλα ποσά στο απεσταγμένο νερό.

#### ➤ Η βενζοειδής ταινία B, 254 nm

Αν και απαγορευμένη και συνεπώς μικρής έντασης, παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, γιατί δεν υπάρχουν παρεμβολές στο φάσμα της από τα έκδοχα των φαρμακευτικών σκευασμάτων. Όμως, σε χαμηλά μήκη κύματος εμφανίζεται ασαφής απορρόφηση, γι αυτό μετρήσεις κάτω από 220-225 nm πρέπει να αποφεύγονται. Ένα άλλο γνώρισμα της βενζοειδούς ταινίας β του βενζολίου είναι η **χαρακτηριστική λεπτή υφή** που οφείλεται σε διεγέρσεις δόνησης των δεσμών, λόγω συμμετρίας της δομής του μορίου. Διεγέρσεις δόνησης είναι οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις που επικάθονται με τη μορφή λόγχων επί των κυρίων διεγέρσεων, των ηλεκτρονικών διεγέρσεων. Επίσης, πρέπει να προστεθεί ότι τα μέγιστα απορρόφησης δεν μεταβάλλονται από

την πολικότητα ή μη των διαλυτών, αυτό που επηρεάζεται είναι η οξύτητα των απορροφήσεων της λεπτής υφής. Τέλος, η βενζοειδής ταινία β που λαμβάνεται από το βενζόλιο σε κατάσταση ατμών, παρουσιάζει πολύ λεπτή υφή, επειδή δεν υπάρχουν επιδράσεις από τον διαλύτη υπό μορφή έντονων διαμοριακών αλληλεπιδράσεων.

## 2. Διαλύτης

Ως διαλύτης για την μελέτη της ουσίας χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη διότι:

- Δεν απορροφά αφού δεν έχει χρωμοφόρες ομάδες
- Είναι σχετικά μη πολική ένωση και δεν επιδρά στα φαρμακομόρια.
- Έχει άριστες διαλυτικές ικανότητες

**Προσοχή:** Η μεθανόλη είναι πτητική με αποτέλεσμα λόγω εξάτμισής της να μεταβάλλεται η συγκέντρωση της υπό προσδιορισμό διαλυμένης ουσίας.

## 3. Πειραματική διαδικασία

1) Στα ακόλουθα φάσματα, να συμπληρωθούν τα κενά και να υπολογιστούν τα ζητούμενα.

2) Να υπολογίσετε σε όλα τα φάσματα του βενζολίου, δυο λόγους τιμών απορρόφησης (αποστάσεις σημείων από βασική γραμμή) που αντιστοιχούν σε μέγιστα και ελάχιστα του φάσματος.

**Σημείωση:** Οι λόγοι να αναφέρονται πάντα στα ίδια σημεία (μήκη κύματος).

### ➤ Βενζόλιο σε μεθανόλη (Εύρος σχισμής 0,5 nm)

**Ανάλυση φάσματος:** Τα βασικότερα στοιχεία του φάσματος είναι η πλούσια λεπτή υφή και η ισχυρή απορρόφηση, αφού η ένταση είναι μεγάλη. Δηλαδή, σε αυτό το εύρος σχισμής, όπου και παίρνουμε συνήθως τα φάσματα, η βενζοειδής ταινία Β του βενζολίου αποκαλύπτεται πλήρως με όλα τα χαρακτηριστικά της λεπτής υφής. Το φάσμα του βενζολίου είναι σημαντικό εξαιτίας της λεπτής υφής, η οποία επιτρέπει τη διεξαγωγή ποσοτικών προσδιορισμών.

Στους πίνακες που ακολουθούν συμπληρώστε τουλάχιστον 2 μέγιστα (max) και 2 ελάχιστα (min) και όσες παρεκκλίσεις ή ώμους παρατηρείται.

**Εύρος ταινίας:** ..... (από ποιο λ (nm), έως ποιο λ(nm))



<b>MAX:</b>	nm	<b>MIN:</b>	nm
	nm		nm
	nm		nm

<b>ΩΜΟΙ:</b>		<b>ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΕΙΣ:</b>	
	nm		nm
	nm		nm

$$A_1 = \frac{\lambda_{1max}}{\lambda_{1min}} = \frac{\quad}{\quad} =$$

$$A_2 = \frac{\lambda_{2max}}{\lambda_{2min}} = \frac{\quad}{\quad} =$$

π.χ.  $A_1 = \frac{\lambda_{1max} 230nm}{\lambda_{2min} 265nm} = \frac{0.350 (Absorb)}{0.010 (Absorb)} = 35$

➤ **Βενζόλιο σε πεντάνιο (Εύρος σχισμής 1 nm)**

Σε αυτό το εύρος σχισμής παρατηρούμε ότι η ένταση απορρόφησης της ταινίας Β έχει ελαττωθεί και τα χαρακτηριστικά της λεπτής υφής (μέγιστα, ελάχιστα, ώμοι, παρεκκλίσεις) είναι αμβλυμμένα.

Εύρος ταινίας: .....

<b>MAX:</b>	nm	<b>MIN:</b>	nm
	nm		nm
	nm		nm

ΨΟΜΟΙ:	ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΕΙΣ:	
	nm	nm
	nm	nm

$$A_1 = \frac{\lambda_{1_{max}}}{\lambda_{1_{min}}} = \text{---} =$$

$$A_2 = \frac{\lambda_{2_{max}}}{\lambda_{2_{min}}} = \text{---} =$$

➤ **Βενζόλιο σε μεθανόλη (Εύρος σχισμής ..... nm)**

Σε αυτό το εύρος σχισμής παρατηρούμε ότι η ένταση της απορρόφησης της ταινίας Β ελαττώνεται ακόμη περισσότερο από ό,τι στο εύρος σχισμής 1. Η λεπτή υφή του φάσματος αμβλύνεται. Συγκεκριμένα, τα χαρακτηριστικά της λεπτής υφής διαμορφώνονται ως εξής:

Εύρος ταινίας: .....

ΜΑΧ:	nm	ΜΙΝ:	nm
	nm		nm
	nm		nm

ΨΟΜΟΙ:	ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΕΙΣ:	
	nm	nm
	nm	nm

$$A_1 = \frac{\lambda_{1_{max}}}{\lambda_{1_{min}}} = \text{---} =$$

$$A_2 = \frac{\lambda_{2_{max}}}{\lambda_{2_{min}}} = \text{---} =$$

➤ **Βενζόλιο σε μεθανόλη (εύρος σχισμής 0,5 nm) (Συγκέντρωση 1/2 της αρχικής)**

Σε εύρος σχισμής ίδιο με το αρχικό (0,5nm) και σε συγκέντρωση δείγματος μειωμένη κατά το 1/2, επαναλαμβάνεται η λήψη του φάσματος βενζολίου. Παρατηρούμε ότι η ένταση της απορρόφησης της ταινίας Β ..... . Η λεπτή υφή του φάσματος .....

Συγκεκριμένα, τα χαρακτηριστικά της λεπτής υφής διαμορφώνονται ως εξής:

MAX:	nm	MIN:	nm
	nm		nm
	nm		nm
ΩΜΟΙ:	ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΕΙΣ:		
	nm		nm
	nm		nm

$$A_1 = \frac{\lambda_{1_{max}}}{\lambda_{1_{min}}} = \frac{\quad}{\quad} =$$

$$A_2 = \frac{\lambda_{2_{max}}}{\lambda_{2_{min}}} = \frac{\quad}{\quad} =$$

3) Σε χιλιοστομετρικό χαρτί να χαραχτούν δύο διαγράμματα μεταβολής απορρόφησης ενός μεγίστου και ενός ελαχίστου, σε συνάρτηση με το εύρος σχισμής του μονοχρωμάτορα. Τι παρατηρείτε;

4) Το εύρος σχισμής του μονοχρωμάτορα επηρεάζει (βαθυχρωμικά-υψιχρωμικά) το φάσμα του βενζολίου;

5) Πώς επηρεάζει η μεταβολή του εύρους σχισμής του μονοχρωμάτορα το φάσμα του βενζολίου. Ποιο εύρος σχισμής είναι το καταλληλότερο, γιατί;

6) Επηρεάζεται η λεπτή υφή, οι λόγοι απορρόφησης, και οι τιμές απορρόφησης από τη συγκέντρωση του δείγματος;

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 2<sup>η</sup>

### Μεταβολές φάσματος απορρόφησης UV λόγω υποκατάστασης στον αρωματικό δακτύλιο

#### 1. Εισαγωγή

Μονοϋποκατάσταση στον αρωματικό δακτύλιο του βενζολίου ελαττώνει τη συμμετρία του μορίου, προκαλεί αλλαγές στην υφή του φάσματος, στην ένταση των απορροφήσεων και παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση του  $\lambda_{\max}$ . Στην περίπτωση μικρών υποκαταστατών (π.χ.  $-\text{CH}_3$ ) που δεν λειτουργούν αυξοχρωμικά προκαλείται αμελητέα βαθυχρωμική μετατόπιση. Διαφορετική υφή βενζοειδούς ταινίας B, λόγω αλλαγής της συμμετρίας του μορίου, λαμβάνουμε και στην περίπτωση του ορθο-, μετα- και παρα-ξυλολίου.

#### Παρατήρηση

Η ελευθερία δόνησης των μορίων επηρεάζεται από δύο παράγοντες, έναν εσωτερικό και έναν εξωτερικό:

- Συμμετρία στη χημική δομή (εσωτερικός παράγοντας) που συνεπάγεται ευκολότερη δόνηση.
- Ο διαλυτής (εξωτερικός παράγοντας) καθώς όσο ελαττώνεται η πολικότητά του, τόσο μεγαλύτερη ευκολία έχουμε στη δόνηση του μορίου.

