



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ανάπτυξη Νέων Αναλυτικών Μεθόδων με την Τεχνική της HPLC –
ELSD για τον Προσδιορισμό Φαρμακευτικών Ουσιών**

ΓΕΩΡΓΙΑ Χ. ΚΩΝΣΤΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ, M.Sc.

ΑΘΗΝΑ

ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2013

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάπτυξη Νέων Αναλυτικών Μεθόδων με την Τεχνική της HPLC –
ELSD για τον Προσδιορισμό Φαρμακευτικών Ουσιών

ΓΕΩΡΓΙΑ Χ. ΚΩΝΣΤΑ

ΑΜ: 102515

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΜΙΧΑΗΛ ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

1. Μιχαήλ Κουππάρης, Καθηγητής ΕΚΠΑ
2. Τζούλια Άττα – Πολίτου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ
3. Ελένη Αρχοντάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Μιχαήλ Κουππάρης, Καθηγητής ΕΚΠΑ
2. Αντώνιος Καλοκαιρινός, Καθηγητής ΕΚΠΑ
3. Κωνσταντίνος Ευσταθίου, Καθηγητής ΕΚΠΑ
4. Τζούλια Άττα – Πολίτου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ
5. Αναστάσιος Οικονόμου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ
6. Ελένη Αρχοντάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ
7. Νικόλαος Θωμαΐδης, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 22/04/2013

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή εξετάζεται η δυνατότητα χρήσης του γενικού εξατμιστικού ανιχνευτή σκέδασης ακτινοβολίας (ELSD) στο χρωματογραφικό προσδιορισμό μερικών από τα πιο κοινά κατιόντα που απαντώνται σε φαρμακευτικά σκευάσματα, βιολογικά υγρά και περιβαλλοντικά δείγματα. Στο πρώτο μέρος, μελετάται η επίδραση της ατομικής μάζας των ιόντων στην απόκριση του ανιχνευτή, όπως αυτή εκφράζεται από την εξίσωση $A = a \cdot m^b$, σε σχέση με τη σύσταση της κινητής φάσης. Ο τρόπος μεταβολής των σταθερών a και b για τα κατιόντα των I_A και II_A ομάδων του Περιοδικού Πίνακα, μελετάται με διάταξη FIA-ELSD για τέσσερις διαφορετικούς διαλύτες και τα αποτελέσματα εφαρμόζονται στους προσδιορισμούς των μετάλλων στα επόμενα κεφάλαια.

Ο προσδιορισμός του λιθίου επιτυγχάνεται με δύο τρόπους: με εφαρμογή μηχανισμού ιοντικών ζευγών με στήλη C_{18} και με εφαρμογή μηχανισμού κατιονανταλλαγής σε στήλη CS_{14} . Οι μέθοδοι που αναπτύσσονται, χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό αλάτων του Li σε δύο φαρμακευτικά σκευάσματα με πολύ καλά αποτελέσματα, καθώς επίσης και σε δείγματα πλάσματος αίματος και ούρων.

Ακολουθεί ο προσδιορισμός του αργιλίου, ως $Al(OH)_3$ σε μίγμα με $Mg(OH)_2$, με μηχανισμό ιοντικών ζευγών και στήλη C_{18} . Η μέθοδος που αναπτύσσεται, εφαρμόζεται σε τρία σκευάσματα, δύο μασώμενα δισκία και ένα γαλακτώδες εναιώρημα, η διαφορετική φαρμακοτεχνική μορφή των οποίων επιβάλλει και διαφοροποιήσεις στην κατεργασία των δειγμάτων. Γίνονται δοκιμές διαλυτοποίησης με οξέα, ωστόσο η πιθανή ανομοιογένεια των σκευασμάτων και τα προβλήματα κατά τη διαδικασία δειγματοληψίας δίνουν αποτελέσματα με μεγάλες διακυμάνσεις.

Στο επόμενο κεφάλαιο επιχειρείται ο προσδιορισμός του ψευδαργύρου σε ενέσιμο εναιώρημα ινσουλίνης, με μηχανισμό ιονανταλλαγής και μηχανισμό ιοντικών ζευγών. Προσδιορίζεται ο ολικός Zn , αλλά και ο ελεύθερος Zn συμφωνα με τις απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας. Ταυτόχρονα, γίνεται σύγκριση της προτεινόμενης μεθόδου με τη μέθοδο αναφοράς, AAS, και παρόλο που η μέθοδος HPLC-ELSD υστερεί σημαντικά σε ευαισθησία, δίνει για το συγκεκριμένο σκεύασμα εξίσου αξιόπιστα αποτελέσματα.

Στο τελευταίο κεφάλαιο επιχειρείται ο προσδιορισμός των ιόντων που απαντώνται στο πόσιμο νερό. Στο πρώτο μέρος του κεφαλαίου αναπτύσσεται μέθοδος προσδιορισμού των κατιόντων Na^+ , K^+ , Mg^{2+} και Ca^{2+} με χρήση κατιονανταλλακτικής στήλης και εφαρμόζεται στο αποσταγμένο νερό που παράγεται στο εργαστήριο, σε τρία δείγματα εμφιαλωμένων μεταλλικών νερών του εμπορίου και στο νερό του δικτύου της ΕΥΔΑΠ. Εφαρμόζεται, ακόμη, σε σκεύασμα φυσιολογικού ορού για ενδοφλέβια χορήγηση. Στο δεύτερο μέρος του τελευταίου κεφαλαίου αναπτύσσεται μέθοδος προσδιορισμού των ιόντων $Cr(III)$ - $Cr(VI)$ που απαντώνται στο νερό, κυρίως ως αποτέλεσμα της βιομηχανικής δραστηριότητας. Για τον προσδιορισμό των δύο συστατικών χρησιμοποιείται στήλη κατιονανταλλαγής και σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης. Η μέθοδος εφαρμόζεται στο πόσιμο νερό από δύο αστικά κέντρα διαφορετικού μεγέθους και υποδομών. Η προτεινόμενη HPLC-ELSD μέθοδος, συγκρινόμενη με τη μέθοδο αναφοράς, AAS, είναι μικρότερης

ευαισθησίας, επιτυγχάνει όμως τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των δύο ειδών ενώσεων του χρωμίου και μπορεί να εφαρμοστεί, είτε σε πολύ επιμολυσμένα δείγματα, είτε σε δείγματα που περιέχουν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις των εν λόγω στοιχείων, μετά από κατεργασία προσυγκέντρωσης.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Αναλυτική Χημεία – Φαρμακευτική Ανάλυση

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: HPLC – ELSD, μέταλλα, φαρμακευτική ανάλυση, περιβαλλοντική ανάλυση, κλινική ανάλυση

ABSTRACT

The subject of the Thesis is to investigate the use of the quasi-universal Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) in the determination of some common metals found in pharmaceuticals, biological and environmental samples. In an attempt to study the effect of relative atomic mass (A_r) on the detector's response A (equation $A = \alpha \cdot m^b$), in relation to the composition of the mobile phase, the cations of I_A and II_A groups of the Periodic Table are chosen. The study uses a FIA–ELSD setup without separation column and four different carrier solvents. The obtained observations are used for the determination of the metals in the following chapters.

Lithium is the first of the cations to be studied. There have been developed and validated two LC-ELSD methods for the determination of lithium salts in two pharmaceutical formulations, blood plasma and urine. The first method uses a C_{18} separation column with an ion-pair reversed phase mechanism, while the second one uses a cation-exchange column CS14. Both methods show good linearity and sensitivity.

Aluminum, in the form of $Al(OH)_3$, is determined by using an ion-pair mechanism. The method is applied in three formulations, two chewable tablets and an oral suspension. There have been developed two methods, by applying several dissolution protocols, due to the differences in the pharmaceuticals' composition. The results show remarkable fluctuations, due to the heterogeneity of the sample and the sampling procedure.

In the following chapter, there have been developed two methods, one by using a cation-exchange and the other by using a C_{18} separation column, for the determination of zinc ions in an injectable insulin suspension. The amount of total and free zinc, are determined, and the results comply with European Pharmacopoeia specifications. Comparison of the proposed method with the reference method, AAS, shows that although the HPLC-ELSD method lacks sensitivity, can give reliable results for the injectable insulin formulation.

In the last chapter there have been developed methods for the determination of ions in drinking water. Na^+ , K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} ions are determined with the use of a cation-exchange column. The method is applied in HPLC laboratory-water, in commercial brands of mineral water, in samples from the main water supply and in an injectable formulation of saline physiological serum. There has also been developed a method for the determination of $Cr(III)$ - $Cr(VI)$, two pollutants found in drinking water, with the use of a cation-exchange column and a gradient elution program. Method is applied in water samples from the water supply of two different urban centers. Comparison of the HPLC-ELSD method with the official AAS method shows that the proposed one is much less sensitive but determines simultaneously $Cr(VI)$ and $Cr(III)$ in one single run without tedious pretreatment of the samples. Thus could be satisfactorily used in heavily polluted water or in samples after preconcentration.

SUBJECT AREA: Analytical Chemistry – Pharmaceutical Analysis

KEYWORDS: HPLC – ELSD, metals, pharmaceutical analysis, environmental analysis, clinical analysis

στους γονείς μου...

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε εξ' ολοκλήρου στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου της Αθήνας.

Προς τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Μιχάλη Κουππάρη, ο οποίος είχε την ευθύνη της ανάθεσης του θέματος της εργασίας και της επίβλεψής μου, θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τις γνώσεις, αλλά και για τη στήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής Παρακολούθησης κ.κ. Τζούλια Άττα-Πολίτου και Ελένη Αρχοντάκη που μου πρόσφεραν βοήθεια και χρήσιμες πληροφορίες και υποδείξεις όταν αυτό ήταν απαραίτητο.

Ευχαριστίες οφείλω και στα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για τις διορθώσεις τους και τις καίριες ερωτήσεις, καθώς και για τις υποδείξεις τους στη βελτίωση του κειμένου της διατριβής μου.

Θέλω, τέλος, να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τους φίλους που με στήριξαν ηθικά σε όλη τη διάρκεια της εργασίας μου και κυρίως τους γονείς μου που στάθηκαν δίπλα μου, προσφέροντας ανεκτίμητη συμπαράσταση και στους οποίους αφιερώνω αυτή μου την προσπάθεια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΣΚΕΔΑΣΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ.....	25
1.1. Εισαγωγή.....	25
1.2. Γενικά για την Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	26
1.3. Οργανολογία HPLC.....	27
1.4. Ανιχνευτές της Υγροχρωματογραφίας.....	31
1.5. Εξατμιστικός Ανιχνευτής Σκέδασης Ακτινοβολίας (ELSD).....	37
1.5.1. Γενικά – Ιστορική αναδρομή.....	37
1.5.2. Σκέδαση ακτινοβολίας.....	38
1.5.3. Αρχή λειτουργίας εξατμιστικού ανιχνευτή σκέδασης ακτινοβολίας.....	43
1.5.4. Σχέσεις ποσοτικοποίησης με ανιχνευτή ELSD.....	52
1.5.5. Χαρακτηριστικά λειτουργίας/ποιότητας ανιχνευτή ELSD.....	53
1.5.6. Σύγχρονες τάσεις στη χρήση του ανιχνευτή ELSD.....	55
1.5.7. Εφαρμογές του ELSD.....	56
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΜΕΤΑΛΛΩΝ – ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥΣ.....	59
2.1. Εισαγωγή.....	59
2.2. Στοιχεία της I _A Ομάδας του Περιοδικού Πίνακα (Αλκάλια).....	59
2.2.1. Λίθιο και ενώσεις του.....	59
2.2.2. Νάτριο και ενώσεις του.....	61
2.2.3. Κάλιο και ενώσεις του.....	62
2.3. Στοιχεία της II _A Ομάδας του Περιοδικού Πίνακα (Αλκαλικές γαίες)	63
2.3.1. Μαγνήσιο και ενώσεις του.....	63
2.3.2. Ασβέστιο και ενώσεις του.....	65
2.4. Μέθοδοι Προσδιορισμού των Στοιχείων της I _A και II _A Ομάδας του Περιοδικού Πίνακα.....	67
2.4.1. Προσδιορισμός λιθίου.....	67
2.4.2. Προσδιορισμός κατιόντων αλκαλίων και αλκαλικών γαιών.....	68
2.5. Στοιχεία της III ^{ης} Ομάδας Συστήματος Fresenius.....	69
2.5.1. Αργίλιο και ενώσεις του.....	69
2.5.1.1. Επίδραση αργιλίου στην υγεία.....	70
2.5.1.2. Φαρμακολογική χρήση αργιλίου.....	70
2.5.1.3. Προσδιορισμός αργιλίου.....	71
2.5.2. Χρώμιο και ενώσεις του.....	71

2.5.2.1.	Τρισθενές χρώμιο Cr(III) – Το χρώμιο in vivo.....	72
2.5.2.2.	Εξασθενές χρώμιο Cr(VI) – Επιπτώσεις στην υγεία και το περιβάλλον.....	73
2.5.2.3.	Προσδιορισμός Cr(III) – Cr(VI).....	74
2.5.3.	Ψευδάργυρος και ενώσεις του.....	76
2.5.3.1.	Βιολογικός ρόλος του ψευδαργύρου.....	76
2.5.3.2.	Προσδιορισμός ψευδαργύρου.....	79
2.6.	Σκοπός της Εργασίας.....	80
3.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ.....	81
3.1.	Σύστημα Υγροχρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	81
3.1.1.	Αντλία υψηλής πίεσης παροχής διαλυτών.....	81
3.1.2.	Σύστημα εισαγωγής δείγματος.....	82
3.1.3.	Αναλυτικές στήλες.....	82
3.1.4.	Σύστημα καταγραφής/επεξεργασίας δεδομένων.....	82
3.2.	Εξατμιστικός Ανιχνευτής Σκέδασης Ακτινοβολίας (ELSD).....	83
3.3.	Λοιπές Συσκευές.....	84
3.4.	Γυάλινα Σκεύη – Ογκομετρικά Όργανα.....	84
3.5.	Γενική Πορεία Χρωματογραφικών Μετρήσεων.....	85
4.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΜΑΖΑΣ ΑΝΑΛΥΤΗ ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ELSD.....	87
4.1.	Εισαγωγή.....	87
4.2.	Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια.....	87
4.3.	Πειραματική Πορεία.....	88
4.3.1.	Παρασκευή διαλυμάτων.....	88
4.3.2.	Πειραματική διαδικασία.....	89
4.3.3.	Αποτελέσματα.....	92
4.3.3.1.	Επίδραση ύδατος.....	92
4.3.3.2.	Επίδραση υδατικού δ/τος CH ₃ COOH 0,01 M.....	94
4.3.3.3.	Επίδραση υδατικού δ/τος TFA 0,01 M.....	96
4.3.3.4.	Επίδραση υδατικού δ/τος NFPA 0,01 M.....	98
4.3.4.	Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	100
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΘΙΟΥ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	105
5.1.	Εισαγωγή.....	105
5.2.	Ανθρακικό Λίθιο.....	106
5.2.1.	Χαρακτηριστικά – Ιδιότητες – Εμπορική ονομασία.....	106
5.2.2.	Έλεγχοι σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποία.....	106
5.3.	Θειικό Λίθιο.....	107

5.3.1.	Χαρακτηριστικά – Ιδιότητες – Εμπορική ονομασία.....	107
5.3.2.	Έλεγχοι σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία.....	107
5.4.	Φαρμακοκινητική Δράση Λιθίου.....	107
5.5.	Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC – ELSD για τον Προσδιορισμό Αλάτων του Λιθίου σε Φαρμακευτικά Σκευάσματα με το Μηχανισμό Ζεύγους Ιόντων (Ion – Pair Chromatography).....	108
5.5.1.	Εισαγωγή – Γενικά για τη χρωματογραφία ζεύγους ιόντων.....	108
5.5.2.	Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια.....	109
5.5.3.	Πειραματική πορεία.....	110
5.5.4.	Αποτελέσματα.....	114
5.5.5.	Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	120
5.6.	Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC – ELSD για τον Προσδιορισμό Αλάτων του Λιθίου σε Φαρμακευτικά Σκευάσματα με το Μηχανισμό Κατιονανταλλαγής (Ion – Exchange Chromatography)	124
5.6.1.	Εισαγωγή – Γενικά για το μηχανισμό κατιονανταλλαγής.....	124
5.6.2.	Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια.....	125
5.6.3.	Πειραματική πορεία.....	125
5.6.4.	Αποτελέσματα.....	128
5.6.5.	Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	132
5.7.	Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC – ELSD για τον Προσδιορισμό του Λιθίου σε Βιολογικά Δείγματα Πλάσματος Αίματος και Ούρων.....	133
5.7.1.	Εισαγωγή.....	133
5.7.2.	Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια.....	133
5.7.3.	Προσπάθεια προσδιορισμού λιθίου σε πλάσμα αίματος.....	133
5.7.4.	Προσπάθεια προσδιορισμού λιθίου σε ούρα.....	140
6.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΓΙΛΙΟΥ ΚΑΙ ΜΑΓΝΗΣΙΟΥ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ.....	143
6.1.	Εισαγωγή.....	143
6.2.	Υδροξείδιο Αργιλίου.....	143
6.2.1.	Χαρακτηριστικά – Ιδιότητες – Εμπορική ονομασία.....	143
6.2.2.	Φαρμακοκινητική δράση.....	144
6.2.3.	Έλεγχοι πρώτης ύλης σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία.....	144
6.3.	Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC – ELSD για τον Προσδιορισμό Αργιλίου και Μαγνησίου σε Στερεά Φαρμακευτικά Σκευάσματα.....	145
6.3.1.	Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια.....	145
6.3.2.	Πειραματική πορεία.....	146
6.3.3.	Αποτελέσματα.....	151
6.3.4.	Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	162

6.4.	Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC – ELSD για τον Προσδιορισμό Αργιλίου και Μαγνησίου σε Υγρό Φαρμακευτικό Σκεύασμα.....	163
6.4.1.	Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια.....	163
6.4.2.	Πειραματική πορεία.....	163
6.4.3.	Αποτελέσματα.....	166
6.4.4.	Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	172
7.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΕ ΕΝΕΣΙΜΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ.....	175
7.1.	Εισαγωγή.....	175
7.2.	Ινσουλίνη.....	175
7.2.1.	Δομή ινσουλίνης	175
7.2.2.	Προσδιορισμός δομής ινσουλίνης	176
7.2.3.	Βιολογικός ρόλος ινσουλίνης.....	177
7.2.4.	Βιομηχανική παραγωγή ινσουλίνης	177
7.2.5.	Διάφοροι τύποι ινσουλίνης... ..	178
7.3.	Περιγραφή Σκευάσματος – Έλεγχοι Φαρμακοποιίας.....	179
7.3.1.	Περιγραφή ενέσιμου σκευάσματος.....	179
7.3.2.	Έλεγχοι πρώτης ύλης σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία.....	179
7.4.	Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC – ELSD για τον Προσδιορισμό Ψευδαργύρου σε Σκεύασμα Ινσουλίνης με Μηχανισμό Κατιονανταλλαγής (Cation – Exchange).....	181
7.4.1.	Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια.....	181
7.4.2.	Πειραματική πορεία.....	181
7.4.3.	Αποτελέσματα.....	186
7.4.4.	Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	188
7.4.5.	Προσδιορισμός ψευδαργύρου με Ατομική Απορρόφηση – Σύγκριση αποτελεσμάτων.....	188
7.5.	Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC – ELSD για τον Προσδιορισμό Ψευδαργύρου σε Σκεύασμα Ινσουλίνης με Μηχανισμό Ιοντικών Ζευγών (Ion – Pair).....	190
7.5.1.	Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια.....	190
7.5.2.	Πειραματική πορεία.....	190
7.5.3.	Αποτελέσματα.....	193
7.5.4.	Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	195
8.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΤΙΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΧΡΩΜΙΟΥ/ ΧΡΩΜΙΚΩΝ ΣΤΟ ΝΕΡΟ.....	197
8.1.	Εισαγωγή.....	197
8.2.	Γενικά για το νερό – Χαρακτηριστικά Ποιότητας Πόσιμου Νερού.....	198
8.2.1.	Συστατικά του φυσικού νερού.....	198

8.2.2.	Σκληρότητα.....	200
8.2.3.	pH.....	200
8.2.4.	Χρώμα.....	200
8.2.5.	Θολερότητα.....	200
8.2.6.	Θερμοκρασία.....	200
8.2.7.	Μικροβιακοί παράγοντες.....	201
8.2.8.	Ραδιενεργοί παράγοντες.....	201
8.3.	Διαδικασίες Καθαρισμού Νερού.....	201
8.4.	Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC – ELSD για τον Προσδιορισμό των Κατιόντων του Πόσιμου Νερού με Μηχανισμό Κατιονανταλλαγής (Cation – Exchange)..<	202
8.4.1.	Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια.....	202
8.4.2.	Πειραματική πορεία.....	202
8.4.3.	Αποτελέσματα.....	205
8.4.4.	Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	217
8.5.	Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC – ELSD για τον Προσδιορισμό Χρωμίου – Χρωμικών Ιόντων στο Πόσιμο Νερό με Μηχανισμό Κατιονανταλλαγής (Cation – Exchange Mechanism).....	219
8.5.1.	Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια.....	219
8.5.2.	Πειραματική πορεία.....	219
8.5.3.	Αποτελέσματα.....	224
8.5.4.	Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	228
9.	ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	231
10.	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....	233
11.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	237
12.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	239

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1:	Ταξινόμηση των μεθόδων χρωματογραφίας στήλης.....	26
Σχήμα 1.2:	Κυριότεροι μηχανισμοί και τεχνικές υγροχρωματογραφίας.....	27
Σχήμα 1.3:	Διαγραμματική απεικόνιση διάταξης HPLC. Διακρίνεται η παλινδρομική αντλία, η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος και η αναλυτική στήλη.....	28
Σχήμα 1.4:	Διάγραμμα ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων.....	33
Σχήμα 1.5:	Στο διάγραμμα φαίνεται ότι το % ποσοστό της σκεδαζόμενης ηλιακής ακτινοβολίας είναι πολύ μεγαλύτερο στην κυανή περιοχή του ορατού φάσματος, γεγονός που εξηγεί το μπλε χρώμα του ουρανού.....	39
Σχήμα 1.6:	Μεταβολή ενέργειας σωματιδίων κατά την ελαστική (Rayleigh) και ανελαστική (Raman) σκέδαση.....	40
Σχήμα 1.7:	Φαίνονται οι δύο τύποι ελαστικής σκέδασης, Rayleigh και Mie, και ο τρόπος που το μέγεθος των σωματιδίων επηρεάζει την ένταση, αλλά και την κατεύθυνση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας.....	42
Σχήμα 1.8:	Στάδια λειτουργίας ενός τυπικού ανιχνευτή ELSD.....	44
Σχήμα 1.9:	Ροή τύπου Venturi: Ισχύει ότι $p_1 > p_2$ (p :πίεση αερίου) διότι $v_1 < v_2$ (v :ταχύτητα αερίου). Το αποτέλεσμα είναι ότι το αέριο άζωτο ρέει παρασύροντας το έκλουσμα της στήλης.....	45
Σχήμα 1.10:	Θάλαμοι εκνέφωσης που επιτρέπουν το διαχωρισμό των σταγονιδίων αναλόγως του μεγέθους τους.....	47
Σχήμα 1.11:	Διάγραμμα ανιχνευτή ELSD τύπου A.....	49
Σχήμα 1.12:	Διάγραμμα ανιχνευτή ELSD τύπου B.....	50
Σχήμα 1.13:	Διάγραμμα της οπτικής κυψελίδας, όπου απεικονίζεται η ροή του βοηθητικού αδρανούς αερίου και η γωνία σκέδασης μεταξύ πηγής ακτινοβολίας και φωτοπολλαπλασιαστή.....	51
Σχήμα 2.1:	Μοντέλα σύνδεσης του Mg^{2+} στο ATP.....	64
Σχήμα 2.2:	Χημικός τύπος της Χλωροφύλλης A. Στο κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου βρίσκεται το άτομο του Mg.....	65
Σχήμα 2.3:	Συμπληρώματα χρωμίου. Πιο διαδεδομένο είναι το $Cr(pic)_3$ που είναι αξιοσημείωτα σταθερό και μπορεί να παραμείνει για ώρες μέχρι να αρχίσει να μεταβολίζεται.....	73
Σχήμα 2.4:	Διαγραμματική απεικόνιση της ανθρακικής ανυδράσης II. Δεξιά φαίνεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου, όπου το άτομο Zn απεικονίζεται ως σφαίρα, συμπλέκεται με τα ιμιδαζόλια των τριών ιστιδινών του ενζύμου, ενώ την τέταρτη θέση καταλαμβάνει ένα μόριο νερού που αντιδρά με το CO_2	77
Σχήμα 2.5:	Ενεργό κέντρο της καρβοξυτεπτιδάσης A. Ο Zn σχηματίζει τετραεδρικό σύμπλοκο με τις πλευρικές αλυσίδες δύο ιστιδινών, ενός γλουταμινικού οξέος και ενός μορίου H_2O	77
Σχήμα 2.6:	Διάγραμμα εξαμερούς της ινσουλίνης. Τα μονομερή συγκρατούνται από ένα άτομο Zn στο κέντρο του μορίου, που συνδέεται με αυτά με τις	

	πλευρικές αλυσίδες ιστιδινών.....	78
Σχήμα 3.1:	Ανιχνευτής ELSD, μοντέλο SEDEX 75.....	83
Σχήμα 4.1:	Επίδραση θερμοκρασίας στη μορφή και την επαναληψιμότητα των χρωματογραφικών κορυφών (πρότυπο υδατικό δ/μα Na^+ συγκέντρωσης $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ σε κινητή φάση 100% ύδωρ). Η %σχετική τυπική απόκλιση %RSD των μετρήσεων ήταν 9,61 και 5,01, αντίστοιχα.	90
Σχήμα 4.2:	Επίδραση ταχύτητας ροής κινητής φάσης στη μορφή και την επαναληψιμότητα των χρωματογραφικών κορυφών (πρότυπο υδατικό δ/μα Na^+ συγκέντρωσης $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ σε κινητή φάση 100% ύδωρ). Το %RSD των μετρήσεων ήταν 4,47 και 2,38, αντίστοιχα.....	91
Σχήμα 4.3:	Ραβδόγραμμα του παράγοντα απόκρισης α συναρτήσει της ατομικής μάζας των εξεταζόμενων μετάλλων παρουσία νερού.....	93
Σχήμα 4.4:	Ραβδόγραμμα του παράγοντα b συναρτήσει της ατομικής μάζας των εξεταζόμενων μετάλλων παρουσία νερού.....	94
Σχήμα 4.5:	Ραβδόγραμμα του παράγοντα απόκρισης α συναρτήσει της ατομικής μάζας των μετάλλων παρουσία CH_3COOH	95
Σχήμα 4.6:	Ραβδόγραμμα του παράγοντα b συναρτήσει της ατομικής μάζας των εξεταζόμενων μετάλλων παρουσία CH_3COOH	96
Σχήμα 4.7:	Ραβδόγραμμα του παράγοντα απόκρισης α συναρτήσει της ατομικής μάζας των μετάλλων παρουσία δ/τος TFA.....	97
Σχήμα 4.8:	Ραβδόγραμμα του παράγοντα b συναρτήσει της ατομικής μάζας των εξεταζόμενων μετάλλων παρουσία δ/τος TFA.....	98
Σχήμα 4.9:	Ραβδόγραμμα του παράγοντα απόκρισης α συναρτήσει της ατομικής μάζας των μετάλλων παρουσία δ/τος NFPA.....	99
Σχήμα 4.10:	Ραβδόγραμμα του παράγοντα b συναρτήσει της ατομικής μάζας των εξεταζόμενων μετάλλων παρουσία δ/τος NFPA.....	100
Σχήμα 4.11:	Χρωματογράφημα πρότυπου υδατικού δ/ματος Na^+ συγκέντρωσης $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ στις επιλεγμένες συνθήκες εργασίας.....	101
Σχήμα 4.12:	Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής του παράγοντα απόκρισης α συναρτήσει της ατομικής μάζας των μετάλλων για τους τέσσερις διαλύτες.....	103
Σχήμα 5.1:	Χρωματογράφημα μίγματος ιόντων με μηχανισμό RP-ion-pair και ισοκρατική έκλουση με κινητή φάση μίγμα NFPA: CH_3COOH 90:10 v/v. Οι χρόνοι κατακράτησης των ιόντων ήταν: Li^+ : $t_R=5,07 \text{ min}$, Na^+ : $t_R=5,20 \text{ min}$, K^+ : $t_R=5,91 \text{ min}$ και Rb^+ : $t_R=6,54 \text{ min}$	113
Σχήμα 5.2:	Χρωματογράφημα placebo σκευάσματος Li_2CO_3 αναλυμένου με μηχανισμό RP-ion-pair και ισοκρατική έκλουση με μίγμα NFPA: CH_3COOH 90:10 v/v.....	117
Σχήμα 5.3:	Χρωματογράφημα σκευάσματος Li_2CO_3 αναλυμένου με μηχανισμό RP-ion-pair και ισοκρατική έκλουση με μίγμα NFPA: CH_3COOH 90:10 v/v. Χρόνος κατακράτησης ιόντων Li^+ : $t_R=5,57 \text{ min}$	118
Σχήμα 5.4:	Χρωματογράφημα σκευάσματος Li_2SO_4 αναλυμένου με μηχανισμό RP-	

	ion-pair και ισοκρατική έκλουση με μίγμα NFPA:CH ₃ COOH 90:10 v/v. Χρόνος κατακράτησης ιόντων Li ⁺ : t _R =5,53 min.....	119
Σχήμα 5.5:	Χρωματογράφημα αραιού δ/τος H ₂ SO ₄ με μηχανισμό RP-ion-pair και ισοκρατική έκλουση με μίγμα NFPA:CH ₃ COOH 90:10 v/v όπου φαίνεται η έκλουση των θειικών ιόντων –SO ₄ ²⁻ στα 2,00 min περίπου.....	120
Σχήμα 5.6:	Καμπύλη πειράματος ανάκτησης Li ₂ CO ₃ από το σκεύασμα Milithin® με την τεχνική των πολλαπλών ζυγίσεων/προσθηκών.....	123
Σχήμα 5.7:	Χρωματογράφημα μίγματος κατιόντων με μηχανισμό κατιονανταλλαγής και ισοκρατική έκλουση με κινητή φάση δ/τη TFA. Οι χρόνοι κατακράτησης των ιόντων ήταν: Li ⁺ : t _R =2,60 min, Na ⁺ : t _R =2,81 min, K ⁺ : t _R =3,52 min και Rb ⁺ : t _R =4,40 min.....	127
Σχήμα 5.8:	Χρωματογράφημα σκεύασματος Li ₂ CO ₃ αναλυμένου με μηχανισμό κατιονανταλλαγής και ισοκρατική έκλουση με δ/μα TFA. Χρόνος κατακράτησης ιόντων Li ⁺ : t _R =2,66 min.....	131
Σχήμα 5.9:	Χρωματογράφημα σκεύασματος Li ₂ SO ₄ αναλυμένου με μηχανισμό κατιονανταλλαγής και ισοκρατική έκλουση με δ/μα TFA. Χρόνος κατακράτησης ιόντων Li ⁺ : t _R =2,65 min.....	131
Σχήμα 5.10:	Χρωματογράφημα δείγματος 1 (blank) πρότυπου δ/τος Li ⁺ με στήλη C ₁₈ και μηχανισμό RP-ion-pair (ισοκρατική έκλουση με μίγμα NFPA:CH ₃ COOH 90:10 v/v).....	135
Σχήμα 5.11:	Χρωματογράφημα δείγματος 2 πλάσματος αίματος τελικής συγκέντρωσης Li ⁺ ίσης με 4 μg·mL ⁻¹ με στήλη C ₁₈ (ισοκρατική έκλουση με μίγμα NFPA:CH ₃ COOH 90:10 v/v).....	135
Σχήμα 5.12:	Χρωματογράφημα δείγματος 3 πλάσματος αίματος τελικής συγκέντρωσης Li ⁺ ίσης με 1 μg·mL ⁻¹ με στήλη C ₁₈ (ισοκρατική έκλουση με μίγμα NFPA:CH ₃ COOH 90:10 v/v).....	136
Σχήμα 5.13:	Χρωματογράφημα δείγματος 1 πλάσματος αίματος τελικής συγκέντρωσης Li ⁺ ίσης με 0,5 μg·mL ⁻¹ με στήλη CS14 (ισοκρατική έκλουση με δ/μα TFA 1,54 mL·L ⁻¹). Η πολύ μικρή κορυφή του λιθίου εκλούεται στα 2,71 min.....	137
Σχήμα 5.14:	Χρωματογράφημα δείγματος 2 πλάσματος αίματος τελικής συγκέντρωσης Li ⁺ ίσης με 3,3 μg·mL ⁻¹ με στήλη CS14 (ισοκρατική έκλουση με δ/μα TFA). Η κορυφή του λιθίου στα 2,71 min υπερκαλύπτεται από τη διπλανή της.....	138
Σχήμα 5.15:	Χρωματογράφημα δείγματος 3 πλάσματος αίματος τελικής συγκέντρωσης Li ⁺ ίσης με 4,2 μg·mL ⁻¹ με στήλη CS14 (ισοκρατική έκλουση με δ/μα TFA). Η κορυφή του λιθίου στα 2,71 min, μεγαλύτερη από ότι στα προηγούμενα δείγματα, επίσης υπερκαλύπτεται από τη διπλανή της.....	139
Σχήμα 5.16:	Χρωματογράφημα δείγματος blank ούρων με στήλη CS14 (ισοκρατική έκλουση με δ/μα TFA 1,54 mL·L ⁻¹).....	141
Σχήμα 5.17:	Χρωματογράφημα δείγματος 2 ούρων μεγάλης συγκέντρωσης Li ⁺ <10	

	μg·mL ⁻¹ με στήλη CS14. Η κορυφή του λιθίου εκλούεται στα 2,71 min αλλά καλύπτεται από τη διπλανή μεγάλη συγκέντρωσης κορυφή.....	142
Σχήμα 6.1:	Χρωματογράφημα μίγματος Mg – Al με στήλη C18 και κινητή φάση δ/μα TFA συγκέντρωσης 0,385 mL·L ⁻¹ . Οι χρόνοι έκλουσης των ιόντων ήταν Mg ²⁺ : t _R =3,69 min και Al ³⁺ : t _R =4,28 min. Ο παράγοντας διαχωριστότητας ήταν Rs=1,58.....	149
Σχήμα 6.2:	Χρωματογράφημα μίγματος Mg – Al με στήλη C18 και κινητή φάση μίγμα TFA (0,45 mL·L ⁻¹):ACN 95:5 (v/v). Οι χρόνοι έκλουσης των ιόντων ήταν Mg ²⁺ : t _R =3,88 min και Al ³⁺ : t _R =4,76 min. Ο παράγοντας διαχωριστότητας ήταν Rs=2,34.....	150
Σχήμα 6.3:	Χρωματογράφημα σκευάσματος Maalox Plus® που διαλυτοποιήθηκε σε δ/μα TFA – H ₂ O 30-70 (v/v) βάσει του πρωτοκόλλου του πίνακα 6.5. Με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, το αργίλιο παρέμενε δεσμευμένο στο σκεύασμα.....	155
Σχήμα 6.4:	Χρωματογράφημα σκευάσματος Maalox Plus® που διαλυτοποιήθηκε σε πυκνό TFA με τη βοήθεια λουτρού υπερήχων, βάσει του πρωτοκόλλου του πίνακα 6.5. Με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, το αργίλιο εκλουόταν σε μικρό ποσοστό, 83,4%, ενώ η διαλυτοποίηση του μαγνησίου ήταν εντός των προδιαγραφών.....	156
Σχήμα 6.5:	Δύο χρωματογραφήματα σκευάσματος Maalox Plus®. Αριστερά φαίνεται σκεύασμα που διαλυτοποιήθηκε με την επίδραση πυκνού HCl και τη βοήθεια λουτρού υπερήχων, όπου δεν εκλουόταν το αργίλιο. Δεξιά είναι σκεύασμα που διαλύθηκε σε σταγόνες πυκνού HNO ₃ όπου και πάλι φαίνεται ότι δεν εκλουόταν το αργίλιο ενώ και η κορυφή του μαγνησίου δεν ήταν καθαρή.....	157
Σχήμα 6.6:	Καμπύλη πειράματος ανάκτησης μαγνησίου – αργιλίου από το σκεύασμα Maalox Plus® με την τεχνική των πολλαπλών μεταβαλλόμενων ζυγίσεων.....	158
Σχήμα 6.7:	Χρωματογράφημα σκευάσματος Maalox Plus® (250 mg στα 100 mL) που έχει υποστεί διαλυτοποίηση με πυκνό δ/μα H ₂ SO ₄ (3,6 M) και προσδιορίστηκε με στήλη C18 και κινητή φάση μίγμα TFA (0,45mL·L ⁻¹):ACN 95:5 (v/v). Καταγράφηκε μια επιπλέον κορυφή στα 2,47 min που αποδίδεται στα ιόντα SO ₄ ²⁻	159
Σχήμα 6.8:	Χρωματογραφήματα σκευάσματος Aludrox® για προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε δραστική ουσία (πάνω) και υπολογισμό της ανάκτησης (κάτω) προσδιορισμένα με στήλη C18 και κινητή φάση μίγμα TFA (0,45 mL·L ⁻¹):ACN 95:5 (v/v). Επισημαίνεται η κορυφή του μαγνησίου που είναι δύσκολο να αξιολογηθεί.....	161
Σχήμα 6.9:	Χρωματογράφημα μίγματος Mg – Al με στήλη C18 και κινητή φάση μίγμα NFPA (2,05 mL·L ⁻¹):ACN 60:40 (v/v). Οι χρόνοι έκλουσης των ιόντων ήταν Mg ²⁺ : t _R =4,40 min και Al ³⁺ : t _R =7,51 min. Ο παράγοντας	

	διαχωριστότητας ήταν $R_s=7,21$	165
Σχήμα 6.10:	Διάγραμμα απεικόνισης των αποτελεσμάτων της ανάκτησης των δραστικών ουσιών με την τεχνική των πολλαπλών μεταβαλλόμενων δειγμάτων την 1 ^η μέρα εκτέλεσης της δοκιμής.....	169
Σχήμα 6.11:	Διάγραμμα απεικόνισης των αποτελεσμάτων της ανάκτησης των δραστικών ουσιών με την τεχνική των πολλαπλών μεταβαλλόμενων δειγμάτων τη 2 ^η μέρα εκτέλεσης της δοκιμής.....	169
Σχήμα 6.12:	Χρωματογράφημα σκευάσματος Maalox [®] or.susp. (2 mL→100 mL) με στήλη C18 και κινητή φάση NFPA (2,05 mL·L ⁻¹):ACN 60:40 (v/v).....	171
Σχήμα 6.13:	Χρωματογράφημα σκευάσματος Maalox [®] or.susp. (2 mL→100 mL) εμβολιασμένου με 5 mL πρότυπου δ/τος Mg ($C_{std}=6,25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) και 5 mL πρότυπου δ/τος Al ($C_{std}=7,50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) με στήλη C18 και κινητή φάση NFPA (2,05 mL·L ⁻¹):ACN 60:40 (v/v).....	172
Σχήμα 6.14:	Χρωματογράφημα placebo σκευάσματος Maalox [®] or.susp. με στήλη C18 και κινητή φάση NFPA (2,05 mL·L ⁻¹):ACN 60:40 (v/v).....	173
Σχήμα 7.1:	Αλληλουχία αμινοξέων ανθρώπινης ινσουλίνης. Οι ινσουλίνες των ζώων (π.χ. βόεια, χοίρεια), διαφέρουν μόνο ως προς λίγα αμινοξέα.....	176
Σχήμα 7.2:	Τροποποιημένη ινσουλίνη Lispro.....	178
Σχήμα 7.3:	Χρωματογράφημα μίγματος Zn – Na με κινητή φάση δ/μα TFA 1,35 mL·L ⁻¹ . Χρόνος κατακράτησης ιόντων Na ⁺ : $t_R=2,87 \text{ min}$ και Zn ²⁺ : $t_R=4,86 \text{ min}$	183
Σχήμα 7.4:	Διάγραμμα των αποτελεσμάτων της ανάκτησης του ψευδαργύρου μετά τις δοκιμές διαλυτοποίησης του σκευάσματος Humulin [®] Lente.....	184
Σχήμα 7.5:	Διαγραμματικό σχήμα των δειγμάτων σκευάσματος για τον προσδιορισμό του ψευδαργύρου.....	185
Σχήμα 7.6:	Χρωματογράφημα σκευάσματος Humulin [®] Lente αναλυμένου με στήλη CS14 και κινητή φάση δ/μα TFA 1,35 mL·L ⁻¹	187
Σχήμα 7.7:	Χρωματογράφημα μίγματος Zn – Na με κινητή φάση μίγμα NFPA:TFA:ACN 65:5:30 v/v/v (δοκιμή α/α 17 βλ.πίν.7.7). Χρόνος κατακράτησης ιόντων Na ⁺ : $t_R=3,01 \text{ min}$ και Zn ²⁺ : $t_R=4,22 \text{ min}$	192
Σχήμα 7.8:	Χρωματογράφημα μίγματος Zn – Na με κινητή φάση μίγμα NFPA:TFA:ACN 68:5:27 v/v/v (δοκιμή α/α 18 βλ.πίν.7.7). Χρόνος κατακράτησης ιόντων Na ⁺ : $t_R=3,18 \text{ min}$ και Zn ²⁺ : $t_R=5,03 \text{ min}$	193
Σχήμα 7.9:	Χρωματογράφημα σκευάσματος Humulin [®] Lente αναλυμένου με κινητή φάση μίγμα NFPA:TFA:ACN 68:5:27 v/v/v. Χρόνος έκλουσης των ιόντων Na ⁺ : $t_R=3,78 \text{ min}$ και Zn ²⁺ : $t_R=5,23 \text{ min}$	195
Σχήμα 8.1:	Χρωματογράφημα πρότυπου μίγματος των κατιόντων του νερού με στήλη CS14 και κινητή φάση δ/μα TFA συγκέντρωσης 1,155 mL·L ⁻¹ . Οι χρόνοι κατακράτησης των ιόντων ήταν Na ⁺ : $t_R=2,43 \text{ min}$, K ⁺ : $t_R=3,51 \text{ min}$, Mg ²⁺ : $t_R=4,57 \text{ min}$ και Ca ²⁺ : $t_R=5,20 \text{ min}$. Η συγκέντρωση όλων των ιόντων ήταν 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	204
Σχήμα 8.2:	Διάγραμμα καμπυλών ανάκτησης των ιόντων νατρίου, καλίου και	

	μαγνησίου για διαφορετικούς όγκους δείγματος νερού.....	210
Σχήμα 8.3:	Διάγραμμα καμπύλης ανάκτησης των ιόντων ασβεστίου για διαφορετικούς όγκους δείγματος νερού.....	210
Σχήμα 8.4:	Χρωματογράφημα απεσταγμένου νερού αναλυμένου με στήλη CS14 και κινητή φάση δ/μα TFA συγκέντρωσης $1,155 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$. Ανιχνεύτηκε μόνο η παρουσία μικρής ποσότητας νατρίου και καλίου.....	211
Σχήμα 8.5:	Χρωματογράφημα του εμφιαλωμένου νερού ΙΟΛΗ® (αραιωμένου 10 mL → 25 mL). Πρόκειται για νερό πλούσιο κυρίως σε άλατα του μαγνησίου και του ασβεστίου ενώ η περιεκτικότητα του σε νάτριο και κάλιο ήταν φτωχή.....	212
Σχήμα 8.6:	Χρωματογράφημα του εμφιαλωμένου νερού ΖΑΓΟΡΙ® (αραιωμένου 10 mL → 25 mL). Ήταν νερό πλούσιο σε άλατα του ασβεστίου. Αντίθετα η περιεκτικότητά του σε νάτριο, κάλιο και μαγνήσιο ήταν μικρή.....	213
Σχήμα 8.7:	Χρωματογράφημα του ανθρακούχου νερού ΣΟΥΡΩΤΗ® (αραιωμένου 10 mL → 25 mL). Πρόκειται για νερό πολύ πλούσιο σε ασβέστιο ενώ υψηλή ήταν και η περιεκτικότητά του σε νάτριο και μαγνήσιο. Από τα δείγματα νερών που εξετάστηκαν, είχε την υψηλότερη συγκέντρωση καλίου.....	214
Σχήμα 8.8:	Χρωματογράφημα του νερού από το δίκτυο της ΕΥΔΑΠ (αραιωμένου 10 mL → 25 mL). Το νερό της Αθήνας είχε σχετικά υψηλή συγκέντρωση ασβεστίου ενώ οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων ιόντων ήταν μικρές.....	215
Σχήμα 8.9:	Χρωματογράφημα φυσιολογικού ορού (αραιωμένου 1,6 mL → 25 mL) για τον προσδιορισμό του ιόντος του καλίου.....	217
Σχήμα 8.10:	Διάγραμμα προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης για το διαχωρισμό $\text{Cr}^{3+}/\text{CrO}_4^{2-}$ και των κατιόντων του νερού με στήλη CS14.....	222
Σχήμα 8.11:	Χρωματογράφημα πρότυπου μίγματος $\text{CrO}_4^{2-}/\text{Cr}^{3+}$ παρουσία και των υπολοίπων κατιόντων του νερού. Η συγκέντρωση των ιόντων του χρωμίου ήταν $15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	223
Σχήμα 8.12:	Χρωματογράφημα δείγματος νερού από το δίκτυο ύδρευσης της Αθήνας οξινισμένο με TFA και αναλυμένο με στήλη CS14. Το χρώμιο και τα χρωμικά ιόντα απουσιάζουν.....	226
Σχήμα 8.13:	Χρωματογράφημα δείγματος νερού από το δίκτυο ύδρευσης της Θήβας οξινισμένο με TFA και αναλυμένο με στήλη CS14. Το χρώμιο και τα χρωμικά ιόντα απουσιάζουν.....	227

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1:	Μηχανισμοί ελαστικής σκέδασης ακτινοβολίας.....	41
Πίνακας 2.1:	Τιμές χαρακτηριστικών ιδιοτήτων των στοιχείων της I _A ομάδας.....	59
Πίνακας 2.2:	Τιμές χαρακτηριστικών ιδιοτήτων των στοιχείων της II _A ομάδας.....	63
Πίνακας 2.3:	Τιμές χαρακτηριστικών ιδιοτήτων των στοιχείων της III ^{ης} ομάδας Fresenius.....	69
Πίνακας 4.1:	Περιοχές συγκεντρώσεων διαλυμάτων εργασίας.....	89
Πίνακας 4.2:	Πειραματικές συνθήκες βελτιστοποίησης.....	89
Πίνακας 4.3:	Γραμμικοποιημένες εξισώσεις απόκρισης ιόντων με κινητή φάση νερό 100%.....	92
Πίνακας 4.4:	Τιμές συντελεστών α, b και k της απόκρισης των ιόντων υπό την επίδραση του ύδατος.....	93
Πίνακας 4.5:	Γραμμικοποιημένες εξισώσεις απόκρισης ιόντων με κινητή φάση υδατικό δ/μα CH ₃ COOH 0,01 M.....	94
Πίνακας 4.6:	Τιμές συντελεστών α, b και k της απόκρισης των ιόντων υπό την επίδραση του δ/τος CH ₃ COOH 0,01 M.....	95
Πίνακας 4.7:	Γραμμικοποιημένες εξισώσεις απόκρισης ιόντων με κινητή φάση δ/μα TFA 0,01 M.....	96
Πίνακας 4.8:	Τιμές συντελεστών α, b και k της απόκρισης των ιόντων υπό την επίδραση του δ/τος TFA 0,01 M.....	97
Πίνακας 4.9:	Εξισώσεις απόκρισης ιόντων με κινητή φάση υδατικό δ/μα NFPA 0,01 M.....	98
Πίνακας 4.10:	Τιμές συντελεστών α, b και k της απόκρισης των ιόντων υπό την επίδραση του δ/τος NFPA 0,01M.....	99
Πίνακας 4.11:	Τιμές ιοντικής ακτίνας των μετάλλων κατά αύξουσα σειρά.....	102
Πίνακας 4.12:	Χαρακτηριστικές τιμές ορισμένων ιδιοτήτων των ιόντων των αλκαλίων	102
Πίνακας 5.1:	Δοκιμές κινητών φάσεων για διαχωρισμό των ιόντων με χρωματογραφία ιοντικών ζευγών.....	111
Πίνακας 5.2:	Πειραματικές συνθήκες χρωματογράφησης.....	112
Πίνακας 5.3:	Καμπύλες αναφοράς Li ₂ CO ₃ – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου.....	115
Πίνακας 5.4:	Καμπύλες αναφοράς Li ₂ SO ₄ – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου.....	115
Πίνακας 5.5:	Αποτελέσματα ελέγχου περιεκτικότητας λιθίου στα σκευάσματα – Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης.....	117
Πίνακας 5.6:	Αποτελέσματα ανάκτησης Li ₂ CO ₃ από το σκεύασμα Milithin® με την τεχνική των πολλαπλών ζυγίσεων/προσθηκών.....	122
Πίνακας 5.7:	Δοκιμές κινητών φάσεων για διαχωρισμό των ιόντων με	

	χρωματογραφία κατιονανταλλαγής.....	126
Πίνακας 5.8:	Πειραματικές συνθήκες χρωματογράφησης.....	127
Πίνακας 5.9:	Καμπύλες αναφοράς Li_2CO_3 – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου.....	128
Πίνακας 5.10:	Καμπύλες αναφοράς Li_2SO_4 – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου.....	129
Πίνακας 5.11:	Αποτελέσματα ελέγχου περιεκτικότητας λιθίου στα σκευάσματα – Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης.....	130
Πίνακας 5.12:	Παρασκευή δειγμάτων για προσδιορισμό του λιθίου σε πλάσμα αίματος με μηχανισμό ion-pair και στήλη C_{18}	134
Πίνακας 5.13:	Παρασκευή δειγμάτων για προσδιορισμό του λιθίου σε πλάσμα αίματος με μηχανισμό κατιονανταλλαγής και στήλη CS_{14}	136
Πίνακας 5.14:	Παρασκευή δειγμάτων για προσδιορισμό του λιθίου σε ούρα με μηχανισμό κατιονανταλλαγής και στήλη CS_{14}	140
Πίνακας 6.1:	Δοκιμές κινητών φάσεων για διαχωρισμό των ιόντων Al^{3+} και Mg^{2+}	148
Πίνακας 6.2:	Πειραματικές συνθήκες χρωματογράφησης.....	148
Πίνακας 6.3:	Καμπύλες αναφοράς Mg^{2+} – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου	152
Πίνακας 6.4:	Καμπύλες αναφοράς Al^{3+} – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου...	152
Πίνακας 6.5:	Πρωτόκολλα διαλυτοποίησης Maalox Plus® chew.tabs.....	154
Πίνακας 6.6:	Αποτελέσματα περιεκτικότητας δραστικών συστατικών σκευάσματος Maalox Plus® – Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης.....	158
Πίνακας 6.7:	Αποτελέσματα περιεκτικότητας δραστικών συστατικών σκευάσματος Aludrox® – Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης.....	160
Πίνακας 6.8:	Δοκιμές κινητών φάσεων για διαχωρισμό των ιόντων Al^{3+} και Mg^{2+} στο εναιώρημα.....	164
Πίνακας 6.9:	Πειραματικές συνθήκες χρωματογράφησης.....	165
Πίνακας 6.10:	Καμπύλες αναφοράς Mg^{2+} – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου	167
Πίνακας 6.11:	Καμπύλες αναφοράς Al^{3+} – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου...	167
Πίνακας 6.12:	Αποτελέσματα περιεκτικότητας δραστικών συστατικών σκευάσματος εναιωρήματος – Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης.....	168
Πίνακας 6.13:	Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης σκευάσματος Maalox® or.susp.....	170
Πίνακας 7.1:	Δοκιμές κινητών φάσεων για τον προσδιορισμό του ψευδαργύρου με χρωματογραφία κατιονανταλλαγής.....	182
Πίνακας 7.2:	Πειραματικές συνθήκες χρωματογράφησης.....	182
Πίνακας 7.3:	Δοκιμές διαλυτοποίησης σκευάσματος Humulin® Lente.....	184
Πίνακας 7.4:	Καμπύλες αναφοράς ZnO – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου.	186
Πίνακας 7.5:	Αποτελέσματα ελέγχου περιεκτικότητας ολικού και διαλυμένου ψευδαργύρου στο σκεύασμα – Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης.....	187
Πίνακας 7.6:	Σύγκριση αποτελεσμάτων προσδιορισμού του Zn	189