#### 2. Πειραματική άσκηση

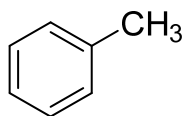
1) Να ληφθούν τα παρακάτω φάσματα, να συμπληρωθούν τα κενά και να υπολογιστούν τα ζητούμενα.

**Σημείωση:** Οι συγκρίσεις θα γίνουν ως προς το φάσμα της ουσίας που δίνει την λεπτότερη υφή ή το φάσμα του βενζολίου

2) Να επιλέξετε δύο μέγιστα, δύο ελάχιστα σε συγκεκριμένα μήκη κύματος και αφού υπολογίσετε τις αποστάσεις τους από τη βασική γραμμή (δηλ. τις απορροφήσεις τους) να υπολογίσετε τους παρακάτω λόγους.

##### ➤ Τολουόλιο σε πεντάνιο

Μια ενδιαφέρουσα χρωμοφόρος ομάδα είναι το τολουόλιο που έχει υποκαταστήσει ένα υδρογόνο του βενζολίου με.....ομάδα. Στην περίπτωση, λοιπόν, του τολουολίου, επειδή υπάρχει ο μεθυλο-υποκαταστάτης η δόνηση του μορίου .....αισθητά, οπότε δίνει .....λεπτή υφή και ..... βαθυχρωμική μετατόπιση γιατί το  $-\text{CH}_3$  λειτουργεί.....λόγω του φαινομένου.



Εύρος σχισμής: 1 nm

Εύρος ταινίας: .....

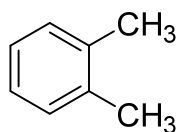
MAX:			MIN:		
Σημείο	Απορρόφηση	nm	Σημείο	Απορρόφηση	nm
ΩΜΟΙ:			ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΕΙΣ:		
Σημείο	Απορρόφηση	nm	Σημείο	Απορρόφηση	nm

$$A_1 = \frac{\lambda_{1max}}{\lambda_{1min}} = \text{-----} =$$

$$A_2 = \frac{\lambda_{2max}}{\lambda_{2min}} = \text{-----} =$$

➤ ορθο-ξυλόλιο σε πεντάνιο

Οι δύο μεθυλικές ομάδες (υποκαταστάσεις) βρίσκονται σε.....θέση στον βενζολικό δακτύλιο. Κατά συνέπεια η δόνηση του δακτυλίου.....αισθητά και αυτό αντικατοπτρίζεται στο φάσμα. Πράγματι το φάσμα του ορθο-ξυλολίου.....λεπτή υφή σε σχέση με το αντίστοιχο του βενζολίου.



Εύρος σχισμής: 1 nm

Εύρος ταινίας: .....

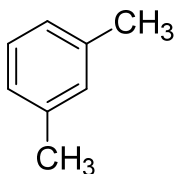
MAX:			MIN:		
Σημείο	Απορρόφηση	nm	Σημείο	Απορρόφηση	nm
ΩΜΟΙ:			ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΕΙΣ:		
Σημείο	Απορρόφηση	nm	Σημείο	Απορρόφηση	nm

$$A_1 = \frac{\lambda_{1_{max}}}{\lambda_{1_{min}}} = \text{-----} =$$

$$A_2 = \frac{\lambda_{2_{max}}}{\lambda_{2_{min}}} = \text{-----} =$$

➤ μετα-ξυλόλιο σε πεντάνιο

Στο μετα-ξυλόλιο τα μεθύλια βρίσκονται υποκατεστημένα σε μετα-θέση, στα οποία παρεμβάλλεται ο άνθρακας. Έτσι, το μόριο του μετα-ξυλολίου μπορεί να δονηθεί .....από το ορθο-ξυλόλιο.



Εύρος σχισμής: 1 nm

Εύρος ταινίας:.....

MAX:			MIN:		
Σημείο	Απορρόφηση	nm	Σημείο	Απορρόφηση	nm
ΩΜΟΙ:			ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΕΙΣ:		
Σημείο	Απορρόφηση	nm	Σημείο	Απορρόφηση	nm

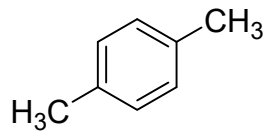
$$A_1 = \frac{\lambda_{1_{max}}}{\lambda_{1_{min}}} = \text{-----} =$$

$$A_2 = \frac{\lambda_{2_{max}}}{\lambda_{2_{min}}} = \text{-----} =$$

➤ παρα-ξυλόλιο σε πεντάνιο

Συγκριτικά, με τα φάσματα του ορθο- και μετα-ξυλολίου, το παρα- ξυλόλιο φαίνεται πιο πολύπλοκο, πράγμα που οφείλεται στις εκ διαμέτρου αντίθετες θέσεις των μεθυλίων στο μόριό του. Δηλαδή, το φάσμα του παρα-ξυλολίου παρουσιάζει....., παρόλο που είναι διπλά υποκατεστημένο. Πράγματι, η θέση των υποκαταστατών επιτρέπει στο μόριο να ..... με αποτέλεσμα λόγω της συμμετρίας που έχει να δίνει φάσμα ..... υφής.





Εύρος σχισμής: 1 nm

Εύρος ταινίας: .....

MAX:			MIN:		
Σημείο	Απορρόφηση	nm	Σημείο	Απορρόφηση	nm
ΩΜΟΙ:			ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΕΙΣ:		
Σημείο	Απορρόφηση	nm	Σημείο	Απορρόφηση	nm

$$A_1 = \frac{\lambda_{1_{max}}}{\lambda_{1_{min}}} = \text{---} =$$

$$A_2 = \frac{\lambda_{2_{max}}}{\lambda_{2_{min}}} = \text{---} =$$

3) Ποια η εφαρμογή της ανεύρεσης λόγων απορρόφησης;

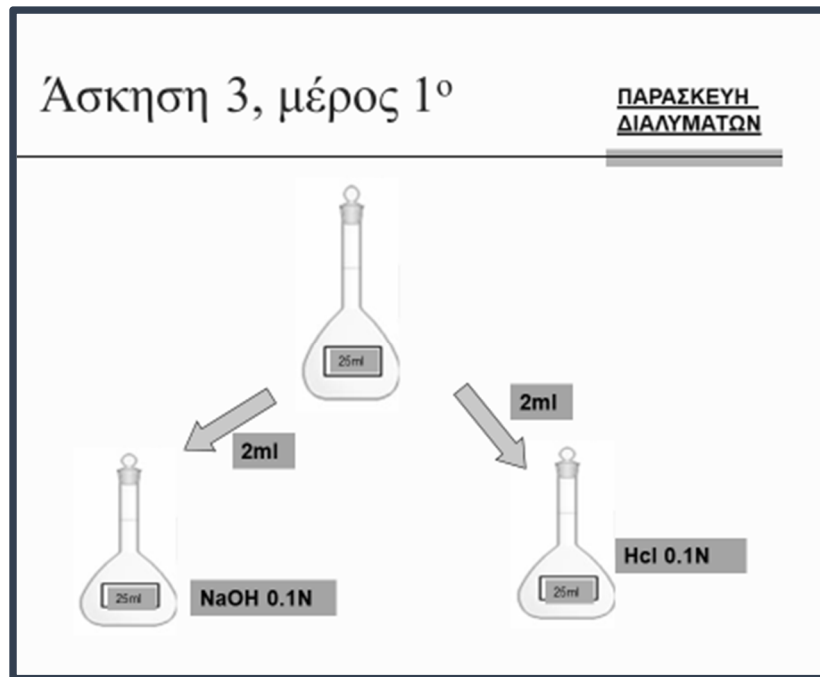
4) Πότε έχουμε λεπτότερη υφή φάσματος στο βενζόλιο, στο ορθο-, μετά- ή στο παρά-ξυλολίου ή στο τολουολίου και γιατί;

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 3<sup>η</sup>

Μεταβολές φάσματος απορρόφησης UV με αλλαγές της τιμής pH

Η βασική ουσία που αναλύεται είναι η .....

### Διαδικασία



### Αποτελέσματα

Προσαρμόστε την κλίμακα του οργάνου ώστε να δίνει ολοκληρωμένο το φάσμα της ουσίας. Ζωγραφίστε (και φωτογραφίστε ) τα φάσματα της σε:

Όξινο περιβάλλον

Αλκαλικό περιβάλλον

- Τα μέγιστα του φάσματός της σε όξινο pH ήταν στα .....nm, ενώ σε αλκαλικό στα .....nm

## Άσκηση 3, μέρος 2<sup>ο</sup>

### Υπολογισμός Συγκεντρώσεων

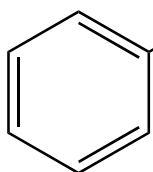
$$\text{Συντελεστής Αραίωσης} = \frac{\text{ml τελικής φιάλης}}{\text{ml σιφωνίου}}$$

$$\text{Συντελεστής Αραίωσης} = \frac{\text{Αρχική συγκέντρωση}}{\text{Τελική συγκέντρωση}}$$

- Ποια είναι η συγκέντρωση αρχικού δείγματος .....mg/ml και ποια του τελικού.....μg/ml (παρουσιάστε αναλυτικά τις πράξεις).

➤ **Φαινόλη**

Μια ενδιαφέρουσα χρωμοφόρος ομάδα είναι της φαινόλης στην οποία ένα υδρογόνο του βενζολίου έχει αντικατασταθεί με.....ομάδα. Στην περίπτωση, λοιπόν της φαινόλης, επειδή υπάρχει ο



OH υδροξύλο-υποκαταστάτης η δόνηση του μορίου ..... αισθητά, οπότε η φαινόλη..... λεπτή υφή. Από άποψη χρωμοφόρων η φαινόλη..... βαθυχρωμική μετατόπιση γιατί το υδροξύλιο λειτουργεί..... Τη μεγαλύτερη βαθυχρωμική μετατόπιση παρουσιάζει σε..... pH.

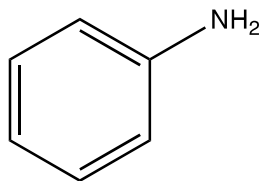
Εύρος σχισμής: 1 nm

Όξινο pH		Αλκαλικό pH	
Απορρόφηση	Μήκος κύματος λ(nm)	Απορρόφηση	Μήκος κύματος λ(nm)

➤ Συγκρίνετε το φάσμα της φαινόλης με αυτό του βενζολίου σε όξινο και αλκαλικό περιβάλλον. Ερμηνεύστε πλήρως το φαινόμενο.

➤ **Ανιλίνη**

Η χρωμοφόρος ομάδα της ανιλίνης δημιουργήθηκε με υποκατάσταση ενός υδρογόνου του βενζολίου με.....ομάδα. Στην περίπτωση, λοιπόν της ανιλίνης, επειδή υπάρχει ο υποκαταστάτης, η δόνηση του μορίου..... αισθητά, οπότε η ανιλίνη.....λεπτή υφή και ..... βαθυχρωμική μετατόπιση γιατί η αμινοομάδα λειτουργεί..... . Δεν επηρεάζεται από το περιβάλλον της σε..... pH.



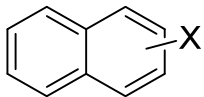
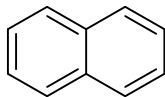
Εύρος σχισμής: 1 nm

Όξινο pH		Αλκαλικό pH	
Απορρόφηση	Μήκος κύματος λ(nm)	Απορρόφηση	Μήκος κύματος λ(nm)

➤ Συγκρίνετε το φάσμα της ανιλίνης με αυτό του βενζολίου σε όξινο και αλκαλικό περιβάλλον. Ερμηνεύστε πλήρως το φαινόμενο.

➤ **Ναφθαλένιο**

Μια επίσης ενδιαφέρουσα χρωμοφόρος ομάδα είναι αυτή του ναφθαλενίου και των παραγώγων του ( $X = -OH, -Cl, \text{ κτλ.}$ ). Στην περίπτωση, που το μόριό είναι το ναφθαλένιο, επειδή υπάρχει μια επιπλέον βενζολική υποκατάσταση στο μόριο του πρώτου βενζολίου έχουμε παρατεταμένη..... και.....βαθυχρωμική μετατόπιση. Η ταινία που μας δίνει σημαντική απορρόφηση στα ..... nm, είναι η .....



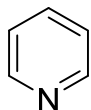
Εύρος σχισμής: 1 nm

Όξινο pH		Αλκαλικό pH	
Απορρόφηση	Μήκος κύματος λ(nm)	Απορρόφηση	Μήκος κύματος λ(nm)

- Συγκρίνετε το φάσμα του ναφθαλενίου σε όξινο και αλκαλικό περιβάλλον με αυτό του βενζολίου. Ερμηνεύστε πλήρως το φαινόμενο.

➤ **Πυριδίνη**

Τα φάσματα της πυριδίνης συμπεριφέρονται ..... σε σύγκριση με τα φάσματα της ανιλίνης και φαινόλης. Αυτό συμβαίνει γιατί το ..... βρίσκεται ..... στο δακτύλιο και το όλο σύστημα είναι αρωματικό. Η ουσία ..... βασικό χαρακτήρα.



Εύρος σχισμής: 1 nm

Όξινο pH		Αλκαλικό pH	
Απορρόφηση	Μήκος κύματος λ(nm)	Απορρόφηση	Μήκος κύματος λ(nm)

- Συγκρίνετε το φάσμα της πυριδίνης σε όξινο και αλκαλικό περιβάλλον με αυτό του βενζολίου. Ερμηνεύστε πλήρως το φαινόμενο.



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 4<sup>η</sup>

Μέθοδος παραγωγίσισης φασμάτων και σημασία αυτής στους ποσοτικούς προσδιορισμούς των δραστικών ουσιών στα φαρμακευτικά σκευάσματα.

### 1. Εισαγωγή

Σύμφωνα με τη διαδικασία παραγωγίσισης, το φάσμα απορρόφησης «μηδενικής τάξης» μιας ουσίας (που περιγράφεται από μία πολυωνμική εξίσωση συσχέτισης συγκέντρωσης με απορρόφηση), παριστάνεται εκ νέου με φάσμα (1ης, 2ας, ...n τάξης) που προκύπτει κατόπιν παραγωγίσισης της αρχικής εξίσωσης. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η δυνατότητα δημιουργίας φάσματος διαφορετικής μορφής για την προσδιοριζόμενη ουσία, με λεπτότερη υφή, περισσότερες λεπτομέρειες και ικανό να την προσδιορίσει σε κατάλληλα μήκη κύματος που δεν παρεμβάλλουν άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες.

Η φασματοφωτομετρία παραγώνων υπεριώδους-ορατού πέτυχε να παρακάμψει πολλά από τα προβλήματα που παρουσίαζε η μελέτη φασμάτων μηδενικής απορρόφησης και να εξαλείψει τυχόν παρεμποδίσεις των εκδόχων κατά την ανάλυση φαρμακευτικών σκευασμάτων.

### 2. Θεωρία παραγωγίσισης φασματικών λόγων

Ο νόμος του Beer για ένα μίγμα δύο συστατικών X και Ψ σε μήκος κύματος  $\lambda_i$  και εφόσον το πάχος της κυψελίδας είναι 1 cm, δίνεται από την παρακάτω σχέση:

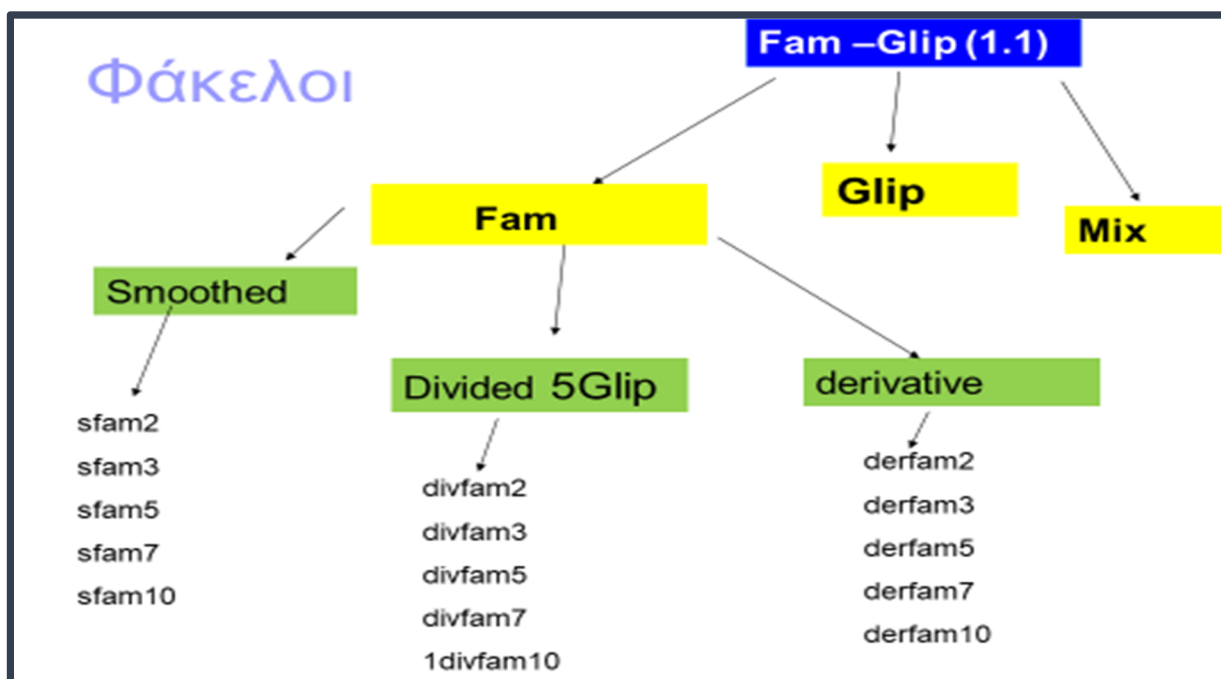
$$A_{\lambda,i} = \varepsilon_{X,\lambda_i} \cdot C_X + \varepsilon_{\Psi,\lambda_i} \cdot C_{\Psi} \quad (1)$$

Διαιρώντας κατά μέλη την εξίσωση (1) με την αντίστοιχη εξίσωση απορρόφησης του φάσματος ενός προτύπου διαλύματος μιας από τις δύο ουσίες (π.χ. για την X ουσία με συγκέντρωση  $C_X^0$ ) και παραγωγίζοντας το αποτέλεσμα, προκύπτει η εξίσωση:

$$\frac{d}{d\lambda} \left[ \frac{A_{\lambda,i}}{\varepsilon_{X,\lambda_i} \cdot C_X^0} \right] = \frac{d}{d\lambda} \left[ \frac{\varepsilon_{\Psi,\lambda_i}}{\varepsilon_{X,\lambda_i}} \right] \frac{C_{\Psi}}{C_X^0} \quad (2)$$

Από την εξίσωση (2) συμπεραίνουμε ότι το φάσμα των δυο ουσιών, επεξεργασμένο με την τεχνική της «Παραγωγίσισης Φασματικών Λόγων» (Derivative Ratio), για την πρώτη παράγωγο, είναι ανεξάρτητο από την  $C_X$  και εξαρτάται μόνο από τις  $C_{\Psi}$  και  $C_X^0$  με αποτέλεσμα οι ουσίες να μπορούν να προσδιοριστούν από τις αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς τους.