Πίνακας 7.7:	Δοκιμές κινητών φάσεων για τον προσδιορισμό του Zn.....	191
Πίνακας 7.8:	Πειραματικές συνθήκες χρωματογράφησης.....	192
Πίνακας 7.9:	Καμπύλες αναφοράς ZnO – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου.	194
Πίνακας 7.10:	Αποτελέσματα ελέγχου περιεκτικότητας ολικού και διαλυμένου ψευδαργύρου στο σκεύασμα – Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης.....	194
Πίνακας 8.1:	Ουσίες που φυσιολογικά απαντώνται στο φυσικό νερό.....	198
Πίνακας 8.2:	Κυριότερες χημικές ουσίες που απαντώνται στο πόσιμο νερό βάσει στοιχείων του WHO.....	199
Πίνακας 8.3:	Δοκιμές κινητών φάσεων για το διαχωρισμό των ιόντων του νερού.....	203
Πίνακας 8.4:	Πειραματικές συνθήκες χρωματογράφησης.....	203
Πίνακας 8.5:	Χημική σύσταση δειγμάτων σε $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	205
Πίνακας 8.6:	Καμπύλες αναφοράς Na^+ – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου..	206
Πίνακας 8.7:	Καμπύλες αναφοράς K^+ – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου....	206
Πίνακας 8.8:	Καμπύλες αναφοράς Mg^{2+} – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου	207
Πίνακας 8.9:	Καμπύλες αναφοράς Ca^{2+} – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου.	207
Πίνακας 8.10:	Αποτελέσματα μετρήσεων κατιόντων του νερού – Ανάκτηση.....	208
Πίνακας 8.11:	Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης στο νερό ΖΑΓΟΡΙ®.....	209
Πίνακας 8.12:	Αποτελέσματα μετρήσεων κατιόντων του ενέσιμου διαλύματος – Ανάκτηση.....	216
Πίνακας 8.13:	Δοκιμές κινητών φάσεων για το διαχωρισμό $\text{Cr}^{3+}/\text{CrO}_4^{2-}$ και των κατιόντων του νερού με ισοκρατική έκλυση.....	220
Πίνακας 8.14:	Μεταβολή σύστασης κινητής φάσης για το διαχωρισμό $\text{Cr}^{3+}/\text{CrO}_4^{2-}$ και των κατιόντων του νερού με βαθμιδωτή έκλυση.....	221
Πίνακας 8.15:	Καμπύλες αναφοράς Cr(VI) – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου.....	224
Πίνακας 8.16:	Καμπύλες αναφοράς Cr(III) – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου.....	225
Πίνακας 8.17:	Αποτελέσματα ανάκτησης από τον εμβολιασμό των δειγμάτων νερού της ΕΥΔΑΠ.....	228

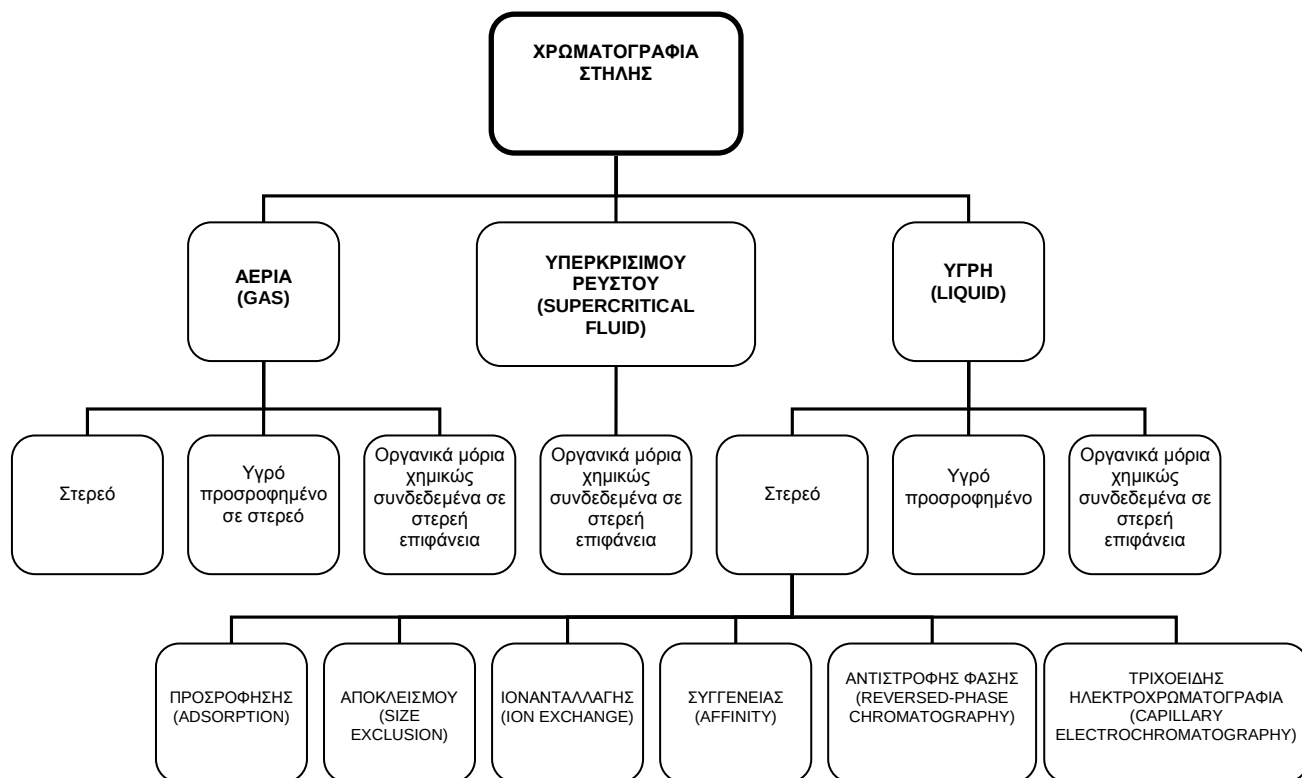
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΣΚΕΔΑΣΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ

1.1. Εισαγωγή ^[1-3]

Ο όρος *χρωματογραφία* αποδίδεται σε μία μεγάλη ποικιλία τεχνικών που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό ουσιών με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες από πολύπλοκα μίγματα. Σε όλους τους διαχωρισμούς, το δείγμα κινείται με τη βοήθεια της κινητής φάσης (*mobile phase*) που μπορεί να είναι ένα αέριο, υγρό ή υπερκρίσιμο ρευστό. Η κινητή φάση διέρχεται μέσα από τη στατική φάση (*stationary phase*) που μπορεί να είναι είτε καθηλωμένη σε στήλη (*χρωματογραφία στήλης, column chromatography*), είτε σε στερεά επιφάνεια (*επίπεδη χρωματογραφία, planar chromatography*). Οι δύο φάσεις επιλέγονται με τρόπο ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται σε διαφορετικό βαθμό μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Συστατικά που συγκρατούνται ισχυρά από τη στατική φάση κινούνται με μικρότερη ταχύτητα σε σχέση με τα συστατικά που συγκρατούνται ασθενέστερα κι αυτή η διαφορά στην ευκινησία είναι που οδηγεί στο σχηματισμό ξεχωριστών ζωνών, από τις οποίες τα συστατικά του δείγματος μπορούν να προσδιοριστούν ποιοτικά ή/και ποσοτικά.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές ταξινομούνται με διάφορους τρόπους αναλόγως των κριτηρίων ταξινόμησης που ο καθένας χρησιμοποιεί. Η περισσότερο θεμελιώδης ταξινόμηση, ωστόσο, βασίζεται στον τύπο των κινητών και στατικών φάσεων, αλλά και στο είδος των ισορροπιών που εμπλέκονται στις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Στο σχήμα 1.1 φαίνεται η ταξινόμηση των τεχνικών χρωματογραφίας στήλης η οποία, με τα χρόνια, έχει κυριαρχήσει σχεδόν ολοκληρωτικά έναντι των τεχνικών επίπεδης χρωματογραφίας. Στην 1^η σειρά του διαγράμματος φαίνονται τα είδη χρωματογραφίας αναλόγως του είδους της κινητής φάσης. Στη 2^η σειρά, η ταξινόμηση γίνεται αναλόγως του είδους της στατικής φάσης, ενώ στην 3^η σειρά του διαγράμματος φαίνονται τα κυριότερα είδη υγροχρωματογραφίας υγρού-στερεού.



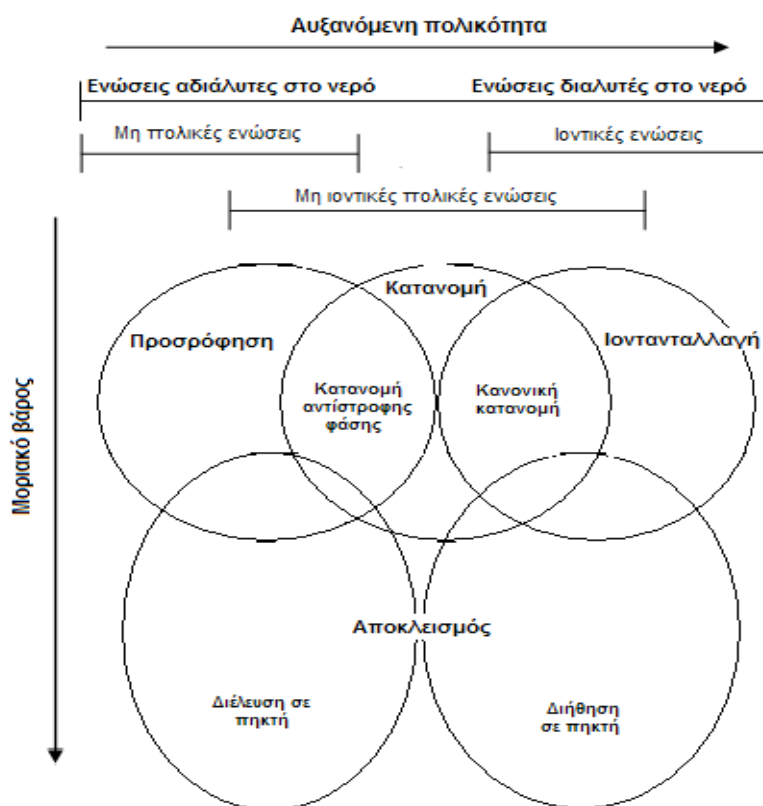
Σχήμα 1.1: Ταξινόμηση των μεθόδων χρωματογραφίας στήλης.

1.2. Γενικά για την Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)^[1-5]

Η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι η πιο διαδεδομένη από όλες τις αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού. Οι λόγοι αυτής της αποδοχής της τεχνικής είναι η ευαισθησία της, η εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς και η καταλληλότητά της για το διαχωρισμό μιγμάτων που περιέχουν μη πτητικά ή θερμοευαίσθητα συστατικά. Σε αντίθεση με την αεριοχρωματογραφία (GC), η HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο διαχωρισμό μιγμάτων ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους και υψηλής πολικότητας, πολυμερών, αλλά και ιοντικών ενώσεων. Η ταχύτητα αναλύσεων είναι παρόμοια με αυτή της GC, η διαχωριστική της ικανότητα 3 έως 10 φορές καλύτερη από τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, το κόστος ωστόσο μιας συσκευής HPLC είναι αρκετά υψηλό. Το πεδίο εφαρμογών της HPLC είναι τεράστιο και αφορά σε ουσίες πρωτίστου ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία, τον έλεγχο ποιότητας και πολλά επιστημονικά πεδία. Αναφέρονται οι προσδιορισμοί αμινοξέων, πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων, υδρογονανθράκων, υδατανθράκων, φαρμακευτικών ουσιών, φυτοφαρμάκων, οργανομεταλλικών ενώσεων, αλλά και ανόργανων ουσιών.

Στο σχήμα 1.2 που ακολουθεί, φαίνονται οι κυριότεροι μηχανισμοί υγροχρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται σήμερα και ο τρόπος επιλογής της κάθε

τεχνικής, που γίνεται αναλόγως του μεγέθους των ουσιών που διαχωρίζονται αλλά και της πολικότητάς τους.



Σχήμα 1.2: Κυριότεροι μηχανισμοί και τεχνικές υγροχρωματογραφίας^[1].

1.3. Οργανολογία HPLC ^[1,3-6]

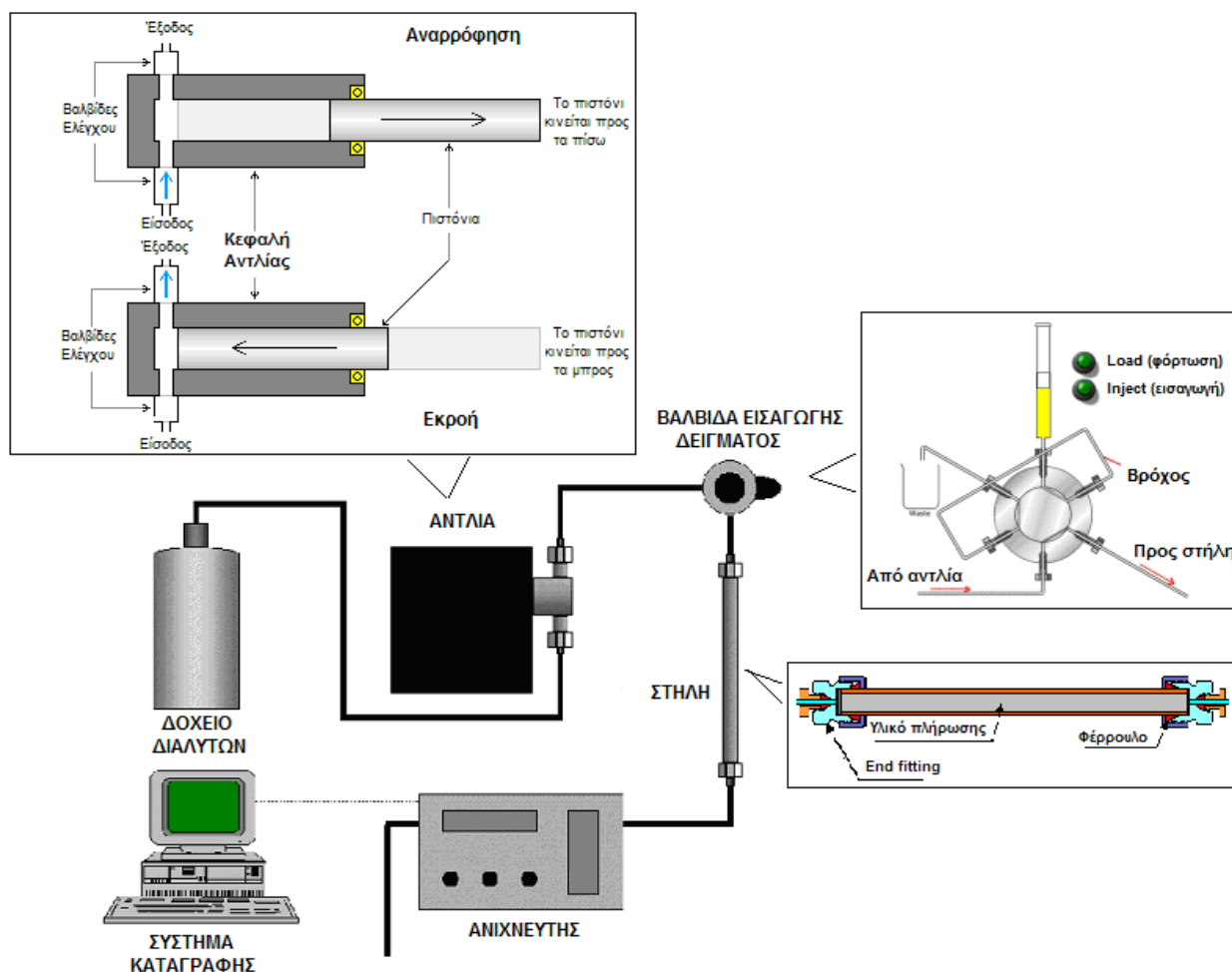
Προκειμένου να επιτευχθούν ικανοποιητικές ταχύτητες ροής της κινητής φάσης, μέσα από τα υλικά πλήρωσης των στηλών που χρησιμοποιούνται στη σύγχρονη υγροχρωματογραφία, αναπτύσσονται σημαντικά υψηλές πιέσεις που φτάνουν τις μερικές χιλιάδες psi (pounds per square inch). Για να ανταποκριθούν σε αυτές τις ακραίες συνθήκες και στις απαιτήσεις της ανάλυσης που γίνονται όλο και περισσότερες, οι διατάξεις HPLC διαθέτουν, σήμερα, μια πολύπλοκη και, κατά συνέπεια, αρκετά δαπανηρή οργανολογία.

Στο σχήμα 1.3 απεικονίζεται μια τυπική διάταξη υγροχρωματογραφίας και τα βασικά τμήματα από τα οποία αποτελείται^[7-9]. Τα τμήματα αυτά είναι τα εξής:

1.3.1. Σύστημα παροχής κινητής φάσης και επεξεργασίας διαλυτών

Αποτελείται από τα δοχεία- συνηθέστερα 1 έως 4- που περιέχουν τους διαλύτες της κινητής φάσης. Η άντληση των διαλυτών γίνεται μέσω ειδικών φίλτρων. Στα σύγχρονα συστήματα HPLC υπάρχει η δυνατότητα να εισάγονται ταυτόχρονα διαλύτες από δύο, ή

και περισσότερα, δοχεία σε θάλαμο ανάμειξης με σταθερό ή μεταβαλλόμενο ρυθμό, καθορίζοντας τη σύσταση της κινητής φάσης (σταθερή ή μεταβαλλόμενη) και κατ' επέκταση τον τρόπο έκλυσης (ισοκρατική ή βαθμιδωτή, αντίστοιχα).



Σχήμα 1.3: Διαγραμματική απεικόνιση διάταξης HPLC. Διακρίνεται η παλινδρομική αντλία, η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος και η αναλυτική στήλη.

Συχνά, τα δοχεία των διαλυτών είναι εφοδιασμένα με σύστημα απαέρωσης της κινητής φάσης. Αυτό εισάγει μικρές φυσαλίδες αδρανούς αερίου χαμηλής πτητικότητας (π.χ Ar, He), το οποίο απομακρύνει τα διαλυμένα αέρια (όπως το O₂) της κινητής φάσης, που μπορεί να σχηματίσουν φυσαλίδες στη στήλη, την αντλία ή τον ανιχνευτή εμποδίζοντας τη σωστή λειτουργία τους.

1.3.2. Σύστημα άντλησης

Στο 90% των εμπορικά διαθέσιμων σήμερα συστημάτων HPLC, η αντλία είναι παλινδρομική (*reciprocating pump*), αντικαθιστώντας τις παλαιότερες πνευματικές αντλίες (*pneumatic pump*), αλλά και τις –τύπου- σύριγγας (*syringe pump*). Αποτελείται από μικρό θάλαμο στον οποίο ο διαλύτης αντλείται με τη βοήθεια κυλινδρικού μηχανικού εμβόλου

που μπορεί να είναι, είτε μονό, είτε διπλό. Έχει μικρό εσωτερικό όγκο, οι ταχύτητες ροής κυμαίνονται από 0,1 έως 10 mL·min⁻¹ και μπορεί να αναπτύξει πολύ υψηλές πιέσεις, ενώ προσαρμόζεται εύκολα η λειτουργία της, τόσο για ισοκρατική όσο και για βαθμιδωτή έκλυση. Η επίτευξη σταθερής ροής της κινητής φάσης, τόσο στις χαμηλές, όσο και στις υψηλές ταχύτητες, είναι από τους σημαντικότερους δείκτες απόδοσης της αντλίας αφού διασφαλίζει την επαναληψιμότητα και εγκυρότητα των μετρήσεων.

Στο μεγαλύτερο μέρος της η αντλία είναι κατασκευασμένη από ανοξείδωτο χάλυβα. Κάποια τμήματά της, ωστόσο, που υφίστανται μεγαλύτερη καταπόνηση από τη χρήση και τη χημική διάβρωση, είναι σχεδιασμένα και κατασκευασμένα από ειδικά ανθεκτικά υλικά, όπως το τεχνητό ζαφείρι που χρησιμοποιείται στην κατασκευή των εμβόλων, το ρουμπίνι που χρησιμοποιείται στις σφαιρικές βαλβίδες (*check valves*), αλλά και το Teflon^[7-10].

1.3.3. Σύστημα έγχυσης δείγματος

Πρόκειται συνήθως για μια περιστρεφόμενη βαλβίδα υψηλής πίεσης κατασκευασμένη από χάλυβα, με βρόχο (*loop*) δείγματος του οποίου ο όγκος μπορεί να μεταβάλλεται από 5 έως 500 μ L. Όταν η βαλβίδα είναι στη θέση «load», το δείγμα εισάγεται με τη βοήθεια μικροσύριγγας ακριβείας μέχρις ότου γεμίσει ο βρόχος. Στη συνέχεια, η βαλβίδα γυρίζει στη θέση «inject» και το δείγμα παρασυρόμενο από την κινητή φάση, οδηγείται προς τη στήλη. Στα σύγχρονα συστήματα HPLC η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με αυτόματους δειγματολήπτες, η αρχή λειτουργίας τους ωστόσο παραμένει η ίδια.

1.3.4. Αναλυτική στήλη

Είναι μία στήλη από ανοξείδωτο χάλυβα το μήκος της οποίας μπορεί να κυμαίνεται από 5 cm – οι αναλυτικές στήλες-, μέχρι τα 100 cm – οι παρασκευαστικές στήλες. Το συνηθέστερο υλικό πλήρωσης είναι το διοξείδιο του πυριτίου (*silica gel*, SiO_2) στο οποίο μπορούν να δεσμευτούν αλυσίδες αλκυλίων από 8 ή 18 άτομα άνθρακα (στήλες C_8 και C_{18} , αντίστοιχα), ομάδες φαινυλίων, κυανίου κ.ά. Ως υλικά πλήρωσης όμως χρησιμοποιούνται και η αλουμίνα, συνθετικές ρητίνες πολυστυρενίου-διβινυλοβενζολίου, ιοντανταλλακτικές ρητίνες κ.ά. Η επιλογή της κατάλληλης στήλης είναι εξαιρετικής σημασίας για όλη την αναλυτική διαδικασία και εξαρτάται βεβαίως από το είδος του αναλυόμενου δείγματος.

Συχνά, πριν από την αναλυτική στήλη παρεμβάλλεται μία προστατευτική στήλη (*guard-column*) ή προστήλη (*pre-column*), με κύριο σκοπό να προστατεύσει την κύρια στήλη, απομακρύνοντας σωματίδια και προσμίξεις από την κινητή φάση, αλλά και συστατικά του δείγματος που συνδέονται μη αντιστρεπτά με τη στατική φάση.

Σε κάποιες αναλύσεις, όπου απαιτείται ο διαχωρισμός συστατικών που εκκλύονται σε παρόμοιους χρόνους, η επιλογή της θερμοκρασίας της ανάλυσης είναι καθοριστικής σημασίας, αφού επιδρά όχι τόσο στο χρόνο έκλυσης (*retention time*), όσο στη διαχωριστικότητα των συστατικών (*resolution*). Γι' αυτές τις περιπτώσεις, οι κατασκευαστές

δίνουν σήμερα τη δυνατότητα στα περισσότερα εμπορικά συστήματα HPLC, η στήλη να βρίσκεται σε ειδικό θερμοστατούμενο χώρο, που συντηρεί τη θερμοκρασία της στατικής και κινητής φάσης σε συγκεκριμένους βαθμούς όταν η ανάλυση το απαιτεί.

1.3.5. Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής είναι κρίσιμο στοιχείο του συστήματος γιατί καθιστά ορατό το διαχωρισμό που γίνεται στη στήλη και επιτρέπει την αξιοποίησή του. Είναι μία διάταξη που αποκρίνεται στην ποσότητα ή στη συγκέντρωση, μέσω της παρακολούθησης μίας φυσικής ή χημικής ιδιότητας της ύλης, όπως είναι η απορρόφηση, η αγωγιμότητα, ο φθορισμός κ.ά. Η απόκριση αυτή μετατρέπεται με τη βοήθεια ηλεκτρονικών κυκλωμάτων σε ηλεκτρικό σήμα του οποίου η ένταση ενισχύεται και καταγράφεται.

Στην υδροχρωματογραφία υπάρχουν δύο βασικοί τύποι ανιχνευτών. Αυτοί που ανταποκρίνονται σε μία *βασική ιδιότητα της κινητής φάσης (bulk property detectors)*, όπως είναι ο δείκτης διάθλασης, η διηλεκτρική σταθερά ή η πυκνότητα. Η τιμή αυτής της ιδιότητας μεταβάλλεται από την παρουσία του εκλουόμενου συστατικού και αυτήν τη μεταβολή καταγράφει ο ανιχνευτής. Ο δεύτερος τύπος ανιχνευτή αποκρίνεται σε μία *ιδιότητα του εκλουόμενου συστατικού* την οποία δεν πρέπει να διαθέτει η κινητή φάση, όπως η απορρόφηση στο υπεριώδες, ο φθορισμός κ.ά. (*solute property detectors*).

1.3.5.1. Χαρακτηριστικά ιδανικού ανιχνευτή

Ο ιδανικός ανιχνευτής ενός υδροχρωματογραφικού συστήματος πρέπει να διαθέτει τα εξής χαρακτηριστικά:

1. *Ικανοποιητική ευαισθησία (sensitivity)*: Ορίζεται ως ο λόγος μεταβολής του αναλυτικού σήματος προς τη μεταβολή της συγκέντρωσης ή της ποσότητας της μετρούμενης ουσίας^[11]. Είναι, με άλλα λόγια, η ικανότητα του οργάνου να διακρίνει πολύ μικρές διαφορές στην ποσότητα του αναλύτη. Είναι ευνόητο ότι όσο μεγαλύτερη είναι η ευαισθησία του ανιχνευτή, τόσο μικρότερη είναι η ποσότητα αναλύτη που αυτός μπορεί να ανιχνεύσει.

2. *Γραμμική απόκριση (linearity)* που να επεκτείνεται σε μία ευρεία περιοχή αρκετών τάξεων μεγέθους. Η γραμμική αυτή περιοχή αποδίδεται και με τον όρο *γραμμική δυναμική περιοχή (linear dynamic range)* και επεκτείνεται από τη μικρότερη συγκέντρωση στην οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί ποσοτική μέτρηση (*όριο ποσοτικοποίησης, limit of quantification, LOQ*), έως τη συγκέντρωση όπου η καμπύλη βαθμονόμησης αποκλίνει από τη γραμμικότητα. Σχεδόν όλοι οι γνωστοί σήμερα ανιχνευτές, από μία τιμή συγκέντρωσης του αναλύτη και πάνω εμφανίζουν κορεσμό και η γραμμικότητά τους παύει να ισχύει.

3. *Σταθερότητα (stability)* κατά τη λειτουργία του η οποία να μην επηρεάζεται από τη διάρκεια της λειτουργίας ή από εξωτερικούς παράγοντες, π.χ. θερμοκρασία, υγρασία, αλλαγή ροών κινητών φάσεων, αλλαγή χημικού συστήματος. Η σταθερότητα εξασφαλίζει ως ένα βαθμό την *αναπαραγωγιμότητα (reproducibility)* των μετρήσεων.

4. Να αποκρίνεται σε όλα τα συστατικά του μίγματος (*γενικός ανιχνευτής*) ή να έχει γνωστή εκλεκτικότητα (*selectivity*) για μια ή περισσότερες ομάδες ενώσεων (*ειδικός ανιχνευτής*).

5. Μικρούς χρόνους απόκρισης ανεξάρτητους από τη ροή των διαλυτών. Οι σύγχρονοι ανιχνευτές, με τις ηλεκτρονικές διατάξεις που διαθέτουν, έχουν χρόνους απόκρισης που φτάνουν τα 50 msec, ενώ για πολύ γρήγορες αναλύσεις έχουν επιτευχθεί χρόνοι απόκρισης μέχρι και 15 msec. Αυτό βέβαια απαιτεί ο ανιχνευτής να είναι εφοδιασμένος με συστήματα που αποκλείουν την παράσιτη ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία από κοντινές ηλεκτρικές και ηλεκτρονικές συσκευές για την αποφυγή θορύβου^[12].

6. Τον ελάχιστο, κατά το δυνατό, εσωτερικό όγκο ώστε να περιορίζεται η διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών.

7. Να μην καταστρέφει το δείγμα, για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί και με άλλο ανιχνευτή σε σειρά.

8. Να είναι εύκολος στη χρήση ακόμη κι από ένα λιγότερο έμπειρο χρήστη.

9. Να έχει –κατά το δυνατό– χαμηλό κόστος αγοράς, λειτουργίας, αλλά και συντήρησης.

Είναι προφανές ότι δεν υπάρχουν στην υγροχρωματογραφία ανιχνευτές που να συνδυάζουν όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά. Η βελτίωση ωστόσο των υπαρχόντων ανιχνευτών, αλλά και η ανάπτυξη καινούριων που θα το επιτύχουν, είναι από τις μεγαλύτερες προκλήσεις του πεδίου γενικά της Αναλυτικής Χημείας.

1.3.6. Σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας αποτελεσμάτων

Τα σύγχρονα συστήματα HPLC δε διαθέτουν απλούς καταγραφείς. Διαθέτουν πανίσχυρους μικροϋπολογιστές με λογισμικά που έχουν τον έλεγχο λειτουργίας όλου του συστήματος, ρυθμίζουν την ανάμειξη και τις ροές των κινητών φάσεων, τη θερμοκρασία της στήλης, τη σειρά εισαγωγής των δειγμάτων, τη λειτουργία του ανιχνευτή. Επιπλέον αναλαμβάνουν τη συλλογή, αποθήκευση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων των μετρήσεων και την παρουσίασή τους με πολλές πληροφορίες και ευφάνταστα γραφικά.

1.4. Ανιχνευτές της Υγροχρωματογραφίας^[1,3-6,12]

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται περισσότερο στην υγροχρωματογραφία είναι οι παρακάτω:

1.4.1. Ανιχνευτής Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis Detector)

Πρόκειται για τον ανιχνευτή που χρησιμοποιείται στην πλειοψηφία των εφαρμογών με HPLC κι έχει καθιερωθεί εξαιτίας της ευκολίας στη χρήση του και του σχετικά χαμηλού πλέον κόστους του. Απαραίτητη προϋπόθεση βέβαια για την επιλογή αυτού του ανιχνευτή, είναι οι ουσίες που ανιχνεύονται να διαθέτουν μία ή περισσότερες χρωμοφόρες ομάδες, όπως είναι π.χ. ο συζυγιακός διπλός δεσμός, οι καρβονυλικές ομάδες, ο αρωματικός

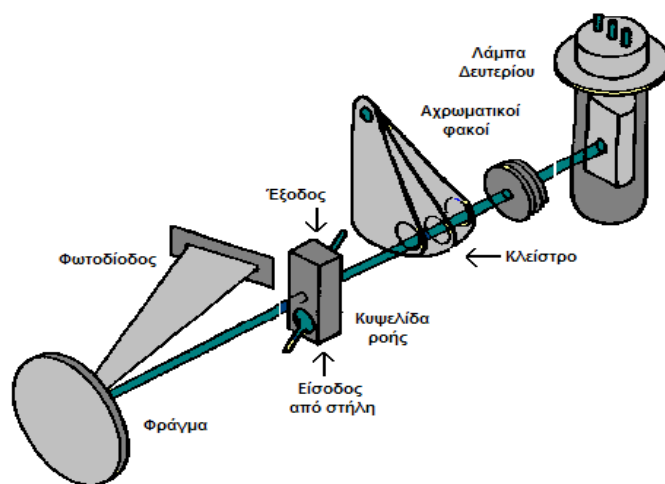
δακτύλιος κ.ά. Ως πηγή ακτινοβολίας χρησιμοποιείται μία λυχνία δευτερίου ή αλογόνου, για μετρήσεις στην περιοχή του υπεριώδους (190-400 nm), και μία λυχνία νήματος βολφραμίου για μετρήσεις στην περιοχή του ορατού (400-800 nm), ενώ αξίζει να αναφερθεί και η λυχνία τόξου ξένου που παράγει έντονη ακτινοβολία και συνεχές φάσμα εκπομπής στην περιοχή 200 έως 1000 nm. Ο ανιχνευτής διαθέτει μία μικροκυψελίδα συνεχούς ροής, όγκου από 1 έως 10 μL , στην οποία διαβιβάζεται το υγρό έκλουσης της στήλης. Η ευαισθησία του εξαρτάται από τη μοριακή απορροφητικότητα των διαφόρων συστατικών, δεν επηρεάζεται από εξωτερικές μεταβολές της θερμοκρασίας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε προγράμματα βαθμιδωτής έκλουσης.

Υπάρχουν τρεις κυρίως τύποι του ανιχνευτή UV-Vis:

1. *Ανιχνευτής σταθερού μήκους κύματος (Fixed Wavelength Detector)*: Είναι ο απλούστερος τύπος ανιχνευτή και χρησιμοποιείται πλέον σπάνια. Διαθέτει πηγή ακτινοβολίας ενός μόνο μήκους κύματος (π.χ. λυχνία ατμών Hg που παράγει έντονη ακτινοβολία στα 254 nm - 253,7 nm για την ακρίβεια-, λυχνία Cd στα 225 nm, λυχνία Zn στα 214 nm, κ.ά.) περιορίζοντας όμως έτσι τη χρήση του στον προσδιορισμό ενώσεων που απορροφούν μόνο σε αυτήν την τιμή. Η χρήση φίλτρου βελτιώνει την απόδοση της πηγής, απομονώνοντας την πιο ισχυρή από τις γειτονικές γραμμές εκπομπής. Η ευαισθησία του φτάνει την τάξη των $10^{-8} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

2. *Ανιχνευτής πολλαπλών σταθερών μηκών κύματος (Variable Wavelength Detector)*: Η πηγή ακτινοβολίας του εκπέμπει φως σε μία ευρεία περιοχή μηκών κύματος. Με τη βοήθεια, όμως, μονοχρωμάτορα, πρίσματος ή φράγματος περίθλασης, επιλέγεται το κατάλληλο μήκος κύματος, στο υπεριώδες ή στο ορατό, όπου αναλύεται το δείγμα. Η επιλογή της συγκεκριμένης τιμής ακτινοβολίας γίνεται, είτε γιατί εκεί ο αναλύτης απορροφά πιο ισχυρά, είτε γιατί δεν απορροφά κανένα άλλο από τα συνυπάρχοντα συστατικά του δείγματος.

3. *Ανιχνευτής με συστοιχία φωτοδιόδων (Photo Diode-Array Detector, PDA, σχήμα 1.4)*: Διαθέτει μία γραμμική συστοιχία εκατοντάδων φωτοδιόδων πυριτίου που έχει τη δυνατότητα να συλλέγει το πλήρες φάσμα κάθε μίας ένωσης του δείγματος κατά την έξοδο της από τη στήλη, σε χρόνο περίπου 1 sec. Αυτό επιτυγχάνεται διότι όταν η δέσμη ακτινοβολίας εξέλθει από την κυψελίδα, προσπίπτει σε φράγμα, αναλύεται και κατευθύνεται στη συστοιχία. Οι μετρήσεις κάθε μιας φωτοδιόδου ξεχωριστά συλλέγονται από τον υπολογιστή και επεξεργάζονται. Η ικανότητα ανάλυσης του ανιχνευτή PDA εξαρτάται από τον αριθμό των φωτοδιόδων που διαθέτει, αλλά και από τη λεπτομέρεια της κατασκευής τους. Η ταχύτητα συλλογής δεδομένων και η πληθώρα των πληροφοριών που παρέχει, έχουν κάνει το συγκεκριμένο ανιχνευτή ιδιαίτερος ελκυστικό για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση συστατικών και τείνει να επικρατήσει για αναλύσεις ρουτίνας παρά το αυξημένο κόστος του σε σχέση με τους άλλους δύο τύπους. Επιπρόσθετα με τον ανιχνευτή αυτό είναι δυνατός ο προσδιορισμός της καθαρότητας κορυφής (*peak purity*) μέσω της οποίας ελέγχεται η εκλεκτικότητα της μεθόδου HPLC.



Σχήμα 1.4: Διάγραμμα ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδίοδων.

1.4.2. Ανιχνευτής Απορρόφησης Υπερύθρου (Infra-Red Detector, IR)

Στο εμπόριο κυκλοφορούν δύο τύποι οργάνων IR για χρήση στην υγροχρωματογραφία. Ο πρώτος τύπος οργάνου, ο πιο απλός, διαθέτει ένα τριπλό φίλτρο και έχει τη δυνατότητα να επιλέγει μήκος κύματος στην περιοχή μεταξύ 4000 και 700 cm^{-1} . Το όργανο μπορεί να προγραμματιστεί για να μετρά την απορρόφηση δείγματος με πολλά συστατικά σε διάφορα μήκη κύματος και στη συνέχεια να υπολογίζει τη συγκέντρωση σε καθένα από αυτά.

Ο δεύτερος και πιο εξελιγμένος τύπος ανιχνευτή βασίζεται σε οργανολογία μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) που χρησιμοποιείται με τρόπο ανάλογο όπως τα φασματοφωτόμετρα με διατάξεις φωτοδίοδων.

Ο ανιχνευτής IR δεν είναι ευαίσθητος και έχει μικρή εκλεκτικότητα επειδή οι περισσότεροι οργανικοί διαλύτες της κινητής φάσης απορροφούν στην περιοχή του υπερύθρου, γι' αυτό και δεν έχει καθιερωθεί στην υγροχρωματογραφία παρά για ελάχιστες εφαρμογές.

1.4.3. Ανιχνευτής Φθορισμού (Fluorescence Detector)

Είναι παραλλαγή του φασματοφωτομετρικού ανιχνευτή απορρόφησης. Χρησιμοποιεί ως πηγή ακτινοβολίας λυχνίες ατμών υδραργύρου ή λυχνίες εκκένωσης αερίου ξένου, ενώ η τάση οδηγεί στην κατεύθυνση της χρήσης ρυθμιζόμενων πηγών λέιζερ που αυξάνουν την ευαισθησία και την εκλεκτικότητα. Μία διάταξη φίλτρων ή ένας μονοχρωμάτορας τοποθετημένος σε γωνία 90° ως προς την ακτινοβολία διέγερσης, απομονώνει την ακτινοβολία φθορισμού και την οδηγεί στο φωτοηλεκτρικό ανιχνευτή. Σε αυτό οφείλεται η εξαιρετικά μεγάλη ευαισθησία και η εκλεκτικότητα του φθορισμομετρικού ανιχνευτή σε σχέση με τον ανιχνευτή UV-Vis. Καθώς όμως δεν είναι πολλές οι ουσίες που έχουν εγγενή

την ιδιότητα του φθορισμού, ο συγκεκριμένος ανιχνευτής δε μπορεί να καθιερωθεί για αναλύσεις ρουτίνας. Συχνά ωστόσο, ουσίες μη φθορίζουσες μπορούν να μετατραπούν σε φθορίζουσες με αντιδράσεις παραγωγοποίησης, με αντιδραστήρια όπως το δανσυλοχλωρίδιο (5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl chloride) ή η ο-φθαλδεΐδη (o-phthaldehyde), με όλα τα μειονεκτήματα που έχει μια τέτοια προκατεργασία.

1.4.4. Διαφορικός Ανιχνευτής Δείκτη Διάθλασης (Refractive Index Detector, RID)

Είναι από τους πρώτους «on-line» ανιχνευτές που αναπτύχθηκε και πρωτοπαρουσιάστηκε από τους Tiselius και Claesson το 1942^[13]. Από τότε, έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τύποι ανιχνευτών RID, καθένας από τους οποίους διαθέτει διαφορετικό οπτικό σύστημα (Angle Deviation-RID, Fresnel Method-RID, Christiansen Effect-RID, Thermal Lens Detector κ.ά.). Όλοι όμως, ανεξαρτήτως της μεθόδου που ακολουθείται, μετρούν τελικά τη γωνία απόκλισης μονοχρωματικής ακτινοβολίας, καθώς αυτή περνάει από το ένα ιστροπικό μέσο στο άλλο, το οποίο ανάγεται σε μέτρηση της διαφοράς του δείκτη διάθλασης της κινητής φάσης παρουσία των διαχωριζόμενων συστατικών του μίγματος.

Το κύριο χαρακτηριστικό του ανιχνευτή δείκτη διάθλασης είναι ότι αποκρίνεται σε όλες σχεδόν τις ενώσεις, ακόμη και σε αυτές που έχουν χαμηλή απορροφητικότητα στο UV, και υπό αυτήν την έννοια χαρακτηρίζεται ως γενικός ανιχνευτής (*universal detector*), ανάλογος με τον ανιχνευτή φλόγας ή θερμικής αγωγιμότητας στην αεριοχρωματογραφία.

Είναι αξιόπιστος ανιχνευτής και η λειτουργία του δεν επηρεάζεται από την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης, επηρεάζεται όμως από εξωτερικές μεταβολές της θερμοκρασίας ενώ, επιπλέον, εμφανίζει μειωμένη ευαισθησία σε σχέση με τους ανιχνευτές Υπεριώδους-Ορατού (περιοχή συγκεντρώσεων ανιχνευτή RID 1-10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Τέλος, δεν ενδείκνυται για εφαρμογές με προγράμματα βαθμιδωτής έκλουσης.

1.4.5. Εξατμιστικός Ανιχνευτής Σκέδασης Ακτινοβολίας (βλ. Υποκ. 1.5.)

1.4.6. Ηλεκτροχημικοί Ανιχνευτές (Electrochemical Detectors)

Οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές δεν έχουν αξιοποιηθεί ιδιαίτερα στην υγροχρωματογραφία, όσο οι οπτικοί ανιχνευτές, παρά το γεγονός ότι η ηλεκτροχημική δραστηριότητα είναι μία φυσική ιδιότητα της ύλης. Οι συσκευές αυτές βασίζονται στην αμπερομετρία, την πολαρογραφία, την κουλομετρία και την αγωγιμομετρία, αλλά οι ανιχνευτές που απαντώνται πιο συχνά σε HPLC εφαρμογές είναι οι εξής:

1. Αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές

Μετρούν, υπό σταθερό δυναμικό, την ηλεκτρική αγωγιμότητα $1/R$ διαλυμάτων του αναλύτη η οποία εξαρτάται από τη συγκέντρωση ιοντικών σωματιδίων. Ο προσδιορισμός της αγωγιμότητας του διαλύματος ανάγεται τελικά σε μέτρηση της ωμικής του αντίστασης R και η αρχή λειτουργίας των αγωγιμομετρικών ανιχνευτών βασίζεται στη γέφυρα Wheatstone. Είναι πολύ ευαίσθητοι ανιχνευτές, απλοί και μικροί σε μέγεθος, φθινοί στην

κατασκευή και τη συντήρησή τους. Η αγωγιμότητα, βέβαια, είναι μία ιδιότητα που επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, αλλά και από παρεμποδίζοντα ιόντα των συστατικών της κινητής φάσης. Το πρόβλημα αυτό, όμως, αντιμετωπίζεται με τη χρήση *σπηλών καταστολής του εκλούσματος (suppressors)* οι οποίοι εξουδετερώνουν τα ιόντα της κινητής φάσης μετατρέποντάς τα σε μοριακά σωματίδια, χωρίς να επηρεάζονται τα ιόντα του αναλύτη.

Χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο στην Ιοντική Χρωματογραφία.

2. Αμπερομετρικοί ανιχνευτές

Μετρούν την ένταση του ρεύματος σε μια κυψελίδα ροής στην οποία εφαρμόζεται σταθερό δυναμικό. Η μεταβολή του ρεύματος προκαλείται από αντιδράσεις οξειδοαναγωγής του αναλύτη πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Σοβαρό μειονέκτημα στη χρήση τους είναι ότι, όπως και στους αγωγιμομετρικούς ανιχνευτές, όλοι οι διαλύτες πρέπει να είναι εξαιρετικής καθαρότητας, απαλλαγμένοι από διαλυμένο οξυγόνο και παρεμποδίζοντα ιόντα, τα ηλεκτρόδια εργασίας χρειάζονται συχνό καθαρίσμα, καθώς προσροφούν πολύ εύκολα τα προϊόντα των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, ενώ και η απόκριση επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, την ταχύτητα ροής, αλλά και εξωγενή ηλεκτρικά σήματα.

Όπως προκύπτει βέβαια, οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές απαιτούν αγωγίμες κινητές φάσεις, π.χ. νερό. Αυτό αυτομάτως αποκλείει την πλειοψηφία των αναλύσεων κανονικής φάσης, όπου χρησιμοποιούνται μη-πολικό διαλύτες, ενώ και στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, όταν χρησιμοποιούνται μη υδατικοί διαλύτες, όπως το ACN, πρέπει να προστίθεται κάποιο άλας, π.χ. εξαφθοροφωσφορικό τετραβουτυλαμμώνιο, ώστε να μεταβάλλεται η αγωγιμότητα του διαλύτη.

1.4.7. Ανιχνευτής Φασματομετρίας Μαζών (Mass Detector, MS)

Παρά το υψηλό κόστος, ο συνδυασμός LC με MS κερδίζει ολοένα θέση ανάμεσα στις αναλυτικές τεχνικές. Η βασική αρχή λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών στηρίζεται στη δημιουργία ιοντικών θραυσμάτων- κυρίως κατιονικών-, το διαχωρισμό και την καταγραφή τους με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο m/z ^[14]. Ο ιοντισμός του δείγματος μπορεί να γίνει με βομβαρδισμό του με ρεύμα ηλεκτρονίων από θερμό νήμα (*ιοντισμός ηλεκτρονίων*), με χημική αντίδραση ιόντων-μορίων στην αέρια φάση (*χημικός ιοντισμός*) ή με βομβαρδισμό του δείγματος με δέσμη ουδέτερων ατόμων από μία πηγή Ar ή Xe (*Fast Atom Bombardment*). Ο αναλυτής μαζών μπορεί να ανιχνεύσει και να ταυτοποιήσει κάθε μία κορυφή του χρωματογραφήματος, να διακρίνει τις κορυφές που αντιστοιχούν στις ζητούμενες ουσίες από άλλες δευτερεύουσες κορυφές και ακόμη να αντιμετωπίσει το φαινόμενο της υπερκάλυψης κορυφών από άλλες γειτονικές με μεγαλύτερη ένταση.

Το βασικότερο πρόβλημα στη σύζευξη των δύο τεχνικών, LC και MS, είναι η ασυμβατότητα ανάμεσα στους σχετικά μεγάλους όγκους διαλυτών της υγροχρωματογραφίας και του κενού που απαιτεί ο αναλυτής μαζών. Για την επίλυσή του έχουν προταθεί διάφορα σχήματα σύνδεσης, όπως ο θερμοψεκασμός (*thermospray*) που

εφαρμόζεται κυρίως για τον προσδιορισμό πολικών μορίων με πολικές κινητές φάσεις, ο ηλεκτροψεκασμός (*electrospray*) ή ακόμη ο ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*), μερικά από τα οποία αποτελούν και τεχνικές ιοντισμού του δείγματος. Ως αναλυτές μάζας χρησιμοποιούνται σήμερα κυρίως τα τετράπολα (*quadrupoles*), αλλά και οι παγίδες ιόντων (*ion-traps*) και οι αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης (*time-of-flight*).

1.4.8. Λιγότερο κοινοί ανιχνευτές

- 1. Ανιχνευτές ραδιενέργειας:** Εξαιρετικά ευαίσθητοι και εκλεκτικοί ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται για ραδιοεπισημασμένες ενώσεις βιολογικού, φαρμακευτικού και περιβαλλοντικού ενδιαφέροντος.
- 2. Πολωσίμετρα:** Χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό οπτικά ενεργών ουσιών.
- 3. Μετρητές ιξώδους:** Η αρχή λειτουργίας τους βασίζεται στη μέτρηση του ιξώδους της κινητής φάσης παρουσία και απουσία του αναλύτη.

1.5. Εξατμιστικός Ανιχνευτής Σκέδασης Ακτινοβολίας (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD)

1.5.1. Γενικά-Ιστορική Αναδρομή

Ο εξατμιστικός ανιχνευτής σκέδασης ακτινοβολίας, ELSD, είναι ένας νέου τύπου ανιχνευτής που είναι εμπορικά διαθέσιμος τα τελευταία χρόνια. Ήρθε να καλύψει μια ανάγκη κι ένα κενό που υπήρχε με τους υπόλοιπους ανιχνευτές της Υγροχρωματογραφίας. Σήμερα στις περισσότερες εφαρμογές με HPLC, στη βιομηχανία και τον έλεγχο ποιότητας, ο ανιχνευτής που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο είναι ο ανιχνευτής Υπεριώδους/Ορατού, ελάχιστα ο ανιχνευτής Δείκτη Διάθλασης, κυρίως για τον προσδιορισμό λιπών και σακχάρων, και σε κάποιες μεμονωμένες περιπτώσεις ο ανιχνευτής Φθορισμού. Και οι τρεις αυτοί ανιχνευτές είναι απλοί στη χρήση, δίνουν αξιόπιστα αποτελέσματα και, επιπλέον, το σχετικά χαμηλό κόστος, τους καθιστά προσιτούς για αναλύσεις ρουτίνας.

Υπάρχουν, όμως και για τους τρεις σοβαροί περιορισμοί στη χρήση τους. Οι ανιχνευτές UV-Vis και φθορισμού είναι αξιοποιήσιμοι μόνο εφ' όσον η προσδιοριζόμενη ουσία διαθέτει χρωμοφόρες ή φθορίζουσες ομάδες, αντίστοιχα. Κι όταν κάτι τέτοιο δεν είναι εφικτό, ο αναλυτής καταφεύγει σε αντιδράσεις παραγωγοποίησης (είτε κατά την προκατεργασία του δείγματος, είτε σε μικρές στήλες τύπου HPLC πριν/μετά την εισαγωγή του δείγματος στην κύρια στήλη, pre/post-column derivatization), που όμως προσθέτουν επιπλέον στάδια στην όλη διαδικασία προσδιορισμού, καθιστώντας την χρονοβόρα, κοστοβόρα και με περισσότερες πιθανότητες σφάλματος. Ο ανιχνευτής RID μπορεί να προσδιορίσει ουσίες που στερούνται χαρακτηριστικών ομάδων, όμως έχει χαμηλή ανιχνευσιμότητα και δε βρίσκει εφαρμογή σε συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης.

Ο ανιχνευτής MS δεν έχει κανέναν από τους παραπάνω περιορισμούς και επιπλέον μπορεί να δίνει πληροφορίες για τις προσδιοριζόμενες ουσίες (π.χ. μοριακή μάζα, χημική δομή ένωσης) που κανέναν από τους υπόλοιπους ανιχνευτές δε μπορεί να δώσει. Όμως το κόστος του, αγοράς και λειτουργίας, παραμένει ακόμη σχετικά απαγορευτικό για αναλύσεις ρουτίνας, γι' αυτό και η χρήση του περιορίζεται, μέχρι σήμερα τουλάχιστον, σε μεγάλα εργαστήρια, ερευνητικά ινστιτούτα και πανεπιστήμια.

Στα παραπάνω προβλήματα φαίνεται ότι μπορεί να δώσει απαντήσεις ο ανιχνευτής ELSD.

Η πρώτη αναφορά στον ανιχνευτή ELSD γίνεται το 1966, όταν πρωτοεισήχθει στα εργαστήρια Union Carbide στην Αυστραλία από τους Ford και Kennard^[15]. Δε χρησιμοποιήθηκε ιδιαίτερα έκτοτε μέχρι και το 1980, οπότε οι Mouery και Oppenheimer αναζητούσαν έναν ανιχνευτή που θα αποκρινόταν στη μάζα του αναλύτη, προκειμένου να μελετηθεί με συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης ένα μίγμα συνθετικών πολυμερών^[16].

Την ίδια εποχή δημιουργείται η πρώτη έκδοση του ELSD που είναι εμπορικά διαθέσιμη, από την εταιρία Applied Chromatography Systems Ltd. (vuv Polymer Labs, Macclesfield, U.K.)^[17]. Στα μέσα του 1980, κατασκευάζεται από την εταιρία Varex Corporation (vuv Alltech Associates Inc., Deerfield), η δεύτερη γενιά ανιχνευτών ELSD,

στην οποία προτείνεται μία διάταξη laser ως πηγή ακτινοβολίας ^[18]. Τέλος, το 1986, η γαλλική εταιρία S.E.D.E.R.E. (Alfortville, Cedex, France) εισήγαγε μία καινοτομία κατά την οποία η εκνέφωση του διαλύματος μετά τη στήλη, γίνεται σε γυάλινο κεκλιμένο σωλήνα αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία του προσδιορισμού^[19].

Σήμερα, όλες οι παραπάνω εταιρίες, αλλά και μερικές ακόμη (βλ. Shimadzu, Agilent), κατασκευάζουν ανιχνευτές ELSD που διαθέτουν εξαιρετικά χαρακτηριστικά ποιότητας, έχουν κόστος πολύ προσιτό και μπορούν να βρουν εφαρμογή σε μία πληθώρα αναλύσεων πολλών και διαφορετικών δειγμάτων.

1.5.2. Σκέδαση Ακτινοβολίας

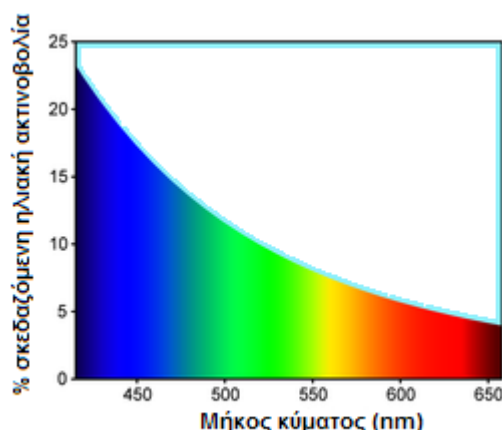
1.5.2.1. Γενικά περί του φαινομένου της σκέδασης

Είναι γνωστό από την ηλεκτρομαγνητική θεωρία, ότι η διάδοση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην ύλη, οδηγεί στη διέγερση των σωματιδίων της ύλης-μορίων, ατόμων ή ιόντων- από τη βασική ενεργειακή τους κατάσταση σε μία διεγερμένη κατάσταση υψηλότερης ενεργειακής στάθμης. Η αποδιέγερση των σωματιδίων γίνεται με την επανεκπομπή (σκέδαση) της απορροφούμενης ακτινοβολίας προς όλες τις κατευθύνσεις. Σύμφωνα με την IUPAC, με τον όρο «σκέδαση του φωτός» (*light scattering*) *εννοείται η μεταβολή στη διεύθυνση διάδοσης της ακτινοβολίας εξαιτίας αλληλεπιδράσεων με μόρια ή αερολύματα (σκέδαση κατά Rayleigh/Raman ή Mie, αντίστοιχα, βλ.υποκ.1.5.2.2.)*^[20].

Η σκέδαση ανήκει στις κυματικές ιδιότητες της ακτινοβολίας, όπως η περίθλαση, η ανάκλαση, η διάθλαση κ.ά. Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός εξαρτάται από την πολωσιμότητα των σωματιδίων της ύλης, η οποία με τη σειρά της, εξαρτάται από τη μοριακή τους μάζα. Εξαρτάται όμως και από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, τις διαστάσεις και το σχήμα των σωματιδίων που προκαλούν το σκεδασμό, τη διευθέτησή τους στο χώρο και τέλος, από τις οπτικές ή ηλεκτρικές ιδιότητες που παρουσιάζουν. Σκέδαση, εκτός από τα σωματίδια, μπορεί να προκληθεί και από φυσαλίδες, σταγονίδια, από διακυμάνσεις της πυκνότητας των ρευστών, από ανωμαλίες στις επιφάνειες των στερεών, ανομοιομορφίες στους στερεούς κρυστάλλους κ.ά. Όλα τα παραπάνω καλούνται *κέντρα σκέδασης (scattering centers)*^[21,22].

Η σκέδαση δε σχετίζεται μόνο με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αλλά και με τον ήχο και τα ραδιοκύματα και επηρεάζει πολλές εκφάνσεις της καθημερινής ζωής. Η σκέδαση του φωτός, για παράδειγμα, σε συνδυασμό με την άλλη πολύ σημαντική ιδιότητά του, την απορρόφηση, είναι ο λόγος που τα αντικείμενα γίνονται αντιληπτά από το ανθρώπινο μάτι, τόσο ως προς το χρώμα, τις διαστάσεις τους, αλλά και την απόστασή τους από ακίνητο παρατηρητή. Στη σκέδαση της ηλιακής ακτινοβολίας στα σωματίδια της ατμόσφαιρας, και συγκεκριμένα στη σκέδαση κατά Rayleigh που θα αναφερθεί παρακάτω, οφείλεται και το μπλε χρώμα του καθαρού ουρανού. Ο συγκεκριμένος τύπος σκέδασης εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και είναι πιο αποτελεσματικός στα μικρά

μήκη κύματος, που αντιστοιχούν στην κυανή περιοχή του ορατού φάσματος, εξηγώντας γιατί το μπλε είναι το κυρίαρχο χρώμα της ατμόσφαιρας. Αντίθετα στη σκέδαση κατά Mie, η οποία δεν εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, οφείλεται το σχεδόν άσπρο χρώμα που έχουν τα σύννεφα, αλλά και η ατμόσφαιρα παρουσία ομίχλης^[23].



Σχήμα 1.5: Στο διάγραμμα φαίνεται ότι το % ποσοστό της σκεδαζόμενης ηλιακής ακτινοβολίας είναι πολύ μεγαλύτερο στην κυανή περιοχή του ορατού φάσματος, γεγονός που εξηγεί το μπλε χρώμα του ουρανού^[23].

1.5.2.2. Μηχανισμοί σκέδασης ακτινοβολίας

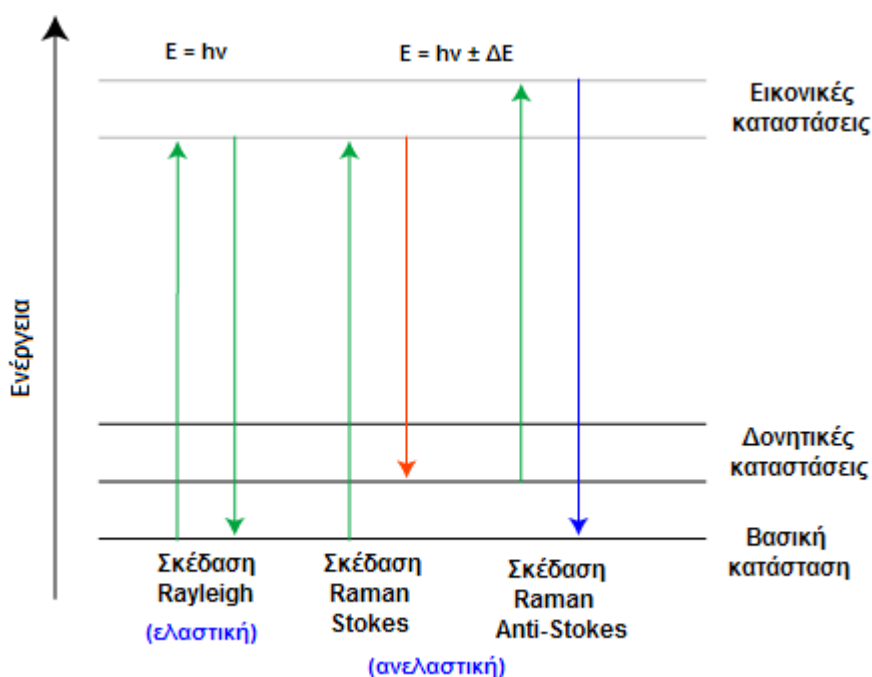
Όταν η σκέδαση της ακτινοβολίας προκαλείται από ένα μόνο κέντρο σκέδασης καλείται *απλή (single scattering)*. Αντίθετα, όταν συνυπάρχουν πολλά κέντρα σκέδασης τότε η ακτινοβολία σκεδάζεται από κάθε ένα από αυτά, αλλάζει διεύθυνση διάδοσης, προσκρούει σε διαφορετικό σωματίδιο και επανασκεδάζεται για δεύτερη, τρίτη, τέταρτη φορά κ.ο.κ. προς διάφορες κατευθύνσεις. Αυτός ο τύπος σκέδασης καλείται *πολλαπλός (multiple scattering)*. Η απλή σκέδαση θεωρείται τυχαίο (random) φαινόμενο εξαιτίας του γεγονότος ότι η θέση ενός μόνο κέντρου σκέδασης δε μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια σε σχέση με την τροχιά διάδοσης της ακτινοβολίας, κι είναι επομένως αδύνατο να βεβαιωθεί ότι υπήρξε κρούση των φωτονίων με το κέντρο σκέδασης κι ότι η παρατηρούμενη σκεδαζόμενη ακτινοβολία είναι το αποτέλεσμα αυτής της κρούσης. Αντιθέτως, στην πολλαπλή σκέδαση η ύπαρξη πλήθους κέντρων σκέδασης οδηγεί σε μεγάλο αριθμό συγκρούσεων που συμβαίνουν ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα αυτή η τυχαιότητα να τείνει να εξαλειφθεί^[24].

Εκτός από τον παραπάνω διαχωρισμό, η σκέδαση της ακτινοβολίας διακρίνεται σε *ανελαστική (inelastic scattering)* και *ελαστική (elastic scattering)*.

Στην ανελαστική σκέδαση, η συχνότητα, κι επομένως η ενέργεια, της προσπίπτουσας ακτινοβολίας είναι διαφορετική από της σκεδαζόμενης, διότι κατά τη σύγκρουση των φωτονίων με τα σωματίδια της ύλης, ανεξάρτητα από τη γωνία σκέδασης,

ενέργεια μπορεί να μεταφερθεί από το φωτόνιο στο σωματίδιο ή αντίστροφα, προκαλώντας περιστροφικές και δονητικές μεταπτώσεις των μορίων. Πρέπει να αναφερθεί ότι, σύμφωνα με την IUPAC, ο ορισμός της ανελαστικής σκέδασης αναφέρεται σε εκείνες τις συγκρούσεις φωτονίων-σωματιδίων που δεν οδηγούν σε χημική αντίδραση^[20]. Το φαινόμενο καλείται σκέδαση κατά Raman και έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της συχνότητας των φωτονίων σε μεγαλύτερα ή μικρότερα μήκη κύματος (μετατόπιση Stokes και anti-Stokes, αντίστοιχα). Στην ίδια κατηγορία υπάγεται και η σκέδαση κατά Brillouin κατά την οποία οι μεταβολές στην ενεργειακή κατάσταση των σωματιδίων της ύλης προκαλούνται από θερμικές μεταβολές στο μέσο διάχυσης της ακτινοβολίας. Τα δύο φαινόμενα αποτέλεσαν τη βάση για την ανάπτυξη σημαντικών φασματοσκοπικών τεχνικών, ωστόσο δε βρίσκουν εφαρμογή στην αρχή λειτουργίας του ανιχνευτή ELSD^[25,26].

Αντίθετα, ελαστική καλείται η σκέδαση κατά την οποία η συχνότητα, και επομένως η ενέργεια της προσπίπτουσας και της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι ίδιες. Το διάγραμμα του σχήματος 1.6 αποτελεί μια ποιοτική προσέγγιση της μεταβολής της ενέργειας των σωματιδίων όταν αυτά αλληλεπιδρούν με φωτόνια από την πηγή, όπως πραγματοποιείται στην ελαστική και την ανελαστική σκέδαση.



Σχήμα 1.6: Μεταβολή ενέργειας σωματιδίων κατά την ελαστική (Rayleigh) και ανελαστική (Raman) σκέδαση.

Η μετατόπιση Stokes είναι πιθανότερη να συμβεί από την anti-Stokes. Επιπλέον η σκέδαση Rayleigh έχει σημαντικά μεγαλύτερη πιθανότητα να συμβεί από τη σκέδαση Raman, επειδή είναι πιθανότερη η μεταφορά ενέργειας σε μόρια που βρίσκονται στη

θεμελιώδη κατάσταση και η επανεκπομπή της λόγω της επιστροφής των μορίων στη θεμελιώδη κατάσταση^[1].

Διακρίνονται τέσσερις διαφορετικοί τύποι ελαστικής σκέδασης και η ταξινόμηση γίνεται με βάση το μέγεθος των σωματιδίων που σκεδάζουν την ακτινοβολία σε σχέση με το μήκος κύματος αυτής^[27,28]. Ο διαχωρισμός αυτός φαίνεται στον πίνακα 1.1 που ακολουθεί:

Πίνακας 1.1: Μηχανισμοί ελαστικής σκέδασης ακτινοβολίας

Τύπος Σκέδασης	Μέγεθος Σωματιδίων
Rayleigh ^a	$d \ll 0,05\lambda$
Debye ^a	$0,05\lambda < d < \lambda$
Mie	$d > \lambda$
Reflection-Refraction (Ανάκλασης-Διάθλασης)	$d \gg \lambda$

a: συχνά καλούνται από κοινού ως σκέδαση Rayleigh-Debye

d: διάμετρος σωματιδίων

λ : μήκος κύματος ακτινοβολίας

Όπως φαίνεται στον πίνακα, η σκέδαση Rayleigh-Debye είναι η κυρίαρχη, όταν τα σωματίδια έχουν μέγεθος μικρότερο από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Σε αυτήν την περίπτωση, τα σωματίδια θεωρούνται σημειακές πηγές, όπου δεχόμενα την επίδραση των φωτονίων, μετατρέπονται σε ταλαντούμενα δίπολα και επανεκπέμπουν αυτήν την ακτινοβολία με μια ενέργεια $(E_{sc})_{\theta}$ η οποία για τυχαία γωνία θ , έχει υπολογιστεί ότι δίνεται από τη σχέση^[29]:

$$(E_{sc})_{\theta} = \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}\right)^2 \left(\frac{D}{2}\right)^6 \frac{(1 + \cos^2 \theta)E_o}{2R^2} \quad (1.1)$$

όπου n και D είναι ο δείκτης διάθλασης και η διάμετρος του σωματιδίου, αντίστοιχα, E_o η ενέργεια της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και R η απόσταση του ανιχνευτή από το σωματίδιο που σκεδάζει το φως.

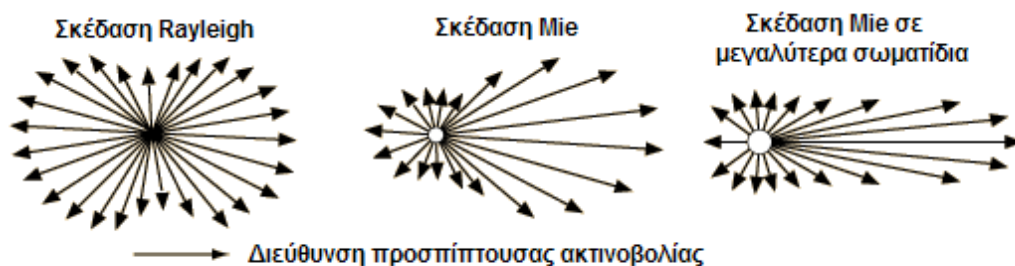
Για τα μόρια, ωστόσο, για τα οποία δεν είναι εύκολο να προσδιοριστεί ούτε ο δείκτης διάθλασης, ούτε η διάμετρός τους, προτιμάται η ενέργεια της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας να εκφράζεται συναρτήσει της πολωσιμότητας, α , των μορίων από τη σχέση:

$$(E_{sc})_{\theta} = \frac{8\pi^4 (\alpha)^2 (1 + \cos^2 \theta)E_o}{\lambda^4 R^2} \quad (1.2)$$

όπου η πολωσιμότητα του μορίου εκφράζει την ικανότητά του να μετατρέπεται σε δίπολο υπό την επίδραση της ακτινοβολίας.

Από τις δύο εξισώσεις, προκύπτει ότι η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας αυξάνει, όσο αυξάνει το μέγεθος των σωματιδίων κι επιπλέον ότι, υπό γωνία 90° , η σκεδαζόμενη ακτινοβολία εμφανίζει πλήρη γραμμική πόλωση.

Όταν η διάμετρος των σωματιδίων έχει μέγεθος μεγαλύτερο από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, τότε τα σωματίδια δε θεωρούνται πλέον σημειακές πηγές και δε σκεδάζουν το φως σχεδόν ομοιόμορφα προς όλες τις κατευθύνσεις, όπως συμβαίνει στη σκέδαση κατά Rayleigh. Αντίθετα, θεωρούνται ως άθροισμα σημείων καθένα από τα οποία μπορεί να δέχεται την επίδραση του φωτός με διαφορετικό τρόπο. Το αποτέλεσμα είναι ότι οι ακτινοβολίες που εκπέμπονται μπορούν να συμβάλλουν και η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός μπορεί να έχει μεγαλύτερη ή μικρότερη ένταση αναλόγως της γωνίας παρατήρησης. Τα παραπάνω τεκμηρίωσε ο Γερμανός φυσικός Gustav Mie σε μία μακροσκελή εργασία που δημοσιεύτηκε το 1908^[30], με αποτέλεσμα η σκέδαση του φωτός που πραγματοποιείται με αυτό το μηχανισμό να πάρει το όνομά του (Σκέδαση Mie).



Σχήμα 1.7: Φαίνονται οι δύο τύποι ελαστικής σκέδασης, Rayleigh και Mie, και ο τρόπος που το μέγεθος των σωματιδίων επηρεάζει την ένταση, αλλά και την κατεύθυνση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας.

Στην πραγματικότητα, η σκέδαση κατά Mie δεν αναπτύσσεται ως μια ανεξάρτητη θεωρία. Ουσιαστικά πρόκειται για τη λύση του Mie στις εξισώσεις του Maxwell που αφορούν στη σκέδαση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από σφαιρικά σωματίδια^[31].

Τέλος, για σωματίδια των οποίων η διάμετρος είναι πολύ μεγάλη σε σχέση με το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, ο κυρίαρχος μηχανισμός είναι αυτός της ανάκλασης-διάθλασης. Τα δύο φαινόμενα συμβαίνουν πάντα μαζί και περιγράφουν τη μεταβολή στην κατεύθυνση του φωτός, καθώς αυτό προσκρούει στη διεπιφάνεια που χωρίζει υλικά διαφορετικών φάσεων. Το άθροισμα των εντάσεων της διαθλώμενης και της ανακλώμενης ακτινοβολίας είναι ίσο με την ένταση της προσπίπτουσας. Ο δε λόγος R_A της έντασης της ανακλώμενης προς την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας δίνεται από την εξίσωση του Fresnel^[32]:

$$R_A = \frac{1}{2} \cdot \left[\frac{\sin^2(\theta_i - \theta_r)}{\sin^2(\theta_i + \theta_r)} + \frac{\tan^2(\theta_i - \theta_r)}{\tan^2(\theta_i + \theta_r)} \right] \quad (1.3)$$

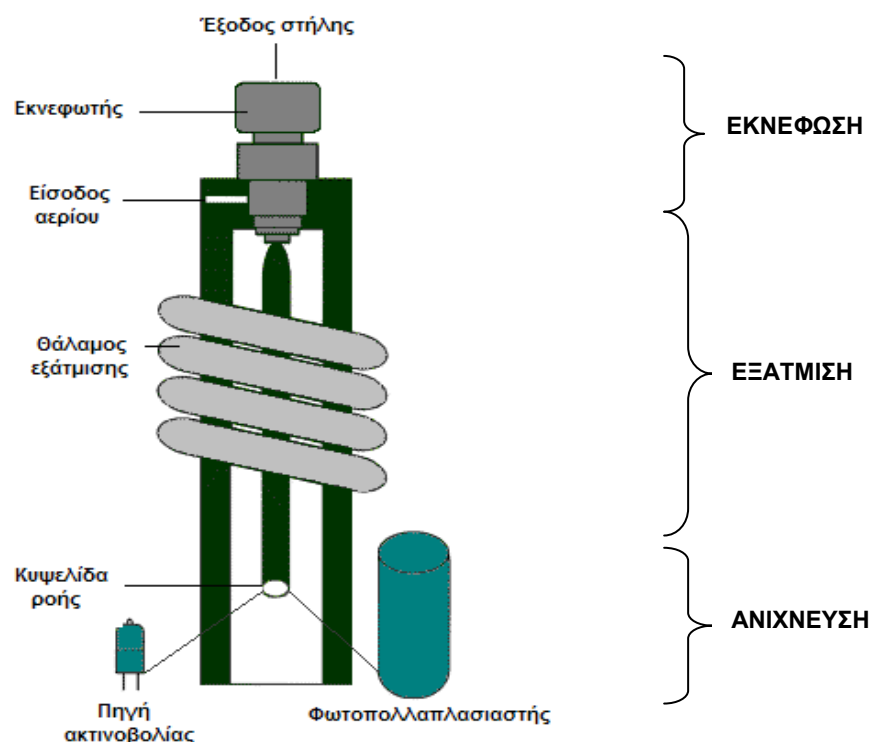
όπου θ_i και θ_r είναι οι γωνίες της πρόσπτωσης και ανάκλασης, αντίστοιχα.

Η μεγάλη πρόκληση για τη θεωρία του φαινομένου της σκέδασης είναι να μπορεί να προβλέπει τον τρόπο με τον οποίο τα διάφορα συστήματα, αναλόγως των ιδιοτήτων τους, σκεδάζουν το φως. Η ακόμη μεγαλύτερη πρόκληση, ωστόσο, είναι το αντίστροφο, γνωστό και ως «*inverse scattering problem*». Το να μπορεί δηλαδή προσδιορίζοντας τη σκεδαζόμενη ακτινοβολία να καθορίσει τις ιδιότητες των συστημάτων που την προκαλούν^[33]. Σε αυτό μπορεί να συμβάλει αποφασιστικά και η χρήση του Εξατμιστικού Ανιχνευτή Σκέδασης Ακτινοβολίας.

1.5.3. Αρχή Λειτουργίας Εξατμιστικού Ανιχνευτή Σκέδασης Ακτινοβολίας

Ο ανιχνευτής σκέδασης ακτινοβολίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό κάθε ουσίας, ακόμη κι αυτών που στερούνται χαρακτηριστικών ομάδων, χρωμοφόρων ή φθορίζουσών, με την προϋπόθεση ότι η πτητικότητά τους είναι μικρότερη από αυτή της κινητής φάσης. Αυτός είναι και ο περιορισμός στον οποίο οφείλεται ο χαρακτηρισμός του ELSD ως *ημι-γενικού ανιχνευτή (quasi-general detector)*. Ωστόσο, με τους νέας γενιάς ανιχνευτές ELSD, αυτός ο περιορισμός έχει εν μέρει αρθεί, αφού έχει καταστεί δυνατή η λειτουργία τους σε ακόμη χαμηλότερες θερμοκρασίες εξάτμισης που επιτρέπουν την ποσοτικοποίηση και ημιπτητικών αναλυτών, έστω και σε βάρος της ευαισθησίας της ανάλυσης. Για τις μη-πτητικές ουσίες, που αποτελούν και την πλειοψηφία των ουσιών που ανιχνεύονται με ELSD, τα όρια ανίχνευσης φτάνουν την τάξη των νανογραμμαρίων^[34].

Η λειτουργία του ανιχνευτή είναι μια διαδικασία τριών σταδίων που φαίνονται περιληπτικά στο ακόλουθο σχήμα και είναι τα εξής:



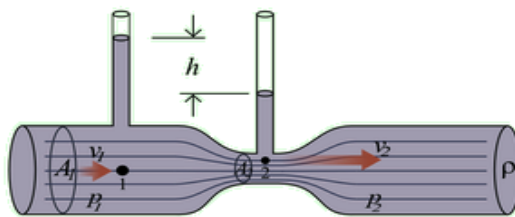
Σχήμα 1.8: Στάδια λειτουργίας ενός τυπικού ανιχνευτή ELSD.

1. *Εκνέφωση (nebulization)* του εκλούσματος μετά την έξοδό του από τη χρωματογραφική στήλη με τη βοήθεια φέροντος αερίου.
2. *Εξάτμιση (evaporation)* της κινητής φάσης.
3. *Ανίχνευση (detection)* της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από τα σωματίδια του αναλύτη που δεν έχουν εξατμιστεί.

Τα παραπάνω στάδια είναι τα ίδια σε όλους τους εμπορικά διαθέσιμους ανιχνευτές ELSD. Μικρές παραλλαγές, κυρίως από εταιρία σε εταιρία, σκοπό έχουν να βελτιώσουν τα χαρακτηριστικά λειτουργίας και απόδοσής τους κι επομένως να τους κάνουν πιο ελκυστικούς στους χρήστες.

1.5.3.1. Εκνέφωση του εκλούσματος

Σε αυτό το πρώτο στάδιο, το έκλουσμα, εξερχόμενο από τη χρωματογραφική στήλη, μετατρέπεται σε σταγονίδια προκειμένου να είναι ευκολότερη η εξάτμιση του διαλύτη της κινητής φάσης στο επόμενο στάδιο. Η εκνέφωση πραγματοποιείται με τη βοήθεια αδρανούς αερίου, ελεύθερου σωματιδίων, συνήθως αζώτου ή αέρα, το οποίο ρέει στον εκνεφωτή διαμέσου μικρής οπής με μία ροή τύπου Venturi (σχήμα 1.9). Όλοι οι ανιχνευτές ELSD σε αυτό το στάδιο καταναλώνουν, κατά κανόνα, σημαντικές ποσότητες φέροντος αερίου, 2-4 L·min⁻¹[35,36].



Σχήμα 1.9: Ροή τύπου Venturi. Ισχύει ότι $p_1 > p_2$ (p :πίεση αερίου) διότι $v_1 < v_2$ (v :ταχύτητα αερίου). Το αποτέλεσμα είναι ότι το αέριο άζωτο ρέει παρασύροντας το έκλουσμα της στήλης.

Το στάδιο της εκνέφωσης είναι εξαιρετικά σημαντικό, καθώς καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ευαισθησία και την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου. Ένα ομοιόμορφο εκνέφωμα διευκολύνει τη διαδικασία εξάτμισης του διαλύτη, συνεπάγεται τη δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού σωματιδίων που σκεδάζουν ακτινοβολία μεγαλύτερης έντασης και επομένως συνεισφέρει και στην ελαχιστοποίηση εμφάνισης σήματος υποβάθρου. Το μέγεθος των σχηματιζόμενων σταγονιδίων καθορίζει ακόμη το μηχανισμό σκέδασης που θα επικρατήσει στο τρίτο στάδιο της διαδικασίας. Οι Nukiyama και Tanasawa έχοντας μελετήσει μια σειρά εκνεφωτών τύπου Venturi, υπολόγισαν ότι η μέση διάμετρος D_o σταγονιδίου δίνεται από την παρακάτω σχέση που έχει πάρει το όνομά τους^[37,38]:

$$D_o = \frac{585\sqrt{\sigma}}{u\sqrt{\rho_l}} + 597 \left(\frac{\mu}{\sqrt{\sigma \cdot \rho_l}} \right)^{0,45} \left(\frac{1000 \cdot Q_l}{Q_a} \right)^{1,5} = \frac{\sum n_a D^3}{\sum n_a D^2} \quad (1.4)$$

όπου n_a είναι ο αριθμός σταγονιδίων διαμέτρου D , σ η επιφανειακή τάση, ρ_l είναι η πυκνότητα του διαλύτη, μ το ιξώδες του διαλύτη, u είναι η σχετική ταχύτητα ανάμεσα στη ροή του φέροντος αερίου και τη ροή της κινητής φάσης, Q_l και Q_a είναι η ογκομετρική ταχύτητα ροής του διαλύτη και του αερίου, αντίστοιχα.

Η σχέση αυτή, παρ' ότι εμπειρική, βρίσκει εφαρμογή στον εκνεφωτή ενός ELSD ανιχνευτή και ισχύει γενικά όταν η πυκνότητα του διαλύτη κυμαίνεται μεταξύ 0,7 και 1,2 g·mL⁻¹, η επιφανειακή τάση μεταξύ 19 και 73 dyn·cm⁻¹ και η διάμετρος των σωματιδίων μεταξύ 15 και 90 μm^[16]. Από τη σχέση 1.4 φαίνεται ότι όσο μεγαλύτερη είναι η ταχύτητα ροής του αδρανούς αερίου, τόσο μικρότερο είναι το μέγεθος των σχηματιζόμενων σταγονιδίων. Το μέγεθος των σταγονιδίων επηρεάζεται, επίσης, από τις φυσικές ιδιότητες, αλλά και τη συγκέντρωση του αναλύτη. Όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση, τόσο μεγαλύτερο το μέγεθος των σωματιδίων^[28]. Είναι δε σαφές ότι κατά τη δημιουργία του εκνεφώματος, δεν έχει τόση σημασία το μέγεθος των σχηματιζόμενων σταγονιδίων, όσο η ομοιομορφία του μεγέθους των σταγονιδίων, όταν δηλαδή η κατανομή της διαμέτρου των σταγονιδίων έχει τη μέγιστη μέση τιμή και τη μικρότερη απόκλιση, οπότε και παρατηρείται η μέγιστη σκέδαση φωτός.

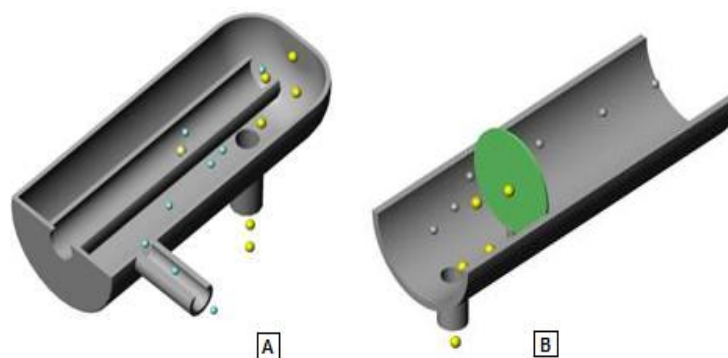
Η μέγιστη διάμετρος σταγονιδίου D_m δίνεται από τη λύση της εξίσωσης των Mugele και Evans^[39]:

$$D_m = D_o \left(1 + \alpha \cdot e^{1/4\delta^2} \right) \quad (1.5)$$

στην οποία α είναι σταθερά του συστήματος και δ σταθερά που σχετίζεται με την τυπική απόκλιση της κατανομής των σταγονιδίων.

Σε κάποιες διατάξεις ELSD υπάρχει η δυνατότητα να ρυθμιστεί η θερμοκρασία στο στάδιο της εκνέφωσης, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία του θαλάμου εξάτμισης. Η ρύθμιση αυτή επιτρέπει να αποφεύγονται οι μεγάλες μεταβολές στη θερμοκρασία μεταξύ εκνέφωσης και εξάτμισης που ενδέχεται να επηρεάσουν την επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Με αυτήν τη ρύθμιση καθίσταται δυνατή και η σύζευξη του ανιχνευτή ELSD με διάταξη υπερκρίσιμης χρωματογραφίας (SFC), όπου η γρήγορη αποσυμπίεση της κινητής φάσης, όντας ισχυρά ενδόθερμη, συχνά έχει ως αποτέλεσμα τον ανεπιθύμητο σχηματισμό ψυχρού CO_2 ^[34].

Κατανοώντας τη σημασία του ομοιόμορφου εκνεφώματος, διάφοροι κατασκευαστές έχουν τελευταία αναπτύξει διατάξεις που επιχειρούν έναν πρόχειρο διαχωρισμό των σταγονιδίων αναλόγως του μεγέθους τους, ώστε να αποκλείονται τα πολύ μεγάλα μεγέθους σταγονίδια και να οδηγούνται στα απόβλητα πριν το στάδιο της εξάτμισης. Σε μια από αυτές τις διατάξεις (σχήμα 1.10A), τα σταγονίδια στο θάλαμο εκνέφωσης διανύουν μια απόσταση στην οποία αναγκάζονται να στρίψουν απότομα προκειμένου να κατευθυνθούν στο θάλαμο εξάτμισης. Τα μεγάλα σταγονίδια όμως, όντας βραδυκίνητα, αδυνατούν να κινηθούν με επιτυχία, συγκρούονται στα τοιχώματα του θαλάμου, συμπυκνώνονται και απομακρύνονται. Η διάταξη αυτή δεν ενδείκνυται για μεγάλες ταχύτητες ροής ή με κινητές φάσεις που εξατμίζονται δύσκολα, διότι τότε μεγάλος αριθμός σταγονιδίων αποβάλλεται, εις βάρος της ευαισθησίας της ανάλυσης. Μία δεύτερη διάταξη (σχήμα 1.10B) διαθέτει δίσκο μέσα στο θάλαμο εκνέφωσης που λειτουργεί ως φίλτρο. Τα μεγάλα σταγονίδια χτυπούν στην επιφάνεια του δίσκου, συμπυκνώνονται και αποβάλλονται, αντίθετα με τα ευκίνητα μικρά σταγονίδια που διαφεύγουν από την περιφέρεια. Ο δίσκος μπορεί, αναλόγως των συνθηκών ανάλυσης, να στρέφεται παράλληλα με τη ροή επιτρέποντας σε όλο το εκνέφωμα να οδηγείται στο θάλαμο εξάτμισης^[40].



Σχήμα 1.10: Θάλαμοι εκνέφωσης που επιτρέπουν το διαχωρισμό των σταγονιδίων αναλόγως του μεγέθους τους.

1.5.3.2. Εξάτμιση

Σε αυτό το δεύτερο στάδιο, τα σταγονίδια, παρασυρμένα από το ρεύμα φέροντος αερίου, οδηγούνται στο θάλαμο εξάτμισης όπου, υπό την επίδραση της θερμοκρασίας, οι διαλύτες της κινητής φάσης εξατμίζονται αφήνοντας στερεά σωματίδια καθαρής ουσίας.

Η επιλογή της θερμοκρασίας εξάτμισης είναι καθοριστική για το σχηματισμό των στερεών σωματιδίων και τον προσδιορισμό της ουσίας. Είναι σημαντικό να εφαρμόζονται, κατά κανόνα, όσο το δυνατόν πιο χαμηλές θερμοκρασίες και τα οφέλη είναι πολλαπλά. Η ήπια εξάτμιση των διαλυτών συνεισφέρει στη διατήρηση της ομοιομορφίας των σχηματιζόμενων σωματιδίων και επιπλέον αυξάνει τις πιθανότητες σχηματισμού κρυστάλλων ουσίας που θα έχουν ως αποτέλεσμα τη σκέδαση ακτινοβολίας μεγαλύτερης έντασης^[41]. Η διατήρηση χαμηλών θερμοκρασιών είναι πρωτεύουσας σημασίας όταν οι ουσίες ενδιαφέροντος είναι ημι-πτητικές ή θερμοευαίσθητες, διότι σε αυτήν την περίπτωση δεν υπάρχει ο κίνδυνος να εξατμιστούν ή να διασπαστούν σε παραπροϊόντα, καθιστώντας αδύνατο τον προσδιορισμό τους. Σε κάθε περίπτωση, η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας εξάτμισης είναι η συνισταμένη διαφόρων παραμέτρων που σχετίζονται με τις ιδιότητες, τόσο της προσδιοριζόμενης ουσίας, όσο και των διαλυτών της κινητής φάσης. Πειραματικές παρατηρήσεις για ένα πλήθος οργανικών διαλυτών (τολουόλιο, 2-βουτανόνη, τετραϋδροφουράνιο και διχλωρομεθάνιο), έδειξαν ότι εξάτμιση σε θερμοκρασίες 30-60 °C, ελάχιστα υψηλότερες από τη θερμοκρασία εμφάνισης θορύβου στη γραμμή βάσης, έδωσαν επαναλήψιμα αποτελέσματα του μετρούμενου σκεδαζόμενου φωτός^[16].

Ένας τρόπος να επιτευχθεί ικανοποιητική εξάτμιση του διαλύτη σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι με την αύξηση του μήκους στο θάλαμο εξάτμισης. Σε αυτές τις συνθήκες έχει επιτευχθεί εξάτμιση των διαλυτών ακόμη και σχεδόν σε θερμοκρασία δωματίου (27-30 °C)^[42]. Αυτή η καινοτομία έχει βρει εφαρμογή σε μια σειρά ανιχνευτών ELSD όπως περιγράφεται παρακάτω (βλ. εδάφιο 1.5.3.2.1).

Αν θεωρηθεί ότι η εξάτμιση είναι μια διαδικασία μεταφοράς θερμότητας στα σταγονίδια του εκνεφώματος, τότε ο ρυθμός μείωσης της μάζας των σταγονιδίων dm/dt , εξαιτίας της απομάκρυνσης του διαλύτη, δίνεται από την ακόλουθη σχέση^[28]:

$$\frac{dm}{dt} = M \cdot h_t \cdot A \frac{\Delta T}{\Delta H_v} \quad (1.6)$$

όπου M είναι η μοριακή μάζα του αναλύτη, h_t είναι ο συντελεστής μεταφοράς θερμότητας, A η επιφάνεια του σωματιδίου, ΔT είναι η διαφορά ανάμεσα στη θερμοκρασία του θαλάμου και τη θερμοκρασία στη επιφάνεια του σωματιδίου και τέλος, ΔH_v είναι η λανθάνουσα θερμότητα εξάτμισης του διαλύτη. Ο χρόνος t , που απαιτείται για την πλήρη εξάτμιση του διαλύτη δίνεται από τη σχέση^[28]:

$$t = \frac{\Delta H_v \cdot \rho_s \cdot r^2}{2M \cdot k_f \cdot \Delta T} \quad (1.7)$$

όπου k_f είναι η θερμική αγωγιμότητα του ρεύματος αέρα που περιβάλλει τα σταγονίδια, ρ_s η πυκνότητα του αναλύτη και r είναι η ακτίνα του σωματιδίου. Σε αυτήν την περίπτωση, η διάμετρος του στερεού σωματιδίου D_s , υπολογίζεται από τη σχέση που ακολουθεί^[43]:

$$D_s = D_m \left(\frac{C}{\rho_s} \right)^{1/3} \quad (1.8)$$

όπου D_m είναι η μέση διάμετρος των σταγονιδίων πριν την εξάτμιση και C η συγκέντρωση του αναλύτη στο έκλουσμα της στήλης.

Τα δύο πρώτα στάδια, της εκνέφωσης και της εξάτμισης, είναι, όπως προκύπτει, και τα πιο καθοριστικά στην όλη διαδικασία μέτρησης με ανιχνευτή ELSD και η βελτιστοποίηση των συνθηκών σε αυτά επηρεάζει την ένταση του σήματος απόκρισης, τα επίπεδα θορύβου της γραμμής βάσης και τελικά την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Στην αγορά κυκλοφορούν σήμερα μοντέλα ELSD που, όπως περιγράφεται στην παράγραφο που ακολουθεί, διαφοροποιούνται στο σύστημα εκνέφωσης, αλλά και στο σχήμα και τη λειτουργία του θαλάμου εξάτμισης, προκειμένου να βελτιώσουν τα χαρακτηριστικά ποιότητας του ανιχνευτή.

1.5.3.2.1. Τύποι ανιχνευτών ELSD

Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι ανιχνευτών ELSD, με διαφορετικό ο καθένας σύστημα εκνέφωσης και εξάτμισης.

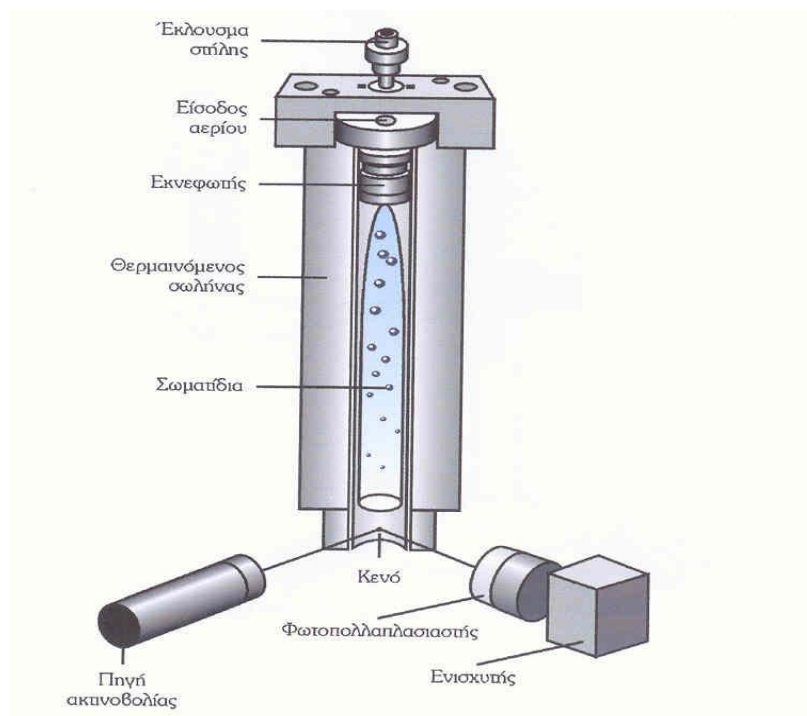
1) Ανιχνευτής τύπου A

Ο σχεδιασμός του ανιχνευτή επιτρέπει σε όλο το εκνέφωμα να μεταφέρεται ποσοτικά στο θάλαμο εξάτμισης ανεξαρτήτως μεγέθους σταγονιδίων. Το αέριο εκνέφωσης είναι είτε προθερμασμένο, είτε αέριο υψηλής θερμικής αγωγιμότητας^[44]. Ο θάλαμος εξάτμισης είναι ένας σωλήνας μικρού μήκους και αυτός είναι ο λόγος που απαιτείται η εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών (συχνά $>60^\circ\text{C}$) προκειμένου να προλάβει να εξατμιστεί όλη η ποσότητα των διαλυτών πριν τα σωματίδια οδηγηθούν στον ανιχνευτή. Σε τέτοιες θερμοκρασίες, όμως, συχνά παρατηρούνται απώλειες στα θερμοευαίσθητα ή ημιπτητικά συστατικά των

δειγμάτων. Η κατασκευή αυτού του τύπου ανιχνευτή, επομένως, απαιτεί τη χρήση διαλυτών πολύ υψηλής πτητικότητας, γεγονός που αποκλείει τις υδατικές φάσεις, ενώ ακόμη περιορίζει τη χρήση υψηλών ταχυτήτων ροής, μεγαλύτερων από $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Εάν, ωστόσο, μπορούν να ικανοποιηθούν όλες οι παραπάνω προϋποθέσεις, ο ανιχνευτής τύπου A, λόγω της ποσοτικής μεταφοράς του εκνεφώματος, συνεπάγεται καλύτερη ανιχνευσιμότητα (detectability) της προσδιοριζόμενης ουσίας.

Στο σχήμα 1.11 φαίνεται το διάγραμμα ενός ανιχνευτή ELSD τύπου A.



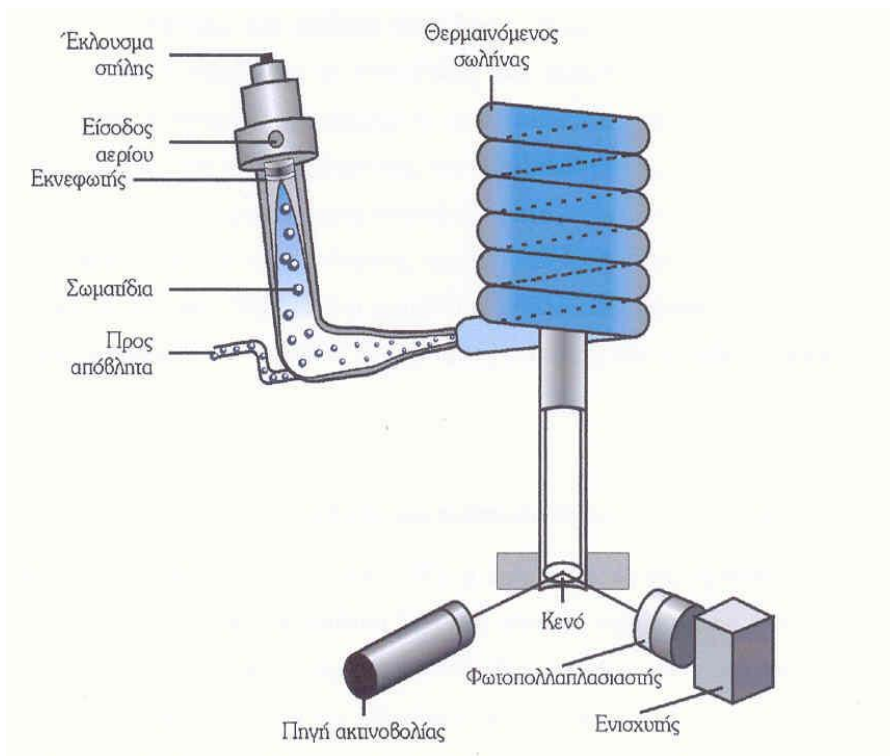
Σχήμα 1.11: Διάγραμμα ανιχνευτή ELSD τύπου A.

2) Ανιχνευτής τύπου B

Στους ανιχνευτές τύπου B, το εκνέφωμα οδηγείται σε ένα θάλαμο εξάτμισης που μπορεί να είναι ένας απλός γυάλινος κεκλιμένος σωλήνας ή μία διάταξη, όπως του σχήματος 1.10, η οποία επιτρέπει το διαχωρισμό των σταγονιδίων αναλόγως του μεγέθους τους. Τα μεγαλύτερα, βαρύτερα και πιο βραδυκίνητα σταγονίδια, συμπυκνώνονται στα τοιχώματα του θαλάμου και αποβάλλονται, αφήνοντας ένα εκνέφωμα με μικρότερη διασπορά μεγέθους. Συνέπεια αυτού είναι ότι δεν απαιτούνται πολύ υψηλές θερμοκρασίες για την εξάτμιση των διαλυτών της κινητής φάσης κι επομένως είναι δυνατός ο προσδιορισμός και αναλυτών αρκετά πτητικών ή ευαίσθητων σε θερμικές διασπάσεις. Έτσι, για παράδειγμα, ενώ μια αύξηση της θερμοκρασίας από τους 40 στους 80 °C δε θα επηρεάσει την απόκριση για ουσίες όπως η σακχαρόζη ή το προπυλοπαραπένιο, αντίθετα για ουσίες, όπως η ουρία και η γλυκερόλη, η αντίστοιχη αύξηση θα μειώσει έως και θα εξαφανίσει το σήμα σκεδαζόμενου φωτός^[45].

Με τη διάταξη εκνέφωσης σε αυτόν τον τύπο ανιχνευτή, το ποσοστό εκλούσματος της στήλης, που φτάνει τελικά στο θάλαμο εξάτμισης, ποικίλλει από <10%, για υδατική κινητή φάση, έως και 100% για κινητές φάσεις που αποτελούνται από μίγματα οργανικών διαλυτών, όπως αυτά που χρησιμοποιούνται στην Υγροχρωματογραφία κανονικής φάσης. Τα ποσοστά είναι αντίστοιχα με εκείνα που παρατηρούνται σε τεχνικές, όπως η Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης ή σε συζευγμένες τεχνικές LC με ανιχνευτές FT-IR ή με ανιχνευτές επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος ICP^[46-48]. Με αυτόν τον τύπο ανιχνευτή υπάρχει η δυνατότητα ρύθμισης της θερμοκρασίας εκνέφωσης ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία εξάτμισης και η δυνατότητα σύζευξης του ELSD με διάταξη υπερκρίσιμης χρωματογραφίας (SFC) (βλ. εδάφιο 1.5.3.1).

Ο θάλαμος εξάτμισης στον ανιχνευτή τύπου B είναι μεγαλύτερος σε μήκος και συνήθως έχει τη μορφή σπείρας, γεγονός που αυξάνει τη «διαδρομή» και επομένως το χρόνο εξάτμισης. Αυτή η κατασκευή επιτρέπει τη χρήση υδατικών κινητών φάσεων ακόμη και σε ποσοστό 100% (όπως συμβαίνει σε αρκετές εφαρμογές χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης), αλλά και την εφαρμογή μεγάλων ταχυτήτων ροής. Τέτοιες ακραίες συνθήκες, ωστόσο, κατά κανόνα αποφεύγονται με τον ανιχνευτή ELSD, καθώς μεγαλώνουν το «φορτίο επιβάρυνσης» στον εξατμιστή και αυξάνουν σημαντικά το θόρυβο γραμμής βάσης στις τελικές μετρήσεις. Αξίζει, παρ' όλα αυτά, να αναφερθεί η περίπτωση όπου καθαρό νερό με ταχύτητα ροής $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, έχει εξατμιστεί επαρκώς στους $40-50^\circ\text{C}$ ^[49,50]. Στο σχήμα 1.12 παρουσιάζεται το διάγραμμα ανιχνευτή ELSD τύπου B.