Πως πρέπει να ονομάσουμε τα αρχεία



Πίνακας συγκεντρώσεων ουσιών

Όγκος προτύπων διαλυμάτων	Συγκέντρωση προτύπων διαλυμάτων (µg/mL)					
	Τολβουταμίδη	Γλιβενκλαμίδη	Γλιπιζίδη	Χλωροπροπαμίδη	Μετφορμίνη	Φαινφορμίνη
(mL)						
1	-	-	-	-	3.26	-
2	8.13	8.19	7.97	8.42	6.53	6.83
3	12.19	12.29	11.95	12.62	9.79	10.25
5	20.32	20.48	19.92	21.04	16.32	17.09
6	-	-	-	-	19.58	20.51
8	32.51	32.77	31.87	33.66	-	27.34
10	40.64	40.96	39.84	42.08	-	-

**3. Πειραματική άσκηση**

Ουσία που προσδιορίζετε .....

Ουσία που παρεμβάλλει..... Ποιο δείγμα χρησιμοποιείτε σαν διαιρέτη .....  
(συγκέντρωση)

Μήκη κύματος που μετρήσατε .....nm ( $\lambda_{\max}$ ) και .....nm ( $\lambda_{\min}$ )

Για την δημιουργία του Mix δείγματος, προσθέστε .....(smoothed) και .....(smoothed)

Δείγμα	Συγκεντρώσεις	Απορροφήσεις (μετά από διαίρεση και παραγωγή)
1ο		
2ο		
3ο		
4ο		
5ο		
6ο		

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς .....

Συντελεστής συσχέτισης ( $r^2$ ).....

Απορρόφηση αγνώστου.....

Συγκέντρωση αγνώστου (βάση της καμπύλης).....

% Ανάκτηση.....

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 5<sup>η</sup> & 6<sup>η</sup>

Προσδιορισμός της δραστικής ουσίας Φουροσεμίδης σε φαρμακοτεχνικά σκευάσματα (δισκία) και μελέτη αυτής με ακτινοβολία UV

### 1. Εισαγωγή

Οι ποσοτικοί προσδιορισμοί με χρήση φασμάτων απορρόφησης βασίζονται στη σχέση που υπάρχει μεταξύ ποσότητας ακτινοβολίας που απορροφάται και της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας. Αν μια μονοχρωματική δέσμη ακτινοβολίας ορισμένου μήκους κύματος προσπέσει σε μια διαλυμένη ουσία, που απορροφά στο συγκεκριμένο μήκος κύματος, τότε μέρος της ακτινοβολίας αυτής απορροφάται από τη διαλυμένη ουσία. Η ελάττωση της έντασης της μονοχρωματικής ακτινοβολίας από  $I_0$  σε  $I$  είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του διαλύματος  $c$ , το πάχος της στιβάδας  $b$  και ένα συντελεστή  $a$ , δηλαδή ισχύει η παρακάτω σχέση:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = abc$$

Η εξίσωση αυτή εκφράζει το **νόμο των Beer-Lambert**, ο οποίος δείχνει πως η ένταση της δέσμης του μονοχρωματικού φωτός ελαττώνεται εκθετικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος και με το πάχος της στιβάδας. Η σχέση  $\log \frac{I_0}{I}$  καλείται **απορρόφηση** του διαλύματος. Επειδή το πάχος της στιβάδας διατηρείται σταθερό (1 cm), ο συντελεστής  $a$  εκφράζεται σύμφωνα με τη συγκέντρωση του διαλύματος. Δηλαδή, όταν η συγκέντρωση του διαλύματος εκφράζεται σε g/100 mL, ο συντελεστής  $a$  ονομάζεται **Ειδικός Συντελεστής Απορρόφησης** και συμβολίζεται με  $A^{1\%}_{1cm}$  ή  $E^{1\%}_{1cm}$  ( $b = 1$  cm). Όταν η συγκέντρωση του διαλύματος εκφράζεται σε mol/L, ο συντελεστής  $a$  καλείται **Μοριακός Συντελεστής Απορρόφησης** και συμβολίζεται με  $\epsilon$ ,  $A^M_{1cm}$ ,  $E^M_{1cm}$  ( $b = 1$  cm). Οι συντελεστές  $A^{1\%}_{1cm}$  και  $\epsilon$  συνδέονται με τη σχέση:

$$\epsilon = \frac{A^{1\%}_{1cm} \times M_r}{10}$$

όπου  $M_r$  είναι το μοριακό βάρος της ένωσης και εξαρτώνται από τη φύση της ουσίας, από το μήκος κύματος, από το χρησιμοποιούμενο διαλύτη και σε αρκετές περιπτώσεις από το pH του διαλύματος. Μικρές μεταβολές της θερμοκρασίας δεν επιφέρουν σημαντικές μεταβολές στην τιμή των  $A^{1\%}_{1cm}$  και  $\epsilon$ .

#### Απαραίτητες προϋποθέσεις για την ισχύ του νόμου Beer-Lambert:

- Η προσπίπτουσα ακτινοβολία να είναι μονοχρωματική
- Το πάχος της κυψελίδας να είναι ομοιόμορφο

- Η απορρόφηση να είναι ο μόνος μηχανισμός αλληλεπίδρασης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας – διαλυμένης ουσίας.

Οι σταθερές αναλογίας  $A^{1\%}_{1cm}$  και  $\epsilon$  χαρακτηρίζονται ως φυσικές σταθερές κάθε ουσίας και είναι ανεξάρτητες από τη συγκέντρωση και το πάχος του διαλύματος (διαστάσεις κυψελίδων). Έτσι, στην πράξη, δε χρησιμοποιούμε διαλύματα 1 g/100 mL ή 1 mol/L επειδή είναι μεγάλης συγκέντρωσης και απορροφούν πλήρως τη μονοχρωματική δέσμη της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Στη Φαρμακευτική Ανάλυση συνήθως παρασκευάζονται διαλύματα της τάξης των 0,01- 0,001 g/100 mL από τα οποία μετράται η απορρόφηση  $A$  του διαλύματος και εν συνεχεία υπολογίζεται αναλογικά ο Ειδικός ή ο Μοριακός Συντελεστής Απορρόφησης. Φαρμακευτικές ουσίες που έχουν Ειδικό Συντελεστή Απορρόφησης  $A^{1\%}_{1cm}$  από 0 – 5 θεωρούνται ως ασθενώς απορροφούσες ουσίες, από 5 – 50 ως μετρίως απορροφούσες και από 50 και πάνω θεωρούνται ως ισχυρώς απορροφούσες ουσίες.

Εδώ πρέπει να τονισθεί πως τα μόρια δρουν ως ανεξάρτητα χημικά σωματίδια και άσχετα προς τον αριθμό και τη φύση του καθενός. Στην περίπτωση λοιπόν μίγματος δύο ή περισσότερων φαρμακευτικών ουσιών, ο νόμος του Beer εκφράζεται με τη σχέση:

$$A_{ολ} = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n$$

όπου  $A_{ολ}$  είναι η ολική απορρόφηση του μίγματος  $A_1 + A_2 + A_3 \dots$ . Αν οι επιμέρους απορροφήσεις των απορροφούντων φαρμακευτικών ουσιών,  $A_{1(1)}, A_{1(2)}, A_{1(3)}, A_{1(n)}$  οι ειδικοί συντελεστές απορρόφησης κάθε ουσίας,  $b$  το πάχος της στιβάδας,  $C_1, C_2, C_3, C_n$  οι συγκεντρώσεις των διαφόρων ουσιών στο διάλυμα.

Στην πράξη είναι μάλλον αδύνατη η μέτρηση των εντάσεων της προσπίπτουσας ακτινοβολίας  $I_0$  και της εξερχόμενης ακτινοβολίας  $I$  (μετά τη διέοδο του διαλύματος). Βασική δυσκολία για τη μέτρηση των εντάσεων  $I, I_0$  θεωρούνται οι κυψελίδες στα τοιχώματα των οποίων συμβαίνει ανάκλαση ή απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Επιπλέον, όταν η ίδια ουσία αποτελείται από μακρομόρια προκαλείται σκεδασμός του φωτός που έχει ως συνέπεια την ελάττωση της έντασης της ακτινοβολίας. Για το λόγο αυτό, στις μετρήσεις χρησιμοποιείται και τυφλό δείγμα (που περιέχει μόνο διαλύτη) και συγκρίνεται η ένταση της ακτινοβολίας που διέρχεται δια μέσου του υπό εξέταση διαλύματος με εκείνη που διέρχεται από το τυφλό, οπότε ισχύει η σχέση για την απορρόφηση του διαλύματος:

$$A \approx \log \frac{I_{τυφλο}}{I_{ουσία}} \approx \log \frac{I_0}{I} \approx A^{1\%}_{1cm} \cdot b \cdot c$$

Επομένως από τις εξισώσεις  $\log \frac{I_0}{I} = abc$  και  $\epsilon = A^{1\%}_{1cm} \times M_r / 10$  είναι δυνατόν να υπολογισθεί η συγκέντρωση ενός διαλύματος με βάση τη μετρηθείσα απορρόφηση  $A$ , του πάχους της στιβάδας του διαλύματος που πάντα είναι ίσο με 1cm και του Ειδικού ή Μοριακού Συντελεστή Απορρόφησης.