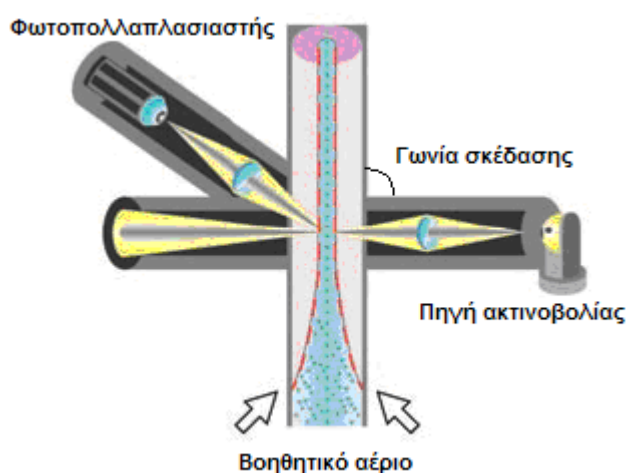


Σχήμα 1.12: Διάγραμμα ανιχνευτή ELSD τύπου B.

1.5.3.3. Ανίχνευση

Είναι το τρίτο και τελευταίο στάδιο της διαδικασίας. Το νέφος των σωματιδίων που έχουν απομείνει μετά την εξάτμιση των διαλυτών της κινητής φάσης, εισέρχεται σε κυψελίδα, όπου δέχεται την επίδραση ακτινοβολίας. Το προσπίπτον φως παράγεται είτε από πολυχρωματική πηγή στην περιοχή του ορατού, όπως μία απλή λυχνία αλογόνου ($W-I_2$), είτε από μονοχρωματική πηγή, π.χ. εκπομπής laser, αλλά δεν έχει αποδειχτεί εάν η μία υπερτερεί έναντι της άλλης. Το φως που σκεδάζεται μετράται από φωτοπολλαπλασιαστή ή φωτοδιόδο.

Κάποια μοντέλα ανιχνευτών διαθέτουν κάτοπτρα που συγκεντρώνουν την ακτινοβολία στο κέντρο της οπτικής κυψελίδας προκειμένου να μεγιστοποιηθεί το σήμα απόκρισης. Ταυτόχρονα είναι εφοδιασμένα με παγίδες με σκοπό την απομάκρυνση της παράσιτης ακτινοβολίας. Επιπροσθέτως, μια δεύτερη παροχή αδρανούς αερίου τύπου Venturi, ανεξάρτητη από την παροχή αερίου του εκνεφωτή, βρίσκεται στην έξοδο του θαλάμου εξάτμισης προκειμένου να καθοδηγεί το πλήθος των στερεών σωματιδίων προς την κυψελίδα, χωρίς απώλειες λόγω διασποράς. Η θέση του φωτοπολλαπλασιαστή σε σχέση με την πηγή ακτινοβολίας σχηματίζει τη «γωνία σκέδασης», η οποία φαίνεται ότι επηρεάζει το συντελεστή απόκρισης του ανιχνευτή, χωρίς ωστόσο να έχει προταθεί κάποια βέλτιστη τιμή της γωνίας όπου συμβαίνει αυτό^[51].



Σχήμα 1.13: Διάγραμμα της οπτικής κυψελίδας, όπου απεικονίζεται η ροή του βοηθητικού αδρανούς αερίου και η γωνία σκέδασης μεταξύ πηγής ακτινοβολίας και φωτοπολλαπλασιαστή.

Όπως έχει περιγραφεί (βλ. εδάφιο 1.5.2.2.) υπάρχουν τρεις διαφορετικοί μηχανισμοί σκέδασης της ακτινοβολίας που εξαρτώνται, κατά κύριο λόγο, από το μέγεθος των σχηματιζόμενων σωματιδίων. Επειδή σε κάθε εκνέφωμα απαντάται μια ποικιλία μεγεθών σωματιδίων, συνυπάρχουν και οι τρεις μηχανισμοί, καθιστώντας το φαινόμενο της σκέδασης αρκετά πολύπλοκο. Η τάξη μεγέθους, όμως, στην οποία βρίσκεται η πλειοψηφία των σωματιδίων φαίνεται ότι καθορίζει ποιος από τους μηχανισμούς είναι ο κυρίαρχος

κάθε φορά. Η ένταση ακτινοβολίας I με μήκος κύματος λ , που σκεδάζεται από ένα μόνο σωματίδιο διαμέτρου D , προς την κατεύθυνση θ , υπολογίζεται από τη σχέση:

$$I_{\theta} = \frac{I_{\text{hor}} + I_{\text{ver}}}{2} = \frac{\lambda^2}{4\pi^2} (i_{\text{hor}}^2 + i_{\text{ver}}^2) \quad (1.9)$$

όπου i_{hor} και i_{ver} είναι οι συνιστώσες της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός στην οριζόντια και την κάθετη διεύθυνση, κάθε μία από τις οποίες προκύπτει από σειρά άλλων εξισώσεων γνωστών από την ηλεκτρομαγνητική θεωρία^[29].

Από τη θεωρία προβλέπεται ότι όταν ο λόγος D/λ κυμαίνεται μεταξύ 0,1 και 10,0 (η καλούμενη και περιοχή Mie), η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι ανάλογη της τέταρτης δύναμης της διαμέτρου D . Εάν ο λόγος D/λ έχει μικρότερη τιμή (περιοχή Rayleigh), η ένταση είναι ανάλογη της έκτης δύναμης του D (Σχέση 1.1)^[29, 52].

Τέλος, όπως προκύπτει κατά τη χρήση πολωμένης ακτινοβολίας, όπως αυτή που παράγεται από πηγές εκπομπής laser, όταν το επίπεδο πόλωσης της ακτινοβολίας είναι παράλληλο με την κατεύθυνση ανίχνευσης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, λαμβάνεται το μικρότερο σήμα από τον ανιχνευτή, η γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων όμως είναι η μέγιστη. Στροφή του επιπέδου πόλωσης ακτινοβολίας σε οποιαδήποτε άλλη γωνία ενισχύει το σήμα απόκρισης χωρίς να επηρεάζει το θόρυβο γραμμής βάσης^[52]. Τα παραπάνω θα μπορούσαν να εφαρμοστούν στη χρήση του ELSD στην ιχνοανάλυση.

1.5.4. Σχέσεις ποσοτικοποίησης με ανιχνευτή ELSD

Η απόκριση του ανιχνευτή A σχετίζεται με τη μάζα m του αναλύτη με την εκθετική σχέση:

$$A = \alpha \cdot m^b \quad (1.10)$$

όπου α και b είναι σταθερές. Το α καλείται *παράγοντας απόκρισης (response factor)* και το b *κλίση (slope)*. Εξαρτώνται από παράγοντες, όπως είναι το μέγεθος των σταγονιδίων, η συγκέντρωση και η φύση του αναλύτη, η ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου και της κινητής φάσης, η θερμοκρασία εξάτμισης, η φύση της κινητής φάσης κ.ά.^[53], από παράγοντες δηλαδή που σχετίζονται, εκτός από το δείγμα και από το όργανο, γι' αυτό και είναι απαραίτητη κάθε φορά η βαθμονόμηση πριν από την ποσοτικοποίηση. Παρόλο που η απόκριση είναι μη-γραμμική, υπάρχει συνήθως μια μικρή περιοχή όπου ισχύει η γραμμικότητα^[36]. Είναι δυνατή γραμμικοποίηση με λογαριθμική μετατροπή της σχέσης 1.10:

$$(1.10) \Rightarrow \log A = \log \alpha + b \cdot \log m \quad (1.11)$$

Στη βιβλιογραφία, οι τιμές του b που αναφέρονται για διάφορες εφαρμογές με τον ELSD, κυμαίνονται από 0,9 ως 1,8 που βρίσκονται σε συμφωνία με τις τιμές 0,66-2,0 που

προβλέπει το θεωρητικό μοντέλο σκέδασης. Χαμηλές τιμές b παρατηρούνται όταν χρησιμοποιούνται υδατικές ή υδατοοργανικές κινητές φάσεις, όπως αυτές της αντίστροφης φάσης, ενώ για μη-υδατικές κινητές φάσεις, οι τιμές του b είναι υψηλότερες.

Γραμμοποίηση της σχέσης 1.10 επιτυγχάνεται και με την ακόλουθη μετατροπή:

$$A = \alpha \cdot m^b \Rightarrow A^{1/b} = \alpha^{1/b} \cdot m = k \cdot m \quad (1.12)$$

Η σχέση (1.10) ισχύει, κατά κανόνα, για συγκεντρώσεις το εύρος των οποίων κυμαίνεται μέχρι 2 τάξεις μεγέθους. Για μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων, πρέπει να εφαρμόζονται πιο πολύπλοκα μαθηματικά μοντέλα που λαμβάνουν υπόψη κι άλλες παραμέτρους, όπως φαινόμενα κορεσμού του φωτοπολλαπλασιαστή^[43].

1.5.5. Χαρακτηριστικά λειτουργίας/ποιότητας ανιχνευτή ELSD

1) Μικρό σήμα υποβάθρου (background signal)

Ο ELSD έχει πολύ χαμηλό σήμα υποβάθρου, εφόσον οι διαλύτες έχουν εξατμιστεί και επομένως, δεν καλύπτεται οποιαδήποτε κορυφή ιχνοποσοτήτων του αναλύτη. Επειδή ο ανιχνευτής δεν αποκρίνεται σε αλλαγές της κινητής φάσης, μπορεί να δώσει εξαιρετικούς διαχωρισμούς κι όταν εργάζεται σε ακραίες συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης. Όλα αυτά βέβαια προϋποθέτουν ότι χρησιμοποιούνται διαλύτες πτητικοί, απαλλαγμένοι από προσμίξεις, αλλά και ότι η επιλογή της θερμοκρασίας εξάτμισης είναι τέτοια, που επιτρέπει την πλήρη απομάκρυνσή τους από το δείγμα.

Η επιλογή των διαλυτών για τον ELSD δε γίνεται απαραίτητα με τα ίδια κριτήρια που χρησιμοποιούνται για εφαρμογές HPLC με ανιχνευτές UV ή φθορισμομετρικούς, όπου οι διαλύτες πρέπει οπωσδήποτε να έχουν χαμηλή απορροφητικότητα. Διαλύτες που μετά την εξάτμιση αφήνουν υπόλειμμα (*residue after evaporation, RAE*) μικρότερο από $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ είναι, κατά κανόνα, ιδανικοί για εφαρμογές με ELSD. Αυτό επιτυγχάνεται με διήθηση των διαλυτών με φίλτρα που έχουν μικρή διάμετρο πόρων και είναι κατασκευασμένα από υλικά που δεν επιμολύνουν. Ομοίως σημαντική είναι η καθαρότητα του αερίου εκνέφωσης, το οποίο πρέπει να φιλτράρεται πριν την παροχέτευσή του στον ανιχνευτή.

Τέλος, προσοχή πρέπει να δίνεται και στην περίπτωση, όπου μπορεί να συμβεί απώλεια υλικού πλήρωσης από στήλη που χρησιμοποιείται σε ακραίες συνθήκες, διότι τότε ο ανιχνευτής θα δώσει σημαντικό σήμα υποβάθρου. Για παράδειγμα, στήλη silica με συζευγμένες αμινομάδες σε υδατική κινητή φάση, υφίσταται μερική υδρόλυση. Τα προϊόντα της υδρόλυσης δε γίνονται αντιληπτά από έναν ανιχνευτή UV, καθώς δεν απορροφούν, με τον ELSD, όμως, δίνουν έναν πολύ έντονο και συνεχή θόρυβο της γραμμής βάσης^[19].

2) Καλή αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility)

Εάν οι συνθήκες ανάλυσης είναι σταθερές (ταχύτητα ροής, πίεση φέροντος αερίου, θερμοκρασία, ποιότητα διαλυτών), τότε η αναπαραγωγιμότητα των μετρήσεων είναι

εξαιρετικά καλή. Αυτό ενισχύεται στους νέας γενιάς ανιχνευτές, όπου κάθε λειτουργία του οργάνου ελέγχεται πλήρως και με ακρίβεια από λογισμικό.

3) Μικρή διεύρυνση χρωματογραφικών ζωνών

Ο μικρός χρόνος απόκρισης του ανιχνευτή σε συνδυασμό με το μήκος και τις διαστάσεις του συστήματος εξάτμισης διασφαλίζουν ότι δεν εμφανίζονται σημαντικά διευρυμένες κορυφές οφειλόμενες στο όργανο, γεγονός που βελτιστοποιεί και τη διαχωριστικότητα ενώσεων οι οποίες εκκλύονται πολύ κοντά η μία την άλλη.

4) Αμελητέα οπισθοπίεση (back pressure)

Η αμελητέα οπισθοπίεση του ELSD βελτιώνει τα χαρακτηριστικά λειτουργίας του και οφείλεται στο γεγονός ότι το δείγμα που εισάγεται στον ανιχνευτή είναι εκνέφωμα.

5) Καταστροφή του δείγματος

Ο τρόπος λειτουργίας του ανιχνευτή με τη δημιουργία στερεών σωματιδίων, δεν επιτρέπει, με τα τωρινά τεχνολογικά δεδομένα, τη χρησιμοποίησή του δείγματος μετά το πέρας της ανίχνευσης. Επομένως σε μία πιθανή σύζευξη με άλλους ανιχνευτές, ο ELSD θα πρέπει να τεθεί τελευταίος.

6) Απόλυτη και όχι διαφορική μέτρηση

Σε αντίθεση με έναν ανιχνευτή UV, φθορισμομετρικό ή RI που μετρούν διαφορές ανάμεσα στην κινητή φάση και το δείγμα, ο ανιχνευτής ELSD μετράει την ποσότητα ακτινοβολίας που σκεδάζεται από τα στερεά σωματίδια του αναλύτη, αφού κάθε ποσότητα διαλύτη της κινητής φάσης και των τροποποιητών, έχει εξατμιστεί σε προηγούμενο στάδιο. Επομένως, ιδιότητες των διαλυτών, όπως είναι η θερμοκρασία τους ή το ιξώδες, δεν επηρεάζουν το σήμα απόκρισης του ανιχνευτή και ο μόνος χρόνος εξισορρόπησης του συστήματος που απαιτείται, είναι το διάστημα μέχρι να φτάσει η θερμοκρασία στο θάλαμο εξάτμισης στην επιθυμητή τιμή.

7) Βελτιστοποίηση σήματος απόκρισης

Από την εξίσωση 1.8 (εδάφιο 1.5.3.2.) φαίνεται ότι αύξηση στη συγκέντρωση του αναλύτη, αυξάνει το μέγεθος των σχηματιζόμενων σταγονιδίων, το οποίο συνεπάγεται αύξηση του σήματος απόκρισης του ανιχνευτή. Όταν, ωστόσο, η τιμή της συγκέντρωσης υπερβεί μια ορισμένη τιμή, το σήμα του ανιχνευτή παύει να αυξάνεται και σε μερικές περιπτώσεις ενδέχεται και να μειώνεται^[16], γεγονός που εν μέρει οφείλεται σε φαινόμενα κορεσμού του ανιχνευτή. Η τιμή της συγκέντρωσης όπου συμβαίνει αυτό δε μπορεί να προβλεφθεί, εξαρτάται από το είδος του αναλύτη, αλλά και τις συνθήκες του πειράματος.

Στη βιβλιογραφία έχουν προταθεί κάποιες τεχνικές για την ενίσχυση του σήματος του ανιχνευτή:

Α) Η προσθήκη *τροποποιητών διαλύτη* (*solvent modifiers*) μπορεί να επιδρά πολλαπλώς στο χημικό σύστημα. Η συνήθης πρακτική είναι η ρύθμιση του pH, η οποία μπορεί όχι μόνο να αυξήσει το εμβαδόν της λαμβανομένης κορυφής, αλλά να βελτιώσει και τη συμμετρία ή τη διαχωριστότητά της από άλλες γειτονικές κορυφές. Προσοχή μόνο πρέπει να λαμβάνεται στην επιλογή του τροποποιητή ώστε να μην περιέχει ιόντα που τον καθιστούν ασύμβατο για χρήση με τον ELSD. Για οξίνιση, ιδανικές επιλογές είναι το

μυρμηκικό, οξικό, τριφθοροξικό ή νιτρικό οξύ, ενώ για αλκαλοποίηση προτιμώνται η αμμωνία, η τριαιθυλαμίνη και η πυριδίνη. Η αύξηση της ιοντικής ισχύος επιτυγχάνεται με χρήση όξινου ανθρακικού αμμωνίου.

Προσθήκη 0,1% (v/v) τριαιθυλαμίνης σε ισομοριακή αναλογία με μυρμηκικό οξύ στην κινητή φάση, έχει βρεθεί ότι έχει βελτιώσει το σήμα απόκρισης από 2 ως και 50 φορές στην περίπτωση προσδιορισμού λιπιδίων. Το σχηματιζόμενο άλας της μυρμηκικής τριαιθυλαμίνης εγκλείεται στα σταγονίδια του αναλύτη αυξάνοντας τη διάμετρό τους και κατ' επέκταση το μέγεθος των σωματιδίων^[54].

Β) Η τεχνική της *συμπύκνωσης πυρήνων (condensation nucleation)* η οποία χρησιμοποιείται κατά κόρον στους οπτικούς μετρητές σωματιδίων^[55]. Με αυτήν την τεχνική, σωματίδια που βρίσκονται σε περιβάλλον κορεσμένο από τους ατμούς κάποιου συμπυκνούμενου υγρού, λειτουργούν ως πυρήνες στην επιφάνεια των οποίων προσκολλώνται σταγονίδια του υγρού αυξάνοντας έτσι το μέγεθος των σωματιδίων. Στη διάταξη ELSD, ο συμπυκνωτής που εμπλουτίζει τα σωματίδια με κάποιον οργανικό διαλύτη, π.χ. βουτανόλη, παρεμβάλλεται μετά το θάλαμο εξάτμισης και πριν το στάδιο της ανίχνευσης^[56].

1.5.6. Σύγχρονες τάσεις στη χρήση του ανιχνευτή ELSD

1.5.6.1. Πολυκαναλικός ανιχνευτής (Multi-channel ELSD)

Τα τελευταία χρόνια κυκλοφορούν στην αγορά συστήματα ELSD που έχουν τη δυνατότητα να συνδέονται ταυτόχρονα έως και με τέσσερις ανεξάρτητες αντλίες HPLC με παράλληλη σύνδεση και πλήρη αυτοματισμό για ακόμη μεγαλύτερο αριθμό αναλύσεων^[57].

1.5.6.2. Συνδυασμός ELSD με άλλους ανιχνευτές

Διάφορες ομάδες ερευνητών έχουν επιχειρήσει τη σύζευξη του ELSD με άλλους ανιχνευτές, σε μία προσπάθεια να αντιμετωπίσουν προβλήματα που σχετίζονται με την αυξανόμενη πολυπλοκότητα των δειγμάτων, αλλά και από την ανάγκη να λαμβάνονται ταυτόχρονα πολλά διαφορετικά δεδομένα από ένα μόνο δείγμα, με την ελάχιστη δυνατή προκατεργασία. Ιδιαίτερα διαδεδομένη είναι η σύζευξη του ELSD με φασματόμετρο μαζών (MS). Και οι δύο ανιχνευτές έχουν ένα στάδιο εξάτμισης, που σημαίνει ότι κινητή φάση η οποία χρησιμοποιείται σε MS μπορεί να είναι απόλυτα συμβατή και για χρήση στον ELSD. Ο ELSD μπορεί, για κάποιες αναλύσεις, να αντικαταστήσει το MS, στην περίπτωση που το εργαστήριο δεν έχει τη δυνατότητα να εξοπλιστεί με το πολύ πιο ακριβό φασματόμετρο μαζών. Μπορεί ακόμη να λειτουργήσει ως συμπληρωματικός του MS, βοηθώντας τον αναλυτή να επιλέξει συνθήκες ανάλυσης (στήλη, κινητή φάση, πρόγραμμα έκλουσης) και στη συνέχεια η προκύπτουσα μεθοδολογία να εφαρμοστεί απευθείας στο MS, μειώνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο το συνολικό κόστος ανάλυσης^[58,59].

Η σύζευξη του ELSD με MS (LC-ELSD-MS) γίνεται με παράλληλη σύνδεση, καθώς και οι δύο είναι καταστροφικοί, με τη βοήθεια *βαλβίδας διαχωρισμού (splitter)*, που μοιράζει

το δείγμα, μετά την έξοδο από τη στήλη, στέλνοντάς το ταυτόχρονα προς τους δύο ανιχνευτές. Μια τέτοια διάταξη έχει χρησιμοποιηθεί για τον ποιοτικό/ποσοτικό προσδιορισμό μίγματος που αποτελείται από μη παραγωγοποιημένα αμινοξέα^[60], αλλά και για τον προσδιορισμό μίγματος ισομερών της ολιγογλυκερόλης^[61].

Ομοίως, για τη μελέτη μίγματος πολικών αμινοξέων, έχει επιτευχθεί η σύζευξη ELSD με UV και NMR ταυτόχρονα (LC-UV-NMR-ELSD) όπου οι ανιχνευτές UV και NMR είναι συνδεδεμένοι σε σειρά ενώ ο ELSD παράλληλα^[62].

1.5.6.3. Σύζευξη του ELSD με συστήματα μικρο-Χρωματογραφίας

Ο γενικός όρος μικρο-Χρωματογραφία περιλαμβάνει τις κατηγορίες της micro-LC όταν χρησιμοποιούνται στήλες διαμέτρου 0,5-1,0 mm, της τριχοειδούς-LC με στήλες διαμέτρου 180-300 μm και nano-LC με στήλες διαμέτρου 50-100 μm . Η μικρο-Χρωματογραφία κερδίζει ολοένα έδαφος διότι δίνει τη δυνατότητα της ανάλυσης πολύ μικρών όγκων δείγματος, με χαμηλές συγκεντρώσεις ουσιών, με πολύ μικρές ταχύτητες ροής, χωρίς να στερείται διαχωριστικής ικανότητας. Απαιτεί μικρή κατανάλωση διαλυτών και επιπλέον είναι συμβατή με συστήματα ανιχνευτή φασματομέτρου μαζών. Η σύζευξη του ELSD με ένα τέτοιο σύστημα κατέστη δυνατή μετά από τροποποίηση στην κυψελίδα εκνέφωσης, ώστε να ρυθμίζεται με ακρίβεια η κατεύθυνση του εκλούσματος σε σχέση με το αέριο εκνέφωσης, και με ταυτόχρονη μεταβολή των διαστάσεων του θαλάμου εξάτμισης, ο οποίος γίνεται μικρότερος σε μήκος και διάμετρο^[63-65].

1.5.6.4. Συμβολή του ELSD στην ανάπτυξη της «πράσινης Χημείας»

Είναι γνωστό ότι στις μεθόδους HPLC-UV, ο διαλύτης που προτιμάται περισσότερο από οποιονδήποτε άλλο είναι το ακετονιτρίλιο, ειδικά όταν το μήκος κύματος του προσδιορισμού είναι κάτω από τα 230 nm, ενώ συχνά (> 230 nm) το ACN αντικαθίσταται από MeOH, δύο διαλύτες επικίνδυνους για τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Ο περιορισμός αυτός δεν υφίσταται με τον ELSD, εφ' όσον στο στάδιο της ανίχνευσης, οι διαλύτες της ανάλυσης έχουν εξατμιστεί και υπάρχει επομένως η δυνατότητα, αναλόγως και του δείγματος, για ανάπτυξη μεθόδων LC-ELSD που χρησιμοποιούν διαλύτες πιο φιλικούς στο περιβάλλον (αιθανόλη, ακετόνη, κ.ά.). Η παγκόσμια τάση μάλιστα είναι προς τη μείωση γενικά της χρήσης του ACN, κάτι που εν μέρει οφείλεται στην έλλειψη του ACN από τη βιομηχανία, υποβοηθάται όμως και από το γεγονός της ανάπτυξης νέων υλικών πλήρωσης στηλών ή της βελτίωσης των υπαρχόντων που επιτρέπουν κινητές φάσεις ως και 100% υδατικές. Η συμβολή του ανιχνευτή ELSD προς αυτήν την κατεύθυνση μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη κι αποτελεί μια μεγάλη πρόκληση για το μέλλον.

1.5.7. Εφαρμογές του ELSD

Παρά το γεγονός ότι ο ανιχνευτής ELSD υπάρχει στην αγορά από το 1966, μόνο τα τελευταία 15-20 χρόνια, έχει καθιερωθεί ως ανιχνευτής επιλογής για μια πληθώρα εφαρμογών. Ειδικά οι νέες γενιές ανιχνευτές, με το νέο σχεδιασμό, τα αναβαθμισμένα

συστήματα εκνέφωσης και εξάτμισης και την ικανότητα να συνδυάζονται με άλλους ανιχνευτές, επιτρέπουν τη διενέργεια εξειδικευμένων αναλύσεων, τον προσδιορισμό πολύπλοκων μιγμάτων και ουσιών σχετικά πτητικών ή θερμοευαίσθητων, με πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης και ικανοποιητική ακρίβεια.

Από τις πρώτες και πιο σημαντικές εφαρμογές του ELSD, είναι ο προσδιορισμός σακχάρων τα οποία μέχρι πρότινος ανιχνεύονταν με ανιχνευτή UV ή φθορισμόμετρο μετά από παραγωγοποίηση. Με LC-ELSD έγινε εφικτός ο διαχωρισμός/προσδιορισμός μίγματος σακχάρων, σε δείγματα βιολογικού και φαρμακευτικού ενδιαφέροντος, με διάφορες στήλες (silica με δεσμευμένες $-NH_2$, $-OH$, $-NO_2$ ομάδες, κ.ά) και κινητές φάσεις, με ισοκρατική και βαθμιδωτή έκλουση^[66-68]. Προσδιορισμός υδατανθράκων έχει επιτευχθεί σε τρόφιμα και ποτά, παρουσία χημικών τροποποιητών που δρουν ως ρυθμιστές του pH και σταθεροποιητές της στήλης (αιθανολαμίνη/τριαιθυλαμίνη^[69] και αιθυλενοδιαμίνη/NaOH^[70]), βελτιώνοντας το σήμα απόκρισης του ELSD. Διαχωρισμός σακχάρων (φρουκτόζης, γλυκόζης, σακχαρόζης και ραφφινόζης) έχει αναφερθεί και με SFC-ELSD με βαθμιδωτή έκλουση^[50], ενώ ο ELSD βρίσκει εφαρμογή και στον προσδιορισμό κυκλοδεξτρινών –απλών και αλκυλιωμένων-, μόνων τους^[71] ή σε σύμπλοκα^[6].

Ο ELSD χρησιμοποιείται πλέον ευρέως στον προσδιορισμό αμινοξέων, τα οποία λόγω χαμηλής απορροφητικότητας, δε μπορούν να ανιχνευτούν από ανιχνευτή UV χωρίς παραγωγοποίηση. Μίγμα μη-παραγωγοποιημένων αμινοξέων (Thr-Hyp-Pro-Ser-Gl-Asp) προσδιορίστηκε με SFC-ELSD^[72], ενώ έχει ήδη αναφερθεί (βλ. εδάφιο 1.5.6.2.) ο διαχωρισμός και προσδιορισμός αμινοξέων με σύζευξη LC-ELSD-MS και LC-UV-NMR-ELSD.

Μία πληθώρα πολύ σημαντικών εφαρμογών του ELSD αφορά στην ανάλυση λιπών, ελαίων και ουσιών που σχετίζονται με αυτά, όπως γλυκερίδια και φωσφολιπίδια. Ενδεικτικά αναφέρεται ο προσδιορισμός παραγώγων της φωσφατιδοχολίνης με LC-ELSD^[73], ο διαχωρισμός μίγματος ελεύθερων λιπαρών οξέων, στερολικών εστέρων, αλκυλογλυκερολών και φωσφολιπιδίων σε βιολογικά δείγματα^[74-76], ο προσδιορισμός φυτοστερολών και τοκοφερολών σε φυτικές ίνες και έλαια^[77,78], στεροειδών ενώσεων, όπως χοληστερόλη^[79], β-οιστραδιόλη/κορτιζόνη^[80] και χολικών οξέων σε βιολογικά και φαρμακευτικά δείγματα^[81,82].

Επιτεύχθηκε, ακόμη, ο προσδιορισμός μη-ιοντικών επιφανειοδραστικών ενώσεων^[83,84], μυκοτοξινών^[85], αλκαλοειδών (ναρκοτίνη, μορφίνη)^[86] και αμινογλυκοσιδών αντιβιοτικών (γενταμικίνη, τομπραμικίνη, καναμικίνη) ο οποίος μέχρι πρόσφατα γινόταν μικροβιολογικά ή μετά από αντιδράσεις παραγωγοποίησης^[87,88].

Τέλος, σημαντική είναι η συνεισφορά του ELSD στις αναλύσεις πλαστικών και πολυμερών, όπως για παράδειγμα στο χαρακτηρισμό πρόσθετων σε πολυμερή^[89], στον προσδιορισμό αλκυλαιθέρων της πολυαιθυλενογλυκόλης^[90], ημι-πτητικών πολυκυκλικών αρωματικών ενώσεων^[91], αλλά και στον προσδιορισμό βιοδραστικών ουσιών που

περιέχονται σε πολλά φυσικά προϊόντα, όπως οι ουσίες ginkgo, black cohosh, σόγια^[92,93], οι πικροσίδες^[94] και οι φυσικές χρωστικές χλωροφύλλες Α και Β^[95].

Είναι εμφανές ότι ο ανιχνευτής ELSD αποτελεί ήδη και θα αποτελέσει και στο μέλλον ένα εργαλείο για τους αναλυτικούς χημικούς για την επίλυση προβλημάτων που δε μπορούν να αντιμετωπιστούν σήμερα με άλλους ανιχνευτές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΜΕΤΑΛΛΩΝ – ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥΣ

2.1. Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία, αναπτύσσονται μέθοδοι προσδιορισμού για μια πλειάδα μετάλλων τα οποία πολύ συχνά απαντώνται σε δείγματα της καθημερινότητας, αλλά και σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Κρίνεται σκόπιμο να παρουσιαστούν κάποιες γενικές πληροφορίες για τα μέταλλα αυτά αλλά να γίνει και μια σύντομη ανασκόπηση των μεθόδων προσδιορισμού τους όπως έχουν, μέχρι στιγμής, προταθεί στη βιβλιογραφία.

2.2. Στοιχεία της I_A Ομάδας του Περιοδικού Πίνακα (Αλκάλια)

Περιλαμβάνει τα στοιχεία Λίθιο (Li), Νάτριο (Na), Κάλιο (K), Ρουβίδιο (Rb), Καίσιο (Cs) και Φράγγιο (Fr). Είναι μέταλλα μαλακά, με αργυρόλευκο χρώμα, αυξημένη δραστηριότητα και καλή ηλεκτρική αγωγιμότητα. Απαντώνται πάντα σε ενώσεις με αριθμό οξείδωσης +1. Κάποιες γενικές ιδιότητές τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2.1: Τιμές χαρακτηριστικών ιδιοτήτων των στοιχείων της I_A ομάδας^[96,97]

Ιδιότητα	Ατομικός αριθμός	Ατομική μάζα	Σημείο ζέσεως (°C)	Σημείο τήξεως (°C)	Πυκνότητα (20°C)(g·cm ⁻³)
Li	3	6,941	1341	180,5	0,531
Na	11	22,990	882,9	97,9	0,971
K	19	39,098	759,5	63,5	0,862
Rb	37	85,468	700	39,0	1,532
Cs	55	132,905	670	28,4	1,90

Από αυτά, ενδιαφέρον για τον άνθρωπο παρουσιάζουν τα τρία πρώτα στοιχεία.

2.2.1. Λίθιο και ενώσεις του^[98]

Το λίθιο είναι το ελαφρύτερο από τα στερεά μέταλλα, με τη μικρότερη πυκνότητα. Είναι πολύ δραστικό, οξειδώνεται από την υγρασία του αέρα σχηματίζοντας μαύρες κηλίδες στην επιφάνειά του. Στη στοιχειώδη κατάστασή του είναι εξαιρετικά εύφλεκτο. Χημικά εμφανίζει ιδιότητες παρόμοιες με του μαγνησίου (διαγώνια συσχέτιση)^[99].

Σύμφωνα με τη θεωρία, το λίθιο ήταν από τα ελάχιστα στοιχεία που σχηματίστηκαν κατά τη Μεγάλη Έκρηξη (Big Bang)^[100] και απαντάται σε πολύ μικρές ποσότητες σε ορυκτά (πεταλίτης, λεπιδόλιθος, κ.ά.), αλλά και σε ίχνη στο νερό των ωκεανών. Σε ίχνη έχει ανιχνευθεί και σε κάποιους οργανισμούς, όπως στα φύλλα του καπνού, όπου υποβοηθά στην ανάπτυξή τους. Μικροποσότητες λιθίου έχουν βρεθεί και σε κρασιά, διαμέσου της πρόσληψης συστατικών από τις ρίζες της αμπέλου, όπου η συγκέντρωσή του κανονικά κυμαίνεται από 5 ως 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[101].

Λόγω του υψηλού ηλεκτροχημικού δυναμικού του, χρησιμοποιείται στην παρασκευή των επαναφορτιζόμενων μπαταριών Li, όπου μία κυψελίδα μόνο μπορεί να παράγει περί τα 3 V ρεύματος σε σχέση με το 1,5 V που παράγει η κυψελίδα απλής μπαταρίας. Στην οργανική σύνθεση, οι οργανολιθικές ενώσεις χρησιμοποιούνται ως αντιδραστήρια για το σχηματισμό δεσμών C-C, αλλά και ως καταλύτες για τον ανιοντικό πολυμερισμό ολεφινών^[102,103].

2.2.1.1. Φαρμακευτική χρήση - Φαρμακολογία Λιθίου

Στη Φαρμακολογία, το λίθιο χρησιμοποιείται υπό μορφή διαλυτών αλάτων, με πιο συνηθισμένα τα άλατα του ανθρακικού (Lithium carbonate, Li_2CO_3), του θειικού (Lithium Sulphate, Li_2SO_4), του κιτρικού (Lithium Citrate) και του ασπαρτικού (Lithium Aspartate) οξέος. Οι φαρμακοτεχνικές μορφές με τις οποίες απαντάται είναι καψάκια, απλά δισκία, δισκία ελεγχόμενης αποδέσμευσης και πόσιμα διαλύματα. Τα άλατα του λιθίου χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για τη θεραπεία της *διπολικής διαταραχής (bipolar disorder)*, όπου επιδρούν ευεργετικά, τόσο στην κατάθλιψη όσο και στη μανία, σε βραχυπρόθεσμα και μακροπρόθεσμα θεραπευτικά σχήματα. Στην κατάθλιψη (*μονοπολική διαταραχή, unipolar disorder*), το λίθιο δρα συμπληρωματικά στη λήψη άλλων αντικαταθλιπτικών^[104,105]. Σπάνια, χορηγείται σε μη ψυχιατρικές παθήσεις, όπως στη θεραπεία κάποιων σοβαρών μορφών πονοκεφάλου. Οι ιδιότητες των ενώσεων του λιθίου ήταν γνωστές ήδη από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα και αποτελούσε για χρόνια βασικό συστατικό δημοφιλών αναψυκτικών (όπως σε κάποια είδη Cola και στο αεριούχο ποτό 7Up). Ωστόσο, η χρήση του επιτράπηκε, μόνο για φαρμακευτικούς σκοπούς, από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων & Φαρμάκων (FDA) μόλις το 1970 κι έκτοτε αφαιρέθηκε από όλα τα υπόλοιπα προϊόντα^[106].

2.2.1.2. Μηχανισμός δράσης

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης του Li^+ στον οργανισμό δεν είναι γνωστός. Μία πιθανή ερμηνεία είναι ότι αλληλεπιδρά με τα μονοσθενή και δισθενή κατιόντα κατά τη μεταφορά τους στους νευρώνες μέσω των νευροδιαβιβαστών, και κυρίως με το Na^+ , το οποίο υποκαθιστά. Το αποτέλεσμα της δράσης του είναι ότι μειώνεται η έκκριση νοραδρεναλίνης με ταυτόχρονη αύξηση της σύνθεσης σεροτονίνης.

Εξαιτίας της αλληλεπίδρασής του με βασικούς ηλεκτρολύτες του οργανισμού, μπορεί να προκαλέσει αφυδάτωση και δυσλειτουργία των νεφρών, ενώ υπερδοσολογία οδηγεί σε

απορύθμιση του θυρεοειδούς, αρρυθμίες, ναυτίες, τρέμουλο κ.ά. με μοιραίες συνέπειες. Επειδή τα θεραπευτικά επίπεδα του λιθίου είναι λίγο χαμηλότερα από τα τοξικά επίπεδα ($0,6-1,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ και $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, αντίστοιχα) πρέπει συχνά, κατά την περίοδο της θεραπείας, να ελέγχονται τα επίπεδα του φαρμάκου στο πλάσμα του αίματος του ασθενούς.

2.2.2. Νάτριο και ενώσεις του

Το νάτριο δε βρίσκεται ελεύθερο σε στοιχειακή μορφή. Οξειδώνεται γρήγορα στον αέρα και αντιδρά βίαια και εξώθερμα με το νερό. Σχεδόν όλες οι ενώσεις που περιέχουν Na^+ είναι υδατοδιαλυτές με αποτέλεσμα το νάτριο να βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο νερό των ωκεανών και πάντα ενωμένο με το χλώριο, αποτελώντας μαζί το κοινό μαγειρικό αλάτι.

Οι ενώσεις του νατρίου είναι παρούσες σε διάφορες μορφές στην καθημερινότητά μας. Αυτές που απαντώνται όμως πιο συχνά, κυρίως στη βιομηχανία, είναι το NaCl στην παρασκευή και στη διατήρηση τροφίμων, τα Na_2CO_3 (soda ash) και NaHCO_3 (baking soda) χρησιμοποιούνται μεταξύ άλλων στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων για ρύθμιση του pH και ως διογκωτικά αρτοσκευασμάτων, το NaOH (καυστική σόδα) που χρησιμεύει ως καθαριστικό και για την παρασκευή σαπουνιών, το Na_2HPO_4 , το Na_3PO_4 , το θειοθειικό νάτριο, ο βόρακας κ.ά.^[107].

2.2.2.1. Βιολογικός ρόλος νατρίου^[107-109]

Το νάτριο είναι απαραίτητο στοιχείο για τη διατήρηση της ζωής φυτών και ζώων. Συμβάλλει στη ρύθμιση του pH στον οργανισμό και στη διατήρηση της οσμωτικής ισορροπίας στις δύο πλευρές της κυτταρικής μεμβράνης, ή αλλιώς στη διατήρηση του ηλεκτρικού δυναμικού των κυτταρικών μεμβρανών, ώστε να επιτρέπεται η ελεύθερη κυκλοφορία χημικών ενώσεων και νευρικών ερεθισμάτων διαμέσου αυτών. Η μετακίνησή του γίνεται μέσω αντλίας Na^+/K^+ και του ενζύμου $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{-ATPάση}$, που δεν είναι τίποτα άλλο παρά πρωτεΐνη με μεγάλη συγγένεια στα δύο ιόντα τα οποία πρέπει να συνυπάρχουν στο περιβάλλον του ενζύμου για να γίνει ενεργοποίηση. Η κατανομή Na^+ και K^+ μέσα κι έξω από τα κύτταρα είναι άνιση. Στον άνθρωπο, η συγκέντρωση Na^+ στους εξωκυττάριους χώρους είναι σταθερή στα $135-140 \text{ meq}\cdot\text{L}^{-1}$, ενώ του K^+ στα $5 \text{ meq}\cdot\text{L}^{-1}$. Το αντίθετο σχεδόν συμβαίνει μέσα στα κύτταρα.

Εκτός από τους εξωκυττάριους χώρους, μεγάλη παρακαταθήκη Na^+ υπάρχει στα οστά, απ' όπου ο οργανισμός μπορεί να αντλήσει, εάν χρειαστεί, καθώς απότομη και μεγάλη πτώση των επιπέδων Na μπορεί να προκαλέσει από ελαφρές νευρολογικές διαταραχές μέχρι και κώμα. Η αποβολή του στα ούρα ρυθμίζεται από το φλοιό των επινεφριδίων μέσω της ορμόνης αλδοστερόνης.

Η μεγαλύτερη και σπουδαιότερη πηγή Na είναι το νερό. Η επεξεργασία των τροφίμων στις βιομηχανίες αυξάνει συχνά την περιεκτικότητά τους σε Na μέσω πρόσθετων, συντηρητικών, ενισχυτικών γεύσης κ.ά. Ως εκ τούτου, το Na ανήκει στην

κατηγορία των *ανόργανων διαιτητικών συστατικών*. Οι απαιτήσεις του οργανισμού δεν είναι επακριβώς καθορισμένες, μια κανονική διαίτα, ωστόσο, εξασφαλίζει συνήθως περισσότερο Na από όσο χρειάζεται το ανθρώπινο σώμα. Είναι δε τόση η σημασία του στοιχείου αυτού για τη συνέχιση της ζωής, ώστε τα φυτοφάγα ζώα έχουν αναπτύξει ειδικό υποδοχέα γεύσης του νατρίου.

2.2.3. Κάλιο και ενώσεις του^[98]

Το κάλιο, ακριβώς όπως και το νάτριο, δεν απαντάται ελεύθερο διότι αντιδρά βίαια με τον αέρα και το νερό, σχηματίζοντας υδατοδιαλυτές ενώσεις που βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο νερό και σε ορυκτά πετρώματα. Παρά τη θέση του στον Περιοδικό Πίνακα η πυκνότητά του είναι μικρότερη από του Na και μεγαλύτερη μόνο από του Li.

Από τις ενώσεις του καλίου, οι πιο συχνά απαντώμενες είναι το KOH (καυστική ποτάσα) που χρησιμοποιείται για ρύθμιση του pH, ως ηλεκτρολύτης των αλκαλικών μπαταριών ή για τη σαπωνοποίηση των εστέρων, το KCl στη βιομηχανία λιπασμάτων ή ως υποκατάστατο του Na στη μαγειρική, το KO₂ (υπεροξείδιο του καλίου) που χρησιμοποιείται στις αναπνευστικές συσκευές επειδή απελευθερώνει O₂ και δεσμεύει CO₂, το KHSO₃ που χρησιμεύει ως συντηρητικό στην οينوποιία και τη ζυθοποιία, το K₂CO₃, το KH₂PO₄, το K₂HPO₄ κ.ά.

2.2.3.1. Βιολογικός ρόλος καλίου^[107-109]

Το K⁺ είναι απαραίτητο στην ομαλή λειτουργία των φυτικών και ζωικών ιστών διότι, όπως και το Na⁺, αποτελεί βασικό ηλεκτρολύτη, που επιδρά στην οσμωτική ισορροπία των κυτταρικών συστημάτων και στη διατήρηση του φυσιολογικού pH. Είναι το κύριο κατιόν των ενδοκυτταρικών υγρών και σχετίζεται με το μεταβολισμό σακχάρων και πρωτεϊνών. Σχετίζεται ακόμη με τη λειτουργία των μυών και των νεύρων, καθώς είναι ένα από τα μέταλλα που συμπλέκονται με το βασικότερο συνένζυμο των κινητικών πρωτεϊνών το ATP. Η μετακίνησή του διαμέσου των μεμβρανών γίνεται μέσω της αντλίας Na⁺/K⁺ (βλ. εδάφιο 2.2.2.1.).

Κάποιες ποσότητες καλίου, ο οργανισμός τις λαμβάνει από το νερό, δε φτάνουν ωστόσο για να καλύψουν τις καθημερινές του ανάγκες. Μία ισορροπημένη διαίτα με φρούτα και λαχανικά είναι συνήθως αρκετή για την κάλυψη αυτών των αναγκών. Το κάλιο ανήκει επίσης στα ανόργανα διαιτητικά συστατικά και γίνεται γευστικά αντιληπτό με διαφορετικό τρόπο αναλόγως της συγκέντρωσής του, καθώς ενεργοποιεί τρεις από τις πέντε γευστικές αισθήσεις. Σε αραιά διαλύματα, όπως στο γάλα ή σε χυμούς, είναι γλυκό, σε πυκνότερα διαλύματα πικρίζει ελαφρά και σε πολύ πυκνά διαλύματα είναι αλμυρό.

Ανεπάρκεια σε κάλιο μπορεί να εμφανιστεί μόνο σε παθολογικές καταστάσεις (π.χ. διάρροιες, νεφρική ανεπάρκεια) και επηρεάζει τη λειτουργία των μυών και της καρδιάς. Η αυξημένη συγκέντρωση καλίου είναι ακόμη πιο επικίνδυνη, διότι μπορεί να προκαλέσει προσωρινή παράλυση ή καρδιακή ανακοπή.

2.2.3.2. Φαρμακευτική χρήση καλίου

Τα σκευάσματα καλίου (κυρίως άλας KCl) δίνονται συνήθως συμπληρωματικά με διουρητικά, ώστε να αντισταθμίσουν τις απώλειες των ηλεκτρολυτών από τη δράση των διουρητικών. Είναι κατά κανόνα σκευάσματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης, καθώς απότομη αύξηση των επιπέδων του μετάλλου στον οργανισμό έχει τοξικά αποτελέσματα και μπορεί να προκαλέσει καταστροφή των ιστών. Ενέσιμο δ/μα KCl χρησιμοποιείται στην καρδιοχειρουργική, όπου προκαλεί ελεγχόμενη προσωρινή διακοπή της καρδιακής λειτουργίας.

2.3. Στοιχεία της II_A Ομάδας του Περιοδικού Πίνακα (Αλκαλικές Γαίες)

Περιλαμβάνει τα στοιχεία Βηρύλλιο (Be), Μαγνήσιο (Mg), Ασβέστιο (Ca), Στρόντιο (Sr), Βάριο (Ba) και Ράδιο (Ra).

Είναι μέταλλα ισχυρά ηλεκτροθετικά, εμφανίζονται στις ενώσεις τους με αριθμό οξείδωσης +2. Πρόκειται για πολύ δραστικά στοιχεία που απαντώνται στη φύση κυρίως ενωμένα παρά ελεύθερα. Κάποιες ιδιότητές τους παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 2.2: Τιμές χαρακτηριστικών ιδιοτήτων των στοιχείων της II_A ομάδας^[96,97]

Ιδιότητα	Ατομικός αριθμός	Ατομική μάζα	Σημείο ζέσεως (°C)	Σημείο τήξεως (°C)	Πυκνότητα (20°C)(g·cm ⁻³)
Be	4	9,012	2500	1287	1,85
Mg	12	24,305	1105	650	1,74
Ca	20	40,08	1483	843	1,55
Sr	38	87,62	1350	770	2,60
Ba	56	137,33	1770	710	3,78
Ra	88	226	2140	960	5,0

Το μαγνήσιο και το ασβέστιο είναι τα σημαντικότερα για τον ανθρώπινο οργανισμό.

2.3.1. Μαγνήσιο και ενώσεις του

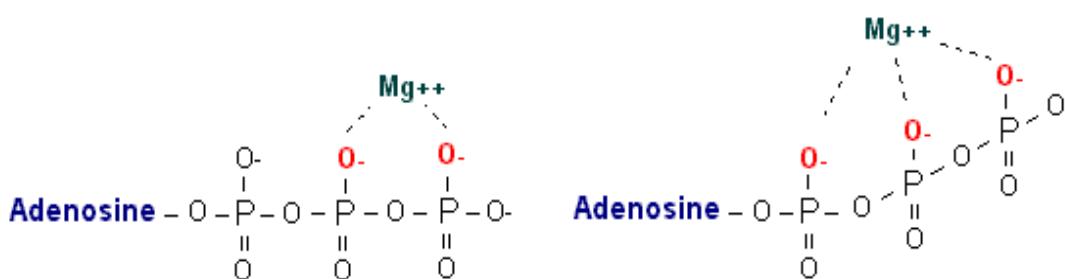
Το μαγνήσιο αποτελεί το 2% του στερεού φλοιού της γης^[110] και λόγω της υψηλής υδατοδιαλυτότητας των αλάτων του βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο νερό. Μάλιστα, η ποσότητα αλάτων Mg και Ca καθορίζει τη *σκληρότητά του νερού* και είναι δείκτης της ποιότητάς του. Το Mg είναι εξαιρετικά εύφλεκτο μέταλλο. Καιγόμενο στον αέρα παράγει εκτυφλωτικό λευκό φως, ιδιότητα που βρήκε εφαρμογή στην κατασκευή πυροτεχνημάτων

και στις πρώτες φωτογραφικές μηχανές. Με το αργίλιο σχηματίζουν τα λεγόμενα *υπερελαφρά κράματα* που χρησιμοποιούνται στη διαστημική αεροναυπηγική και στη βιομηχανία αυτοκινήτων^[99]. Με ενώσεις αλκυλαλογονιδίων, δίνει τα αντιδραστήρια Grignard, σημαντικά ενδιάμεσα προϊόντα στην οργανική σύνθεση.

Οι ανόργανες ενώσεις του είναι κατά κανόνα λευκοί κρύσταλλοι. Οι περισσότερες είναι υδατοδιαλυτές. Κάποιοι τύποι φυσικών νερών από περιοχές πλούσιες σε άλατα μαγνησίου, έχουν μια ελαφρά όξινη γεύση που οφείλεται στα ιόντα Mg^{2+} . Από τις πιο σημαντικές ενώσεις του Mg για ανθρώπινη χρήση είναι το $Mg(OH)_2$, το $MgCO_3$, το $MgSO_4$, το στεατικό μαγνήσιο (magnesium stearate) κ.ά. (βλ. εδάφια 2.3.1.1 και 2.3.1.2).