Η πρώτη προσέγγιση Ποσοτικής Φασματοφωτομετρικής Ανάλυσης που αναπτύχθηκε παραπάνω με τη χρήση της σχέσης  $A = abc$  παρουσιάζει το εξής μειονέκτημα: οι τιμές του συντελεστή απορρόφησης ( $a$ ) για μια

φαρμακευτική ουσία μπορεί να διαφέρουν μεταξύ τους, αφού ενδέχεται να υπολογίστηκαν με διαφορετικούς τύπους φασματοφωτομέτρων, διαφορετικού εύρους σχισμής και κάτω από διαφορετική τάση ρεύματος κ.λ.π. Το αποτέλεσμα είναι οι τιμές του  $\alpha$  που αναφέρονται στη βιβλιογραφία να διαφέρουν μεταξύ τους. Τη δυσκολία αυτή αντιμετωπίζει η δεύτερη μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού, σύμφωνα με την οποία η απορρόφηση  $A$  μιας ουσίας είναι γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσης  $C$ , οι απορροφήσεις  $A_1, A_2$  δύο διαλυμάτων της ίδιας ουσίας και συγκέντρωσης  $C_1, C_2$  αντίστοιχα συνδέονται με τη σχέση:

$$\frac{A_1}{A} = \frac{C_1}{C_2}$$

Με τη σχέση αυτή μπορούμε να υπολογίσουμε την ποσότητα μιας ουσίας που περιέχεται σε ένα άγνωστο διάλυμα. Έτσι, αν,  $C_2$  είναι η συγκέντρωση της ουσίας στο άγνωστο διάλυμα τότε:

$$C_2 = \frac{A_1}{A} \cdot C_1$$

Η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί της πρώτης μεθόδου γιατί παίρνουμε αξιόπιστα αποτελέσματα αφού τα  $A_1$  και  $A_2$  καταγράφονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

Η μέθοδος που παρέχει τη μεγαλύτερη δυνατή αξιοπιστία στον ποσοτικό προσδιορισμό μιας δραστικής ουσίας σε ένα άγνωστο δείγμα θεωρείται αυτή της χάραξης καμπύλης αναφοράς. Για την ανάπτυξη της τεχνικής απαιτείται προηγουμένως η προετοιμασία μιας σειράς προτύπων διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων της υπό προσδιορισμό δραστικής η οποία βρίσκεται σε καθαρή μορφή.

Η μέθοδος της χάραξης καμπύλης αναφοράς, γνωστής και σαν *ευθεία παλινδρόμησης* (regression line), στηρίζεται στη γραμμική συσχέτιση της συγκέντρωσης ( $X$ ) και της απορρόφησης ( $\Psi$ ) της ουσίας σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση.

$$\Psi = \beta x + \alpha$$

όπου  $\beta$  η κλίση (slope) η οποία καθορίζει την ευαισθησία της μεθόδου και δηλώνει το λόγο μεταβολής απορρόφησης δια της μεταβολής συγκέντρωσης.

Η τομή  $\alpha$  (intercept) είναι η απόσταση του σημείου τομής της καμπύλης απ' την αρχή των αξόνων. Η τομή  $\alpha$  αναφέρεται στο πειραματικό σφάλμα που μπορεί να έχει μια μέθοδος και θεωρητικά πρέπει να είναι ίση με 0.

Ο **συντελεστής συσχέτισης  $r$**  (correlation coefficient) δείχνει πόσο καλή συσχέτιση υπάρχει μεταξύ των τιμών απορρόφησης και συγκέντρωσης. Μια καμπύλη αναφοράς θεωρείται ιδανική όταν η τιμή του  $r$  πλησιάζει τη μονάδα και ικανοποιητική για τιμές  $0,95 < r < 0,99$  ενώ τιμές  $r > 0,99$  δηλώνουν πολύ καλή γραμμικότητα.

Για την αντικειμενική χάραξη της καλύτερης καμπύλης (ευθείας) συνήθως εφαρμόζεται η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων, που βασίζεται στην αρχή ότι καλύτερη καμπύλη είναι εκείνη για την οποία το άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων είναι το ελάχιστο.

Τα **πλεονεκτήματα** αυτής της μεθόδου είναι:

- Ακρίβεια (η συγκέντρωση υπολογίζεται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων ή γραφικά)
- Επαναληψιμότητα
- Έχουμε ευθεία γραμμή οπότε και γραμμική εξάρτηση
- Καταδεικνύει ποια είναι η περιοχή μέσα στην οποία υπάρχει εξάρτηση της συγκέντρωσης από την απορρόφηση
- Επειδή κάνουμε χρήση του συντελεστή αραίωσης δεν είναι αναγκαία η λήψη μικροποσοτήτων

Τα **μειονεκτήματα** αυτής είναι τα εξής:

- Το δείγμα πρέπει να είναι πανομοιότυπο με τα πρότυπα διαλύματα, γιατί τα τυχόν έκδοχα μπορεί να αλλοιώσουν την απορρόφηση
- Παίρνουμε το δείγμα πάντα κατά προσέγγιση και ποτέ ακριβή ποσότητα.

Αν η ελεγχόμενη ουσία συνυπάρχει στο τελικό προς ανάλυση διάλυμα με άλλη ουσία της οποίας η απομάκρυνση δεν ήταν δυνατή τότε υπάρχουν τρεις δυνατότητες:

**1)** Η υπό ανάλυση δραστική ουσία μπορεί να μετατραπεί με κατάλληλο αντιδραστήριο σε άλλη ουσία παράγωγο, που απορροφά ισχυρά συνήθως σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Η αντίδραση ονομάζεται **παραγωγοποίηση** (derivatization) και μπορεί να είναι συμπλοκομετρική διαζώτωση κ.ά. Η ύπαρξη άλλης ουσίας στο τελικό προς ανάλυση διάλυμα δεν είναι ο μόνος λόγος για το σχηματισμό παραγώγου αλλά και η αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου πολλές φορές επιβάλλει την ανάγκη δημιουργίας παραγώγου. Για το σχηματισμό του παραγώγου πρέπει να έχουμε υπόψη μας τα παρακάτω:

- Το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης που χρησιμοποιείται θα πρέπει να αντιδρά εκλεκτικά και ποσοτικά με την προσδιοριζόμενη ουσία. Να είναι σταθερό, να μην απορροφά στην περιοχή απορρόφησης του παραγώγου. Συνήθως, υπολογίζεται η ποσότητα του αντιδραστηρίου που πρέπει να χρησιμοποιηθεί γιατί περίσσεια ή ανεπάρκεια αυτού είναι δυνατόν να προκαλέσει αποκλίσεις από το νόμο του Beer.
- Το διαλυτικό μέσο που χρησιμοποιείται πρέπει να διαλύει άριστα τις ουσίες που πρόκειται να αντιδράσουν και εκείνες που προκύπτουν ώστε αφενός να αποφευχθεί καθίζηση και αφετέρου να δημιουργηθούν τέτοιες συνθήκες ώστε να προχωρήσει η αντίδραση σχηματισμού του παραγώγου εύκολα. Επειδή πολλά φαρμακευτικά μόρια, αντιδραστήρια και παράγωγα είναι δυσδιάλυτα στο νερό γι' αυτό χρησιμοποιείται οργανικός διαλύτης συνήθως μεθανόλη, αιθανόλη ή μίγμα νερού – οργανικού διαλύτη.
- Η μέτρηση της απορρόφησης του τελικού διαλύματος (που περιέχει το προϊόν της αντίδρασης και το παράγωγο) πρέπει να γίνει κάτω από διαφορετικά pH ώστε να καθοριστεί μια βέλτιστη περιοχή τιμών PH. Οι διαφορετικές τιμές του pH επιτυγχάνονται με την προσθήκη ρυθμιστικών διαλυμάτων. Εδώ πρέπει να τονισθεί πως η προσθήκη του αντιδραστηρίου γίνεται νωρίτερα από την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος. Διαφορετικά, είναι πιθανόν να υπάρξουν τέτοιες συνθήκες που θα εμποδίσουν το σχηματισμό παραγώγου.

- Ο σχηματισμός παραγώγου πρέπει να παράγεται σε εύλογο χρονικό διάστημα αλλά προπαντός, πρέπει να είναι σταθερή η θερμοκρασία του περιβάλλοντος για μια χρονική περίοδο τουλάχιστον, ώστε η μέτρηση της απορρόφησης A να γίνεται και με άνεση και να τηρούνται οι άριστες συνθήκες για την ακρίβεια της μεθόδου.

**2)** Για την απαλλαγή της δραστηκής από την παράσιτο απορρόφηση μπορεί να γίνει η μέτρηση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, εφόσον βέβαια επιτρέπει το φάσμα της υπό προσδιορισμό ουσίας.

**3)** Για την απαλλαγή από τις απορροφήσεις των εκδόχων και εφόσον βοηθάει η μοριακή δομή του φαρμάκου μπορεί να χαραχτεί καμπύλη αναφοράς λαμβάνοντας σαν απορρόφηση το ΔΑ αντί της απορρόφησης A. Δηλαδή να ληφθεί το φάσμα της πρότυπης αμιγούς δραστηκής ουσίας σε όξινο και κατόπιν σε αλκαλικό διάλυμα. Αν στο τελικό προς ανάλυση διάλυμα υπάρχει παράσιτος απορρόφηση η τιμή της ΔΑ παραμένει αμετάβλητη και το αποτέλεσμα είναι αξιόπιστο.

**4)** Να εφαρμοστεί μέθοδος εκχύλισης υγρού-υγρού, υγρού-στερεού ή η τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (solid phase extraction), η οποία επιτυγχάνεται με τη διαβίβαση διαλυτών σε μικροστήλες και επιτελείται με τη βοήθεια συρίγγων ή συσκευών κενού.

**5)** Με την εφαρμογή της προσθετικής μεθόδου.

**6)** Με την παραγωγή των φασμάτων μηδενικής τάξης μιας ουσίας σε φάσματα πρώτης, δευτέρας.....ν τάξης.

## **2. Πειραματική διαδικασία**

Πριν αρχίσει η ποσοτική ανάλυση μιας ουσίας με τη χρήση φασμάτων UV, πρέπει πρώτα να είναι γνωστό πως η ως προς εξέταση ουσία να απορροφάει στην περιοχή του υπεριώδους και το διάλυμα της να μην περιέχει προσμίξεις.