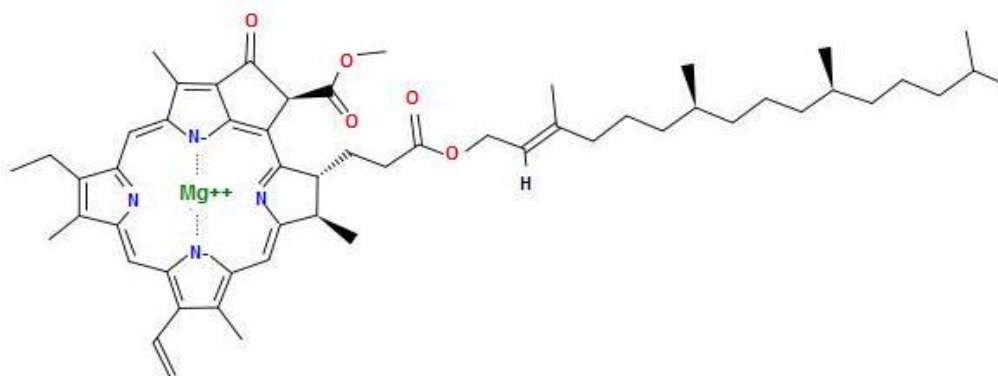
2.3.1.1. Βιολογικός ρόλος μαγνησίου^[107-109]

Το μαγνήσιο είναι σε ποσοστό το 11^ο στη σειρά στοιχείο του ανθρώπινου οργανισμού και ο ρόλος του είναι πολλαπλός. Τα ιόντα Mg εξαιτίας της ισχυρής αλληλεπίδρασής τους με τα φωσφορικά ιόντα, επηρεάζουν τη δομή των πρωτεϊνών και λειτουργούν ως καταλύτες σε ένα πλήθος σημαντικών ενζυμικών αντιδράσεων των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων όλων των ενζύμων που σχετίζονται με τη σύνθεση και τη λειτουργία του ATP, αλλά και ενζύμων που εμπλέκονται στη σύνθεση και σταθεροποίηση της δομής του DNA και του RNA. Ειδικά η φωσφορυλίωση των αλκοολών, που αποτελεί μια από τις σημαντικότερες λειτουργίες του ATP, καταλύεται από τα ένζυμα κινάσες, η δραστηριότητα των οποίων εξαρτάται απόλυτα από την παρουσία Mg^{2+} . Το δισθενές μεταλλικό ιόν σχηματίζει σύμπλοκο με το ATP, η πιθανή δομή του οποίου απεικονίζεται στο σχήμα 2.1.



Σχήμα 2.1: Μοντέλα σύνδεσης του Mg^{2+} στο ATP.

Το μαγνήσιο, εξίσου αναγκαίο για τα φυτά, σχηματίζει σύμπλοκο με τις πορφυρίνες, με πιο σημαντική τη χλωροφύλλη (Σχ.2.2). Ανεπάρκεια σε Mg έχει ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση του ρυθμού φωτοσύνθεσης, που εκδηλώνεται ως κιτρίνισμα των φύλλων, και καταπολεμάται με την προσθήκη λιπάσματος $MgSO_4$ (*άλας του Epsom*) στο χώμα.



Σχήμα 2.2: Χημικός τύπος της Χλωροφύλλης Α. Στο κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου βρίσκεται το άτομο του Mg.

Αντίστοιχα, ανεπάρκεια του ανθρώπινου οργανισμού σε Mg ευθύνεται για την εμφάνιση μυϊκών σπασμών, ασθένειες του καρδιοαναπνευστικού συστήματος, άσθμα και οστεοπόρωση. Κύρια πηγή μαγνησίου είναι τα φυτικά τρόφιμα. Ο δυτικός τρόπος διατροφής όμως, ο σύγχρονος τρόπος βιομηχανικής επεξεργασίας των τροφών, αλλά και η χρήση λιπασμάτων χωρίς Mg, έχουν καταστήσει την ανεπάρκεια σε Mg μία κατάσταση πολύ κοινή πλέον στις ανεπτυγμένες χώρες^[111].

2.3.1.2. Φαρμακολογική χρήση μαγνησίου

Τα φάρμακα που περιέχουν Mg ($MgSO_4$, Magnesium Aspartate, κ.ά) δίνονται κυρίως ως διατροφικά συμπληρώματα στην περίπτωση ανεπάρκειας, αλλά και για τη θεραπεία ασθενειών που σχετίζονται με αυτή, και χορηγούνται από το στόμα ή ενδοφλέβια. Άλατα του μαγνησίου, διαλυμένα στο μπάνιο, μπορούν να ανακουφίσουν πόνους από μυαλγίες, κράμπες, ερεθισμούς και οιδήματα. Μπορούν, ακόμη, να συμβάλουν στην καθυστέρηση πρόωρου τοκετού, αλλά και να βοηθήσουν στην αντιμετώπιση της εκλαμψίας σε εγκύους, μία επικίνδυνη επιπλοκή που μπορεί να είναι μοιραία για τη μητέρα και το μωρό.

Ειδικά το $Mg(OH)_2$, γάλα της Μαγνησίας, χρησιμοποιείται ως αντιόξινο, αφού εξουδετερώνει τα οξέα του στομάχου, αλλά και ως ηπακτικό.

Τέλος, το στεατικό μαγνήσιο ($Mg(C_{18}H_{35}O_2)_2$) θεωρείται ασφαλές για ανθρώπινη κατανάλωση και χρησιμοποιείται κατά κόρον ως έκδοχο στην παρασκευή φαρμακευτικών σκευασμάτων, όπως δισκία και καψάκια, διότι προσδίδει στα κοκκία εξαιρετικές ιδιότητες ροής που διευκολύνουν την κατεργασία τους.

2.3.2. Ασβέστιο και ενώσεις του

Το ασβέστιο είναι αργυρόλευκο, στιλπνό, σχετικά μαλακό, πολύ δραστικό μέταλλο που αντιδρά με το νερό, ελευθερώνοντας υδρογόνο. Είναι πέμπτο στη σειρά διάδοσης των στοιχείων στο γήινο στερεό φλοιό, αποτελεί κύριο συστατικό των οστών, των δοντιών και των οστράκων^[99,110]. Το ασβέστιο απαντάται κυρίως σε ενώσεις αλάτων, πολλές από τις οποίες δεν είναι υδατοδιαλυτές. Από τι πιο σημαντικές ενώσεις του είναι το $CaCO_3$ με

εφαρμογές στην τσιμεντοβιομηχανία και τη βιομηχανία τροφίμων για ρύθμιση του pH, το $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (limewater) το οποίο θολώνει παρουσία CO_2 και χρησιμοποιείται για την ανίχνευσή του, το CaCl_2 που χρησιμοποιείται για απομάκρυνση της υγρασίας και βέβαια το $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (υδροξυαπατίτης) που είναι η μορφή με την οποία απαντάται το ασβέστιο στα οστά και αποτελεί το 70% αυτών.

2.3.2.1. Βιολογικός ρόλος ασβεστίου^[107-109]

Το ασβέστιο είναι ένα στοιχείο εξαιρετικά απαραίτητο για τη ζωή. Η συγκέντρωσή του στο πλάσμα του αίματος ρυθμίζεται από μηχανισμούς, ώστε να κυμαίνεται σε πολύ αυστηρά όρια, αφού απότομη αύξηση των ιόντων Ca^{2+} στον ενδοκυττάριο χώρο, μπορεί να προκαλέσει ρήξη ή νέκρωση του κυττάρου. Περίπου το 99% του ασβεστίου, βρίσκεται στα οστά και τα δόντια. Το υπόλοιπο κινείται ελεύθερα στο αίμα ως Ca^{2+} , είτε σχηματίζει σύμπλοκα με πρωτεΐνες, όπως η αλβουμίνη, και επιδρά σε βιολογικές διεργασίες που ρυθμίζουν τη διάσπαση του γλυκογόνου και τη διαβίβαση νευρικών ερεθισμάτων.

Σημαντικότερος όμως είναι ο ρόλος του στη ρύθμιση της κίνησης των μυών. Όταν ο μυς είναι σε ηρεμία, η συγκέντρωση Ca^{2+} στα μυϊκά κύτταρα είναι πολύ χαμηλή. Διέγερση της κυτταρικής τους μεμβράνης προκαλούμενη από νευρικές ώσεις, οδηγεί σε απότομη απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων του μετάλλου που πυροδοτούν τη μυϊκή συστολή μέσω των πρωτεϊνών τροπονίνη και τροπομυοσίνη, ενώ κατά την επαναφορά του μυός στην ηρεμία, τα επίπεδα Ca^{2+} μειώνονται και πάλι. Η διαδικασία αυξομειώσης της συγκέντρωσης του ασβεστίου γίνεται διαμέσου της δράσης μιας αντλίας Ca^{2+} παρόμοιας με την αντλία Na^+/K^+ .

Παρότι το ασβέστιο που είναι δεσμευμένο στα οστά μπορεί, σε περίπτωση ανάγκης του οργανισμού, να αποδεσμευτεί στο αίμα μέσω κυττάρων που καλούνται οστεοκλάστες, μπορεί να παρατηρηθεί μακροχρόνια ανεπάρκεια σε Ca όταν γενικά η διαίτα είναι φτωχή σε πρωτεΐνες και γαλακτοκομικά προϊόντα. Η κατάσταση αυτή οδηγεί στη δημιουργία αδύναμων οστών που, ιδιαίτερα σε γυναίκες στην εμμηνόπαυση, εκδηλώνεται ως οστεοπόρωση και αποτελεί αιτία συχνών καταγμάτων. Αντιθέτως, χρόνια υπερβολική λήψη Ca (υπερασβεσταιμία) μπορεί να προκαλέσει από δυσκολία στην απορρόφηση άλλων μετάλλων έως δυσλειτουργία των νεφρών και των μυών, καρδιακές αρρυθμίες και νοητική αστάθεια. Η βιταμίνη D_3 (χοληκαλσιφερόλη) ευνοεί την αποτελεσματικότερη απορρόφηση του ασβεστίου από τον οργανισμό.

2.3.2.2. Φαρμακολογική χρήση ασβεστίου

Οι ενώσεις του ασβεστίου που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα (CaCO_3 , CaCl_2 , Calcium Dobesilate, κ.ά), χορηγούνται για την αντιμετώπιση της έλλειψης του οργανισμού στο συγκεκριμένο στοιχείο. Συνήθως μάλιστα, πρόκειται για συνδυασμό ασβεστίου-βιταμίνης D_3 για μεγαλύτερη απορρόφηση του μετάλλου. Το CaCO_3 χρησιμοποιείται και ως έκδοχο για την παρασκευή δισκίων, στις οδοντόπαστες, αλλά και στην ομοιοπαθητική ιατρική^[104].

2.4. Μέθοδοι Προσδιορισμού των Στοιχείων της I_A και II_A Ομάδας του Περιοδικού Πίνακα

Τα στοιχεία των I_A και II_A ομάδων του περιοδικού πίνακα (Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, μαζί με το NH₄⁺), παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για τον άνθρωπο και βρίσκονται σε βιολογικά και περιβαλλοντικά δείγματα και τρόφιμα και συνήθως απαντώνται ταυτόχρονα. Αυτός είναι ο λόγος που οι προτεινόμενες στη βιβλιογραφία αναλυτικές μέθοδοι αφορούν στον προσδιορισμό των παραπάνω ιόντων ως μια ενιαία ομάδα. Σε κάποιες από αυτές τις μεθόδους περιλαμβάνεται και το λίθιο, συνήθως για να δοθεί έμφαση στη διαχωριστικότητα της μεθόδου. Ειδικά για το λίθιο, όμως, έχουν αναπτυχθεί και εξειδικευμένες μέθοδοι προσδιορισμού.

2.4.1. Προσδιορισμός λιθίου

Η συνήθης μέθοδος προσδιορισμού του λιθίου βασίζεται στη χρήση φλογοφωτομετρίας ατομικής απορρόφησης (FAAS) με χρήση φλόγας υποξειδίου του αζώτου (N₂O) και ακετυλενίου, για συγκεντρώσεις της τάξης των 0,03 μg·mL⁻¹ και όριο ανίχνευσης τα 0,001 μg·mL⁻¹. Η φλογοφωτομετρία ατομικής εκπομπής έχει υψηλότερη ευαισθησία, όμως τα αποτελέσματά της είναι λιγότερο ακριβή. Μεγάλη εφαρμογή βρίσκει και η τεχνική της ατομικής απορρόφησης με ηλεκτροθερμική ατομοποίηση (ET-AAS) σε χημικά τροποποιημένο φούρνο γραφίτη (πλατφόρμα L'νόν επικαλυμμένη με ζιρκόνιο) ώστε να επιτυγχάνονται μεγαλύτερες θερμοκρασίες ατομοποίησης^[112]. Οι παραπάνω τεχνικές βρίσκουν εφαρμογή στην ιχνοανάλυση του λιθίου κυρίως σε δείγματα πλάσματος αίματος^[98, 113-116].

Τα τελευταία χρόνια, η τεχνική του επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος συνδυασμένου με ατομική εκπομπή (ICP-AES), φασματομετρία μαζών (ICP-MS) ή φθορισμομετρία με laser (DLIF-ICP), τείνει να γίνει πολύ δημοφιλής, ειδικά στην πολυστοιχειακή ανάλυση, παρά τα προβλήματα που παρουσιάζει (αστάθεια στο σήμα, παρεμποδίσσεις από το υπόστρωμα), ιδιαίτερα όταν η συγκέντρωση του λιθίου είναι σχετικά υψηλή^[98,117-119].

Οι ηλεκτροχημικές τεχνικές, με τη χρήση ηλεκτροδίων εκλεκτικών στην ανίχνευση του Li, προσφέρουν τη δυνατότητα για γρήγορες αναλύσεις δειγμάτων πλάσματος και ούρων σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με λίθιο και πρέπει να παρακολουθούν διαρκώς τα επίπεδα του μετάλλου στον οργανισμό τους. Οι προσπάθειες που έχουν γίνει, έχουν οδηγήσει στη δημιουργία μεμβρανών εκλεκτικών στην ανίχνευση του Li, τροποποιημένων με αιθέρες-στέμματα^[120,121], οξειδία^[122,123], σιλοξάνια/καρβοσιλοξάνια^[124]. Σημαντικό πρόβλημα είναι η συνήθως υψηλή συγκέντρωση αλκαλοϊδόντων που συνυπάρχουν στα δείγματα αυτού του είδους, αλλά και η κατακράτηση υπολειμμάτων πρωτεϊνών στις μεμβράνες των ηλεκτροδίων που μπορεί να φράξουν τους πόρους τους^[98].

Η υγροχρωματογραφία, τέλος, έχει χρησιμοποιηθεί ήδη από παλιά για τον διαχωρισμό του Li από τα υπόλοιπα αλκαλοϊδόντα και τον προσδιορισμό του^[125], και κυρίως

η Ιοντική Χρωματογραφία, με ή χωρίς καταστολέα, και κατιονανταλλακτικές στήλες που εκμεταλλεύονται τη σύγχρονη τεχνολογία ως προς τα υλικά πλήρωσης των στηλών. Έχει γίνει έτσι εφικτός ο προσδιορισμός του Li σε κρασιά για τον έλεγχο νοθείας^[101], σε πόσιμα νερά και απόβλητα σε ιχνοποσότητες^[126-128], σε αναψυκτικά^[129] κ.ά.

2.4.2. Προσδιορισμός κατιόντων αλκαλίων και αλκαλικών γαιών

Τα στοιχεία νάτριο, κάλιο, ασβέστιο και μαγνήσιο απαντώνται συνήθως ανά δύο (Na-K και Ca-Mg) ή και τα τέσσερα ταυτόχρονα και μάλιστα σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Η μέθοδος αναφοράς για τον προσδιορισμό Na και K είναι η φασματοφωτομετρία ατομικής εκπομπής. Η μέτρηση του Na γίνεται στα 589 nm και όταν οι περιβαλλοντικές επιμολύνσεις είναι μηδαμινές, το όριο ανίχνευσης του μετάλλου φτάνει μέχρι τα 0,02 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[98,130]. Αντίστοιχα, η μέτρηση του K γίνεται στα 766,5 nm. Ειδικά για το κάλιο έχουν αναπτυχθεί και άλλες μέθοδοι, όπως ο σταθμικός προσδιορισμός του μετά από καταβύθιση με εξαχλωροπλατινικά (PtCl_6^{2-}) ή εξανιτρωδοκοβαλτικό οξύ ($\text{Co}(\text{NO}_2)_6^{3-}$), αλλά και ογκομέτρηση, καμία όμως από αυτές τις τεχνικές δε φτάνει στο χαμηλό όριο ανίχνευσης που επιτυγχάνεται με την ατομική απορρόφηση^[98].

Για το Ca και το Mg η μέθοδος αναφοράς είναι η ογκομέτρηση με EDTA σε αλκαλικό pH, με την οποία μπορούν να προσδιοριστούν τα δύο ιόντα και μάλιστα ταυτόχρονα, στην περίπτωση που μετράται η σκληρότητα του ύδατος. Εκτός αυτού, έχουν αναπτυχθεί και σταθμικές μέθοδοι προσδιορισμού με καταβύθιση παρουσία διαφόρων αντιδραστηρίων (π.χ. προσθήκη $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ προκαλεί καταβύθιση του Mg, ενώ προσθήκη $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ καταβυθίζει το Ca), παρ' όλα αυτά οι παραπάνω μέθοδοι ενδέχεται να δώσουν ψευδή αποτελέσματα λόγω παρεμποδισμών από συνυπάρχοντα κατιόντα^[98].

Το Mg προσδιορίζεται και με φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης με χρήση φλόγας (συνήθως αέρα-ακετυλενίου) ή σε φούρνο γραφίτη. Η μέτρηση γίνεται στα 285,2 nm και το όριο ανίχνευσης φτάνει στα 0,004 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (με φούρνο γραφίτη). Το Ca, αντίστοιχα, μετράται στα 422,7 nm με όριο ανίχνευσης τα 0,08 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (με φούρνο γραφίτη)^[98].

Μεγαλύτερο ενδιαφέρον, ωστόσο, έχει ο συμπροσδιορισμός των κατιόντων αλκαλίων και αλκαλικών γαιών όπου σχεδόν κυριαρχεί η χρήση της Ιοντικής Χρωματογραφίας, με ή χωρίς καταστολέα και αγωγιμομετρικό ανιχνευτή. Οι μέθοδοι που έχουν προταθεί, χρησιμοποιούν διάφορες στήλες, απλές κατιονανταλλακτικές^[131,132], στήλες σίλικα τροποποιημένες με αργίλιο και πολύπλοκες κινητές φάσεις για βελτιστοποίηση της διαχωριστικότητας (π.χ. με αιθέρες-στέμματα, πυριδινωδικαρβοξυλικά οξέα, κ.ά.)^[133,134], ή τροποποιημένες με ιμινοδιοξεικό οξύ^[135], με άλατα χολικού οξέος συζευγμένα με ταυρίνη^[136], με θεικές δεξτράνες^[137] κ.ά. Έχει προταθεί ακόμη η χρήση μονολιθικής C_{18} στήλης που λειτουργεί με υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις (HILIC) σε κινητή φάση που περιέχει ως και 90% ACN και ανιχνευτή ELSD^[138]. Με όλους αυτούς τους τρόπους, έχει επιτευχθεί ο διαχωρισμός των κατιόντων αλκαλίων και αλκαλικών γαιών –σε μία περίπτωση διαχωρίστηκαν μέχρι και 11 κατιόντα (Cu^{2+} , Li^{+} , Na^{+} , NH_4^{+} , K^{+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} και Zn^{2+}) σε δείγματα μπύρας και εμφιαλωμένων μεταλλικών νερών^[139], σε

πόσιμο νερό, σε νερό οικιακών αποβλήτων, αλλά και σε περιβαλλοντικά δείγματα (νερό από έδαφος, ποτάμια, λίμνες)^[140-144], σε συμπύκνωμα εκπνοής^[145], πλάσμα αίματος^[146] κ.ο.κ.

Εκτός από την υδροχρωματογραφία, η τεχνική της ατομικής εκπομπής/απορρόφησης έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των εν λόγω κατιόντων σε βιολογικά δείγματα (ούρα, σάλιο, πλάσμα αίματος, κ.τ.λ.)^[147], γάλα^[148], φαρμακευτικά προϊόντα^[149], βιοκαύσιμα^[150] κ.ά. Έχει επίσης αναφερθεί ο προσδιορισμός αλκαλίων και αλκαλικών γαιών με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση και ανιχνευτή UV σε βιολογικά δείγματα^[151], νερά^[152] κ.ά.

2.5. Στοιχεία της III^{ης} Ομάδας Συστήματος Fresenius

Περιλαμβάνει 19 κατιόντα, τα πιο συνηθισμένα όμως είναι 8 τα: Αργίλιο (Al), Χρώμιο (Cr), Σίδηρος (Fe), Μαγγάνιο (Mn), Κοβάλτιο (Co), Νικέλιο (Ni) και Ψευδάργυρος (Zn).

Πρόκειται για στοιχεία που ανήκουν σε διάφορες ομάδες του περιοδικού πίνακα και όλα καταβυθίζονται ως θειούχες ενώσεις ή υδροξείδια, με υδρόθειο ή θειοακεταμίδιο από αλκαλικά δ/τα, που περιέχουν περίσσεια NH_4^{+} ^[153]. Εκτός από το Al, που ανήκει στην III_A ομάδα του Π.Π., όλα τα υπόλοιπα στοιχεία αποτελούν τα λεγόμενα στοιχεία μεταπτώσεως και εμφανίζουν περισσότερους από έναν αριθμούς οξείδωσης. Οι ιδιότητες των σημαντικότερων από αυτά παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 2.3: Τιμές χαρακτηριστικών ιδιοτήτων των στοιχείων της III^{ης} ομάδας συστήματος Fresenius^[96,97].

Ιδιότητα	Ατομικός αριθμός	Ατομική μάζα	Σημείο ζέσεως (°C)	Σημείο τήξεως (°C)	Πυκνότητα (20°C) (g·cm ⁻³)
Al	13	26,982	2327	660	2,7
Cr	24	51,996	2672	1903	7,14
Fe	26	55,847	3000	1535	7,87
Zn	30	65,380	908	419	7,14

2.5.1. Αργίλιο και ενώσεις του

Είναι αργυρόλευκο, ελαφρύ, μαλακό μέταλλο με πολύ καλή θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητα. Είναι το πλέον διαδεδομένο στοιχείο, μετά το οξυγόνο και το πυρίτιο στο στερεό φλοιό της γης^[99,110]. Η κύρια πηγή παραγωγής του είναι το ορυκτό βωξίτης και λόγω της χαμηλής τιμής του, έχει σχεδόν εκτοπίσει το σίδηρο και το χαλκό από πολλές εφαρμογές^[99]. Το αργίλιο (ή αλουμίνιο) είναι ένα μέταλλο 100% ανακυκλώσιμο, χωρίς να

υποστεί υποβάθμιση στις ιδιότητές του, γεγονός που συνεισφέρει τα μέγιστα στην προστασία του περιβάλλοντος.

Στις ενώσεις του εμφανίζεται με αριθμό οξείδωσης +3 και πολύ σπάνια με +2 (π.χ. στην ένωση AlO). Οι πιο συχνά απαντώμενες ενώσεις του αργιλίου είναι το $\text{Al}(\text{OH})_3$ με φαρμακευτικές και απολυμαντικές ιδιότητες, το Al_2O_3 , μόνο του ή με προσμίξεις που χρησιμοποιείται στην κεραμοποιεία για την κατασκευή ημιπολύτιμων λίθων, αλλά και ως βάση για την παρασκευή στατικών φάσεων στις στήλες χρωματογραφίας, το AlCl_3 που είναι συστατικό των αποσμητικών, το $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ που χρησιμοποιείται εκτός των άλλων και ως πρόσθετο τροφίμων, κ.ά. Διάλυμα θειικού αργιλίου αναμειγμένο με διαλύματα άλλων θειικών αλάτων σχηματίζει στυπτηρίες, μια χαρακτηριστική τάξη διπλών θειικών αλάτων, ενός μονοσθενούς κι ενός τρισθενούς κατιόντος με γενικό τύπο $\text{M}^{\text{I}}\text{M}^{\text{III}}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Τα κράματα του Al με άλλα μέταλλα (π.χ. Mg, Cu) έχουν εξαιρετικές ιδιότητες με κύριες εφαρμογές στις κατασκευές.

2.5.1.1. Επίδραση αργιλίου στην υγεία

Το αργίλιο δεν είναι απαραίτητο στη λειτουργία των κυττάρων. Αντιθέτως, ανταγωνίζεται το ασβέστιο στην απορρόφηση από τον οργανισμό προκαλώντας οστεοπενία. Ωστόσο, επειδή οι καθημερινές του χρήσεις είναι πάρα πολλές, στα αντιόξινα φάρμακα, τις οδοντόπαστες, τα αποσμητικά, τις συσκευασίες αναψυκτικών ή το οικιακό αλουμινόχαρτο, υπάρχουν ενδείξεις ότι σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να είναι τοξικό. Αυξημένη μακροχρόνια λήψη αργιλίου ενδέχεται να προκαλέσει οστεοπενία ή νευρολογικές διαταραχές. Άνθρωποι με αλλεργία στο αργίλιο μπορεί να εμφανίσουν δερματίτιδες, πεπτικές διαταραχές και άλλα συμπτώματα, αναλόγως του τρόπου λήψης. Παρότι τα τοξικά αποτελέσματα της χρήσης του αργιλίου είναι ακόμη αμφιλεγόμενα, κάποιοι επιστήμονες έχουν συνδέσει τη χρήση αποσμητικών και αντιόξινων φαρμάκων με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού^[154] ή με τη νόσο Alzheimer^[155], καθώς στις «ασθενείς» περιοχές του οργανισμού έχουν μετρηθεί αυξημένα επίπεδα του μετάλλου.

Το αργίλιο είναι γενικά αβλαβές στα φυτά. Σε όξινα όμως εδάφη ευνοείται η υδρόλυση των ενώσεων στα πετρώματά του, το ριζικό σύστημα των φυτών φθείρεται κι αυτό μπορεί να προκαλέσει καθυστέρηση στην ανάπτυξη ή καταστροφή του φυτού^[156].

2.5.1.2. Φαρμακολογική χρήση αργιλίου

Το αργίλιο είτε ως υδροξείδιο, $\text{Al}(\text{OH})_3$, είτε στην άνυδρη μορφή του, Al_2O_3 , χρησιμοποιείται ως αντιόξινο φάρμακο και εξουδετερώνει την περίσσεια οξέων του στομάχου. Βοηθάει έτσι στην ανακούφιση των συμπτωμάτων του έλκους, της καούρας ή της δυσπεψίας. Έχει ακόμη χρησιμοποιηθεί για να ελέγχει τα επίπεδα φωσφόρου στο αίμα ασθενών με νεφρική ανεπάρκεια. Το $\text{Al}(\text{OH})_3$ προστίθεται ως συμπλήρωμα σε κάποια εμβόλια (π.χ. στο εμβόλιο του Άνθρακα) διότι φαίνεται ότι ενισχύει τη δράση του οργανισμού στην παραγωγή αντισωμάτων^[157].

2.5.1.3. Προσδιορισμός αργιλίου

Εξαιτίας της ενδεχόμενης τοξικότητας του αργιλίου, είναι πολύ μεγάλης σημασίας ο προσδιορισμός του μετάλλου. Η μέθοδος αναφοράς, όταν το αργίλιο είναι το πρωτεύον συστατικό, π.χ. σε φαρμακευτικό σκεύασμα, είναι η ογκομέτρηση του μετάλλου με τη χρήση EDTA σε όξινο περιβάλλον^[130].

Για τις πολύ μικρές συγκεντρώσεις, ωστόσο, οι τεχνικές που προτείνονται, εκμεταλλεύονται την ιδιότητα του αργιλίου να σχηματίζει φθορίζουσες ενώσεις με μία πληθώρα αντιδραστηρίων, όπως οι υδροξυκινολόνες, οι υδροξυφλαβόνες κ.ά. Στην πιο απλή εκδοχή, η αντίδραση παραγωγοποίησης του δείγματος που περιέχει αργίλιο γίνεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και το φθορίζον προϊόν, κατόπιν, μετράται σε ένα φθορισμόμετρο^[158-160]. Σε πιο πολύπλοκα δείγματα, όμως, όταν και οι απαιτήσεις για ακρίβεια είναι μεγαλύτερες, το παραγωγοποιημένο δείγμα εισάγεται σε σύστημα HPLC με στήλη C₁₈, φαινυλίου, κ.λ.π., και η φθορίζουσα ένωση μετά το διαχωρισμό της από το υπόλοιπο μίγμα ανιχνεύεται με φθορισμομετρικό ανιχνευτή. Για την 8-υδροξυκινολόνη, που είναι ένα τυπικό αντιδραστήριο για τον προσδιορισμό του Al, η ακτινοβολία διέγερσης (λ_{ex}) είναι τα 370 nm και η ακτινοβολία εκπομπής (λ_{em}) τα 504 nm^[161,162].

Εκτός από τη φθορισμομετρία, το Al, προσδιορίζεται και με φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης με φούρνο γραφίτη (GF-AAS), ειδικά όταν πρόκειται για βιολογικά δείγματα. Φαίνεται όμως ότι η μέθοδος υστερεί σε ακρίβεια, εξαιτίας παρεμποδίσεων από το υπόστρωμα, ιδιαίτερα στην περίπτωση που μετράται πλάσμα αίματος το οποίο περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις από οργανικά και ανόργανα ενδογενή συστατικά και η συγκέντρωση του Al είναι κοντά στο όριο ανίχνευσης της μεθόδου^[163,164].

2.5.2. Χρώμιο και ενώσεις του

Είναι ένα αργυρόλευκο μέταλλο, με ελαφρά κυανίζουσα απόχρωση, σκληρό και δύστηκτο. Είναι το 21^ο πιο διαδεδομένο στοιχείο στο στερεό φλοιό της γης και απαντάται σε πολλά ορυκτά (π.χ. χρωμίτης (Fe(Mg)Cr₂O₄), κροκοϊτης (PbCrO₄))^[98]. Παρουσιάζει αντοχή στην οξείδωση από τον αέρα, σχηματίζοντας εξωτερικά ένα λεπτό προστατευτικό στρώμα που εμποδίζει την περαιτέρω διάβρωση (*παθητικοποίηση, passivation*), ενώ είναι ανθεκτικό και στην επίδραση ορισμένων χημικών αντιδραστηρίων, γι' αυτό χρησιμοποιείται για την προστατευτική επικάλυψη μεταλλικών αντικειμένων (π.χ. *επιχρωμίσωση του χάλυβα*). Προστιθέμενο μαζί με νικέλιο στο χάλυβα, αυξάνει τη σκληρότητά του και βελτιώνει την αντοχή του στη φθορά και τον αποχρωματισμό (ανοξειδωτοι χάλυβες)^[96,99].

Το χρώμιο εμφανίζεται στις ενώσεις του με διάφορες βαθμίδες οξείδωσης, από -1 έως +6 με πιο συνηθισμένες τις +3 και +6. Οι ενώσεις του έχουν διάφορα χρώματα, π.χ. οι ενώσεις του Cr(III) έχουν συνήθως κυανό χρώμα, ενώ του Cr(VI) ερυθρό. Οξείδια του Cr ως προσμίξεις σε μικρές ποσότητες στο κορούνδιο (Al₂O₃) δίνουν στο πέτρωμα τα χαρακτηριστικά χρώματα που έχουν οι ημιπολύτιμοι λίθοι ρουμπίνι και ζαφείρι.

Τα φυσιολογικά επίπεδα συγκεντρώσεων του χρωμίου, σε μη ρυπασμένα επιφανειακά ύδατα, κυμαίνονται στην περιοχή $0,1-6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ για το πόσιμο νερό και $0,3-0,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ για το θαλασσινό νερό, ενώ στον αέρα βρίσκεται σε συγκεντρώσεις $<0,1 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ [98].

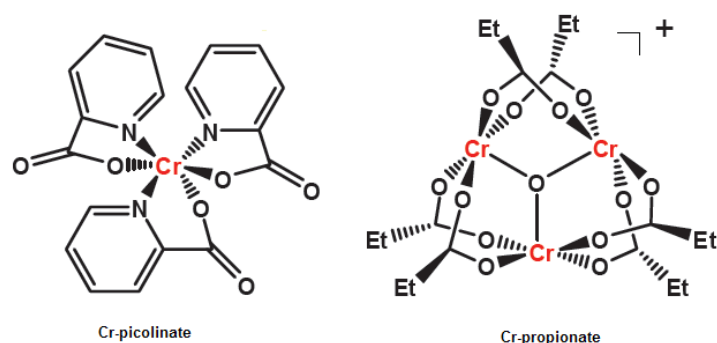
2.5.2.1. Τρισθενές χρώμιο Cr(III) - Το χρώμιο in vivo

Στην οξειδωτική βαθμίδα +3 το χρώμιο σχηματίζει τις πιο σταθερές ενώσεις. Στη φύση, σχεδόν όλο το χρώμιο βρίσκεται ως Cr(III). Πολλές από τις ενώσεις του χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία των χρωμάτων (π.χ. το Cr_2O_3 είναι πράσινο, το άνυδρο CrCl_3 είναι σκούρο πράσινο, ενώ το ένυδρο $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]\text{Cl}_3$ κυανό κ.λ.π.). Στο περιβάλλον θεωρείται «μη ευκίνητο», διότι τείνει να προσροφάται στα αιωρούμενα σωματίδια και στα ιζήματα, κι επομένως εμφανίζεται σχετικά αδρανές, με μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα και τοξικότητα για τους υδρόβιους οργανισμούς.

Από το 1985 έχει διαπιστωθεί ότι το Cr(III) είναι απαραίτητο ιχνοστοιχείο, αφού συμμετέχει στο ενεργό τμήμα του *παράγοντα ανοχής της γλυκόζης (glucose tolerance factor, GTF)*. Ο GTF είναι μια μεταλλοπρωτεΐνη που σχηματίζεται όταν το ολιγοπεπτιδίο χρωμοδουλίνη (chromodulin) ενώνεται με 4 ιόντα Cr^{3+} και θεωρείται ότι μαζί με την ινσουλίνη, ρυθμίζει την ποσότητα γλυκόζης στο αίμα. Σύμφωνα με ενδείξεις, το Cr(III) παίζει ρόλο και στον έλεγχο της χοληστερόλης, στη βιοσύνθεση των λιπιδίων, των αμινοξέων και των νουκλεϊνικών οξέων. Ο τρόπος δράσης του μετάλλου δεν είναι επακριβώς γνωστός. Μία υπόθεση είναι ότι σταθεροποιεί το μόριο της ινσουλίνης, είτε απευθείας με το σχηματισμό της εν λόγω μεταλλοπρωτεΐνης, είτε έμμεσα εμποδίζοντας τη δράση του ενζύμου ινσουλινάση. Σύμφωνα με άλλη άποψη, βοηθά στη μεταφορά της ινσουλίνης διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών. Γεγονός όμως είναι ότι παρουσία του Cr σε βιολογικά ενεργή μορφή, απαιτούνται χαμηλότερα επίπεδα ινσουλίνης για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού^[165,166]. Όταν ο ρόλος του χρωμίου στην ενεργοποίηση του GTF ολοκληρωθεί, δεν επαναπορροφάται, αλλά απεκκρίνεται με τα ούρα γι' αυτό και στα νεφρά ανιχνεύονται σχετικά μεγάλες ποσότητες του μετάλλου. Οι σύγχρονες δίαιτες που περιέχουν υψηλά ποσοστά επεξεργασμένων υδατανθράκων, οι καταστάσεις στρες και οι φλεγμονές, φαίνεται ότι ενισχύουν την απώλεια χρωμίου από τον οργανισμό. Για λόγους που δεν είναι ακόμη σαφείς, ο απορρόφηση του μετάλλου μειώνεται στα άτομα ηλικίας άνω των 50, ακόμη κι αν η δίαιτά τους είναι επαρκής, γεγονός που πιθανώς συνηγορεί στην εμφάνιση διαβήτη τύπου-II (διαβήτη ενηλίκων)^[166].

Χρώμιο Cr(III) περιέχουν, μεταξύ άλλων, τα προϊόντα ολικής άλεσης, ο καφές, κάποια λαχανικά και η μαγιά της μπύρας. Τις μεγαλύτερες ποσότητες ωστόσο, ο άνθρωπος τις λαμβάνει από τα δοχεία ανοξειδωτού χάλυβα που χρησιμοποιεί στις οικιακές του δραστηριότητες. Καθημερινά, ενδείκνυται η πρόσληψη 30-50 μg Cr(III) ή και λίγο παραπάνω (μέγιστο 200 μg), χωρίς να αναφέρονται προβλήματα υγείας^[167]. Η απορρόφηση του μετάλλου από τον οργανισμό είναι γενικά πολύ μικρή (1-5%), γι' αυτό όταν παραστεί ανάγκη, χορηγούνται διατροφικά συμπληρώματα που περιέχουν χρώμιο

(Σχ.2.3) που δεν υποκαθιστούν την ινσουλίνη, δρουν όμως συμπληρωματικά στον έλεγχο του σακχάρου στους διαβητικούς.

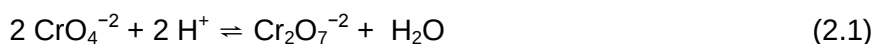


Σχήμα 2.3: Συμπληρώματα χρωμίου. Πιο διαδεδομένο είναι το $\text{Cr}(\text{pic})_3$ που είναι αξιοσημείωτα σταθερό και μπορεί να παραμείνει για ώρες μέχρι να αρχίσει να μεταβολίζεται.

Παρ' όλα αυτά, η χρήση των παραπάνω συμπληρωμάτων είναι αμφιλεγόμενη. Αυτό σχετίζεται με το γεγονός ότι το $\text{Cr}(\text{III})$ που περιέχουν, ενδέχεται να μετατρέπεται στον οργανισμό στα πολύ επικίνδυνα $\text{Cr}(\text{V})$ και $\text{Cr}(\text{VI})$ (βλ. § 2.5.2.2.), παρουσία ισχυρών οξειδωτικών ουσιών, όπως το H_2O_2 και ClO^- , που τα κύτταρα παράγουν μέσα από φυσικές διαδικασίες^[168].

2.5.2.2. Εξασθενές χρώμιο $\text{Cr}(\text{VI})$ – Επιπτώσεις στην υγεία και το περιβάλλον

Στην οξειδωτική βαθμίδα +6, το χρώμιο σχηματίζει ενώσεις που δεν είναι πολύ σταθερές, είναι όμως ισχυρά οξειδωτικές. Απαντάται κυρίως με τη μορφή χρωμικών (CrO_4^{2-}) και διχρωμικών ιόντων ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), μεταξύ των οποίων υπάρχει ισορροπία, αναλόγως του pH στο οποίο βρίσκονται (Εξ.2.1), και προέρχεται σχεδόν αποκλειστικά από ανθρώπινες δραστηριότητες.

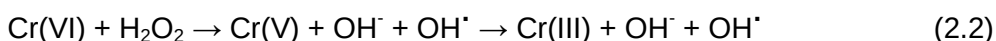


(όπου σε πιο όξινο pH ευνοείται η παρουσία διχρωμικών)

Τα άλατα του χρωμικού οξέος έχουν κίτρινο χρώμα, ενώ του διχρωμικού πορτοκαλέρυθρο, και χρησιμοποιούνταν παλαιότερα κατ' εξοχήν ως βαφές (π.χ. το χαρακτηριστικό *κίτρινο του χρωμίου*, $\text{PbCrO}_4 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$). Σήμερα, οι ενώσεις του $\text{Cr}(\text{VI})$ χρησιμοποιούνται υπό προϋποθέσεις κυρίως στη βιομηχανία, για την προστατευτική επικάλυψη μεταλλικών επιφανειών, στη βυρσοδεψία, αλλά και ως συντηρητικά του ξύλου. Γίνονται όμως πολλές σοβαρές προσπάθειες για τον περιορισμό ή την αντικατάστασή τους από άλλες.

Οι λόγοι της κινητοποίησης αυτής είναι πλήθος επιδημιολογικών μελετών που αποδεικνύουν ότι το Cr(VI) είναι ισχυρά τοξικό. Αντίθετα με το Cr(III), το Cr(VI) θεωρείται «ευκίνητο» στο υδατικό περιβάλλον, παραμένει στη διαλυτή φάση και είναι βιοδιαθέσιμο. Εισέρχεται στον οργανισμό με την εισπνοή, από την κατάποση μολυσμένου νερού και τροφίμων, αλλά και με τη δερματική έκθεση. Μπορεί να προκαλέσει από απλό κνησμό και φτέρνισμα έως έλκη, αιμορραγίες, καταστροφή νεφρών και ήπατος ακόμη και θάνατο. Οι τιμές τοξικότητάς LC_{50} σε διάφορους μικροοργανισμούς κυμαίνονται από 0,032 έως 6,4 $mg \cdot L^{-1}$ (ppm) (LC_{50} : *Lethal Concentration 50*. Είναι η συγκέντρωση που θανατώνει το 50% του πληθυσμού του εξεταζόμενου είδους). Μακροχρόνια έκθεση σε ενώσεις Cr(VI) μπορεί να προκαλέσει διαφόρων ειδών καρκίνους, καταστροφή του DNA και μεταλλάξεις^[169].

Ο μηχανισμός καρκινογένεσης είναι σχετικά απλός. Το Cr(VI), με τη μορφή των ιόντων του, εμφανίζεται όμοιο στη δομή και το φορτίο με τα φωσφορικά και τα θειικά ιόντα και γι' αυτό εισέρχεται στο κύτταρο μέσω της κυτταρικής μεμβράνης από τις διόδους που αυτά τα ιόντα χρησιμοποιούν. Μέσα στο κύτταρο, το Cr(VI) ανάγεται από το πλήθος των αναγωγικών ουσιών και ενζύμων που αποτελούν φυσικά συστατικά του κυτταρικού περιβάλλοντος (π.χ. γλουταθειόνη, H_2O_2 κ.ά) σε χρώμιο μικρότερης βαθμίδας οξειδωσης, πρώτα στο μετασταθές Cr(V) και κατόπιν σε Cr(III). Κατά την πορεία αναγωγής του όμως, τόσο το σχηματιζόμενο Cr(III), όσο και τα παραγόμενα παραπροϊόντα, όπως ρίζες $OH^\cdot$ (βλ.Εξ.2.2), μπορεί να προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες στο DNA, θραύση των κλώνων του, σχηματισμό ενώσεων προσθήκης Cr(III)-DNA, διακλωνικές συνδέσεις, συνδέσεις πρωτεϊνών-DNA κ.ά.^[170-172].



Το πολύ ευεργετικό, κατά τ' άλλα, ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) παραδόξως φαίνεται ότι ενισχύει την τοξική δράση του Cr(VI) ευνοώντας την αναγωγή του σε Cr(III). Παρουσία ασκορβικού οξέος, το Cr(VI) προκαλεί 15 φορές περισσότερες θραύσεις χρωμοσωμάτων και 10 φορές περισσότερες μεταλλάξεις από ό,τι απουσία της βιταμίνης^[173,174].

Τα τελευταία χρόνια, η Ευρωπαϊκή Ένωση, αναγνωρίζοντας την επιβλαβή δράση του Cr(VI) στο περιβάλλον και τους οργανισμούς, εξέδωσε την *Οδηγία Περιορισμού Επικίνδυνων Ουσιών* (2002/95/EC, της 27^{ης} Ιανουαρίου 2003), που θέτει περιορισμούς στη βιομηχανική χρήση για ηλεκτρικό και ηλεκτρονικό εξοπλισμό, 6 εξαιρετικά επικίνδυνων χημικών ουσιών, μεταξύ των οποίων είναι και οι ενώσεις του Cr(VI)^[175]. Η οδηγία εφαρμόζεται σε όλα τα κράτη-μέλη από τον Ιούλιο του 2006. Στο πόσιμο νερό, και με βάση και τις κατευθύνσεις του Π.Ο.Υ., το ανώτατο επιτρεπτό όριο ολικού χρωμίου έχει οριστεί στα 50 $\mu g \cdot L^{-1}$ (Οδηγία 98/83/EC, της 3^{ης} Νοεμβρίου 1998)^[175,176].

2.5.2.3. Προσδιορισμός Cr(III)-Cr(VI)

Ο προσδιορισμός του χρωμίου, ιδιαίτερα στο επίπεδο της ιχνοανάλυσης που ενδιαφέρει τους φορείς υγείας και τον κρατικό έλεγχο, είναι δύσκολος. Βιολογικά δείγματα,

όπως ο ορός αίματος και τα ούρα, έχουν συγκεντρώσεις χρωμίου που είναι πολλές φορές μικρότερες από $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Επιπλέον, αυτό που συχνά επιβάλλεται, είναι ο προσδιορισμός όχι του ολικού χρωμίου, αλλά των χημικών ειδών του (*speciation analysis*), εξαιτίας της διαφορετικής βιοδιαθεσιμότητας και τοξικότητάς τους.

Κατά τον προσδιορισμό του χρωμίου, δίνεται προσοχή ήδη από το στάδιο της δειγματοληψίας, όπου αποφεύγεται η χρήση εργαλείων από ανοξείδωτο χάλυβα (λαβίδες, μαχαίρια, βελόνες, ομογενοποιητές κ.ά.), καθώς περιέχουν σημαντικές ποσότητες χρωμίου και μπορεί να επιμολύνουν το δείγμα δίνοντας εσφαλμένα αποτελέσματα. Άντ' αυτού προτιμώνται υλικά από πολυμερή, χαλαζία ή τιτάνιο. Αναλόγως των απαιτήσεων της μεθόδου, συχνά ακολουθείται μία διαδικασία προσυγκέντρωσης του δείγματος που αυξάνει την ευαισθησία, επιτρέποντας την ανίχνευση μικροποσοτήτων του αναλύτη. Επιπλέον, απαιτείται προσοχή στη χρήση των αντιδραστηρίων προκατεργασίας διότι μπορεί να φέρουν όλα τα ιόντα στην ίδια οξειδωτική κατάσταση και να μην είναι δυνατός ο διαχωρισμός των χημικών ειδών του χρωμίου, εκτός αν αυτό είναι το επιθυμητό^[98]. Η σύζευξη με υδρο/αέριοχρωματογραφία ή εκχύλιση στερεάς φάσης (*solid phase extraction*, SPE) καθιστά το διαχωρισμό πιο γρήγορο και μειώνει τη διαδικασία προκατεργασίας του δείγματος.

Από τις τεχνικές προσδιορισμού, εκείνη που αποτελεί μέθοδο επιλογής, ειδικά στην ιχνοανάλυση είναι η ατομική απορρόφηση με ηλεκτροθερμική ατομοποίηση (ET-AAS) σε φούρνο γραφίτη. Η μέτρηση γίνεται στα 357,9 nm και κατά κανόνα επιβάλλεται η διόρθωση υποβάθρου Zeeman για την αντιμετώπιση των παρεμποδίσεων από το υπόστρωμα. Με την ET-AAS μπορούν να επιτευχθούν θερμοκρασίες μέχρι 1200°C , όπου όλη η οργανική ύλη καταστρέφεται, ή χρησιμοποιούνται χημικοί τροποποιητές όπως Pd ή Mg, συνήθως όμως εις βάρος της ανιχνευσιμότητας ($\text{LOD} \sim 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Η φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης με φλόγα (FAAS) είναι πιο οικονομική, όμως η φλόγα αέρα-ακετυλενίου δημιουργεί οξείδια με τα πιθανά ιόντα σιδήρου και νικελίου του δείγματος μειώνοντας την ευαισθησία^[98,177]. Οι παραπάνω τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως για τον προσδιορισμό Cr(III)-Cr(VI) σε πόσιμο νερό και απόβλητα^[178-181].

Πολύ διαδεδομένη είναι και η χρήση της τεχνικής ICP-MS συζευγμένη κυρίως με Ιοντική Χρωματογραφία και χρήση στήλης ανιονανταλλαγής ή συνδυασμού ανιον- και κατιον-ανταλλαγής. Το όριο ανίχνευσης φτάνει τα $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ και η ανίχνευση των ιόντων γίνεται στα m/z 52 και m/z 53^[182-184]. Σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται χηλικά αντιδραστήρια, πριν ή μετά τη στήλη (*pre- ή post-column derivatization*), με τα οποία τα ιόντα χρωμίου σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα που διευκολύνουν τον προσδιορισμό τους. Συνηθέστερη είναι η χρήση EDTA^[185-187], έχει αναφερθεί ωστόσο και η χρήση του 1,2-διαμινοκυκλοεξανο-N,N',N'-τετραοξεικού οξέος (DCTA)^[188], του 2,6-πυριδινό δικαρβονικού οξέος^[189], του όξινου φθαλικού καλίου (KHP)^[190], κ.ά. Μειονέκτημα είναι το γεγονός ότι τα εν λόγω αντιδραστήρια σχηματίζουν σύμπλοκα και με άλλα ιόντα που ενδεχομένως υπάρχουν στο δείγμα, π.χ. Ca, Mg, Fe, Cu, παρεμποδίζοντας τον προσδιορισμό.

Σπανιότερα, γίνεται αναφορά για ταυτόχρονο προσδιορισμό Cr(III)-Cr(VI) με φασματοφωτομετρία UV-Vis μετά από παραγωγοποίηση, αφού πρώτα δεσμεύεται το ένα ιόν με κάποιο αντιδραστήριο, προσδιορίζεται κατόπιν το ολικό χρώμιο και το άλλον ιόν προσδιορίζεται από τη διαφορά των δύο αποτελεσμάτων. Αναφέρεται η χρήση του 1,5-διφαινυλοκαρβαζιδίου με το οποίο το Cr(VI) σχηματίζει ερυθροϊώδες σύμπλοκο που απορροφά στα 540 nm^[98,191]. Ηλεκτροχημικές τεχνικές, πολαρογραφία, αμπερομετρία, βολταμμετρία, μπορούν να εφαρμοστούν για τον προσδιορισμό Cr(III)-Cr(VI) κυρίως σε νερά, αλλά με όρια ανίχνευσης αρκετά υψηλότερα σε σχέση με τις υπόλοιπες τεχνικές (~30 μg·L⁻¹)^[98, 192]. Τέλος, η χημειοφωταύγεια προσφέρεται για τον άμεσο προσδιορισμό του Cr(III), διότι στηρίζεται στην οξείδωση της λουμινόλης από το H₂O₂ που καταλύεται από μικρές ποσότητες τρισθενούς χρωμίου, ενώ το εξασθενές χρώμιο δεν αντιδρά. Η ποσότητα Cr(VI) υπολογίζεται έμμεσα από τη διαφορά ολικού Cr-Cr(III)^[98,193].

2.5.3. Ψευδάργυρος και ενώσεις του

Είναι τεφρόλευκο μέταλλο, σκληρό και εύθραυστο. Είναι το 24^ο πιο διαδεδομένο στοιχείο στο στερεό φλοιό της γης και απαντάται σε διάφορα ορυκτά (σφαλερίτης, ZnS, σμιθωνίτης, ZnCO₃, κ.ά) από τα οποία λαμβάνεται με φρύξη ή πύρωση. Αντιδρά πολύ γρήγορα με το CO₂ της ατμόσφαιρας σχηματίζοντας εξωτερικά ένα προστατευτικό στρώμα που εμποδίζει την περαιτέρω αντίδραση με το νερό ή τον αέρα (παθητικοποίηση)^[96,110]. Ο *γαλβανισμός* (*galvanization*), η επικάλυψη δηλαδή των μετάλλων όπως ο σίδηρος, για να προστατευθούν από τη διάβρωση, είναι από τις πιο γνωστές χρήσεις του ψευδαργύρου. Γνωστή είναι και η χρήση του ως ηλεκτρόδιο ανόδου στα γαλβανικά στοιχεία, τις κοινές μπαταρίες^[1].