Επιγραμματικά τα στάδια μιας ποσοτικής φασματοφωτομετρικής ανάλυσης είναι τα εξής:

- 1)** Λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης της υπό εξέταση καθαρής ουσίας
- 2)** Επιλέγεται το κατάλληλο μήκος κύματος, συνήθως αυτό που είναι γνωστό ότι δε μπορεί να επικαλυφθεί από άλλες παραμέτρους (έκδοχα, αλλαγή διαλύτη, κτλ)
- 3)** Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα της ουσίας με διαφορετικές συγκεντρώσεις
- 4)** Λαμβάνονται τα φάσματα των πρότυπων διαλυμάτων
- 5)** Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς (διάγραμμα απορρόφησης-συγκέντρωσης)
- 6)** Μετράται η απορρόφηση του άγνωστης συγκέντρωσης δείγματος και
- 7)** Βρίσκεται η συγκέντρωση του δείγματος από την καμπύλη αναφοράς



### Εργαστηριακά όργανα:

- 1) Φασματοφωτόμετρο Υπεριώδους πλήρους φάσματος
- 2) Φασματοφωτόμετρο Υπεριώδους με δυνατότητα επιλογής ενός μήκους κύματος
- 3) Αναλυτικός ζυγός με τουλάχιστον ένα δεκαδικό ψηφίο
- 4) Συσκευή υπερήχων

### Αναλυτικά σκεύη:

- Ένα ιγδίο με ύπερο
- Μια ογκομετρική φιάλη των 50, δύο των 100 mL, έναν ογκομετρικό κύλινδρο των 1000 mL και 5 φιάλες των 25 mL
- Σιφώνια πληρώσεως των 2, 3, 5, 10 mL
- Ροιγε βοηθητικά για την αναρρόφηση των διαλυμάτων
- Πλαστικό σταγονόμετρο για την προσθήκη σταγόνων διαλύτη και τη ρύθμιση της χαραγής στη φιάλη.
- Ποτήρι ζέσεως των 25, 50, 100 mL
- Συσκευή διήθησης δειγμάτων (acrodisc)
- Πλαστικές σύριγγες των 20 mL
- Ξύλινη σπάτουλα για τη ζύγιση των δισκίων και του NaOH
- Απορροφητικό χαρτί για τον καθαρισμό των σκευών
- Υαλογράφο
- 5 μικροί γυάλινοι περιέκτες για την αποθήκευση των δειγμάτων

### Διαλύματα:

#### 1) Υδατικό Διάλυμα NaOH 0.1N

Για την παρασκευή του διαλύματος NaOH 0.1N, να υπολογίσετε το συνολικό όγκο διαλύτη που απαιτείται για την εφαρμογή της άσκησης και να τον προσαρμόσετε στον αντίστοιχο όγκο φιάλης (ογκομετρικό κύλινδρο) που διατίθεται στο εργαστήριο. Στην συνέχεια να παρασκευάσετε το διάλυμα λαμβάνοντας υπόψη τα ακόλουθα  $A_{r(\text{Na})} = 23$ ,  $A_{r(\text{O})} = 16$ ,  $A_{r(\text{H})} = 1$

Αναφέρετε:

- 1) Συνολικό όγκο που παρασκευάσατε (με το απόθεμα) ..... mL
- 2) Ποσότητα NaOH που ζυγίσατε..... g
- 3) Περιγράψτε την παρασκευή του διαλύματος και δικαιολογήστε μαθηματικώς τις επιλογές σας.

### A. Παρασκευή Προτύπων Διαλυμάτων Φουροσεμίδης

Από το αρχικό διάλυμα «Α, Β, Γ, Δ» φουροσεμίδης που περιέχει.....mg δραστικής να μεταφέρετε με τη βοήθεια σιφωνίου πληρώσεως των.....mL, ποσότητα αντίστοιχη σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Αφού γίνει πλήρωση της φιάλης με διάλυμα NaOH 0.1N, να τη συμπληρώσετε μέχρι τη χαραγή (με τη βοήθεια

σταγονόμετρου) και να την ανακινήσετε καλά. Το διάλυμα αυτό θα αποτελέσει το Μητρικό Διάλυμα παρασκευής μιας σειράς προτύπων διαλυμάτων για τη χάραξη καμπύλης αναφοράς.

Από το μητρικό διάλυμα και με σιφώνια πλήρωσεως των 2, 3, 5, 10 mL να μεταφέρετε τους αντίστοιχους όγκους σε ογκομετρικές φιάλες των 25 mL. Ακολουθεί πλήρωση της φιάλης μέχρι τη χαραγή με διάλυμα NaOH 0.1N και ανακίνηση.

Να αναφέρετε τους συντελεστές αραιώσης των διαλυτών, ξεκινώντας τους υπολογισμούς από το αρχικό διάλυμα, καθώς και τις τελικές συγκεντρώσεις ( $\mu\text{g/mL}$ ) που προκύπτουν για κάθε ένα από τα πρότυπα διαλύματα ως ακολούθως:

**i) Πρότυπο διάλυμα που προκύπτει μετά από τελική αραιώση 2 mL στα 25 mL**

(A τρόπος) Συντελεστής αραιώσης.....

(όγκος φιάλης αραιώσης / όγκος σιφωνίου)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

(B τρόπος) Συντελεστής αραιώσης.....

(Συγκέντρωση αρχικού δείγματος/συγκέντρωση τελικού)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

Τελική συγκέντρωση.....

(Αρχική συγκέντρωση δείγματος Χ όγκος σιφωνίου/ όγκος φιάλης αραιώσης)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

**ii) Πρότυπο διάλυμα που προκύπτει μετά από τελική αραιώση 3 mL στα 25 mL**

(A τρόπος) Συντελεστής αραιώσης.....

(όγκος φιάλης αραιώσης / όγκος σιφωνίου)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

(B τρόπος) Συντελεστής αραιώσης.....

(Συγκέντρωση αρχικού δείγματος/συγκέντρωση τελικού)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

Τελική συγκέντρωση.....

(Αρχική συγκέντρωση δείγματος Χ όγκος σιφωνίου/ όγκος φιάλης αραίωσης)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

**iii) Πρότυπο διάλυμα που προκύπτει μετά από τελική αραίωση 5 mL στα 25 mL**

(Α τρόπος) Συντελεστής αραίωσης.....

(όγκος φιάλης αραίωσης / όγκος σιφωνίου)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

(Β τρόπος) Συντελεστής αραίωσης.....

(Συγκέντρωση αρχικού δείγματος/συγκέντρωση τελικού)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

Τελική συγκέντρωση.....

(Αρχική συγκέντρωση δείγματος Χ όγκος σιφωνίου/ όγκος φιάλης αραίωσης)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

**iv) Πρότυπο διάλυμα που προκύπτει μετά από τελική αραίωση 10 mL στα 25 mL**

(Α τρόπος) Συντελεστής αραίωσης.....

(όγκος φιάλης αραίωσης / όγκος σιφωνίου)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

(Β τρόπος) Συντελεστής αραίωσης.....

(Συγκέντρωση αρχικού δείγματος/συγκέντρωση τελικού)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

Τελική συγκέντρωση.....

(Αρχική συγκέντρωση δείγματος Χ όγκος σιφωνίου/ όγκος φιάλης αραίωσης)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

### **Β. Προετοιμασία δείγματος φουροσεμίδης σε δισκία**

Αφού λάβετε 3 δισκία, από το συνολικό βάρος τους ..... να υπολογίσετε το μέσο βάρος του ενός δισκίου. Στη συνέχεια να λιотριβήσετε επαρκώς τα δισκία στο ιγδίο, με τη βοήθεια του υπέρου, και να ζυγίσετε (σκαφίδιο ζύγισης) ποσότητα κόνεως περίπου ίση με .....mg. Γράψτε με ακρίβεια δεκαδικού ψηφίου την ποσότητα που ζυγίσατε.....

Μεταφέρετε ποσοτικά τη ζυγισθείσα ποσότητα κόνεως σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Αφού προσθέσετε περίπου 50 mL διαλύματος NaOH 0.1N στην ογκομετρική φιάλη του δείγματος να το τοποθετήσετε σε λουτρό υπερήχων για περίπου 10 min (ανακίνηση ανά 3 λεπτά). Όταν το δείγμα έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (με τη βοήθεια υδατόλουτρου) να συμπληρώσετε μέχρι τη χαραγή τη φιάλη με διάλυμα NaOH 0.1N και να την ανακινήσετε. Ακολουθεί μια αραίωση του δείγματος με σιφώνιο πλήρωσεως των.....mL σε ογκομετρική φιάλη των ..... mL και πλήρωση αυτής μέχρι τη χαραγή με διάλυμα NaOH 0.1N. Υπολογίστε το συντελεστή αραίωσης του τελικού δείγματος..... . Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις.

### **Γ. Μέτρηση απορροφήσεων στο φασματοφωτόμετρο Υπεριώδους**

1) Αφού μηδενίσετε το φασματοφωτόμετρο πλήρους φάσματος με το διαλύτη NaOH 0.1N, να υπολογίσετε την τιμή  $\lambda_{\max}$  της φουροσεμίδης λαμβάνοντας το πλήρες φάσμα της ουσίας.

**Σημείωση:** Για τη λήψη του φάσματος χρησιμοποιείτε ένα δείγμα από τα πρότυπα της καμπύλης αναφοράς.

2) Ρυθμίστε το «φασματοφωτόμετρο επιλογής ενός μήκους κύματος» στην τιμή  $\lambda_{\max}$  της φουροσεμίδης, που υπολογίσατε από πριν και αφού το μηδενίσετε, να λάβετε τις απορροφήσεις των ακόλουθων δειγμάτων.

Πρότυπο διάλυμα που προκύπτει μετά από τελική αραίωση **2 mL** στα **25 mL** (5 φορές)

1<sup>η</sup>..... 2<sup>η</sup>..... 3<sup>η</sup>.....4<sup>η</sup>.....5<sup>η</sup>.....