Στις ενώσεις του απαντάται με αριθμό οξείδωσης +2. Ενώσεις του Zn⁺¹ δεν υπάρχουν σε κανονικές συνθήκες, παρ' όλο που το ZnH και τα αλογονούχα ZnX είναι γνωστά από τα φάσματά τους. Μερικές από τις πιο γνωστές ενώσεις είναι το ZnO που χρησιμοποιείται ως καταλύτης, ο ZnCl₂ στα αποσμητικά και ως συντηρητικό του ξύλου, ο ZnS στη χρωματοποιία, τα ZnCO₃ και Zinc gluconate ως διαιτητικά συμπληρώματα, το Zinc pyrithione στα φαρμακευτικά σαμπουάν κ.ά.

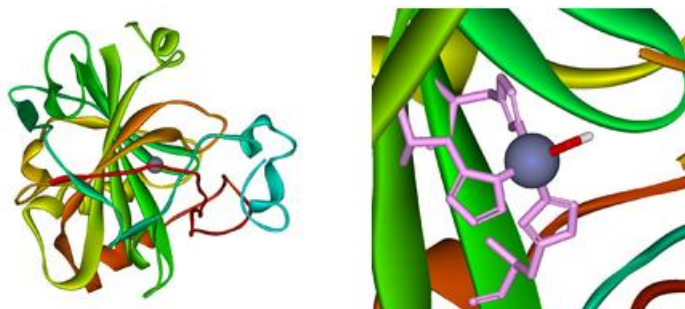
Τα κράματα του ψευδαργύρου παρουσιάζουν μεγάλο βιομηχανικό ενδιαφέρον. Το γνωστότερο από αυτά, που χρησιμοποιείται, σύμφωνα με ιστορικές αναφορές, ήδη από το 10^ο αιώνα, είναι το κράμα με χαλκό, ο ορείχαλκος. Ο ψευδάργυρος ανήκει στα ανακυκλώσιμα μέταλλα αλλά μόνο το 30% του μετάλλου που χρησιμοποιείται παγκοσμίως προέρχεται από αυτήν την πηγή, ενώ το υπόλοιπο 70% προέρχεται από εξορύξεις^[194].

2.5.3.1. Βιολογικός ρόλος ψευδαργύρου^[109]

Ο ψευδάργυρος συγκαταλέγεται στα μέταλλα που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία φυτών και ζώων.

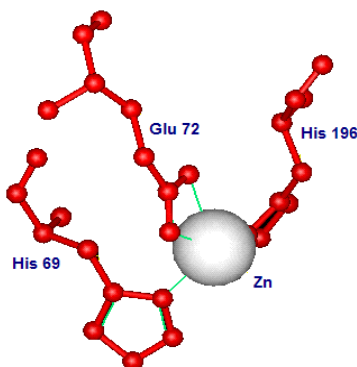
Είναι περίπου 100 τα ένζυμα που έχουν ψευδάργυρο (άλλες πηγές υποστηρίζουν ότι είναι πάνω από 300)^[194], είναι δομικό ιόν σε *παράγοντες μεταγραφής του DNA*

(*transcription factors*), αποθηκεύεται και μεταφέρεται με τις μεταλλοθειονίνες. Τυπικά είναι το 2^ο σε αφθονία στοιχείο μετάπτωσης στον οργανισμό, μετά το σίδηρο^[195]. Ο ψευδάργυρος καταλύει την υδροξυλίωση των πρωτεϊνών, αλλά επίσης βοηθά τις πρωτεΐνες να αποκτήσουν την κατάλληλη δομή, ώστε να πραγματοποιηθούν οι βιολογικές αντιδράσεις. Δύο είναι τα πιο χαρακτηριστικά ένζυμα στα οποία φαίνεται ο ρόλος του Zn, η ανθρακική ανυδράση και η καρβοξυπεπτιδάση A. Η ανθρακική ανυδράση (Σχ.2.4) βρίσκεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια και καταλύει τη μετατροπή του CO₂ σε ανθρακικά, και αντίστροφα, κατά την αναπνοή^[96]. Απουσία Zn, η παραπάνω μετατροπή θα γινόταν 10⁵ φορές πιο αργά στο pH 7 του αίματος, ή θα απαιτούνταν pH 10 για να πραγματοποιηθεί γρήγορα^[196,197].



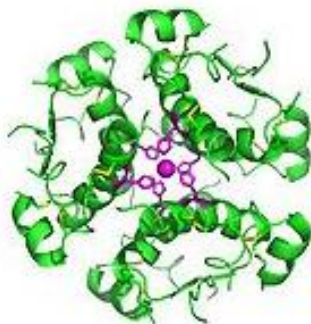
Σχήμα 2.4: Διαγραμματική απεικόνιση της ανθρακικής ανυδράσης II. Δεξιά φαίνεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου, όπου το άτομο Zn απεικονίζεται ως σφαίρα, συμπλέκεται με τα ιμιδαζόλια των τριών ιστιδινών του ενζύμου, ενώ την τέταρτη θέση καταλαμβάνει ένα μόριο νερού που αντιδρά με το CO₂.

Η καρβοξυπεπτιδάση A (Σχ.2.5), ένα ένζυμο της πέψης, βρίσκεται κυρίως στο πάγκρεας και υδρολύει τον πεπτιδικό δεσμό του καρβόξυ-τελικού άκρου των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Παρουσία Zn, το ένζυμο μεταβάλλει τη δομή του, καθίσταται πιο εύκαμπτο κι επιπλέον αυξάνει την ηλεκτρονική πυκνότητα στο κέντρο του ώστε να είναι πιο αποτελεσματικό στην κατάλυση.



Σχήμα 2.5: Ενεργό κέντρο της καρβοξυπεπτιδάσης A. Ο Zn σχηματίζει τετραεδρικό σύμπλοκο με τις πλευρικές αλυσίδες δύο ιστιδινών, ενός γλουταμινικού οξέος και ενός μορίου H₂O.

Πολύ σπουδαίος είναι και ο ρόλος του Zn στη σταθεροποίηση του μορίου της ινσουλίνης. Η ορμόνη αποθηκεύεται στο σώμα ως εξαμερές που είναι η ανενεργός, αλλά πολύ σταθερή μορφή της ορμόνης και διασπάται στα ενεργά μονομερή κατά τις απαιτήσεις του οργανισμού^[198]. Κάθε έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας συνοδεύεται από ελάττωση της συγκέντρωσης του Zn σε αυτό.



Σχήμα 2.6: Διάγραμμα εξαμερούς της ινσουλίνης. Τα μονομερή συγκρατούνται από ένα άτομο Zn στο κέντρο του μορίου, που συνδέεται με αυτά με τις πλευρικές αλυσίδες ιστιδινών.

Στο ανθρώπινο σώμα υπάρχουν περίπου 2-4 g του στοιχείου. Η μεγαλύτερη ποσότητα βρίσκεται στον εγκέφαλο, στους μύες, στα οστά, στο συκώτι, στα μάτια-όπου θεωρείται ο «συνδετικός κρίκος» που συγκρατεί στη θέση του τον αμφιβληστροειδή χιτώνα-, αλλά και στον προστάτη, όπου ανιχνεύεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο σπέρμα ως σημαντικός παράγοντας στην αναπαραγωγική λειτουργία.

Ο ανθρώπινος οργανισμός χρειάζεται κατά μέσο όρο 10-20 mg ψευδαργύρου την ημέρα. Τροφές πλούσιες είναι το κόκκινο κρέας, οι ξηροί καρποί, το σάρι, το σουσάμι και το σινάπι, παρότι γενικά η περιεκτικότητα των φυτών εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση του στοιχείου στο έδαφος. Ανεπάρκεια ή κακή απορρόφηση του στοιχείου από τον οργανισμό, συνεπάγεται καθυστέρηση στη σωματική και αναπαραγωγική ωρίμανση, αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα, προβλήματα όρασης και δερματοπάθειες, εμφάνιση μολύνσεων και χρόνιων παθήσεων που συνδέονται με την εμφάνιση διαβήτη. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά η ανάπτυξη του εμβρύου. Η ανεπάρκεια σε Zn μαστίζει περίπου 2 δις ανθρώπους στον αναπτυσσόμενο κόσμο και λέγεται ότι συνεισφέρει στο θάνατο περίπου 800.000 παιδιών κατ' έτος^[199-202].

Αντίθετα, υπερβολικές ποσότητες ψευδαργύρου στον οργανισμό, παρεμποδίζουν την απορρόφηση άλλων απαραίτητων μετάλλων, όπως του χαλκού και του σιδήρου. Εάν μεταλλικός Zn βρεθεί στο στομάχι, π.χ. από κατάποση μεταλλικού υπολείμματος σε τρόφιμο ή κέρματος, μετατρέπεται, παρουσία HCl, στο πολύ διαβρωτικό $ZnCl_2$ που μπορεί να προκαλέσει δηλητηριάσεις ή ακόμη και θάνατο^[203,204]. Ψευδάργυρος σε προϊόντα προορισμένα για ενδορινική χρήση, ενδέχεται να καταστρέψει τα νευρικά κύτταρα προκαλώντας ανοσμία, μία κατάσταση εξαιρετικά επικίνδυνη. Εξίσου επικίνδυνη μπορεί να είναι η χρήση γαλβανισμένων δοχείων για τρόφιμα.

2.5.3.2. Προσδιορισμός ψευδαργύρου

Ο ψευδάργυρος είναι ένα μέταλλο πολύ κοινό στο περιβάλλον, στο νερό ή ως πρόσμιξη των χημικών αντιδραστηρίων. Έτσι, ο προσδιορισμός του, ειδικά στα βιολογικά δείγματα που οι συνήθεις περιεκτικότητες του στοιχείου είναι $1\text{-}10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, καθίσταται δύσκολος, αφού μία μικρή επιμόλυνση μπορεί να εισάγει μεγάλο σφάλμα στα αποτελέσματα.

Στα βιολογικά δείγματα, ο ψευδάργυρος βρίσκεται σε σύμπλοκα με πρωτεΐνες από τις οποίες πρέπει να αποδεσμευτεί με την προσθήκη οξέων ή με διαδικασίες υγρής/ξηρής τεφροποίησης, όπου όμως μπορεί να συμβεί μερική απώλεια του στοιχείου. Διαχωρίζεται από άλλα μέταλλα με καταβύθιση ως ZnS , ZnNH_4PO_4 , $\text{Zn}(\text{C}_9\text{H}_6\text{ON})_2$ ή εκχυλίζεται με διθειζόνη με ρύθμιση του pH ώστε να αποφεύγεται η συγκαταβύθιση άλλων στοιχείων, π.χ. Co , Ni , Fe , Cu , Pb , του δείγματος. Η μέτρηση γίνεται με τη βοήθεια ηλεκτροχημικών τεχνικών (ανοδική βολταμμετρία, πολαρογραφία κ.ά.)^[98,205,206].

Η συμπλοκομετρική ογκομέτρηση είναι ένας τρόπος προσδιορισμού του ψευδαργύρου σε νερά, ορυκτά, κράματα και τηγμένα μίγματα μετάλλων και γίνεται με $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ή EDTA, όπου το τελικό σημείο ανιχνεύεται, είτε παρουσία δείκτη, είτε με τη βοήθεια ποτενσιομετρικού/αμπερομετρικού ανιχνευτή. Αναλόγως των μετάλλων που συνυπάρχουν, προστίθενται καλυπτικά αντιδραστήρια ή επιλέγεται το pH εργασίας και επομένως το είδος του δείκτη που θα χρησιμοποιηθεί^[98].

Μέθοδος αναφοράς, ωστόσο, είναι η φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης (AAS), με τη χρήση φλόγας αέρα-ακετυλενίου ή με ηλεκτροθερμική ατομοποίηση και μετράται η απορρόφηση στα $213,9\text{ nm}$. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου, συγκαταλέγεται η ακρίβεια, η ταχύτητα, το πολύ χαμηλό όριο ανίχνευσης ($\sim 0,005\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) και το γεγονός ότι στο επιλεγμένο μήκος κύματος παρατηρούνται μικρές φασματικές παρεμποδίσεις. Η AAS έχει χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό του Zn , συνήθως μαζί με άλλα μέταλλα, σε τρόφιμα, βιολογικά δείγματα, φαρμακευτικά σκευάσματα^[207-210] κ.ά. Η τεχνική του ICP-MS μόνη ή σε συνδυασμό με AAS, μπορεί να μειώσει κι άλλο το όριο ανίχνευσης της μεθόδου^[211-214].

Η φασματοφωτομετρία UV-Vis χρησιμοποιείται επίσης συχνά στον προσδιορισμό Zn . Από τα αντιδραστήρια που έχουν προταθεί, η διθειζόνη σχηματίζει με τον ψευδάργυρο σε αλκαλικό περιβάλλον ερυθρό σύμπλοκο σε αναλογία 1:2 που μετράται στα $520\text{-}540\text{ nm}$. Έχουν ακόμη χρησιμοποιηθεί η 8-υδροξυκινολόνη, η 1-(2-πυριδυλ-αζο)-2-ναφθόλη (PAN), η 4-(2-πυριδυλ-αζο)ρεσορκινόλη (PAR), φορμαζάνες κ.ά. Κάποια από αυτά τα αντιδραστήρια, ακινητοποιημένα πάνω σε λεπτές μεμβράνες, έχουν μετατραπεί σε οπτικούς αισθητήρες, εξειδικευμένους στον προσδιορισμό ψευδαργύρου^[215-217]. Το σύμπλοκο $\text{Zn}/8\text{-υδροξυκινολόνης}$, σε pH 8, μπορεί να μετρηθεί και φθορισμομετρικά ($\lambda_{\text{ex}}:375\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}:517\text{ nm}$) για τον προσδιορισμό σε βιολογικά δείγματα, όπως αίμα, ορός, ούρα. Είναι μία γρήγορη, απλή διαδικασία, όμως η σταθερότητα του σήματος φθορισμού ελαττώνεται μετά από περίπου 1 ώρα^[98]. Ο συνδυασμός Ιοντικής Χρωματογραφίας με μία από τις παραπάνω τεχνικές έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό ψευδαργύρου σε

μίγματα μεγάλου αριθμού μετάλλων και σε πολύπλοκα δείγματα (π.χ. χώμα) με την προσθήκη αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης (post-column) και όριο ανίχνευσης της τάξης των ppb^[218-225].

Έχουν αναφερθεί κι άλλες τεχνικές για τον προσδιορισμό του ψευδαργύρου, όπως, για παράδειγμα, η μέτρηση με την τεχνική της ενεργοποίησης νετρονίων (Neutron Activation Analysis)^[226] ή με τη χρήση ακτίνων-Χ^[227]. Κάποιες είναι μη καταστροφικές, άλλες μπορούν να εφαρμοστούν σε ελάχιστη ποσότητα δείγματος και να δώσουν αποτελέσματα εξαιρετικής ακρίβειας, όμως ο εξεζητημένος εξοπλισμός δεν τις έχει ακόμη καταστήσει προσιτές.

2.6. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας είναι καταρχήν η συστηματική μελέτη της επίδρασης της ατομικής μάζας βασικών μετάλλων, όπως είναι τα αλκάλια και οι αλκαλικές γαίες, στην απόκριση του ανιχνευτή ELSD. Εξετάζεται επιπλέον ο τρόπος που επηρεάζεται η απόκριση συναρτήσει του «χημικού περιβάλλοντος» των ιόντων μέσω της μεταβολής της σύστασης της κινητής φάσης.

Στη συνέχεια, αναπτύσσονται μέθοδοι προσδιορισμού με HPLC-ELSD για μερικά από τα βασικότερα κατιόντα που απαντώνται στην καθημερινότητα. Οι μέθοδοι αυτοί εφαρμόζονται κατόπιν, σε φαρμακευτικά σκευάσματα, βιολογικά δείγματα και νερά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

3.1. Σύστημα Υγροχρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης - HPLC

Το σύστημα HPLC που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας αποτελείται από τα παρακάτω μέρη:

1) Αντλία υψηλής πίεσης παροχής διαλυτών SHIMADZU, μοντέλο LC-10AD VP (Duisburg, Germany).

2) Σύστημα εισαγωγής δείγματος αποτελούμενο από χειροκίνητη βαλβίδα 2 θέσεων Rheodyne 7725i με βρόχο (loop) 20 μL , (Rohnert Park, CA, USA).

3) Αναλυτική στήλη διαχωρισμού C18 Spherisorb[®] 5 μm ODS-2 της Waters διαστάσεων 250 x 4,6 mm.

4) Αναλυτική στήλη κατιονανταλλαγής CS14 IonPac[®] διαστάσεων 250 x 4 mm της Dionex (Sunnyvale, CA, USA).

5) Μεταλλικός σωλήνας σύνδεσης, διαμέτρου 1/16 inch, για εκτέλεση πειραμάτων με την τεχνική της εισαγωγής δείγματος σε ροή (Flow Injection, FI).

6) Εξατμιστικός Ανιχνευτής Σκέδασης Ακτινοβολίας (Evaporative Light Scattering Detector) της S.E.D.E.R.E., μοντέλο SEDEX 75 (Cedex, France).

7) Φιάλη αερίου αζώτου N_2 , βιομηχανικής καθαρότητας.

8) Σύστημα καταγραφής/επεξεργασίας δεδομένων συνδεδεμένο με H/Y και πρόγραμμα επεξεργασίας δεδομένων Shimadzu Class-VP 4.

Αναλυτικά τα μέρη της οργανολογίας έχουν ως εξής:

3.1.1. Αντλία υψηλής πίεσης παροχής διαλυτών

Η αντλία της SHIMADZU που χρησιμοποιήθηκε, διαθέτει δύο πιστόνια συνδεδεμένα παράλληλα που κινούνται παλινδρομικά (reciprocating pump), αντλώντας κάθε φορά από τα δοχεία που περιέχουν την κινητή φάση, όγκο ίσο με 10 μL .

Η συγκεκριμένη αντλία έχει δυνατότητα λειτουργίας, είτε ως αντλία σταθερής ροής, είτε ως αντλία σταθερής πίεσης, με μέγιστη δυνατή αναπτυσσόμενη πίεση τα 39,2 MPa. Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης (flow rate) μπορεί να κυμαίνεται από 0,001 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ως 9,999 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, ενώ υπάρχει και δυνατότητα για λειτουργία σε συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης με χρήση έως και τεσσάρων διαλυτών σε αναλογίες από 0,0 ως 100,0%.

Η αποδεκτή περιοχή pH για ομαλή λειτουργία της αντλίας είναι 1-13, η οποία λόγω του μεγάλου εύρους της, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ένα πλήθος αναλυτικών εφαρμογών.

3.1.2. Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Η βαλβίδα της Rheodyne, είναι μια βαλβίδα δύο θέσεων, «load» και «inject». Στη θέση «load» ο βρόχος, που είναι αποκλεισμένος από την κινητή φάση, δέχεται το δείγμα το οποίο εισάγεται με μικροσύριγγα και η επιπλέον ποσότητα οδηγείται στα απόβλητα. Κατόπιν η βαλβίδα γυρίζει στη θέση «inject» και το δείγμα παρασύρεται από τη ροή της κινητής φάσης κατευθυνόμενο προς την αναλυτική στήλη.

3.1.3. Αναλυτικές στήλες

Η στήλη C18 της Spherisorb® ODS-2 έχει ως υλικό πλήρωσης πηκτή διοξειδίου του πυριτίου τροποποιημένη με οκταδεκυλοομάδες. Οι διαστάσεις της είναι 250 x 4,6 mm και αποτελείται από σφαιρικά σωματίδια με μέση διάμετρο 5 μm και μέγεθος πόρων 80 Å. Η περιοχή pH της κινητής φάσης, για ασφαλή και βέλτιστη λειτουργία της στήλης, είναι 2 ως 8. Η ενεργός επιφάνεια των σφαιριδίων, πάνω στην οποία λαμβάνουν χώρα τα φυσικοχημικά φαινόμενα διαχωρισμού του μίγματος, είναι 220 m²·g⁻¹.

Η στήλη CS14 Ion Pac® είναι μία μέτρια υδρόφιλη, κατιονιανταλλακτική στήλη. Το υλικό πλήρωσής της είναι συμπολυμερές από αιθυλοβινυλοβενζόλιο και 55% διβινυλοβενζόλιο, στο οποίο είναι προσδεσμένες καρβοξυλοομάδες (–COOH). Έχει διαστάσεις 250 mm x 4 mm και ολική χωρητικότητα 1300 μEq. Η μέση διάμετρος των σωματιδίων της είναι 8,0 μm και η μέγιστη πίεση στην οποία λειτουργεί είναι 27 MPa. Είναι απολύτως συμβατή με την εισαγωγή όξινων δειγμάτων και διαλυτών χωρίς να απαιτείται προηγουμένως ρύθμιση του pH και χωρίς μείωση στην απόδοσή της^[228].

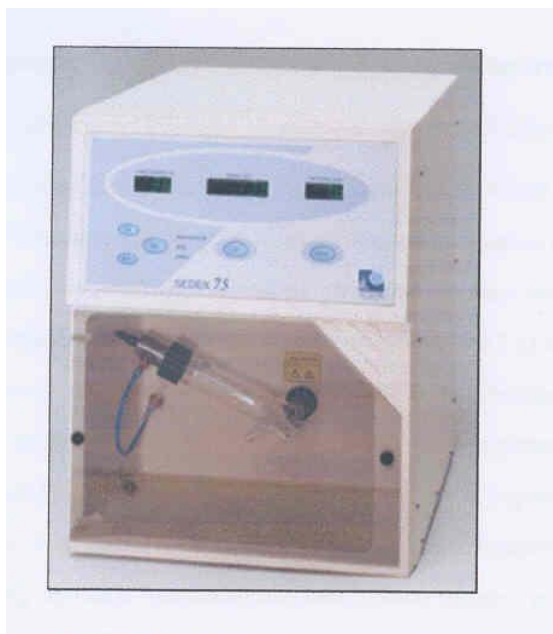
3.1.4. Σύστημα καταγραφής/επεξεργασίας δεδομένων

Είναι συνδεδεμένο με τον ανιχνευτή και ένα H/Y και καταγράφει τις χρωματογραφικές κορυφές των εκλουόμενων συστατικών κατά τη διάρκεια λήψης του χρωματογραφήματος. Το λογισμικό Class-VP 4 της SHIMADZU δίνει τη δυνατότητα μέτρησης, μεταξύ πολλών άλλων, του χρόνου έκλουσης t_R μιας ουσίας, του εμβαδού (*peak area*), του ύψους (*peak height*) ή του εύρους (*width*) της κορυφής, αλλά και επεξεργασίας των δεδομένων, για τον υπολογισμό του παράγοντα ασυμμετρίας (*asymmetry factor*), της διαχωριστότητας (*resolution*) μεταξύ των κορυφών κ.ά.

Ανάμεσα σε άλλες δυνατότητες, το λογισμικό αυτό μπορεί να «διαχωρίσει» δύο κορυφές που αλληλεπικαλύπτονται ή να αγνοήσει κορυφές που δίνουν πολύ μικρό σήμα ή ακόμη να απορρίψει άλλες που δεν ενδιαφέρουν στον προσδιορισμό.

3.2. Εξατμιστικός Ανιχνευτής Σκέδασης Ακτινοβολίας (ELSD)^[229]

Οι αρχές λειτουργίας του ανιχνευτή περιγράφηκαν αναλυτικά στο 1^ο κεφάλαιο. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο SEDEX 75 της εταιρίας S.E.D.E.R.E. που φαίνεται στο ακόλουθο Σχήμα 3.1.



Σχήμα 3.1: Ανιχνευτής ELSD, μοντέλο SEDEX 75.

Ο σχεδιασμός του ανιχνευτή, επιτρέπει, με μικρές διαφοροποιήσεις, τη σύζευξη, τόσο με διάταξη HPLC, όσο και με διατάξεις Χρωματογραφίας Υπερκρίσιμου Ρευστού (SFC) και Χρωματογραφίας Πηκτής (Gel Permeation Chromatography).

Εφόσον η απόκριση δεν εξαρτάται από την απορρόφηση ακτινοβολίας, δεν επηρεάζεται από τις χαρακτηριστικές απορροφήσεις των διαλυτών. Επομένως, διαλύτες που απορροφούν στο UV δεν προκαλούν καμία παρεμπόδιση στους προσδιορισμούς με τον ELSD.

Ο ανιχνευτής της παρούσας εργασίας είναι τύπου B (βλ. §1.5.3.2.1), ο οποίος επιτρέπει το διαχωρισμό των σταγονιδίων μετά την εκνέφωση και πριν το στάδιο της εξάτμισης έτσι, ώστε το εκνέφωμα να είναι περισσότερο ομοιόμορφο και η απαιτούμενη θερμοκρασία εξάτμισης χαμηλότερη. Αναφέρεται χαρακτηριστικά από τον κατασκευαστή, ότι ο SEDEX MODEL 75 μπορεί να εξατμίσει ικανοποιητικά κινητή φάση από 100% ύδωρ ακόμη και στους 40 °C.

Ως πηγή ακτινοβολίας χρησιμοποιείται λυχνία βολφραμίου/αλογόνου, ενώ ο φωτοπολλαπλασιαστής είναι τοποθετημένος σε γωνία 120° σε σχέση με τη διεύθυνση της ακτινοβολίας. Ο ανιχνευτής είναι συνδεδεμένος με φιάλη N₂, που του παρέχει το αέριο για

τη δημιουργία εκνεφώματος και διαθέτει μανόμετρα για διαρκή έλεγχο της πίεσης. Διαθέτει, ακόμη, φίλτρα για καθαρισμό του αζώτου από σωματίδια που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν τον προσδιορισμό.

Ο ανιχνευτής έχει δυνατότητα ρύθμισης της θερμοκρασίας και του συντελεστή ευαισθησίας (gain) στην κλίμακα 1-12. Ο σχεδιασμός επιτρέπει την καταγραφή οξειών κορυφών ακόμη και με ταχύτητες ροής που φτάνουν τα $4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Η πίεση του φέροντος αερίου δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 4,5 bar διότι υπάρχει κίνδυνος βλάβης του ανιχνευτή.

3.3. Λοιπές Συσκευές

3.3.1. Συσκευή μέτρησης pH

pHμετρο της εταιρίας Metrohm (Herisau, Switzerland) για τη μέτρηση του pH της κινητής φάσης.

3.3.2. Λουτρό υπερήχων (ultrasonic bath)

Χρησιμοποιήθηκε για τη διαλυτοποίηση των δραστικών συστατικών κατά την κατεργασία των φαρμακευτικών σκευασμάτων.

3.3.3. Συσκευή αντίστροφης ώσμωσης για παραγωγή νερού καθαρότητας HPLC

Συσκευή Milli-Q® Plus Reagent Grade Water Purification System της εταιρίας Millipore (Billerica, MA, USA). Χρησιμοποιεί νερό απιονισμένο και απεσταγμένο που λαμβάνει από ιονανταλλακτική ρητίνη της συσκευής απόσταξης.

Το νερό μέσα στη συσκευή Millipore υφίσταται μια σειρά διηθήσεων. Αρχικά μέσα από φίλτρο συνθετικού ενεργού άνθρακα, κατόπιν διαμέσου ιονανταλλακτικής ρητίνης και φίλτρων αντίστροφης ώσμωσης και τέλος διοχετεύεται μέσα από φίλτρο με διάμετρο πόρων $0,22 \text{ }\mu\text{m}$. Στην έξοδο, συλλέγεται υπερκάθαρο νερό, DDW, έτοιμο να χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή διαλυμάτων για εφαρμογές με HPLC.

3.3.4. Συσκευή φυγοκέντρωσης ECCO-LABOR 1

Χρησιμοποιήθηκε για την καταβύθιση δυσδιάλυτων σωματιδίων σε διάλυμα, μέσω της φυγόκεντρου δύναμης και λειτουργεί ως και τις 9000 rpm.

3.4. Γυάλινα Σκεύη – Ογκομετρικά Όργανα

Τα γυάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή και τη φύλαξη των διαλυμάτων είναι τα ακόλουθα:

1. ποτήρια ζέσεως των 50, 100 και 250 mL
2. ογκομετρικοί κύλινδροι των 25, 50, 100 και 250 mL
3. ογκομετρικές φιάλες των 10, 25, 100, 250, 500 και 1000 mL

4. ρυθμιζόμενες πιπέτες με άκρα (tips) μιας χρήσης των 200 μL και 1000 μL
5. γυάλινοι σωλήνες φυγοκέντρωσης
6. δοκιμαστικοί σωλήνες
7. πλαστικές σύριγγες για διήθηση των δειγμάτων
8. φίλτρα διήθησης με διάμετρο πόρων 0,45 μm (Millipore, Alltech)

3.5. Γενική Πορεία Χρωματογραφικών Μετρήσεων

Για καθένα από τα πειράματα που ακολουθούν, εφαρμόστηκε ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο εργασίας χρήσης της τεχνικής HPLC-ELSD, που περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

1. Παρασκευάζονταν σε γυάλινο περιέκτη η κατάλληλη κινητή φάση, διηθούνταν υπό κενό με φίλτρα Millipore 0,45 μm και απεερωνόταν με τη διαβίβαση αερίου ηλίου για περίπου 5 min.

2. Στο γυάλινο δοχείο, εμβαπτιζόταν ο σωλήνας με το φίλτρο άντλησης της κινητής φάσης και διαμέσου της βαλβίδας έκπλυσης της αντλίας (*purging line*), η κινητή φάση διέτρεχε το σύστημα με τη μέγιστη ροή εκπλύνοντας τις σωληνώσεις και απομακρύνοντας φυσαλίδες από το σύστημα. Η έκπλυση επαναλαμβανόταν 2-3 φορές.

3. Ρυθμίζονταν οι συνθήκες λειτουργίας της αντλίας (ταχύτητα ροής, πίεση, αναλογία διαλυτών), για ισοκρατική ή για βαθμιδωτή έκλουση, και τίθονταν σε λειτουργία η αντλία η οποία διοχετεύει την κινητή φάση μέσα από τη στήλη. Αφηνόταν να τρέξει για όσο κριθεί απαραίτητο μέχρις ότου να καθαρίσει η στήλη από προηγούμενους διαλύτες και να εξισορροπήσει.

4. Τίθονταν σε λειτουργία ο ανιχνευτής, ρυθμιζόταν η θερμοκρασία του θαλάμου εξάτμισης, ο συντελεστής ευαισθησίας και η παροχή του αερίου N_2 .

5. Διοχετεύονταν κινητή φάση, μέσω της στήλης, στον ανιχνευτή για κάποια λεπτά μέχρις ότου σταθεροποιηθεί η γραμμή βάσης (*baseline*). Ο χρόνος που χρειαζόταν για την εξισορρόπηση της γραμμής βάσης εξαρτάται από τη σύσταση της κινητής φάσης και το συντελεστή ευαισθησίας.

6. Το δείγμα, κατάλληλα προκατεργασμένο, ενίονταν στο σύστημα μέσα από τη βαλβίδα εισαγωγής και λαμβανόταν το χρωματογράφημα.

7. Τα αποτελέσματα επεξεργάζονταν από το λογισμικό του H/Y του συστήματος και εκτυπώνονταν ή φυάσσονταν σε αρχεία.

8. Καθ' όλη τη διάρκεια λειτουργίας του οργάνου, ο απαγωγός στον οποίο καταλήγουν με ειδικό σωλήνα τα απόβλητα του ανιχνευτή παρέμενε σε λειτουργία, για να διασφαλιστεί το απαιτούμενο κενό για τη λειτουργία του ανιχνευτή ELSD και να προστατεύεται ο χειριστής από τους ατμούς των οργανικών διαλυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΜΑΖΑΣ ΑΝΑΛΥΤΗ ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ELSD

4.1. Εισαγωγή

Όπως ανφέρθηκε (Εδάφιο.1.5.4), η απόκριση του ανιχνευτή ELSD συνδέεται με τη μάζα (συγκέντρωση) του αναλύτη με τις σχέσεις (1.10, 1.11):

$$A = \alpha \cdot m^b \Rightarrow \log A = \log \alpha + b \cdot \log m$$

όπου A είναι το εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής και m η συγκέντρωση μάζας του αναλύτη. Οι συντελεστές α (παράγοντας απόκρισης) και b (κλίση της γραμμικοποιημένης εξίσωσης), εξαρτώνται από παράγοντες, όπως είναι το μέγεθος των σταγονιδίων, η φύση του αναλύτη, η ταχύτητα ροής του αερίου και της κινητής φάσης, η θερμοκρασία εξάτμισης της κινητής φάσης μέσα στο θάλαμο εξάτμισης κ.ά.

Σκοπός του τμήματος αυτού της εργασίας είναι να μελετηθεί ο τρόπος που οι συντελεστές α και b μεταβάλλονται: i) συναρτήσει της ατομικής μάζας (atomic mass ή weight, AW) και κατ' επέκταση του μεγέθους του αναλύτη και ii) συναρτήσει της σύστασης της κινητής φάσης. Για την πραγματοποίηση της μελέτης επιλέχθηκε η I_A και II_A ομάδα των στοιχείων του Περιοδικού Πίνακα.

Η διεξαγωγή του πειράματος έγινε σε συνθήκες εισαγωγής δείγματος σε ροή (Flow Injection, FI), χωρίς στήλη διαχωρισμού, αλλά με μεταλλικό σωλήνα σύνδεσης που οδηγεί τα δείγματα, μετά την έγχυσή τους, κατευθείαν στον ανιχνευτή.

4.2. Όργανα - Συσκευές - Αντιδραστήρια

4.2.1. HPLC - ELSD

Χρησιμοποιήθηκε η οργανολογία που περιγράφεται στα υποκεφάλαια 3.1 και 3.2 με αντικατάσταση της αναλυτικής στήλης από μεταλλικό σωλήνα σύνδεσης.

4.2.2. Γυάλινα σκεύη – Ογκομετρικά όργανα

Αναφέρονται στο υποκεφάλαιο 3.4.

4.2.3. Διαλύτες - Αντιδραστήρια

A) Διαλύτες

Νερό υψηλής αναλυτικής καθαρότητας κατάλληλο για HPLC που παρασκευάστηκε με συσκευή Αντίστροφης Ώσμωσης σύμφωνα με το εδάφιο 3.3.1.

B) Υγρά αντιδραστήρια

- i) Τριφθοροξικό οξύ, TFA, καθαρότητας $\geq 98\%$, MW: $114,02 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, d: $1,48 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, bp: $72,4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Riedel-de-Haën, Seelze, Germany)
- i) Παγόμορφο οξικό οξύ, CH_3COOH , καθαρότητας $\geq 99,7\%$, MW: $60,05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, d: $1,05 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, bp: $118 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Panreac, Barcelona, Spain)
- ii) Εννεαφθοροπεντανοϊκό οξύ, $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3\text{COOH}$ (NFPA), καθαρότητας $\geq 97\%$, MW: $264,05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, d: $1,71 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, bp: $140 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- iv) Υδροχλωρικό οξύ, HCl, περιεκτικότητας 37% , d: $1,19 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Germany))

Γ) Στερεά αντιδραστήρια

- i) Υδροξείδιο Λιθίου, LiOH, καθαρότητας $\geq 98\%$, Mr: 23,95 (Merck)
- ii) Χλωριούχο Νάτριο, NaCl, καθαρότητας $\geq 99,5\%$, Mr: 58,44 (Merck)
- iii) Χλωριούχο Κάλιο, KCl, καθαρότητας $\geq 99\%$, Mr: 74,55 (Merck)
- iv) Χλωριούχο Ρουβίδιο, RbCl, καθαρότητας $\geq 99\%$, Mr: 120,92 (Merck)
- v) Χλωριούχο Μαγνήσιο, $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, καθαρότητας $99-101\%$, Mr: 203,30 (Riedel-de-Haën)
- vi) Ανθρακικό Ασβέστιο, CaCO_3 , καθαρότητας $\geq 99\%$, Mr : 100,09 (Merck)
- vii) Νιτρικό Στρόντιο, $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, καθαρότητας $\geq 99\%$, Mr: 211,63 (Merck)
- viii) Χλωριούχο Βάριο, $\text{BaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, καθαρότητας $\geq 99\%$, Mr: 244,28 (Merck)

4.3. Πειραματική Πορεία

4.3.1. Παρασκευή διαλυμάτων

➤ Διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions)

Για την παρασκευή των διαλυμάτων παρακαταθήκης ζυγίστηκαν $0,3496 \text{ g}$ LiOH, $0,2542 \text{ g}$ NaCl, $0,1907 \text{ g}$ KCl, $0,1415 \text{ g}$ RbCl, $0,8363 \text{ g}$ $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0,2497 \text{ g}$ CaCO_3 και $0,1778 \text{ g}$ $\text{BaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Όλα τα αντιδραστήρια διαλύθηκαν σε νερό σε ογκομετρικές φιάλες των 100 mL . Εξαίρεση αποτελεί το δυσδιάλυτο CaCO_3 στο οποίο προστέθηκαν αρχικά λίγες σταγόνες δ/τος HCl 6 M και ακολούθησε η αραιώση με νερό. Η συγκέντρωση όλων των διαλυμάτων ήταν $1000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ppm), εκφρασμένη σε συγκέντρωση των μετάλλων. Τα διαλύματα φυλάχθηκαν στις ογκομετρικές φιάλες για διάστημα περίπου μιας εβδομάδας. Ήταν όμως σταθερά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

➤ Παρασκευή δ/τος SrCl_2

Ζυγίστηκε ποσότητα $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ ίση με $0,2415 \text{ g}$ και αραιώθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL με δ/μα HCl $0,01 \text{ M}$. Κατά τη διάλυση παρατηρήθηκε αφρισμός.

➤ Διαλύματα εργασίας

Με τις κατάλληλες αραιώσεις, παρασκευάστηκαν τα διαλύματα εργασίας των κατιόντων σε συγκεντρώσεις $1, 3, 5, 10, 15, 20, 50, 80$ και $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Οι τελικές αραιώσεις έγιναν στην κινητή φάση σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL . Αναλυτικά, οι περιοχές συγκεντρώσεων των δ/των εργασίας είχαν ως εξής:

Πίνακας 4.1: Περιοχές συγκεντρώσεων διαλυμάτων εργασίας

Κατιόν	Περιοχή συγκεντρώσεων διαλυμάτων εργασίας ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Li, Na, Mg, K, Ca, Rb	1 - 50
Sr, Ba	10 -100

➤ Κινητές φάσεις

Οι κινητές φάσεις για τη μελέτη της απόκρισης των ιόντων στον ανιχνευτή ELSD ήταν ύδωρ 100%, δ/μα TFA 0,01 M, δ/μα CH_3COOH 0,01 M και δ/μα NFPA 0,01 M.

4.3.2. Πειραματική διαδικασία

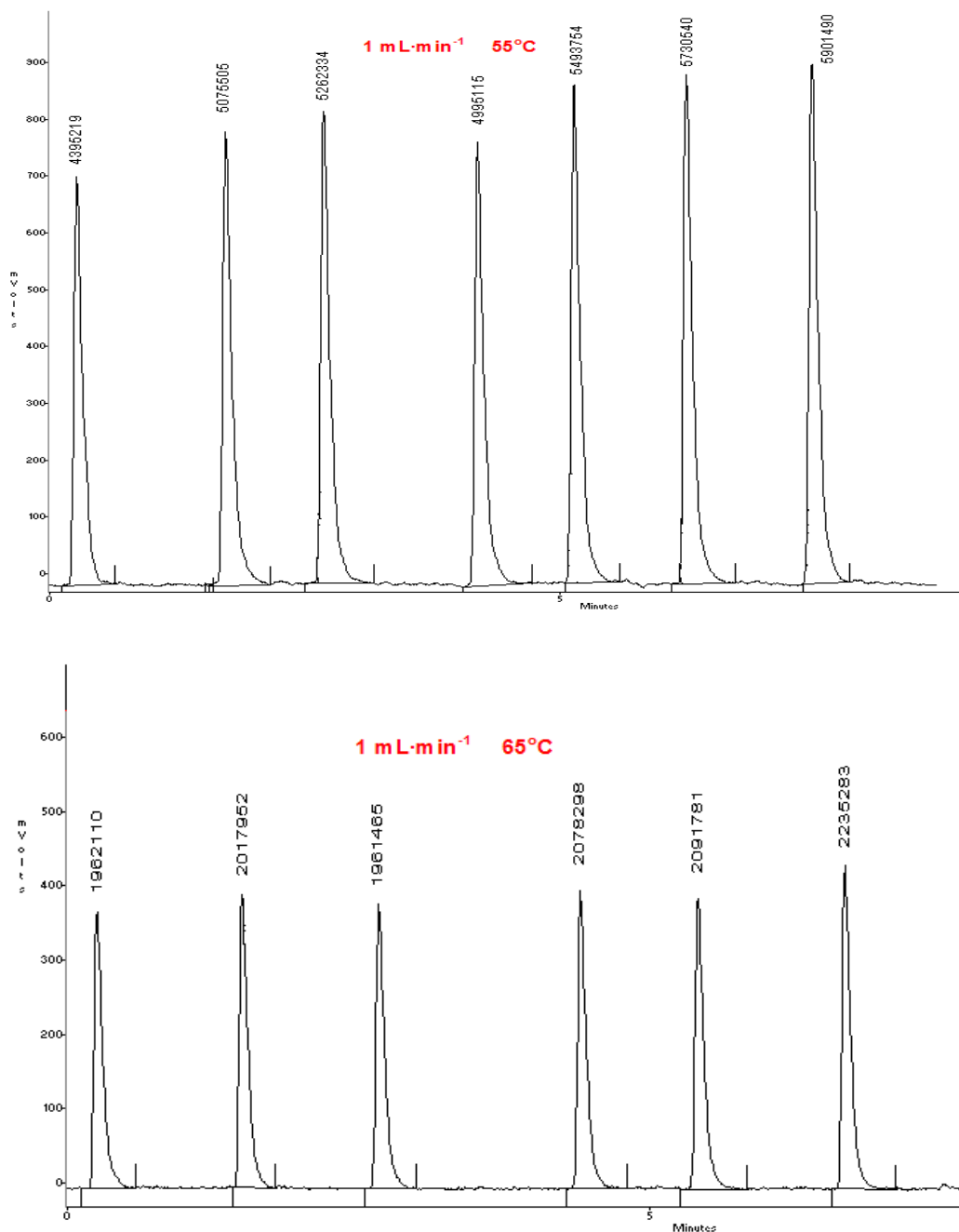
Προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες για να πραγματοποιηθεί η μελέτη της επίδρασης της ατομικής μάζας στην απόκριση του ELSD, δοκιμάστηκαν διάφορες συνθήκες ροής και λειτουργίας του ανιχνευτή που φαίνονται στον πίνακα 4.2. Οι τονισμένες με τη σκίαση είναι οι πειραματικές συνθήκες που τελικά επιλέχθηκαν.

Πίνακας 4.2.: Πειραματικές συνθήκες βελτιστοποίησης. Ευαισθησία ανιχνευτή (gain) 12.

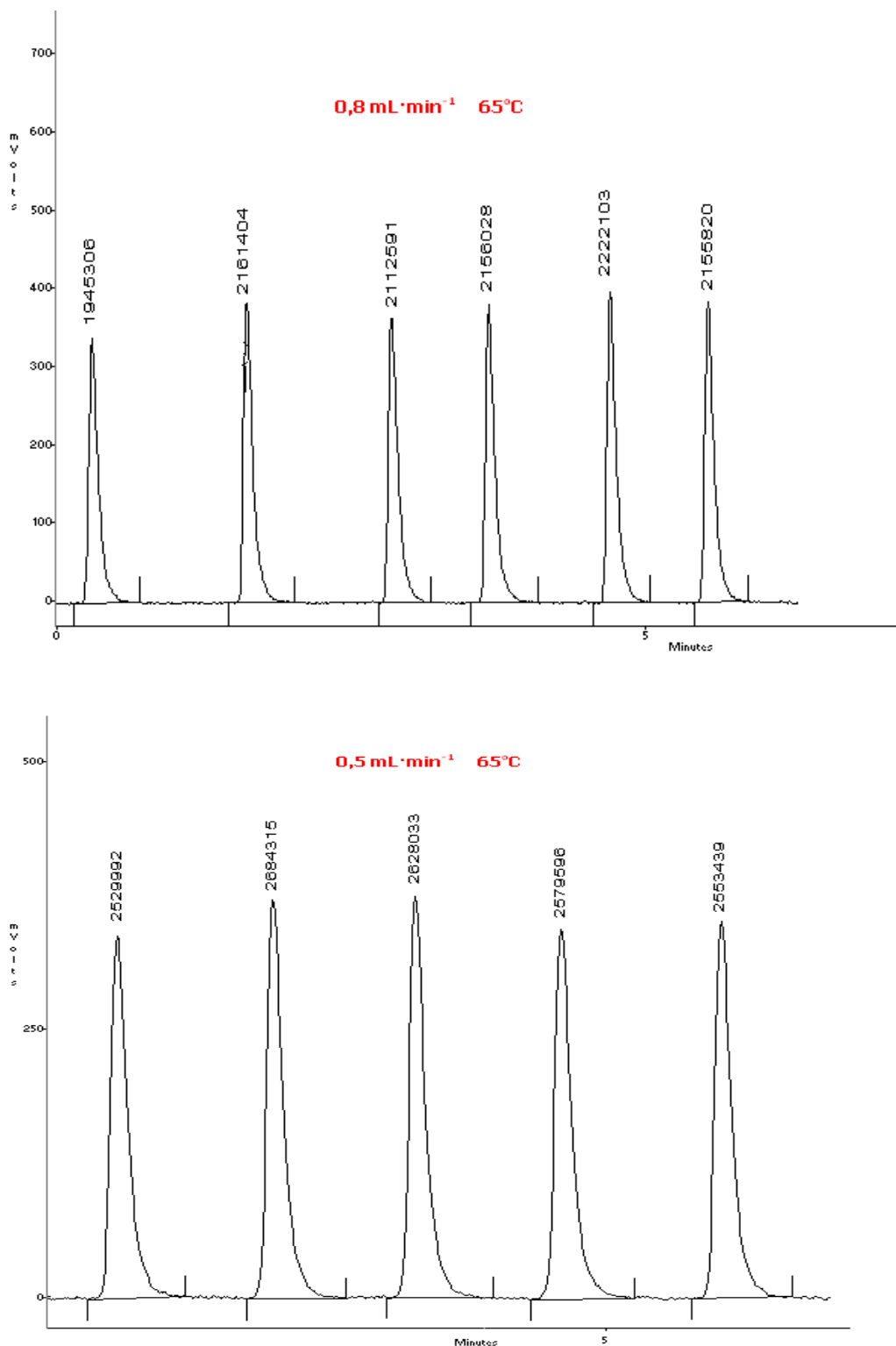
Θερμοκρασία θ ($^{\circ}\text{C}$)	Ταχύτητα ροής κινητής φάσης ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	Πίεση φέροντος αερίου (bar)
50	1,0	3,0
55	1,0	3,0
60	1,0	3,5
65	1,0	3,5
65	0,8	3,5
65	0,5	3,5
70	0,5	3,5
75	0,5	3,5

Οι παραπάνω πειραματικές συνθήκες επιλέχθηκαν διότι οι χρωματογραφικές κορυφές εμφανίζουν καλύτερη επαναληψιμότητα και η μορφή τους μοιάζει πρακτικά με τη μορφή της κορυφής Gauss. Αυτό συμβαίνει διότι για μια διάταξη που λειτουργεί με συνθήκες FIA, μικρότερη ταχύτητα ροής είναι πιο στρωτή, οι κορυφές πιο συμμετρικές, ο λόγος διαλύτη προς το λόγο ποσοστών εκνέφωσης/εξάτμισης είναι μικρότερος, τα σημεία ψηφιακής ολοκλήρωσης ανα κορυφή είναι περισσότερα σε όφελος, τελικά, της επαναληψιμότητας.

Στο σχήμα 4.1, παρουσιάζονται χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα όπου φαίνεται η διαφορά στην επαναληψιμότητα και τη μορφή των κορυφών αναλόγως των συνθηκών.



Σχήμα 4.1: Επίδραση θερμοκρασίας στη μορφή και την επαναληψιμότητα των χρωματογραφικών κορυφών (πρότυπο υδατικό δ/μα Na^+ συγκέντρωσης $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ σε κινητή φάση 100% ύδωρ). Η %σχετική τυπική απόκλιση, %RSD, των μετρήσεων ήταν 9,61 και 5,01, αντίστοιχα.



Σχήμα 4.2: Επίδραση ταχύτητας ροής κινητής φάσης στη μορφή και την επαναληψιμότητα των χρωματογραφικών κορυφών (πρότυπο υδατικό δ/μα Na⁺ συγκέντρωσης 10 μg·mL⁻¹ σε κινητή φάση 100% ύδωρ). Το %RSD των μετρήσεων ήταν 4,47 και 2,38, αντίστοιχα.

Από την εξέταση των χρωματογραφημάτων αποδεικνύεται ότι η υψηλότερη θερμοκρασία, σε συνδυασμό με τη χαμηλή ταχύτητα ροής, δίνουν καλύτερης μορφής κορυφές και πιο επαναλήψιμες μετρήσεις.

4.3.3. Αποτελέσματα

Ακολουθούν τα αποτελέσματα της επίδρασης της κινητής φάσης στην απόκριση του ανιχνευτή για τα διάφορα κατιόντα.

4.3.3.1. Επίδραση ύδατος

Τα διαλύματα εργασίας, σε τελική αραίωση με νερό, εγχύθηκαν τουλάχιστον πέντε φορές στο σύστημα HPLC και οδηγήθηκαν στον ανιχνευτή με κινητή φάση νερό και ροή $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Μετρήθηκε το σήμα απόκρισης του ανιχνευτή και υπολογίστηκε η εξίσωση απόκρισης με τη γραμμική της μορφή (Εξ. 1.11 και 1.12). Από αυτές προέκυψαν οι τιμές των συντελεστών α , b και k . Για τους υπολογισμούς της γραμμικοποιημένης εξίσωσης χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα StatMost και η μέθοδος της γραμμικής παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων (linear regression analysis).

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τα εξεταζόμενα ιόντα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί. Οι εξισώσεις δίνονται με τη μορφή $Y = \beta(\pm SD) + \alpha(\pm SD) \cdot X$ όπου $Y = \log A$, $X = \log C$ και SD η τυπική απόκλιση των συντελεστών.

Πίνακας 4.3 Γραμμικοποιημένες εξισώσεις απόκρισης κατιόντων με κινητή φάση νερό 100%.

Κατιόν	Εξίσωση ευθείας	Συντελεστής συσχέτισης, r^2 ($N \geq 4$, $n \geq 5$)
Li	$Y = 5,846(\pm 0,062) + 1,48(\pm 0,13) \cdot X$	0,996
Na	$Y = 5,229(\pm 0,068) + 1,001(\pm 0,076) \cdot X$	0,994
Mg	$Y = 5,483(\pm 0,034) + 1,255(\pm 0,041) \cdot X$	0,998
K	$Y = 5,010(\pm 0,054) + 1,151(\pm 0,053) \cdot X$	0,996
Ca	$Y = 5,021(\pm 0,050) + 1,199(\pm 0,039) \cdot X$	0,998
Rb	$Y = 4,255(\pm 0,067) + 1,423(\pm 0,054) \cdot X$	0,998
Sr	$Y = 4,314(\pm 0,039) + 1,379(\pm 0,024) \cdot X$	0,9994
Ba	$Y = 4,438(\pm 0,050) + 1,181(\pm 0,030) \cdot X$	0,9991

N: σημεία της καμπύλης απόκρισης

n: επαναλήψεις για κάθε τιμή συγκέντρωσης

Ακολουθούν οι υπολογισμένες τιμές των συντελεστών α , b και k . Η τιμή του συντελεστή α προέκυψε με αντιλογαρίθμηση της τεταγμένης επί την αρχή $\log \alpha$, ενώ ο συντελεστής b δίνεται κατευθείαν από την κλίση της ευθείας. Η τυπική απόκλιση, SD , του α υπολογίστηκε από τη σχέση:

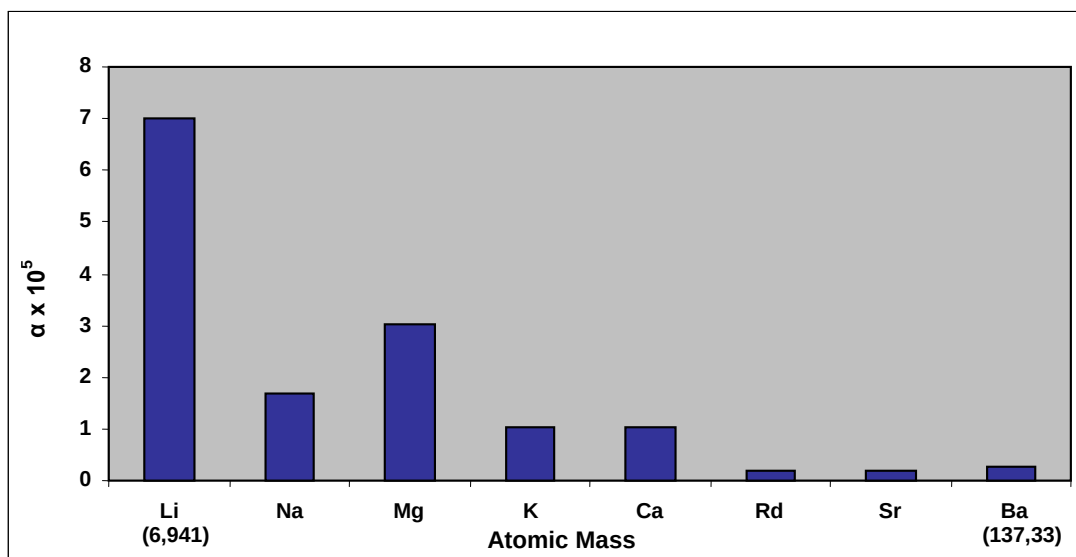
$$SD_{\alpha} = \frac{SD_{\log \alpha}}{0,4343} \times \alpha \quad (4.1)$$

όπου $SD_{\log a}$ είναι η τυπική απόκλιση της τεταγμένης επί την αρχή $\log a$ και δίνεται από το στατιστικό πρόγραμμα StatMost, όπως και το SD του συντελεστή b .

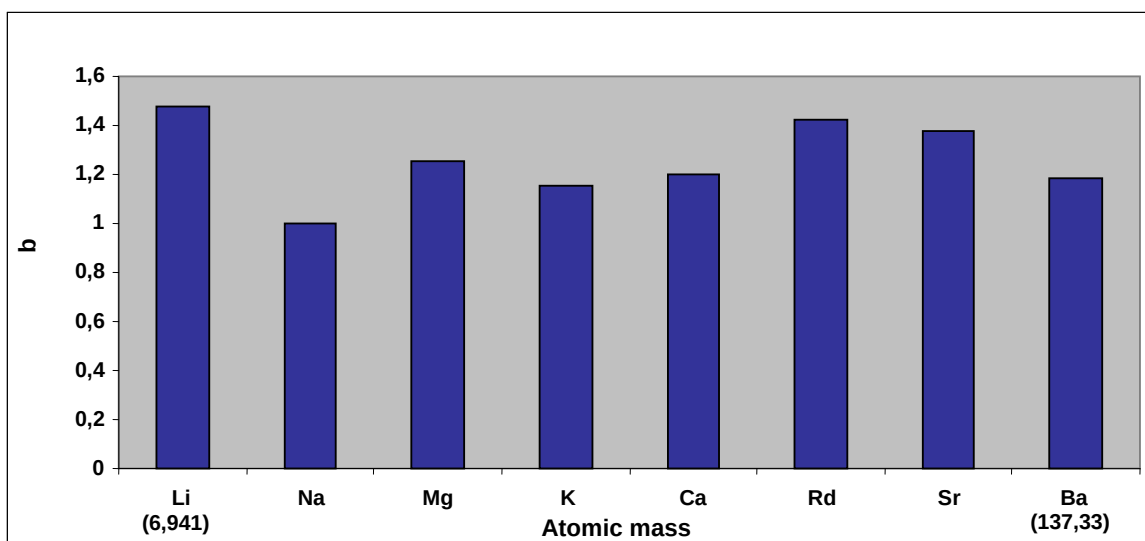
Πίνακας 4.4: Τιμές συντελεστών a , b και k της απόκρισης των κατιόντων υπό την επίδραση του ύδατος.

Κατιόν	Ατομικός αριθμός	Ατομική μάζα	$a (\pm SD) \times 10^5$	$b (\pm SD)$	$k = a^{1/b} \times 10^4$
Li	3	6,941	7,0($\pm 1,0$)	1,48($\pm 0,13$)	0,89
Na	11	22,990	1,69($\pm 0,26$)	1,001($\pm 0,076$)	16,74
Mg	12	24,305	3,04($\pm 0,24$)	1,255($\pm 0,041$)	2,34
K	19	39,098	1,02($\pm 0,13$)	1,151($\pm 0,053$)	2,25
Ca	20	40,08	1,05($\pm 0,12$)	1,199($\pm 0,039$)	1,54
Rb	37	85,468	0,180($\pm 0,028$)	1,423($\pm 0,054$)	0,098
Sr	38	87,62	0,206($\pm 0,018$)	1,379($\pm 0,024$)	0,13
Ba	56	137,33	0,274($\pm 0,032$)	1,181($\pm 0,030$)	0,57

Από τα αποτελέσματα του πίνακα προκύπτουν τα ραβδογράμματα των συντελεστών συναρτήσει της ατομικής μάζας.



Σχήμα 4.3: Ραβδόγραμμα του παράγοντα απόκρισης a συναρτήσει της ατομικής μάζας των εξεταζόμενων μετάλλων παρουσία νερού.



Σχήμα 4.4: Ραβδόγραμμα του παράγοντα b συναρτήσει της ατομικής μάζας των εξεταζόμενων μετάλλων παρουσία νερού.

4.3.3.2. Επίδραση υδατικού δ/τος CH_3COOH 0,01 M

Το πείραμα επαναλήφθηκε με κινητή φάση δ/μα οξικού οξέος συγκέντρωσης 0,01 M ($0,572 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$) και ροή $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τα εξεταζόμενα ιόντα παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν:

Πίνακας 4.5: Γραμμικοποιημένες εξισώσεις απόκρισης κατιόντων με κινητή φάση υδατικό δ/μα CH_3COOH 0,01 M.

Κατιόν	Εξίσωση ευθείας	Συντελεστής συσχέτισης, r^2 ($N \geq 4$, $n \geq 5$)
Li	$Y = 5,768(\pm 0,077) + 0,969(\pm 0,086) \cdot X$	0,98
Na	$Y = 5,5835(\pm 0,0086) + 1,965(\pm 0,010) \cdot X$	0,9998
Mg	$Y = 5,403(\pm 0,072) + 1,257(\pm 0,088) \cdot X$	0,993
K	$Y = 5,151(\pm 0,012) + 1,197(\pm 0,015) \cdot X$	0,9997
Ca	$Y = 4,658(\pm 0,041) + 1,365(\pm 0,032) \cdot X$	0,9991
Rb	$Y = 5,124(\pm 0,037) + 0,814(\pm 0,045) \cdot X$	0,995
Sr	$Y = 4,417(\pm 0,016) + 1,322(\pm 0,010) \cdot X$	0,9998
Ba	$Y = 4,471(\pm 0,057) + 1,173(\pm 0,034) \cdot X$	0,998

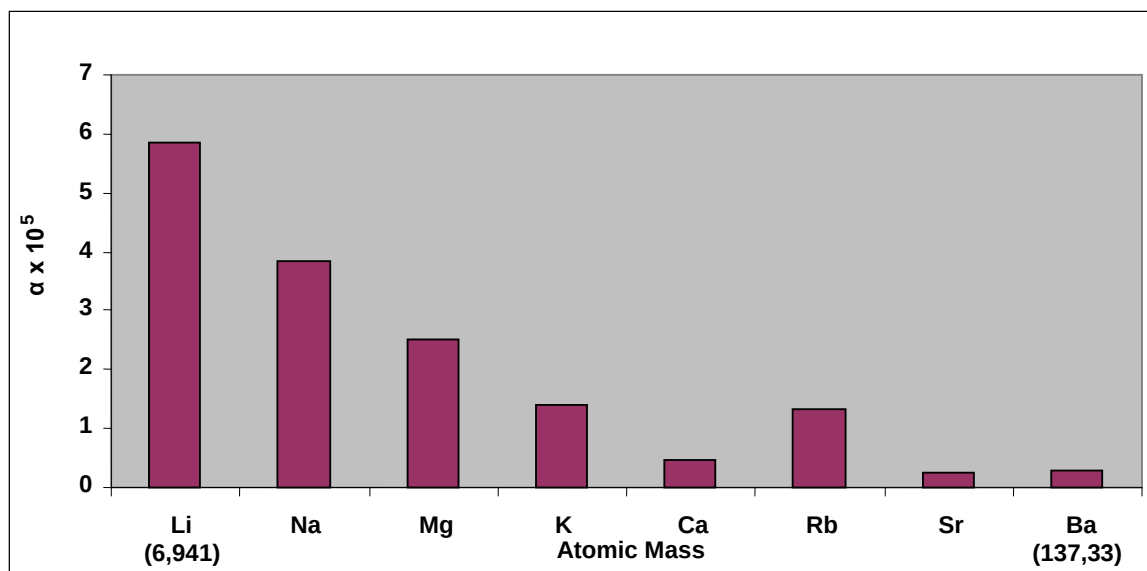
N: σημεία της καμπύλης απόκρισης

n: επαναλήψεις για κάθε τιμή συγκέντρωσης

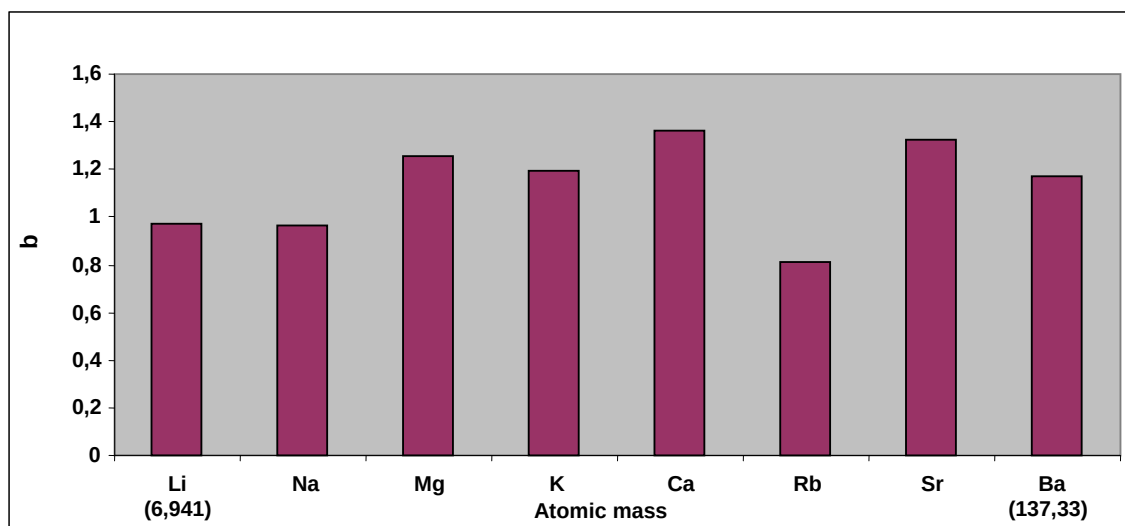
Πίνακας 4.6: Τιμές συντελεστών α , b και k της απόκρισης των κατιόντων υπό την επίδραση του $\delta/\text{τος CH}_3\text{COOH } 0,01 \text{ M}$.

Κατιόν	Ατομικός αριθμός	Ατομική μάζα	$\alpha (\pm\text{SD}) \times 10^5$	$b (\pm\text{SD})$	$k=\alpha^{1/b} \times 10^4$
Li	3	6,941	5,9($\pm 1,0$)	0,969($\pm 0,086$)	89,64
Na	11	22,990	3,833($\pm 0,076$)	0,965($\pm 0,010$)	61,09
Mg	12	24,305	2,53($\pm 0,42$)	1,257($\pm 0,088$)	1,99
K	19	39,098	1,416($\pm 0,039$)	1,197($\pm 0,015$)	2,01
Ca	20	40,08	0,455($\pm 0,043$)	1,365($\pm 0,032$)	0,26
Rb	37	85,468	1,33($\pm 0,11$)	0,814($\pm 0,045$)	197,17
Sr	38	87,62	0,2612($\pm 0,0096$)	1,322($\pm 0,010$)	0,22
Ba	56	137,33	0,296($\pm 0,039$)	1,173($\pm 0,034$)	0,65

Τα αποτελέσματα αυτά παρατίθενται στα ραβδογράμματα στα οποία φαίνεται η μεταβολή των συντελεστών των εξισώσεων αναλόγως της ατομικής μάζας των κατιόντων υπό την επίδραση του οξικού οξέος.



Σχήμα 4.5: Ραβδόγραμμα του παράγοντα απόκρισης α συναρτήσει της ατομικής μάζας των μετάλλων παρουσία CH_3COOH .



Σχήμα 4.6: Ραβδόγραμμα του παράγοντα b συναρτήσει της ατομικής μάζας των εξεταζόμενων μετάλλων παρουσία CH_3COOH .

4.3.3.3. Επίδραση υδατικού δ/τος TFA 0,01 M

Η μελέτη επαναλήφθηκε με κινητή φάση υδατικό διάλυμα TFA συγκέντρωσης 0,01 M ($0,070 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$) στις ίδιες ακριβώς συνθήκες, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις. Οι προκύπτουσες γραμμικοποιημένες εξισώσεις, οι τιμές των συντελεστών καθώς και τα ραβδογράμματα των τιμών τους, συναρτήσει της ατομικής μάζας των μετάλλων είναι τα ακόλουθα.

Πίνακας 4.7: Γραμμικοποιημένες εξισώσεις απόκρισης κατιόντων με κινητή φάση δ/μα TFA 0,01 M

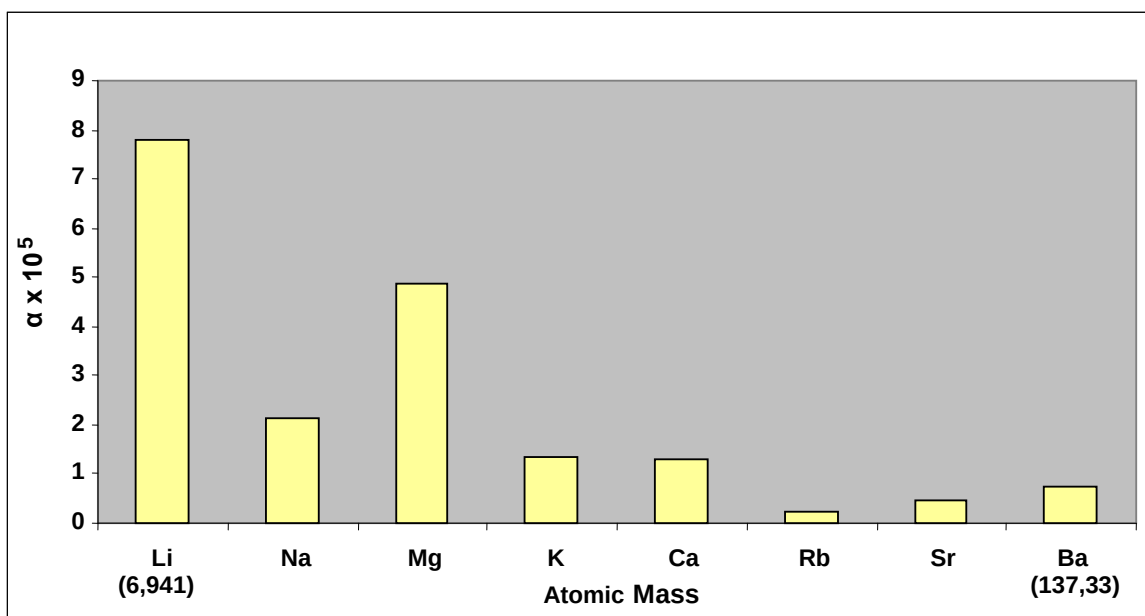
Κατιόν	Εξίσωση ευθείας	Συντελεστής συσχέτισης, r^2 ($N \geq 4$, $n \geq 5$)
Li	$Y = 5,891(\pm 0,027) + 1,047(\pm 0,041) \cdot X$	0,998
Na	$Y = 5,329(\pm 0,089) + 1,029(\pm 0,079) \cdot X$	0,991
Mg	$Y = 5,686(\pm 0,089) + 1,08(\pm 0,11) \cdot X$	0,98
K	$Y = 5,134(\pm 0,099) + 1,003(\pm 0,082) \cdot X$	0,993
Ca	$Y = 5,11(\pm 0,11) + 1,106(\pm 0,082) \cdot X$	0,991
Rb	$Y = 4,403(\pm 0,070) + 1,270(\pm 0,057) \cdot X$	0,998
Sr	$Y = 4,671(\pm 0,039) + 1,227(\pm 0,022) \cdot X$	0,9996
Ba	$Y = 4,873(\pm 0,093) + 0,998(\pm 0,058) \cdot X$	0,993

N: σημεία της καμπύλης απόκρισης

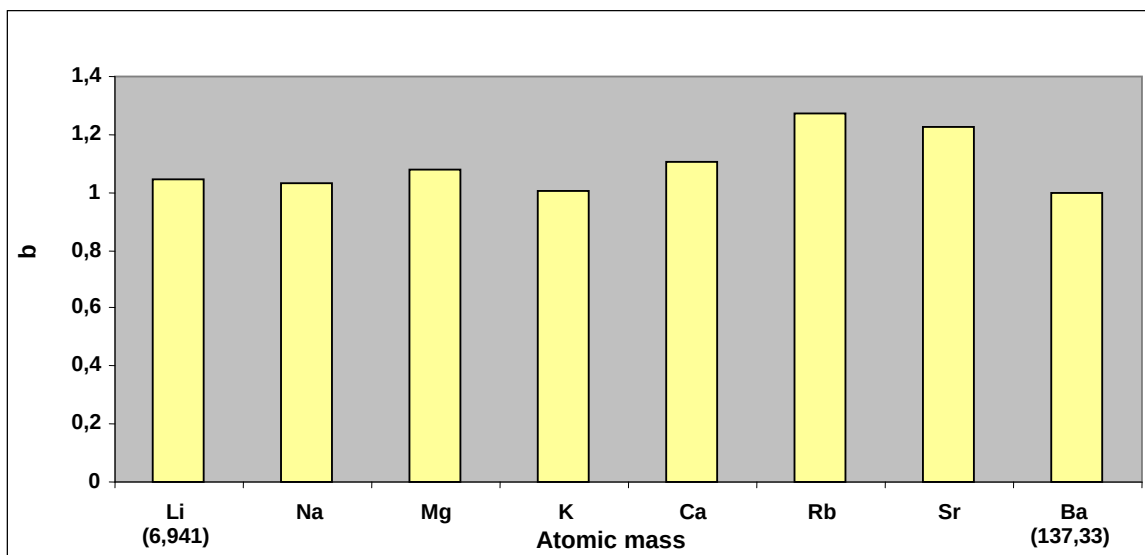
n: επαναλήψεις για κάθε τιμή συγκέντρωσης

Πίνακας 4.8: Τιμές συντελεστών α, b και k της απόκρισης των κατιόντων υπό την επίδραση του δ/τος TFA 0,01 M.

Κατιόν	Ατομικός αριθμός	Ατομική μάζα	$\alpha (\pm SD) \times 10^5$	$b (\pm SD)$	$k = \alpha^{1/b} \times 10^4$
Li	3	6,941	7,78($\pm 0,48$)	1,047($\pm 0,041$)	42,32
Na	11	22,990	2,13($\pm 0,44$)	1,029($\pm 0,079$)	15,09
Mg	12	24,305	4,85($\pm 0,99$)	1,08($\pm 0,11$)	18,40
K	19	39,098	1,36($\pm 0,31$)	1,003($\pm 0,082$)	13,14
Ca	20	40,08	1,29($\pm 0,33$)	1,106($\pm 0,082$)	4,17
Rb	37	85,468	0,253($\pm 0,041$)	1,270($\pm 0,057$)	0,29
Sr	38	87,62	0,469($\pm 0,042$)	1,227($\pm 0,022$)	0,64
Ba	56	137,33	0,75($\pm 0,16$)	0,998($\pm 0,058$)	7,63



Σχήμα 4.7: Ραβδόγραμμα του παράγοντα απόκρισης α συναρτήσει της ατομικής μάζας των μετάλλων παρουσία δ/τος TFA.



Σχήμα 4.8: Ραβδόγραμμα του παράγοντα b συναρτήσει της ατομικής μάζας των εξεταζόμενων μετάλλων παρουσία δ/τος TFA.

4.3.3.4. Επίδραση υδατικού δ/τος NFPA 0,01 M

Τέλος, η μελέτη επαναλήφθηκε με κινητή φάση υδατικό διάλυμα NFPA, ένα εξαιρετικά λιπόφιλο αντιδραστήριο που σχηματίζει ζεύγη ιόντων (ion-pairs) με τα ιόντα των εξεταζόμενων μετάλλων αυξάνοντας παράλληλα σημαντικά τον όγκο τους. Η συγκέντρωση της κινητής φάσης είναι 0,01 M ($1,54 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$).

Πίνακας 4.9: Εξισώσεις απόκρισης των κατιόντων με κινητή φάση υδατικό δ/μα NFPA 0,01 M.

Κατιόν	Εξίσωση ευθείας	Συντελεστής συσχέτισης, r^2 ($N \geq 4$, $n \geq 5$)
Li	$Y = 6,107(\pm 0,040) + 0,934(\pm 0,067) \cdot X$	0,992
Na	$Y = 5,621(\pm 0,075) + 0,826(\pm 0,067) \cdot X$	0,990
Mg	$Y = 5,893(\pm 0,064) + 1,028(\pm 0,078) \cdot X$	0,991
K	$Y = 5,730(\pm 0,056) + 0,629(\pm 0,063) \cdot X$	0,990
Ca	$Y = 5,294(\pm 0,055) + 1,108(\pm 0,043) \cdot X$	0,997
Rb	$Y = 4,891(\pm 0,069) + 1,044(\pm 0,056) \cdot X$	0,997
Sr	$Y = 5,078(\pm 0,049) + 1,088(\pm 0,032) \cdot X$	0,998
Ba	$Y = 5,088(\pm 0,053) + 1,011(\pm 0,034) \cdot X$	0,998

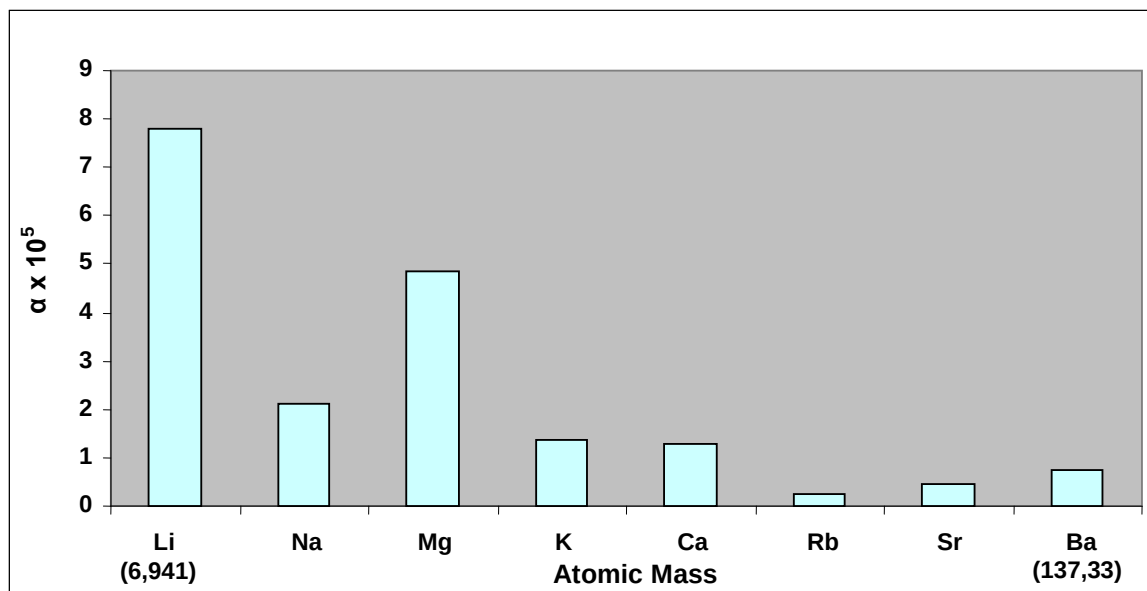
N: σημεία της καμπύλης απόκρισης

n: επαναλήψεις για κάθε τιμή συγκέντρωσης

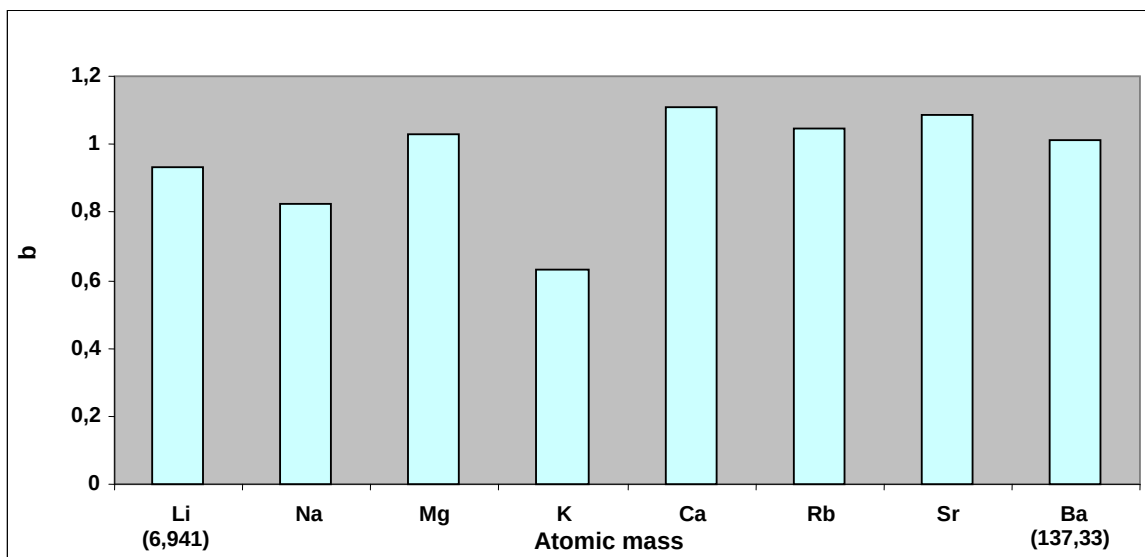
Πίνακας 4.10: Τιμές συντελεστών α, b και k της απόκρισης των κατιόντων υπό την επίδραση του δ/τος NFPA 0,01M.

Κατιόν	Ατομικός αριθμός	Ατομική μάζα	$\alpha (\pm SD) \times 10^5$	$b (\pm SD)$	$k = \alpha^{1/b} \times 10^4$
Li	3	6,941	12,8($\pm 1,2$)	0,934($\pm 0,067$)	345,58
Na	11	22,990	4,18($\pm 0,72$)	0,826($\pm 0,067$)	638,39
Mg	12	24,305	7,82($\pm 1,15$)	1,028($\pm 0,078$)	54,01
K	19	39,098	5,37($\pm 0,69$)	0,629($\pm 0,063$)	12,87
Ca	20	40,08	1,97($\pm 0,25$)	1,108($\pm 0,043$)	6,00
Rb	37	85,468	0,78($\pm 0,12$)	1,044($\pm 0,056$)	4,84
Sr	38	87,62	1,20($\pm 0,13$)	1,088($\pm 0,032$)	4,65
Ba	56	137,33	1,22($\pm 0,15$)	1,011($\pm 0,034$)	10,78

Ομοίως τα ραβδογράμματα των συντελεστών συναρτήσεως του μεγέθους των κατιόντων είναι τα ακόλουθα.



Σχήμα 4.9: Ραβδόγραμμα του παράγοντα απόκρισης α συναρτήσεως της ατομικής μάζας των μετάλλων παρουσία δ/τος NFPA.



Σχήμα 4.10: Ραβδόγραμμα του παράγοντα b συναρτήσει της ατομικής μάζας των εξεταζόμενων μετάλλων παρουσία δ/τος NFPA.

4.3.4. Συμπεράσματα-Συζήτηση

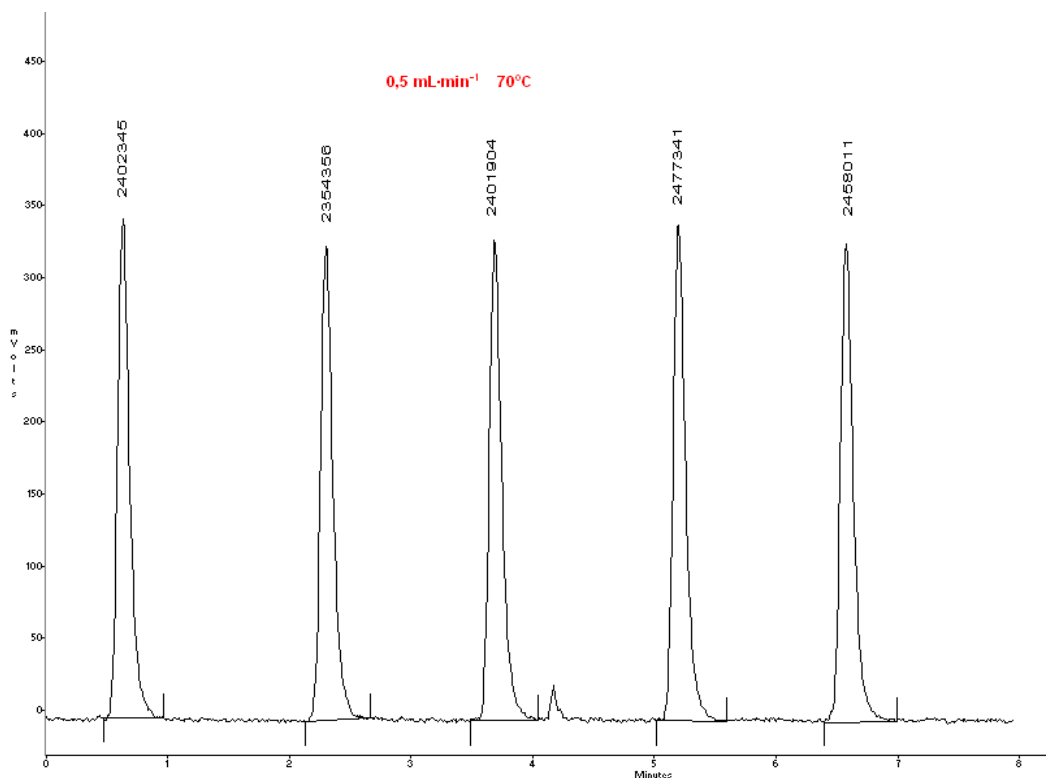
4.3.4.1. Πειράματα βελτιστοποίησης λειτουργίας του ανιχνευτή

Η μελέτη των πειραμάτων βελτιστοποίησης των συνθηκών αποδεικνύει την άμεση εξάρτηση των μετρήσεων από τη θερμοκρασία εξάτμισης (εδάφιο 4.3.2.). Στη χαμηλότερη θερμοκρασία, τους 55 °C, το εμβαδόν των κορυφών ήταν μεγαλύτερο, σε σχέση με την υψηλότερη θερμοκρασία, πιθανόν διότι η εξάτμιση του διαλύτη της κινητής φάσης ήταν ημιτελής, με αποτέλεσμα τα σωματίδια που σκεδάζουν την ακτινοβολία να έχουν μεγαλύτερο μέγεθος. Παρατηρήθηκε ότι για το εξεταζόμενο πρότυπο διάλυμα (υδατικό δ/μα Na^+ συγκέντρωσης $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), αύξηση της θερμοκρασίας εξάτμισης κατά 10 βαθμούς, από τους 55 °C στους 65 °C, μείωσε το εμβαδόν των κορυφών περίπου 2,5 φορές, από τα 5×10^5 στα $2 \times 10^5 \text{ mV}\cdot\text{s}$. Η χαμηλότερη θερμοκρασία, ωστόσο, φαίνεται ότι δεν εξάτμιζε το έκλουσμα με ομοιόμορφο τρόπο με αποτέλεσμα οι μετρήσεις να εμφανίζουν μεταξύ τους μεγάλες αποκλίσεις. Αυτό αποδεικνύεται και στατιστικά αφού το %RSD του εμβαδού των κορυφών στους 55 °C και 65 °C είναι 9,61 και 5,01, αντίστοιχα.

Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης δεν επέδρασε το ίδιο δραστικά στο μέγεθος των κορυφών όσο στη μορφή τους. Η μικρή ταχύτητα ροής ($0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) παρείχε περισσότερο συμμετρικές κορυφές γεγονός που φαίνεται και από τους συντελεστές ασυμμετρίας (Asymmetry factor, A_f) των κορυφών που για τα $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ είναι $1,970(\pm 0,078)$ ενώ για τα $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ είναι $1,706(\pm 0,015)$. Τελικά, ένας συνδυασμός μιας σχετικά υψηλής θερμοκρασίας με μία χαμηλή ταχύτητα ροής έδωσε σαφώς ικανοποιητικές μετρήσεις.

Απόδειξη είναι το χρωματογράφημα που ακολουθεί (Σχ.4.11) που ελήφθη στις επιλεγμένες συνθήκες λειτουργίας (70 °C και $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). Το %RSD του εμβαδού των

μετρήσεων είναι 2,03 ενώ και ο συντελεστής ασυμμετρίας των κορυφών είναι 1,378($\pm 0,043$).



Σχήμα 4.11: Χρωματογράφημα πρότυπου υδατικού δ/ματος Na⁺ συγκέντρωσης 10 μg·mL⁻¹ στις επιλεγμένες συνθήκες εργασίας.

4.3.4.2. Επίδραση κινητής φάσης και ατομικής μάζας αναλύτη

Η βιβλιογραφία αναφέρει ότι η τιμή του συντελεστή b κυμαίνεται, για την πλειοψηφία των αναλύσεων, μεταξύ 0,8 και 1,8. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των εξεταζόμενων μετάλλων και για τις τέσσερις κινητές φάσεις ενίσχυσαν αυτόν τον ισχυρισμό. Με εξαίρεση το σύστημα Mg/NFPA όπου $b=0,629$, σε όλα τα υπόλοιπα συστήματα η τιμή του b βρέθηκε στα εντός της βιβλιογραφίας ορίων. Η ελάχιστη τιμή b που παρατηρήθηκε είναι 0,814 και η μέγιστη 1,480, χωρίς όμως ο τρόπος μεταβολής του να ακολουθεί ένα συγκεκριμένο μοντέλο. Σε αρκετές περιπτώσεις, μάλιστα, $b \rightarrow 1$ όπως στο Na/H₂O ($b=1,001$), K/TFA ($b=1,003$) και Ba/TFA (0,998).

Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το b είναι μάλλον ανεξάρτητο του είδους του αναλύτη, όσο και της σύστασης της υδατικής κινητής φάσης και πιθανόν εξαρτάται από το διαλύτη και τις συνθήκες λειτουργίας και απόδοσης του ELSD για την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος. Αυτός εξάλλου είναι και ο λόγος που επιβάλλεται η λήψη καινούριας καμπύλης αναφοράς πριν από κάθε σειρά μετρήσεων. Πάντως επιβεβαιώνεται ότι για καθαρά υδατική κινητή φάση η τιμή b πλησιάζει το 1.

Αντίθετα η τιμή του α φαίνεται ότι επηρεάζεται άμεσα από το μέγεθος και κατ' επέκταση από την ατομική μάζα των εξεταζόμενων μετάλλων και μάλιστα με τάση να αυξάνει αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθος των κατιόντων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι όσο μικρότερο ήταν το μέγεθος του κατιόντος, τόσο μεγαλύτερη ήταν η προκύπτουσα τιμή του α , με το λίθιο που είναι το μικρότερο από τα εξεταζόμενα κατιόντα να έχει τη μεγαλύτερη τιμή α , σημαντικά μεγαλύτερη από τα πιο «ογκώδη» στρόντιο και βάριο. Η παρατήρηση αυτή ισχύει και για τις τέσσερις κινητές φάσεις που εξετάστηκαν. Η τιμή του παράγοντα α είναι άμεση συνάρτηση της τιμής εμβαδού των κορυφών. Έτσι, π.χ. στην κινητή φάση NFPA, για συγκέντρωση ιόντος $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, τα εμβαδά των κορυφών ενδεικτικά ήταν $A_{\text{Li}} \approx 1,3 \times 10^6 \text{ mV}\cdot\text{s}$, $A_{\text{Mg}} \approx 0,9 \times 10^6 \text{ mV}\cdot\text{s}$, $A_{\text{K}} \approx 0,5 \times 10^6 \text{ mV}\cdot\text{s}$, ενώ το στρόντιο και το βάριο δεν ήταν καν ανιχνεύσιμα σε αυτή τη συγκέντρωση και ανιχνεύθηκαν για συγκέντρωση μεγαλύτερη των $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (βλ. και Πίνακα 4.1). Το φαινόμενο αυτό πιθανόν να οφείλεται στην επιδιαλύτωση και στο σχηματισμό ιοντικών ζευγών των κατιόντων και στο γεγονός ότι όσο μεγαλύτερη είναι η ακτίνα του κατιόντος, τόσο περισσότερο ελαττώνεται η ενέργεια επιδιαλύτωσης και η ακτίνα του επιδιαλυτωμένου ιόντος.

Από τη βιβλιογραφία, για τις ακτίνες των ιόντων των υπό εξέταση στοιχείων δίνονται κατά αύξουσα σειρά τα εξής δεδομένα:

Πίνακας 4.11: Τιμές ιοντικής ακτίνας των μετάλλων κατά αύξουσα σειρά^[230]

Κατιόν	Li^+	Mg^{2+}	Na^+	Ca^{2+}	Sr^{2+}	K^+	Ba^{2+}	Rb^+
Ακτίνα ιόντος (Å)	0,60	0,65	0,98	0,99	1,10	1,33	1,35	1,48

Ενώ για τα αλκάλια, συγκεκριμένα, οι τιμές ιδιοτήτων των κατιόντων τους, όταν διαλύτης είναι το νερό, μεταβάλλονται με το μέγεθος ως εξής:

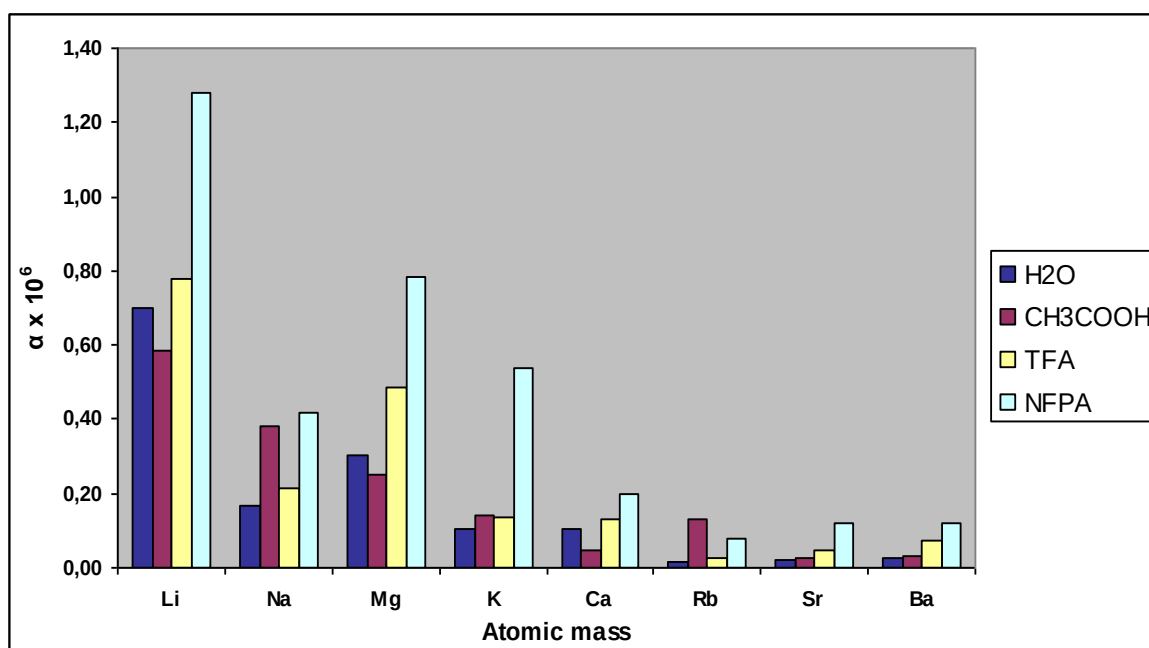
Πίνακας 4.12: Χαρακτηριστικές τιμές ορισμένων ιδιοτήτων των ιόντων των αλκαλίων^[230]

Ιδιότητα	Li	Na	K	Rb
Ακτίνα ιόντος (Å)	0,60	0,98	1,33	1,48
Ακτίνα εφυδατωμένου ιόντος (Å)	3,40	2,76	2,32	2,28
Αριθμός εφυδάτωσης	25,3	16,6	10,5	10,0
Ενέργεια εφυδάτωσης ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)	132,3	97,1	77,0	10,0

Έτσι τα «μικρά» ιόντα, επιδιαλυτωμένα, αποκτούν τελικά μεγαλύτερο μέγεθος από τα υπόλοιπα και η θερμότητα του ανιχνευτή δεν ήταν, καθώς φαίνεται, αρκετή για να εξατμίσει, στις συγκεκριμένες συνθήκες, πλήρως το διαλύτη που σχηματίζει στιβάδες γύρω

από αυτά, με αποτέλεσμα τα σχηματιζόμενα σωματίδια που σκεδάζουν την ακτινοβολία να ήταν μεγαλύτερα σε μέγεθος. Από τα τρία πρόσθετα, στο νερό τα κατιόντα έδωσαν τιμές απόκρισης που συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα του πίνακα 4.11. (βλ. Σχ.4.3). Οι ανακολουθίες που εμφανίζονται για τα υπόλοιπα πρόσθετα πιθανόν να οφείλονται σε διάφορες άλλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων των οξέων και των κατιόντων (σχηματισμός ιοντικών ζευγών).

Αξιοσημείωτο είναι επίσης ότι από τα τέσσερα οξέα/διαλύτες, το NFPA αύξησε το σήμα απόκρισης για όλα τα κατιόντα περισσότερο από τα υπόλοιπα τρία, όπως φαίνεται στο συγκριτικό ραβδόγραμμα του παράγοντα απόκρισης α όλων των κατιόντων παρουσία όλων των οξέων.



Σχήμα 4.12: Συγκριτικό ραβδόγραμμα του παράγοντα απόκρισης α συναρτήσει της ατομικής μάζας των μετάλλων για τους τέσσερις διαλύτες.

Όπως φαίνεται από το σχήμα 4.12, τα οξέα TFA (M.B.114) και NFPA (M.B. 264) ενίσχυσαν σημαντικά το σήμα σε ορισμένα κατιόντα λόγω της δημιουργίας ογκωδών ιοντικών ζευγών. Η ιδιότητα του NFPA να αυξάνει σε σημαντικό βαθμό το σήμα απόκρισης ενός ιόντος, χρησιμοποιήθηκε στους προσδιορισμούς που ακολουθούν και περιγράφονται στα επόμενα κεφάλαια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΘΙΟΥ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

5.1. Εισαγωγή

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται μέθοδοι προσδιορισμού ενώσεων του λιθίου, ενός μετάλλου που χρησιμοποιείται στη Φαρμακευτική για την παρασκευή σκευασμάτων για τη θεραπεία της διπολικής διαταραχής. Πρόκειται για μια διαταραχή της εγκεφαλικής λειτουργίας που φέρει ασυνήθιστες, απότομες και ακραίες εναλλαγές της συναισθηματικής διάθεσης, της δραστηριότητας και της γενικότερης λειτουργικότητας του ατόμου. Ο κίνδυνος νόσησης από την ασθένεια, γνωστή και ως μανιοκατάθλιψη, ανέρχεται στο 1% στη διάρκεια της ζωής και προσβάλλει το 0,3-0,5% του γενικού πληθυσμού. Υπολογίζεται ότι στην Ελλάδα 10.000-20.000 άτομα πάσχουν από μανιοκατάθλιψη. Επειδή εμφανίζεται συνήθως περί το τέλος της εφηβείας, δε γίνεται άμεσα αντιληπτή η νοσηρότητα των συμπτωμάτων, τα οποία πολλοί αποδίδουν στο «ιδιόρρυθμο» της ηλικίας, με αποτέλεσμα ο ασθενής να υποφέρει χρόνια πριν λάβει την κατάλληλη αγωγή^[231].

Το λίθιο ήταν το πρώτο φάρμακο, «σταθεροποιητικό της διάθεσης» που κυκλοφόρησε για την αντιμετώπιση της νόσου. Απαντάται με τη μορφή του ιόντος Li^+ σε ένα πλήθος αλάτων, με πιο συνηθισμένα τα άλατα του ανθρακικού (Lithium carbonate, Li_2CO_3), του θειικού (Lithium Sulphate, Li_2SO_4), του κιτρικού (Lithium Citrate) και του ασπαρτικού οξέος (Lithium Aspartate). Ο μηχανισμός δράσης του λιθίου έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 2. Οι φαρμακοτεχνικές του μορφές είναι καψάκια, απλά δισκία, δισκία ελεγχόμενης αποδέσμευσης και πόσιμα διαλύματα.

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφονται οι μέθοδοι για τον προσδιορισμό του ανθρακικού και του θειικού λιθίου. Αναπτύχθηκαν δύο μέθοδοι προσδιορισμού για κάθε άλας, μία που βασίζεται στο μηχανισμό ιοντικών ζευγών (ion-pair mechanism) και μία που εκμεταλλεύεται τις ιοντικές αλληλεπιδράσεις των αλάτων με στήλη ιονανταλλαγής (ion-exchange interactions).

Οι μέθοδοι εφαρμόστηκαν σε δύο φαρμακευτικά σκευάσματα, ένα με τη μορφή καψακίου και ένα με τη μορφή δισκίων ελεγχόμενης απελευθέρωσης, που είναι διαθέσιμα στην ελληνική αγορά. Εφαρμόστηκαν ακόμη σε βιολογικά δείγματα ούρων και πλάσματος αίματος.

5.2. Ανθρακικό Λίθιο

5.2.1. Χαρακτηριστικά – Ιδιότητες – Εμπορική ονομασία

Το Li_2CO_3 έχει μοριακό βάρος 73,89. Είναι άσπρη, άοσμη, ελαφρά αλκαλική σκόνη. Η διαλυτότητά της στο νερό είναι 1,33 g στα 100 mL (25 °C), ενώ είναι πρακτικά αδιάλυτη

στην ακετόνη και την αιθανόλη. Διατηρεί σταθερά τα χαρακτηριστικά της κατά την έκθεσή της στο φως, την υγρασία και σε θερμοκρασία δωματίου. Αναφέρεται ότι αρχίζει να διασπάται σε οξείδιο του λιθίου, Li_2O , και διοξείδιο του άνθρακα CO_2 σε θερμοκρασία πάνω από $200\text{ }^\circ\text{C}$ ^[232].

Είναι το κυριότερο από τα άλατα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της μανιοκατάθλιψης και προτιμάται λόγω της αυξημένης σταθερότητάς του – είναι ελάχιστα υγροσκοπικό – και διότι δεν προκαλεί ερεθισμούς στη γαστρεντερική οδό. Στην αγορά κυκλοφορεί με τα εμπορικά ονόματα Carbolith[®], Lithonate[®], Duralith[®], Eskalith[®], Lithane[®]. Στην ελληνική αγορά κυκλοφορεί με τη μορφή καψακίων με την ονομασία Milithin[®].

5.2.2. Έλεγχοι σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία^[130]

Περίληπτικά, οι δοκιμές που προτείνει η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία για τον έλεγχο του ανθρακικού λιθίου περιλαμβάνουν:

1. Ταυτοποίηση δραστικής ουσίας

- 1.1. Μετά τη διαβροχή με διάλυμα HCl , δίνει ερυθρό χρώμα όταν τοποθετηθεί σε μη-φθορίζουσα φλόγα.
- 1.2. Ποσότητα ουσίας διαλύεται σε αραιό HCl και εξατμίζεται μέχρι ξηρού. Το ξηρό υπόλειμμα διαλύεται σε αλκοόλη.
- 1.3. Ποσότητα της ουσίας διασπείρεται σε νερό και αναμιγνύεται με δ/μα αραιού οξικού οξέος. Το μίγμα σε πωματισμένο σωλήνα θερμαίνεται μέχρις ότου να εκλυθεί άχρωμο και άοσμο αέριο. Το τελευταίο συλλέγεται σε δ/μα $\text{Ba}(\text{OH})_2$ όπου σχηματίζει λευκό ίζημα (αντίδραση των ανθρακικών).