Πρότυπο διάλυμα που προκύπτει μετά από τελική αραίωση **3 mL** στα **25 mL**.....  
 Πρότυπο διάλυμα που προκύπτει μετά από τελική αραίωση **5 mL** στα **25 mL**.....  
 Πρότυπο διάλυμα που προκύπτει μετά από τελική αραίωση **10 mL** στα **25 mL**.....

**Απορρόφηση αγνώστου δείγματος**.....

#### Δ. Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

- Χαράξετε σε σύστημα ορθογωνίων αξόνων, την καμπύλη αναφοράς που προκύπτει από τα πρότυπα διαλύματα (Άξονας των «X» συγκεντρώσεις mg/mL, άξονας των «Ψ» απορροφήσεις). Στη συνέχεια βάση της καμπύλης αναφοράς που θα χαράξετε επίσης με τη βοήθεια του προγράμματος “Excel” (regression analysis) και της τιμής απορρόφησης του αγνώστου δείγματος να υπολογίσετε την τελική συγκέντρωση αυτού σε mg/ mL.

Ποια η περιεκτικότητα των δισκίων σε φουροσεμίδη ανά μέσο βάρος δισκίου; .....  
 Να αναφέρετε τις πράξεις.

- Να βρείτε βάση του προγράμματος “Excel” (regression analysis) τις τιμές που περιγράφουν την ευθεία παλινδρόμησης εφαρμόζοντας τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Η ευθεία είναι της μορφής  $\psi = \beta x + \alpha$  και οι τιμές που την περιγράφουν είναι:

Το  $\beta$ ..... η κλίση της ευθείας, δηλαδή η μεταβολή του  $\psi$  για μεταβολή του  $x$  κατά μια μονάδα.

Μεγάλη τιμή του  $\beta$  δηλώνει ότι η μέθοδος μας είναι πολύ ευαίσθητη

Το  $\alpha$ ..... είναι η τομή της ευθείας με τον άξονα των  $\psi$ . Δηλαδή είναι η τιμή του  $\psi$  για  $x = 0$ .

Ο συντελεστής συσχέτισης  $r$  (correlation coefficient)..... Είναι το μέτρο της καλής συσχέτισης των δύο μεταβλητών  $X, \Psi$  και η τιμή του είναι τόσο καλύτερη όσο πλησιέστερα προς τη μονάδα βρίσκεται.

- Να υπολογίσετε βάση της καμπύλης αναφοράς που προκύπτει από το πρόγραμμα Excel, την τιμή του ειδικού συντελεστή  $\epsilon$  απορρόφησης. Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις και τις μονάδες.

**Σημείωση:** Ο ειδικός συντελεστής απορρόφησης,  $\epsilon$ , δηλώνει την απορρόφηση που θα έχει μία ουσία σε συγκέντρωση 1% βάρος ανά όγκο (1 g / 100 mL).

- Από τις 5 τιμές απορρόφησης που πήρατε για το δείγμα **2 mL** στα **25 mL** να υπολογίσετε την τιμή της τυπικής απόκλισης (standard deviation) για μικρό αριθμό μετρήσεων ( $s$ ) που δίνεται από τον τύπο:

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

$N$  = ο αριθμός των μετρήσεων που έγιναν ( $N-1$  = οι βαθμοί ελευθερίας)

$\bar{x}$  = ο μέσος όρος των απορροφήσεων

**Σημείωση:** Η τιμή της τυπικής απόκλισης χρησιμοποιείται σαν μέτρο ελέγχου της επαναληπτικότητας μιας μεθόδου, δηλαδή δείχνει πόσο κοντά βρίσκονται μεταξύ τους τα αποτελέσματα μιας σειράς μετρήσεων. Η επαναληπτικότητα είναι τόσο μεγαλύτερη, όσο μικρότερη είναι η διασπορά των αποτελεσμάτων.

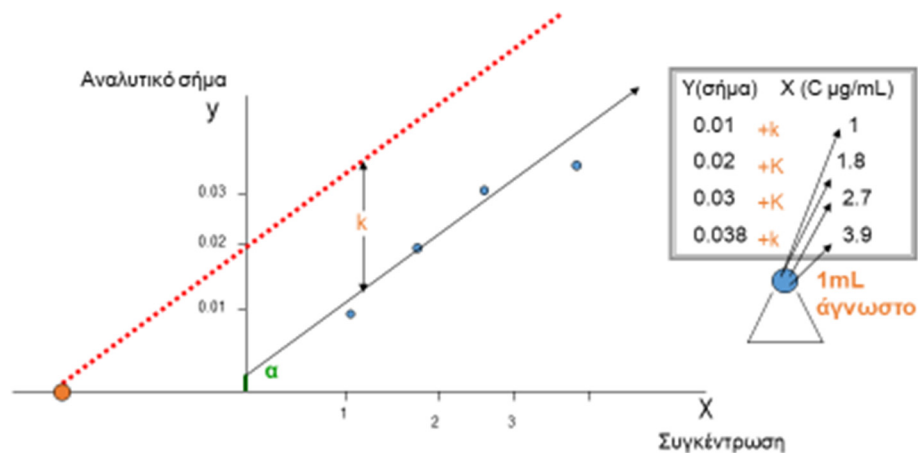
## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 7<sup>η</sup>

### Μέθοδος προσθήκης γνωστών ποσοτήτων (standard addition)

#### 1. Εισαγωγή

Χρησιμοποιείται όταν είναι αδύνατη η παρασκευή προτύπων διαλυμάτων παρόμοιας συστάσεως με τα διαλύματα των αγνώστων, είτε διότι είναι άγνωστη η σύστασή τους ή ποικίλλει από δείγμα σε δείγμα, είτε επειδή υπάρχουν ουσίες που παρεμποδίζουν. Κατά τη μέθοδο αυτή, προστίθεται σταθερή ποσότητα του αγνώστου δείγματος σε διάλυμα τυφλού και σε σειρά προτύπων διαλυμάτων της προσδιοριζόμενης ουσίας, ώστε να προκαλέσει αύξηση της συγκεντρώσεως της.

### Προσθετική μέθοδος



$y = a + bx$  (κανονική καμπύλη αναφοράς που περιέχει το σφάλμα μεθόδου)

$y = k + a + bx$  (καμπύλη προσθετικής που περιέχει και το σφάλμα της μεθόδου)

$y = k + bx$  (καμπύλη προσθετικής δίχως το σφάλμα) για  $y=0$  έχουμε  $0 = k + bx$  ή  $x = -k/b$

#### 2. Πειραματική διαδικασία

Προσδιορισμός σε άγνωστο δείγμα της δραστικής ουσίας ..... με τη μέθοδο προσθήκης προτύπου. Με τη βοήθεια του φασματοφωτομέτρου επιλογής ενός μήκους κύματος, να μετρήσετε τις απορροφήσεις των παραπάνω διαλυμάτων και να τις καταγράψετε στον ακόλουθο πίνακα.

Δείγμα	Απορροφήσεις	ΔC (συγκεντρώσεις)

### Ερωτήσεις

Η ουσία που προσδιορίστηκε ήταν.....

Σε ποιο μήκος κύματος μετρήσατε; Μήκος κύματος.....

Η εξίσωση που περιγράφει την καμπύλη αναφοράς ήταν .....

Το  $r^2$  ήταν.....

Ποια η συγκέντρωση του αγνώστου δείγματος. Συγκέντρωση.....

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 8<sup>η</sup>

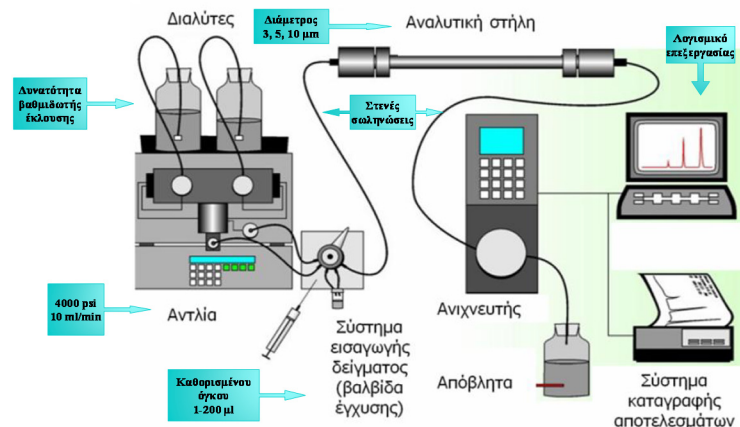
Προσδιορισμός περιεκτικότητας παρακεταμόλης και καφεΐνης σε αναβράζοντα δισκία με χρωματογραφία υγρού (HPLC)

### 1. Εισαγωγή

Όπως προαναφέρθηκε και στο εισαγωγικό μέρος, η χρωματογραφία είναι μία τεχνική διαχωρισμού στην οποία τα συστατικά που πρόκειται να διαχωριστούν είναι κατανεμημένα μεταξύ δύο φάσεων, εκ των οποίων, η μια είναι στατική και καλείται **στατική φάση**, ενώ η δεύτερη κινείται με καθορισμένη κατεύθυνση και ονομάζεται **κινητή φάση**. Ο διαχωρισμός των μιγμάτων επιτυγχάνεται με κατανομή των προσδιοριζόμενων συστατικών μεταξύ των δύο φάσεων και βασίζεται στις διαφορές που υπάρχουν σε ορισμένες ιδιότητες των συστατικών αυτών όπως είναι η λιποφιλικότητα, η πολικότητα, το ηλεκτρικό φορτίο (για τυχόν φορτισμένες ενώσεις) και το μέγεθος των μορίων.

Μία τυπική διάταξη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συνίσταται από τα παρακάτω τμήματα:

- Περιέκτες για τη τοποθέτηση των διαλυτών της κινητής φάσεως
- Αντλίες προώθησης των διαλυτών
- Σύστημα αυτόματης δειγματοληψίας και έγχυσης
- Χρωματογραφική στήλη
- Ανιχνευτής
- Σύστημα καταγραφής του χρωματογραφήματος, επεξεργασίας δεδομένων και ελέγχου της λειτουργίας της αναλυτικής διάταξης
- Σωληνώσεις στενής διαμέτρου για τη μεταφορά των διαλυτών και των προσδιοριζόμενων ουσιών ανάμεσα στα διάφορα τμήματα της χρωματογραφικής διάταξης
- Περιέκτης για τη συλλογή των αποβλήτων



Σχήμα 14. Τυπική διάταξη συστήματος χρωματογραφίας υγρού



## 2. Πειραματική διαδικασία

### Αναλυτικά σκεύη:

- Ιγδίο με ύπερο
- Δυο ογκομετρικές φιάλες των 50, και δυο των 100 mL
- Σιφώνια πληρώσεως των 2 mL
- Ροίρες για την αναρρόφηση των διαλυμάτων
- Πιπέτα Pasteur για την ρύθμιση της χαραγής στη φιάλη
- Ποτήρι ζέσεως των 50 mL
- Απορροφητικό χαρτί για τον καθαρισμό των σκευών
- Υαλογράφο

### Οργανολογία

Ο χρωματογραφικός προσδιορισμός της ..... και ..... πραγματοποιείται με τη βοήθεια συστήματος χρωματογραφίας υγρού υψηλής πίεσης (HPLC) της εταιρείας Shimadzu, αποτελούμενο από δύο αντλίες (LC-20AD), απαερωτή (DGU-14A), σύστημα αυτόματης δειγματοληψίας SIL-10AD και φούρνο στήλης (CTO-6A).

Για τον έλεγχο της λειτουργίας του συστήματος HPLC και για την επεξεργασία των λαμβανόμενων χρωματογραφημάτων και αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται το λογισμικό LC-Solution. Η ανάλυση λαμβάνει χώρα σε στήλη αντίστροφής φάσεως τύπου .....

Ο ανιχνευτής υπεριώδους με συστοιχία φωτοδιόδων (SPD-M20A) ρυθμίστηκε (με τη βοήθεια του λογισμικού LC Solution) ώστε να ανιχνεύει τις ενώσεις..... και..... στο μήκος κύματος ..... nm.

### Παρασκευή διαλυμάτων

Παρασκευάστε τα παρακάτω διαλύματα

- *Παρασκευή προτύπου διαλύματος καφεΐνης*

Μεταφέρετε περίπου ..... mg πρότυπης ουσίας καφεΐνης (καθαρότητας 99 %) σε μια ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Προσθέστε περίπου 10 mL μεθανόλης και ανακινήστε ή τοποθετήστε το διάλυμα σε λουτρό υπερήχων μέχρι πλήρους διαλυτοποίησης του στερεού. Συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή με νερό. (Συγκέντρωση  $C_{CAF,stock} = \dots\dots\dots \mu\text{g/mL}$ ).

- *Παρασκευή προτύπου μίγματος παρακεταμόλης-καφεΐνης (working reference standard, WRS)*

Μεταφέρετε περίπου ..... mg πρότυπης ουσίας παρακεταμόλης (καθαρότητας 99 %) σε μια ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Προσθέστε περίπου 10 mL μεθανόλης και ανακινήστε ή τοποθετήστε το διάλυμα σε λουτρό υπερήχων μέχρι πλήρους διαλυτοποίησης του στερεού. Στην συνέχεια, με τη βοήθεια σιφωνίου προσθέστε 10 mL από το πρότυπο διάλυμα καφεΐνης συγκέντρωσης  $C_{CAF,stock}$  και συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή με νερό. ( $C_{PAR} = \dots\dots\dots \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $C_{CAF} = \dots\dots\dots \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

- *Παρασκευή κινητής φάσης A*

Μεταφέρετε 1 mL φορμικού οξέος σε μια ογκομετρική φιάλη του 1 L και αραιώστε μέχρι τη χαραγή με νερό HPLC καθαρότητας. (Η συγκέντρωση του φορμικού οξέος είναι .....% v/v).

### Συνθήκες διαχωρισμού

Η κινητή φάση αποτελείται από δυο διαλύτες (κινητή φάση Α, κινητή φάση Β). Η κινητή φάση Α είναι ένα υδατικό διάλυμα φορμικού οξέος συγκέντρωσης..... % v/v, ενώ η κινητή φάση Β είναι..... Η ταχύτητα ροής του διαχωρισμού είναι..... και έχει σταθερή τιμή για όλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Ο εγχύομενος όγκος του δείγματος ( $V_{inj}$ ) έχει ρυθμιστεί στα ..... μL και η θερμοκρασία της στήλης στους..... °C. Ο χρόνος ανάλυσης είναι ..... min.

### Ανάλυση πρότυπου μίγματος παρακεταμόλης-καφεΐνης

Πραγματοποιήστε 6 επαναλαμβανόμενες αναλύσεις του μίγματος και με τη βοήθεια του λογισμικού του οργάνου καταγράψτε τα εμβαδά κορυφής της παρακεταμόλης και καφεΐνης. Συμπληρώστε τον παρακάτω πίνακα με τη βοήθεια ενός στατιστικού λογισμικού (π.χ. MS Excel).

No	Παρακεταμόλη		Καφεΐνη	
	Εμβαδό κορυφής ( $A_{WRS}$ )	Χρόνος συγκράτησης $R_t$ (min)	Εμβαδό κορυφής ( $A_{WRS}$ )	Χρόνος συγκράτησης $R_t$ (min)
1				
2				
3				
4				
5				
6				
μέρος όρος (AVG)				
τυπική απόκλιση (SD)				
σχετική τυπ. απόκλιση (% RSD)				

Επίσης, να υπολογιστούν οι παρακάτω χρωματογραφικοί παράμετροι με τη βοήθεια του λογισμικού επεξεργασίας των χρωματογραφημάτων:

- Διαχωριστική ικανότητα  $R_s$  (μεταξύ των κορυφών των δυο ενώσεων): .....
- Ασυμμετρία κορυφής  $A_{s(Par)}$ : .....,  $A_{s(Caf)}$ : .....
- Αριθμός των θεωρητικών πλακών  $N_{(Par)}$ : .....,  $N_{(Caf)}$ : .....

### Ανάλυση δειγμάτων

Μετρήστε το μέσο όρο ( $\bar{W}$ , mg) δέκα δισκίων ( $n = 10$ ). Λειτουργίστε τα και μεταφέρετε περίπου.....(750 mg) ( $W_{sample}$ , mg) δείγματος με μια ογκομετρική φιάλη των 50 mL ( $V_{flask}$ , mL). Προσθέστε περίπου 30 mL νερό και αναδεύστε μέχρι πλήρους διαλυτοποίησης. Συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή με τον ίδιο διαλύτη. Αραιώστε 2 mL από το προκύπτον διάλυμα σε μια ογκομετρική φιάλη των 50 mL με νερό και πραγματοποιήστε 3 αναλύσεις.

Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιείτε τους παρακάτω τύπους. Γράψτε αναλυτικά τους υπολογισμούς.

$$1) C_{sample}(\mu\text{g/mL}) = \frac{A_s}{A_{STD}} \times C_{STD} \times \frac{P_{STD}}{100}$$

όπου  $A_s$  : ο μέσος όρος των εμβαδών κορυφής του δείγματος ( $n = 3$ )

$A_{STD}$  : ο μέσος όρος των εμβαδών κορυφής της κάθε ένωση στο WRS ( $n = 6$ )

$C_{STD}$  : η συγκέντρωση του WRS ( $\mu\text{g/mL}$ )

$P\%$  : η εκατοστιαία καθαρότητα της πρότυπης ένωσης

$$2) \text{Περιεκτ. σε δραστική/δισκίο (mg)} = \frac{C_{sample} \times DF \times V_{flask} \times \bar{W}}{W_{sample} \times 1000}$$

όπου  $DF$  : συντελεστής αραιώσης του δείγματος (dilution factor)

$$3) \text{Assay \%} = \frac{\text{Περιεκτ.σε δραστική/δισκίο (mg)}}{\text{Αναγραφόμενη ποσότητα / δισκίο (mg)}} \times 100$$

## **Βιβλιογραφία**

- 1) **Techniques and Practice of Chromatography**, Raymond P. W. Scott, Marcel Dekker Inc. New York, 1995
- 2) **Liquid chromatography | Normal Phase**, P. Jandera, in *Encyclopedia of Analytical Science* (Third Edition) (2013) 162-173
- 3) **Liquid Chromatography | Overview**, P.N. Nesterenko, M. D. Palamareva, in *Encyclopedia of Analytical Science* (Third Edition) (2019) 174-181
- 4) **Liquid Chromatography | Reversed Phase**, A. Soliven, S. Kayillo, R.A. Shalliker, in *Encyclopedia of Analytical Science* (Third Edition) (2013) 238-243
- 5) **Liquid Chromatography | Principles**, in *Encyclopedia of Analytical Science* (Third Edition) (2013) 231-237
- 6) **Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry**, E. Stauffer, J. A. Dolan, R. Newman, in *Fire Debris Analysis*, Academic Press, 2008, pp 235-293
- 7) **Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης**, D.A. Skoog, F. James holler, T.A. Nieman, Ελληνική έκδοση, εκδόσεις Κωσταράκης 2005
- 8) **Φαρμακευτική Ανάλυση 3<sup>η</sup> έκδοση**, D.G. Watson, Ελληνική Έκδοση, εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε.
- 9) **Ενόργανη Χημική Ανάλυση**, Ι. Παπαδογιάννης, Β. Σαμανίδου, Εκδόσεις Πήγασος, 2001
- 10) [http://www.waters.com/waters/en GR/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\\_GR](http://www.waters.com/waters/en_GR/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_GR)
- 11) <https://phenomenex.blog/2017/06/13/hplc-info/>