2. Έλεγχοι καθαρότητας

- 2.1. *Διάλυμα Δ*: Παρασκευάζεται με διασπορά της ουσίας σε απεσταγμένο νερό και διάλυση με προσθήκη αραιού HNO_3 . Προστίθεται αραιό δ/μα NaOH μέχρις εξουδετέρωσης. Το δ/μα Δ ανταποκρίνεται στις προδιαγραφές όταν είναι διαυγές και άχρωμο.
- 2.2. *Χλωριούχα*: Το δ/μα Δ αραιωμένο σε νερό πρέπει να ανταποκρίνεται στον έλεγχο ορίου για χλωριούχα ($200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- 2.3. *Θειικά*: Ποσότητα της ουσίας σε νερό θερμαίνεται καταρχήν με αραιό υδροχλωρικό οξύ και κατόπιν εξουδετερώνεται με αραιό δ/μα NaOH . Το προκύπτον δ/μα πρέπει να ανταποκρίνεται στον έλεγχο ορίου για θειικά ($200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- 2.4. *Αρσενικό*: Πρέπει να ανταποκρίνεται στον έλεγχο ορίου για αρσενικό ($2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- 2.5. *Ασβέστιο*: Το δ/μα Δ πρέπει να ανταποκρίνεται στον έλεγχο ορίου για το ασβέστιο ($200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- 2.6. *Βαρέα μέταλλα*: Ποσότητα του δ/τος Δ πρέπει να ανταποκρίνεται στον έλεγχο ορίου Α της Φαρμακοποιίας για τα βαρέα μέταλλα ($20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- 2.7. *Σίδηρος*: Ποσότητα δ/τος Δ πρέπει να ανταποκρίνεται στον έλεγχο ορίου για το σίδηρο ($20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- 2.8. *Μαγνήσιο*: Δεν πρέπει να υπερβαίνει τα $150\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.9. *Κάλιο*: Να μην υπερβαίνει τα $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ προσδιορισμένο με φασματομετρία ατομικής εκπομπής στα 766,5 nm.

2.10. *Νάτριο*: Δεν πρέπει να είναι περισσότερο από $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ προσδιορισμένο με φασματομετρία ατομικής εκπομπής στα 589 nm.

3. Έλεγχος περιεκτικότητας πρώτης ύλης (Assay)

Πραγματοποιείται με διάλυση ορισμένης ποσότητας της ουσίας σε $\delta/\mu\alpha$ HCl 1 M. Ακολουθεί ογκομέτρηση περίσσειας HCl με πρότυπο $\delta/\mu\alpha$ NaOH 1 M και δείκτη πορτοκαλόχρουν του μεθυλίου.

1 mL HCl συγκέντρωσης 1 M ισοδυναμεί με 36,95 mg Li_2CO_3 .

5.3. Θεϊκό Λίθιο

5.3.1. Χαρακτηριστικά – Ιδιότητες – Εμπορική ονομασία

Το Li_2SO_4 έχει μοριακό βάρος 109,94. Είναι άσπρη, άοσμη, κρυσταλλική σκόνη. Είναι υγροσκοπική και ευδιάλυτη στο νερό (34,5 g στα 100 mL στους 25 °C). Η διαλυτότητά της μάλιστα μειώνεται αντιστρόφως ανάλογα με την αύξηση της θερμοκρασίας, ιδιότητα που παρατηρείται σε πολύ λίγες ακόμη ανόργανες ενώσεις.

Χρησιμοποιείται εναλλακτικά για τη θεραπεία ψυχικών παθήσεων που σχετίζονται με τη μανιοκατάθλιψη. Στην ελληνική αγορά κυκλοφορεί με τη μορφή δισκίου ελεγχόμενης απελευθέρωσης με την ονομασία Lithiofor®.

5.3.2. Έλεγχοι σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποία

Μονογραφία σχετική με το θεϊκό λίθιο δεν υπάρχει στην Ευρωπαϊκή ή την Αμερικάνικη Φαρμακοποία.

5.4. Φαρμακοκινητική Δράση Λιθίου^[104, 232]

Μετά τη λήψη του φαρμάκου, τα ιόντα λιθίου απορροφώνται τάχιστα από το γαστρεντερικό σύστημα και η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα του αίματος φτάνει στη μέγιστη τιμή 1-4 ώρες αργότερα, για απλά δισκία, και 2-12 ώρες για σκευάσματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης. Δε συμπλέκονται με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Το λίθιο τείνει να κατανέμεται ομοιόμορφα σε όλο το «υδατικό» περιβάλλον του οργανισμού, παρ' όλα αυτά παρατηρείται μια καθυστέρηση στο χρόνο διαβίβασής του στον εγκέφαλο. Η ισορροπία στη συγκέντρωση του μετάλλου μεταξύ του αίματος και του εγκεφάλου αποκαθίσταται μέσα σε 24 ώρες από τη λήψη, η συγκέντρωση που ανιχνεύεται όμως, στον εγκέφαλο είναι η μισή από αυτή που μετράται στο πλάσμα του αίματος.

Το λίθιο απεκκρίνεται σχεδόν αποκλειστικά στα νεφρά και το 95% από μία εφ'άπαξ δόση αποβάλλεται στα ούρα μέσα σε 24 ώρες. Ταυτόχρονη αυξημένη λήψη νατρίου επηρεάζει ελάχιστα έως καθόλου τη φυσιολογική απέκκριση του λιθίου. Αντίθετα, μειωμένα

επίπεδα νατρίου στον οργανισμό, ενισχύουν την κατακράτηση ή επαναπορρόφησή του και με δεδομένο το πόσο στενά είναι τα όρια μεταξύ θεραπευτικών και τοξικών επιπέδων του στοιχείου ($<1,5 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ και $>1,6 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$, αντίστοιχα, στο πλάσμα αίματος), μια τέτοια κατάσταση μπορεί να είναι επικίνδυνη (τοξίκωση του οργανισμού).

5.5. Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC-ELSD για τον Προσδιορισμό Αλάτων του Λιθίου σε Φαρμακευτικά Σκευάσματα με το Μηχανισμό Ζεύγους Ιόντων (Ion-Pair Chromatography)

5.5.1. Εισαγωγή- Γενικά για τη χρωματογραφία ζεύγους ιόντων^[1, 2]

Η χρωματογραφία ζεύγους ιόντων ή συζευγμένων ιόντων, είναι είδος χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (*RP-ion-pair*) που χρησιμοποιείται στο διαχωρισμό και προσδιορισμό ιόντων ή ιοντισμένων ενώσεων. Η κινητή φάση αποτελείται από ένα υδατοργανικό ρυθμιστικό διάλυμα. Το διάλυμα αυτό περιέχει έναν οργανικό διαλύτη (π.χ. MeOH, ACN κ.ά.) και μια ιοντική ουσία, που αποτελείται από το *αντισταθμιστικό ιόν* (*counter ion*) αντίθετου φορτίου από αυτό του αναλύτη. Το αντισταθμιστικό ιόν συνδέεται με το ιοντισμένο τμήμα του αναλύτη και σχηματίζει ένα ζεύγος ιόντων ουδέτερου φορτίου που κατακρατείται από το υλικό πλήρωσης της στήλης. Τα περισσότερα από τα αντισταθμιστικά ιόντα που χρησιμοποιούνται περιέχουν αλκυλομάδες, κατά κανόνα μεγάλου μεγέθους, έτσι, ώστε να αυξήσουν την κατακράτηση του σχηματιζόμενου ζεύγους στη μη-πολική στατική φάση. Η έκλυση του ζεύγους από τη στήλη επιτυγχάνεται από τον οργανικό διαλύτη της κινητής φάσης.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την κατακράτηση και το διαχωρισμό είναι κυρίως το είδος και η *συγκέντρωση* του αντισταθμιστικού ιόντος, το *pH* και η ιοντική ισχύς της υδατικής φάσης, το *είδος του οργανικού διαλύτη*, αλλά και η θερμοκρασία. Η επιλογή της κατάλληλης τιμής pH γίνεται με κριτήριο να είναι και ο αναλύτης και το ιοντικό αντιδραστήριο πλήρως φορτισμένα, λαμβάνοντας πάντα υπ' όψη και τη συμβατότητα με τη στήλη (για τις C_8 και C_{18} στήλες $pH \approx 2-8$). Αύξηση της συγκέντρωσης του οργανικού διαλύτη μειώνει την κατακράτηση, κυρίως διότι ελαττώνει το ποσό του ιοντικού αντιδραστηρίου που προσροφάται στη στατική φάση. Τέλος, αύξηση της συγκέντρωσης του αντισταθμιστικού ιόντος αυξάνει εκθετικά την κατακράτηση μέχρι που φτάνει σε ένα πλατό στο οποίο παρατηρείται κορεσμός της στήλης από το αντιδραστήριο. Βασικό ρόλο στην επιλογή του αντισταθμιστικού ιόντος παίζει η συμβατότητά του με το φορτίο του αναλύτη. Έτσι, για το διαχωρισμό κατιονικών ενώσεων χρησιμοποιούνται αρνητικά φορτισμένες ουσίες που προσροφώνται στη στήλη και αντίστροφα. Ο σχηματισμός ιοντικού ζεύγους παρατηρείται τόσο στην κινητή φάση, όσο και επί της στατικής φάσης όπου προσροφάται το αντισταθμιστικό ιόν.

Μεγάλο πλεονέκτημα της τεχνικής είναι ότι δεν απαιτεί ειδικές στατικές φάσεις ή εξοπλισμό, επιτυγχάνει την εκλεκτικότητα μόνο με μικρές αλλαγές στην κινητή φάση και

επιτρέπει τον ταυτόχρονο διαχωρισμό ουδέτερων και ιοντισμένων ενώσεων. Η χρωματογραφία ζεύγους ιόντων πλεονεκτεί έναντι της χρωματογραφίας ιοντανταλλαγής στο διαχωρισμό μεγάλων ιόντων, όπως για παράδειγμα στις επιφανειοδραστικές ενώσεις, όπου οι ιονανταλλακτικές ρητίνες θα είχαν μειωμένη απόδοση, καθώς διαθέτουν πυκνά εσωτερικά δίκτυα που επιβραδύνουν τους μηχανισμούς μεταφοράς μάζας. Πλεονεκτεί τέλος στην περίπτωση που οι διαχωριζόμενες ουσίες έχουν μεγάλη χημική συγγένεια με τον ιονανταλλάκτη, οπότε καθίσταται δύσκολη η έκλουσή τους με ιοντική χρωματογραφία.

Η επιλογή του αντισταθμιστικού ιόντος σχετίζεται άμεσα με το είδος του αναλύτη. Άλατα του τεταρτοταγούς αμμωνίου χρησιμοποιούνται στο διαχωρισμό οξέων, αλκυλοθειικές ενώσεις στο διαχωρισμό μικρών κατιόντων κ.ό.κ. Στη μέθοδο που ακολουθεί για τον προσδιορισμό των αλάτων του λιθίου, το ρόλο του αντισταθμιστικού ιόντος έχει το εννεαφθοροπεντανοϊκό οξύ (NFPA).

5.5.2. Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια

5.5.2.1. HPLC – ELSD (Υποκ. 3.1 & 3.2)

Χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική στήλη διαχωρισμού C18 Spherisorb® 5μm ODS-2 της Waters διαστάσεων 250 x 4,6 mm.

5.5.2.2. Γυάλινα σκεύη – Ογκομετρικά όργανα (§ 3.4)

5.5.2.3. Διαλύτες – Αντιδραστήρια

A) Διαλύτες

Νερό κατάλληλο για HPLC (εδάφιο 3.3.1).

B) Υγρά αντιδραστήρια

- i) Τριφθοροξικό οξύ, TFA, καθαρότητας $\geq 98\%$, MW:114,02 g·mol⁻¹, d:1,48 g·mL⁻¹ (Riedel-de-Haën, Seelze, Germany)
- ii) Παγόμορφο οξικό οξύ, CH₃COOH, καθαρότητας $\geq 99,7\%$, MW: 60,05 g·mol⁻¹, d:1,05 g·mL⁻¹ (Panreac, Barcelona, Spain)
- iii) Εννεαφθοροπεντανοϊκό οξύ, NFPA, καθαρότητας $\geq 97\%$, MW:264,05 g·mol⁻¹, d:1,71 g·mL⁻¹ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- iv) Υδροχλωρικό οξύ, HCl, περιεκτικότητας 37%, d:1,19 g·mL⁻¹ (Merck, Darmstadt, Germany)

Γ) Στερεά αντιδραστήρια

- i) Ανθρακικό λίθιο, Li₂CO₃, αναλυτικής καθαρότητας, Mr:73,89 (Merck)
- ii) Θειικό λίθιο, Li₂SO₄, αναλυτικής καθαρότητας, Mr:109,94 (CHEMO PURO Manufacturing Co, NY, USA)
- iii) Υδροξείδιο Λιθίου, LiOH, καθαρότητας $\geq 98\%$, Mr:23,95 (Merck)

- iv) Χλωριούχο Νάτριο, NaCl, καθαρότητας $\geq 99,5\%$, Mr:58,44 (Merck)
- v) Χλωριούχο Κάλιο, KCl, καθαρότητας $\geq 99\%$, Mr:74,55 (Merck)
- vi) Χλωριούχο Ρουβίδιο, RbCl, καθαρότητας $\geq 99\%$, Mr:120,92 (Merck)

5.5.3. Πειραματική πορεία

5.5.3.1. Παρασκευή διαλυμάτων

➤ Διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions)

Ζυγίστηκαν 0,3496 g LiOH, 0,2542 g NaCl, 0,1907 g KCl και 0,1415 g RbCl και διαλύθηκαν ξεχωριστά σε νερό σε ογκομετρικές φιάλες των 100 mL. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων ήταν $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ως προς συγκέντρωση των κατιόντων. Τα διαλύματα φυλάχθηκαν στις ογκομετρικές φιάλες για διάστημα περίπου μιας εβδομάδας. Χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή δ/τος εργασίας μίγματος ιόντων.

Ζυγίστηκε ποσότητα Li_2CO_3 ίση με 0,0750 g και διαλύθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL με δ/μα HCl 0,001 M. Ζυγίστηκε ποσότητα Li_2SO_4 ίση με 0,0825 g και διαλύθηκε σε νερό σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Η διάλυση των ουσιών επιταχύνθηκε με τη χρήση λουτρού υπερήχων για περίπου 5 min ή μέχρις ότου τα διαλύματα ήταν διαυγή. Τα διαλύματα φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και ήταν σταθερά για διάστημα σχεδόν δύο εβδομάδων.

➤ Διαλύματα εργασίας

Με κατάλληλες αραιώσεις των διαλυμάτων παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν τα διαλύματα εργασίας των Li_2CO_3 και Li_2SO_4 σε συγκεντρώσεις 0,5, 0,8, 1,0, 3,0 και 5,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ λιθίου. Η τελική αραιώση έγινε στην κινητή φάση.

➤ Διάλυμα μίγματος ιόντων

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL αναμίχθηκαν ποσότητες από τα διαλύματα παρακαταθήκης του LiOH, του NaCl, του KCl και του RbCl και παρασκευάστηκε μίγμα των τεσσάρων κατιόντων, οι συγκεντρώσεις των οποίων ήταν 5, 10, 50 και 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, αντίστοιχα. Η τελική αραιώση του μίγματος έγινε στην κινητή φάση.

Το δ/μα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου διαχωρισμού του λιθίου από τα υπόλοιπα κατιόντα. Ο λόγος που οι συγκεντρώσεις των τεσσάρων κατιόντων ήταν διαφορετικές, ήταν διότι, όπως αποδείχτηκε στο κεφάλαιο 4, οι παράγοντες απόκρισης στον ELSD διαφέρουν για τα διάφορα κατιόντα και το ζητούμενο στη συγκεκριμένη δοκιμή βελτιστοποίησης δεν ήταν η ποσοτικοποίηση του μίγματος, αλλά η λήψη ευκρινών κορυφών και από τα τέσσερα ιόντα ώστε να αποδεικνύεται ο διαχωρισμός τους.

5.5.3.2. Δοκιμές βελτιστοποίησης μεθόδου διαχωρισμού

Προκειμένου να βρεθεί το κατάλληλο χρωματογραφικό σύστημα έτσι, ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των κατιόντων, δοκιμάστηκαν συνδυασμοί κινητής φάσης οι

οποίοι παρατίθενται στον πίνακα 5.1. Για κάθε ένα από τα μίγματα κινητής φάσης, ενύονταν το δ/μα του μίγματος των κατιόντων και λαμβανόταν το χρωματογράφημα.

Πίνακας 5.1: Δοκιμές κινητών φάσεων για διαχωρισμό των κατιόντων με χρωματογραφία ιοντικών ζευγών.

Κινητή Φάση Α	Κινητή Φάση Β	Κινητή Φάση Γ	Αναλογία Α:Β:Γ (v/v/v)
NFPA ¹	–	ACN	95:5
NFPA	H ₂ O	ACN	80:10:10
NFPA	H ₂ O	ACN	70:20:10
NFPA	TFA ²	-	90:10
NFPA	TFA	ACN	70:20:10
NFPA	TFA	ACN	40:40:20
NFPA	CH₃COOH³	-	90:10
NFPA	CH ₃ COOH	-	80:20
NFPA	CH ₃ COOH	ACN	50:35:15
TFA	CH ₃ COOH	ACN	50:45:5

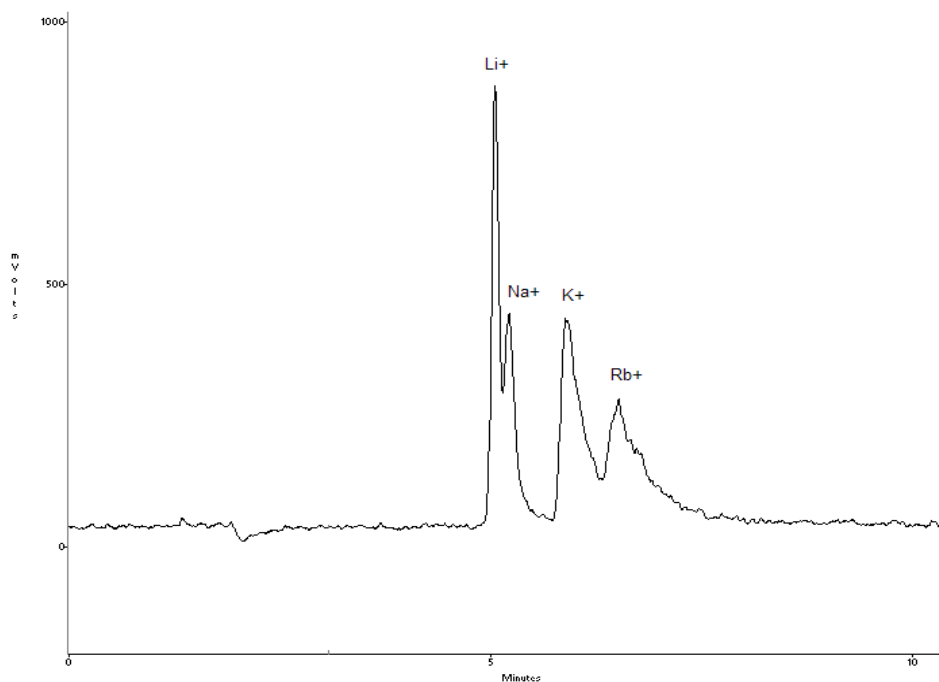
1: το υδατικό δ/μα NFPA είχε αρχική συγκέντρωση 0,02 M ή 3,18 mL·L⁻¹ και pH≈2,3

2: το υδατικό δ/μα TFA είχε αρχική συγκέντρωση 0,01 M ή 0,77 mL·L⁻¹

3: το υδατικό δ/μα CH₃COOH είχε αρχική συγκέντρωση 0,01 M ή 0,57 mL·L⁻¹

Η τονισμένη με τη σκίαση είναι η κινητή φάση που επιλέχθηκε, διότι επετεύχθη ο βέλτιστος δυνατός διαχωρισμός των κατιόντων του μίγματος. Είναι η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε, στη συνέχεια, για τον προσδιορισμό των ιόντων του λιθίου στα φαρμακευτικά σκευάσματα.

Το σχήμα 5.1 απεικονίζει το χρωματογράφημα του μίγματος των κατιόντων με το επιλεγμένο σύστημα κινητής φάσης όπου φαίνεται ότι υπάρχει μια σχετική επικάλυψη των κορυφών Li⁺ και Na⁺.



Σχήμα 5.1: Χρωματογράφημα μίγματος κατιόντων με μηχανισμό RP-ion-pair και ισοκρατική έκλουση με κινητή φάση μίγμα NFPA:CH₃COOH 90:10 v/v. Οι χρόνοι κατακράτησης των ιόντων ήταν: Li⁺: t_R=5,07 min, Na⁺: t_R=5,20 min, K⁺: t_R=5,91 min και Rb⁺: t_R=6,54 min.

Μετά και τις δοκιμές βελτιστοποίησης, οι πειραματικές συνθήκες με τις οποίες επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός του στοιχείου στα σκευάσματα, δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 5.2: Πειραματικές συνθήκες χρωματογράφησης

Σύστημα HPLC – ELSD	
Στήλη	ODS-2 C18 (250 x 4,6 mm)
Κινητή φάση	NFPA:CH ₃ COOH (90:10 v/v)
Ταχύτητα ροής κινητής φάσης	1 mL·min ⁻¹
Θερμοκρασία ανιχνευτή	70 °C
Ευαισθησία (gain) ανιχνευτή	12
Πίεση φέροντος αερίου	3,5 bar

5.5.3.3. Κατασκευή καμπύλης αναφοράς – Επικύρωση μεθόδου

Κάθε ένα από τα διαλύματα εργασίας ενύονταν στο σύστημα HPLC-ELSD τουλάχιστον τρεις φορές και μετρούνταν το σήμα απόκρισης, A, του ανιχνευτή. Με βάση

αυτές τις μετρήσεις κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς, για κάθε μία από τις ενώσεις, με τη γραμμική της μορφή (Εξ. 1.11), και υπολογίστηκαν οι τιμές των συντελεστών $\log a$ και b καθώς και ο συντελεστής συσχέτισης, r^2 .

Η επικύρωση (*validation*) περιελάμβανε τον έλεγχο της επαναληψιμότητας, της αναπαραγωγιμότητας και της ακρίβειας της μεθόδου. Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα ελέγχθηκε με τον υπολογισμό της %RSD, των συντελεστών $\log a$, ή a , και b για καμπύλες αναφοράς που λαμβάνονταν κάτω από τις ίδιες συνθήκες σε διαφορετικές ημέρες. Ο έλεγχος της ακρίβειας έγινε με τη διενέργεια πειραμάτων ανάκτησης (*recovery tests*) που στόχευαν στον εντοπισμό των συστηματικών σφαλμάτων της μεθόδου.

Σύμφωνα με την επικρατούσα από τις μεθοδολογίες των πειραμάτων ανάκτησης, αρχικά αναλύεται το άγνωστο δείγμα και προσδιορίζεται η άγνωστη συγκέντρωση C_o . Στη συνέχεια προστίθεται γνωστή συγκέντρωση αναλύτη έτσι, ώστε να προκύψει γνωστή μεταβολή ΔC . Αναλύεται το εμβολιασμένο (*spiked*) δείγμα με κατεργασία ίδια με αυτή του άγνωστου δείγματος και βρίσκεται η C_{sp} . Η % ανάκτηση, %R, υπολογίζεται από τις σχέσεις:

$$\%R = \frac{(C_{sp} - C_o)}{\Delta C} \times 100 \quad (\text{αυστηρός τύπος}) \quad (5.1)$$

$$\%R = \frac{C_{sp}}{(C_o + \Delta C)} \times 100 \quad (\text{ελαστικός τύπος}) \quad (5.2)$$

Τα C_{sp} και C_o υπολογίζονται από την καμπύλη αναφοράς της ημέρας και στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο τύπος 5.2.

Η επικύρωση της μεθόδου ολοκληρώθηκε με τον υπολογισμό του ορίου ανίχνευσης, LOD, και του ορίου ποσοτικοποίησης, LOQ, που ως γνωστόν δίνονται από τις σχέσεις:

$$LOD = \frac{3.3 \times SD}{b} \quad \text{και} \quad LOQ = \frac{10 \times SD}{b} \quad (5.3 \ \& \ 5.4)$$

όπου SD είναι η τυπική απόκλιση της τεταγμένης επί την αρχή $\log a$.

5.5.3.4. Κατεργασία σκευασμάτων και προετοιμασία δειγμάτων

➤ Σκεύασμα Li_2CO_3 : Το σκεύασμα με την ονομασία Milithin[®] έχει τη μορφή καψακίου. Το εξωτερικό της περίβλημα είναι πράσινου χρώματος ενώ το περιεχόμενο φάρμακο είναι σκόνη άσπρου χρώματος. Μετά από ζύγιση 10 μονάδων, το μέσο βάρος κάθε καψακίου βρέθηκε ότι είναι $W_{cap}=0,50037(\pm 0,00061)$ g και περιείχε $W_{gran}=0,4201(\pm 0,0011)$ g φαρμάκου, όπου σύμφωνα με την παρασκευάστρια εταιρία, η ονομαστική περιεκτικότητα είναι 300 mg Li_2CO_3 (ή 56,37 mg Li^+) ανά καψάκιο. Το σκεύασμα περιέχει ακόμη τα έκδοχα άμυλο αραβοσίτου, μονοϋδρική λακτόζη και παραφινέλαιο.

Το περιεχόμενο από 10 καψάκια τοποθετήθηκε σε γουδί και ομογενοποιήθηκε. Ζυγίστηκε ποσότητα από τη σκόνη ίση με 0,105 g, που περιέχει 0,075 g δραστικής ουσίας, και έγινε διασπορά του σε δ/μα HCl 0,01 M μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για ~10 min, για μέγιστη διαλυτοποίηση της δραστικής ουσίας, και φυγοκεντρήθηκε. Το υπερκείμενο διάλυμα φιλτραρίστηκε από φίλτρα Millipore 0,45 μm.

Παρασκευάστηκε ακόμη λευκό δείγμα (placebo) που περιέχει τα έκδοχα του σκεύασματος σε αναλογίες 1:1:1. Ζυγίστηκε ποσότητα του λευκού ίση με 0,0300 g και υπέστη την ίδια κατεργασία, όπως το πραγματικό σκεύασμα. Ο ρόλος του placebo ήταν να ελέγξει την ύπαρξη παρεμποδίσεων από τα έκδοχα στον προσδιορισμό της δραστικής ουσίας.

➤ Σκεύασμα Li_2SO_4 : Το σκεύασμα που καλείται Lithiofor® είναι δισκία ελεγχόμενης αποδέσμευσης άσπρου χρώματος με εγκάρσια εγκοπή. Από τη ζύγιση 10 δισκίων, το μέσο βάρος κάθε δισκίου βρέθηκε ότι είναι $W_{\text{tab}}=1,0014(\pm 0,0015)$ g. Η ονομαστική περιεκτικότητα σε δραστική ουσία είναι 660 mg Li_2SO_4 (ή 83,32 mg Li^+) ανά δισκίο. Ως έκδοχα χρησιμοποιούνται τα στετικό μαγνήσιο, υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνη, μεθακρυλικό αμμώνιο και το πολυμερές Eudragit.

Αριθμός 10 δισκίων κονιοποιήθηκε σε γουδί και ομογενοποιήθηκε. Ζυγίστηκε ποσότητα της σκόνης ίση με 0,1250 g, η οποία περιέχει 0,0825 g Li_2SO_4 , και έγινε διασπορά της στο νερό σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για ~10 min και φυγοκεντρήθηκε. Το υπερκείμενο δ/μα διηθήθηκε από φίλτρα Millipore 0,45 μm. Παρασκευάστηκε δείγμα placebo, ζυγίστηκε ποσότητά του ίση με 0,0425 g και κατεργάστηκε όπως ακριβώς και το σκεύασμα.

Οι τελικές αραιώσεις από τα διαλύματα φαρμάκου και placebo, και στις δύο περιπτώσεις, έγιναν στην κινητή φάση, σε συγκεντρώσεις που βρίσκονταν στην περιοχή εργασίας της καμπύλης αναφοράς.

5.5.4. Αποτελέσματα

5.5.4.1. Καμπύλες αναφοράς Li_2CO_3 και Li_2SO_4 – Επικύρωση

Οι καμπύλες αναφοράς που ελήφθησαν και για τις δύο ουσίες σε τέσσερις διαδοχικές ημέρες, με τους συντελεστές log a και b, παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί. Παρουσιάζονται ακόμη περιληπτικά τα δεδομένα από την επικύρωση της μεθόδου, τα σχετικά με την επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα, καθώς και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Όπου r^2 στους πίνακες, είναι ο συντελεστής συσχέτισης της εξίσωσης της ευθείας, N είναι τα σημεία της καμπύλης αναφοράς και n είναι οι επαναλήψεις για κάθε μία συγκέντρωση διαλύματος.

Πίνακας 5.3: Καμπύλες αναφοράς Li_2CO_3 – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου

Ημέρα	Εξίσωση ευθείας	r^2 (N≥4, n≥4)	% RSD (0,5 – 5,0 µg·mL ⁻¹)
1 ^η	$\log A = 6,0496(\pm 0,0026) + 1,2083(\pm 0,0052) \cdot \log C$	0,999991	1,5 – 6,1
2 ^η	$\log A = 5,919(\pm 0,011) + 1,362(\pm 0,028) \cdot \log C$	0,9994	0,89 – 5,8
3 ^η	$\log A = 6,0755(\pm 0,0096) + 1,147(\pm 0,019) \cdot \log C$	0,9998	0,59 – 1,9
4 ^η	$\log A = 6,115(\pm 0,018) + 1,139(\pm 0,036) \cdot \log C$	0,9995	0,031 – 2,1
Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα			
Interday %RSD του loga		1,4	
Interday % RSD του b		8,5	
LOQ (µg·mL ⁻¹)		0,46	
LOD (µg·mL ⁻¹)		0,20	

Όμοια, για το Li₂SO₄ τα αντίστοιχα δεδομένα είναι:

Πίνακας 5.4: Καμπύλες αναφοράς Li₂SO₄ – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου

Ημέρα	Εξίσωση ευθείας	r^2 (N≥4, n≥4)	% RSD (0,5 – 5,0 µg·mL ⁻¹)
1 ^η	$\log A = 5,7789(\pm 0,0090) + 1,467(\pm 0,020) \cdot \log C$	0,9998	1,8 – 3,0
2 ^η	$\log A = 5,849(\pm 0,013) + 1,373(\pm 0,028) \cdot \log C$	0,9998	2,1 – 3,4
3 ^η	$\log A = 5,977(\pm 0,022) + 1,173(\pm 0,045) \cdot \log C$	0,9993	0,45 – 5,2
4 ^η	$\log A = 5,9758(\pm 0,0017) + 1,2621(\pm 0,0035) \cdot \log C$	0,999996	2,3 – 4,4
Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα			
Interday %RSD του loga		1,7	
Interday %RSD του b		9,7	
LOQ (µg·mL ⁻¹)		0,31	
LOD (µg·mL ⁻¹)		0,14	

Τα αποτελέσματα της επικύρωσης της μεθόδου κρίνονται ικανοποιητικά, δεδομένου του αριθμού των παραγόντων που επηρεάζουν την τιμή των συντελεστών α και b, μερικοί

από τους οποίους (π.χ. πραγματική θερμοκρασία θαλάμου εξάτμισης, μέγεθος σταγονιδίων εκνεφώματος κ.ά.) δε μπορούν να ρυθμιστούν με απόλυτη ακρίβεια έτσι, ώστε οι συνθήκες του πειράματος να είναι επαναλήψιμες. Ικανοποιητικά χαμηλά ήταν και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου όπως προέκυψαν από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

5.5.4.2. Έλεγχος περιεκτικότητας σε δραστική – Έλεγχος ανάκτησης

Στο σύστημα HPLC-ELSD ενέθηκαν με τη σειρά διαλύματα που αποτελούνταν από:

- Placebo: 30 mg
- Placebo + std Li_2CO_3 : 30 mg + 75 mg
- Σκεύασμα Milithin® Li_2CO_3 : 105 mg
- Σκεύασμα Li_2CO_3 + std Li_2CO_3 : 105 mg + 75 mg

κατεργασμένα και αραιωμένα όπως περιγράφηκε στο εδάφιο 5.5.3.4. Για κάθε δ/μα ελήφθη το χρωματογράφημα και μετρήθηκε η απόκρισή του τρεις φορές τουλάχιστον. Από την καμπύλη αναφοράς υπολογίστηκε η περιεκτικότητα σε Li^+ ανά καψάκιο, εκφρασμένη σε mg Li^+ /cap, αλλά και σε ποσοστό επί τοις εκατό επί της ονομαστικής περιεκτικότητας. Τέλος, από το εμβολιασμένο με την πρότυπη ουσία δ/μα του σκευάσματος, υπολογίστηκε η % ανάκτηση του φαρμάκου.

Όμοια, για τον προσδιορισμό του Li_2SO_4 ενέθηκαν τα διαλύματα:

- Placebo: 42,5 mg
- Placebo + std Li_2SO_4 : 42,5 mg + 82,5 mg
- Σκεύασμα Lithiofor® Li_2SO_4 : 125 mg
- Σκεύασμα Li_2SO_4 + std Li_2SO_4 : 125 mg + 82,5 mg

κατεργασμένα και αραιωμένα όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Για κάθε δ/μα μετρήθηκε η απόκρισή του τρεις φορές τουλάχιστον. Από την καμπύλη αναφοράς υπολογίστηκε η περιεκτικότητα σε Li^+ ανά δισκίο, εκφρασμένη επίσης σε mg Li^+ /tab, αλλά και σε ποσοστό επί τοις εκατό επί της ονομαστικής περιεκτικότητας καθώς και η % ανάκτηση του φαρμάκου.

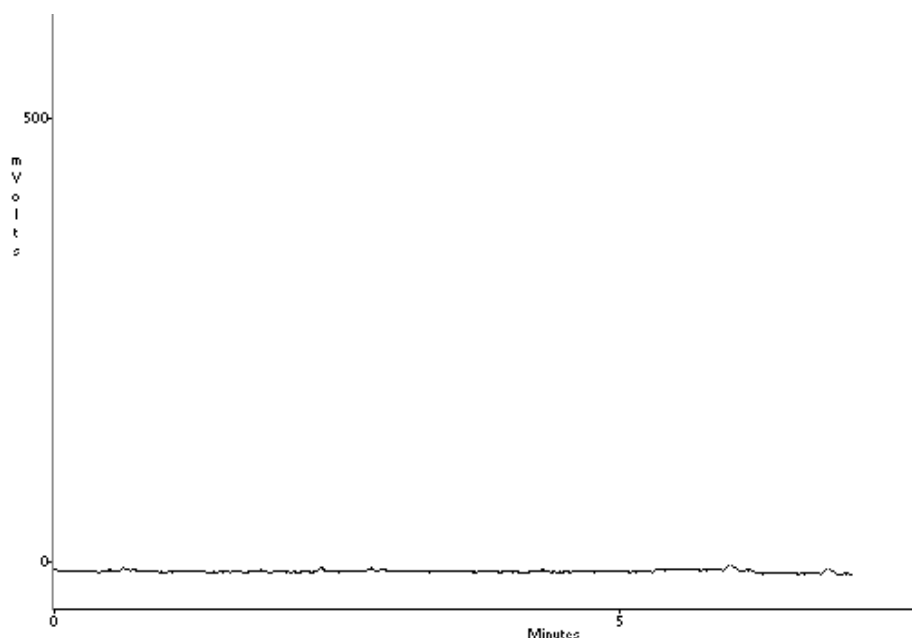
Η χρωματογράφιση των διαλυμάτων του placebo με την πρότυπη ουσία, απέδειξε ότι κανένα από τα έκδοχα δεν παρεμποδίζει τον προσδιορισμό του φαρμάκου στις επιλεγμένες συνθήκες κατεργασίας των δειγμάτων. Ακόμη και το στετικό μαγνήσιο και το μεθακρυλικό αμμώνιο, έκδοχα του σκευάσματος Li_2SO_4 που περιέχουν τα ιόντα μαγνησίου και αμμωνίου, παρέμειναν αδιάλυτα και απομακρύνθηκαν κατά την κατεργασία των δισκίων (βλ. Σχήμ. 5.2- 5.5).

Όλα τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα:

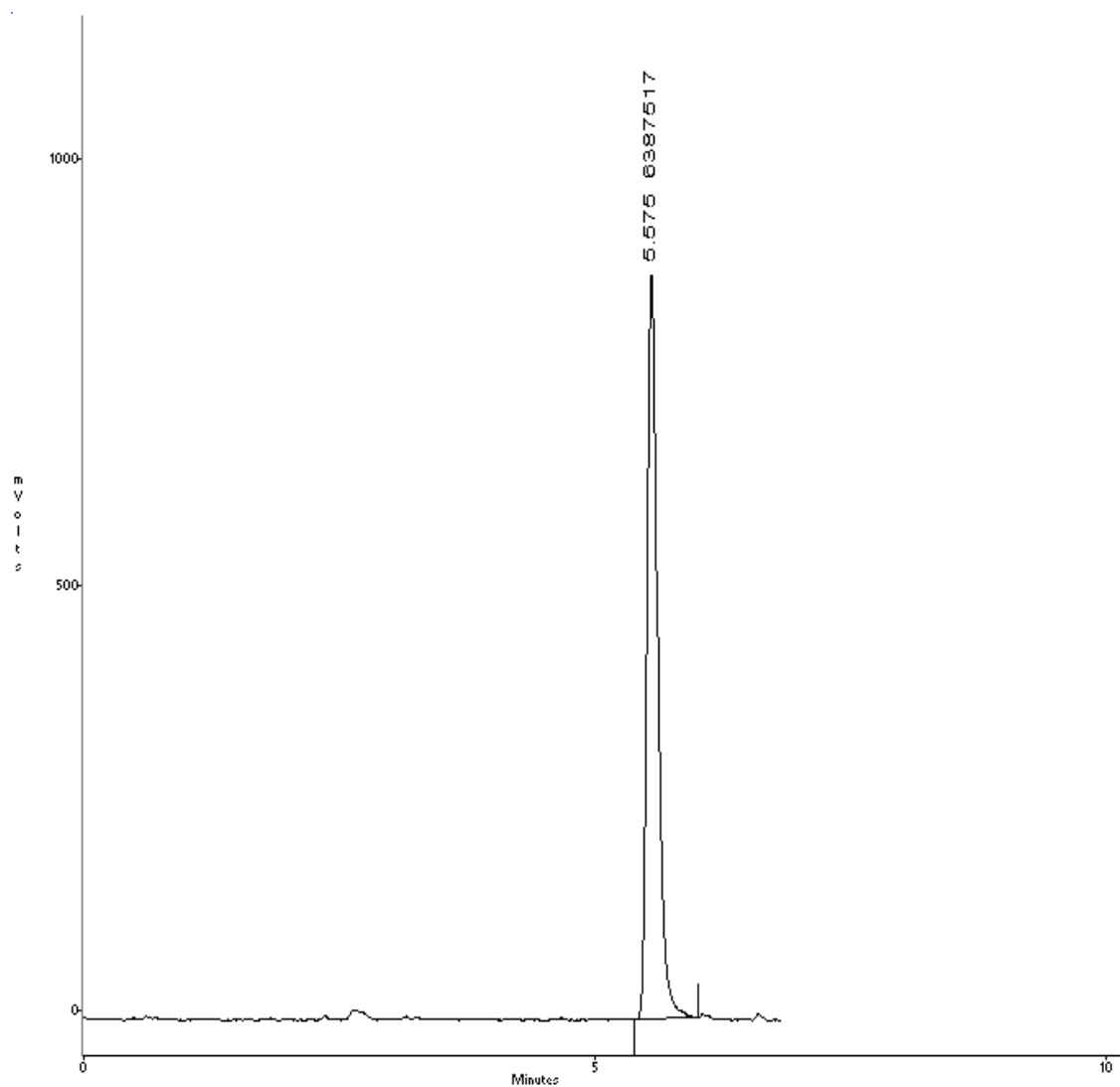
Πίνακας 5.5: Αποτελέσματα ελέγχου περιεκτικότητας λιθίου στα σκευάσματα – Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης.

Σκεύασμα Milithin® (Li ₂ CO ₃)			
Ονομαστική περιεκτικότητα: 56,37 mg Li ⁺ / καψάκιο			
Δείγμα	Περιεκτικότητα Li ⁺ (mg/cap)	Περιεκτικότητα %	
Milithin	57,97(±0,45)	102,85(±0,80)	
	C _o (mg Li ⁺ /100mL)	C _{sp} (mg Li ⁺ /100mL)	% Ανάκτηση (Εξ.5.2)
Milithin + Li ₂ CO ₃	14,49	31,74	111,0
Σκεύασμα Lithiofor® (Li ₂ SO ₄)			
Ονομαστική περιεκτικότητα: 83,32 mg Li ⁺ / δισκίο			
Δείγμα	Περιεκτικότητα Li ⁺ (mg/tab)	Περιεκτικότητα %	
Lithiofor	91,0(±1,9)	109,2(±2,2)	
	C _o (mg Li ⁺ /100mL)	C _{sp} (mg Li ⁺ /100mL)	% Ανάκτηση (Εξ.5.2)
Lithiofor + Li ₂ SO ₄	12,89	22,60	97,0

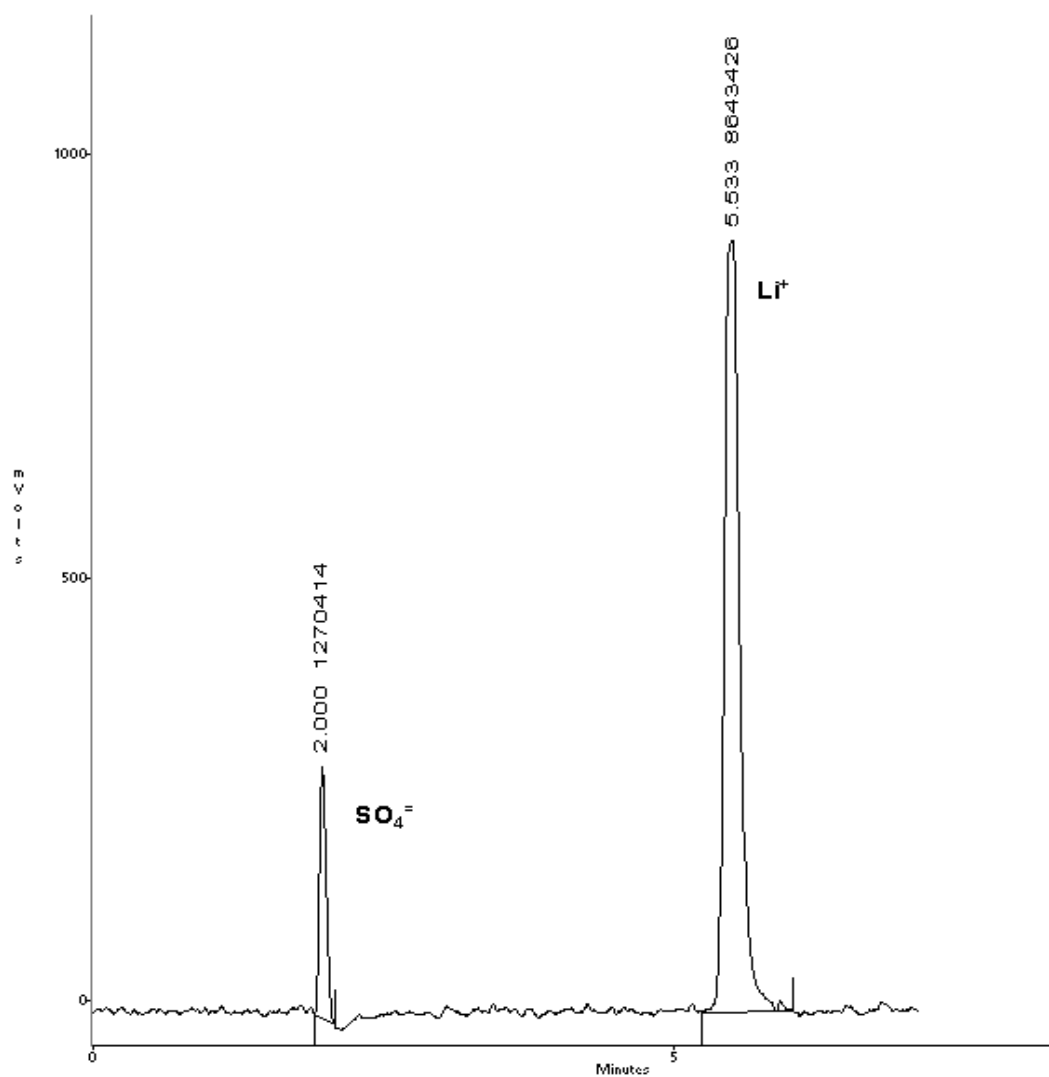
Ακολουθούν ενδεικτικά χρωματογράφημα του προσδιορισμού των αλάτων του λιθίου με το μηχανισμό ζεύγους ιόντων.



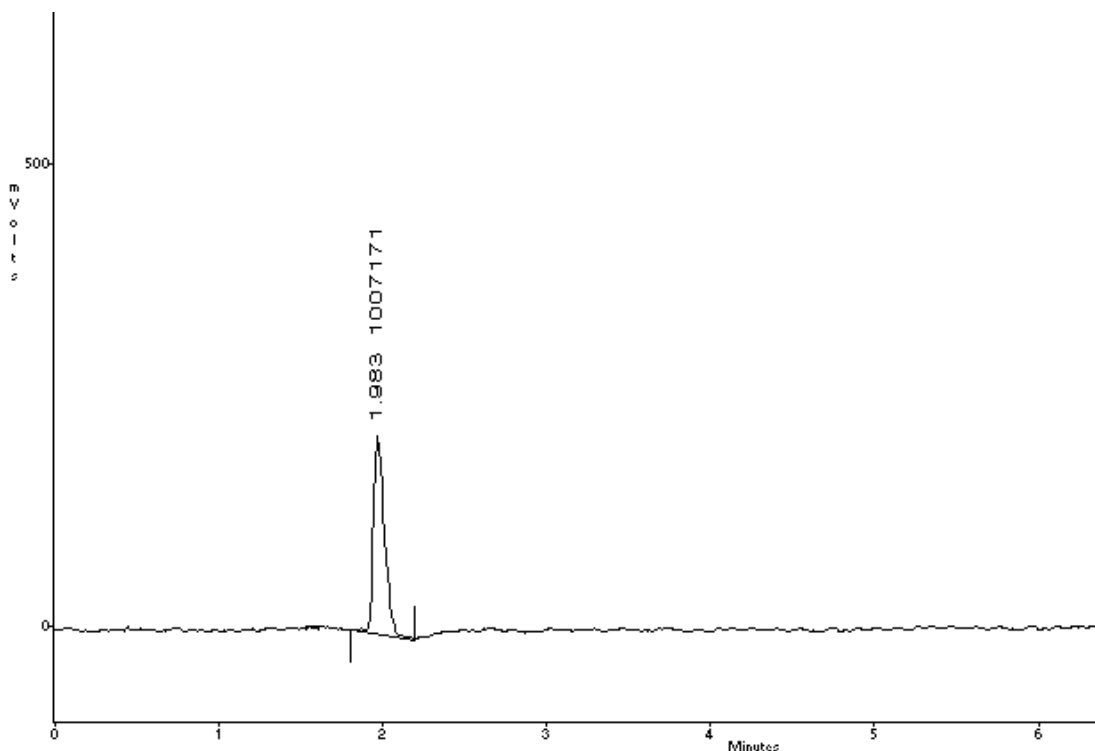
Σχήμα 5.2: Χρωματογράφημα placebo σκευάσματος Li₂CO₃ αναλυμένου με μηχανισμό RP-ion-pair και ισοκρατική έκλουση με μίγμα NFPA:CH₃COOH 90:10 v/v.



Σχήμα 5.3:Χρωματογράφημα σκευάσματος Li_2CO_3 αναλυμένου με μηχανισμό RP-ion-pair και ισοκρατική έκλουση με μίγμα NFPA: CH_3COOH 90:10 v/v. Χρόνος κατακράτησης ιόντων Li^+ : $t_R=5,57$ min.



Σχήμα 5.4: Χρωματογράφημα σκευάσματος Li_2SO_4 αναλυμένου με μηχανισμό RP-ion-pair και ισοκρατική έκλουση με μίγμα NFPA: CH_3COOH 90:10 v/v. Χρόνος κατακράτησης ιόντων Li^+ : $t_R=5,53$ min.



Σχήμα 5.5: Χρωματογράφημα αραιού δ/τος H_2SO_4 με μηχανισμό RP-ion-pair και ισοκρατική έκλουση με μίγμα NFPA: CH_3COOH 90:10 v/v όπου φαίνεται η έκλουση των θειικών ιόντων $-\text{SO}_4^{2-}$ στα 2,00 min περίπου.

5.5.5. Συμπεράσματα – Συζήτηση

1. Παρ' όλο που σκοπός του παρόντος κεφαλαίου ήταν ο διαχωρισμός και ο προσδιορισμός μόνο των αλάτων του λιθίου, θεωρήθηκε χρήσιμο να επιχειρηθεί η βελτιστοποίηση της μεθόδου, με το διαχωρισμό των ιόντων Li^+ από τα υπόλοιπα ιόντα της οικογένειας των αλκαλίων, κυρίως από τα Na^+ και K^+ που είναι και τα πιο κοινά. Παρ' όλο που τα φαρμακευτικά σκευάσματα που εξετάστηκαν δε διαθέτουν τα εν λόγω ιόντα στα έκδοχά τους, η σκοπιμότητα αυτής της διαδικασίας έγινε εμφανής κατά την προσπάθεια προσδιορισμού του λιθίου σε βιολογικά δείγματα πλάσματος αίματος και ούρων που ακολουθεί στο παρόν κεφάλαιο.

Έτσι, από το χρωματογράφημα του σχήματος 5.1 φαίνεται ότι ενώ ο διαχωρισμός του Li^+ από το K^+ με τη στήλη C_{18} και το μηχανισμό ιοντικών ζευγών, ήταν πλήρης (συντελεστής διαχωρισμού, $R_s = 3,69$), η διαχωριστικότητα του Li^+ και του Na^+ εξαρτόνταν από τις συγκεντρώσεις τους στο δείγμα. Το τελευταίο έγινε εμφανές κατά τον προσδιορισμό του λιθίου σε βιολογικά δείγματα στο υποκεφάλαιο 5.7 που ακολουθεί.

2. Η επιλογή του NFPA ως αντιδραστήριο σχηματισμού ιοντικών ζευγών έγινε διότι, αφενός μεν, το NFPA είναι λιπόφιλο έτσι, ώστε τα σχηματιζόμενα ζεύγη ιόντων να συγκρατούνται ισχυρά στη στήλη C_{18} , αφετέρου δε, είναι ένα πτητικό αντιδραστήριο που δεν αφήνει στερεά κατάλοιπα κατά την εξάτμισή του κι επομένως είναι κατάλληλο για χρήση με τον ELSD.

3. Οι διάφορες κινητές φάσεις που εξετάστηκαν (βλ.πίν.5.1) και τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα, δείχνουν ότι ήταν απαραίτητη η ύπαρξη του οξέος προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των στοιχείων. Ο διαχωρισμός εξαρτάται από την ισχύ των οξέων και τη λιποφιλία των σχηματιζόμενων ιοντικών ζευγών.

4. Η προκατεργασία του δείγματος ήταν απλή και γρήγορη. Η χρήση λουτρού υπερήχων συνεισέφερε στην πληρέστερη διαλυτοποίηση των δειγμάτων. Το σκεύασμα Li_2SO_4 διαλυτοποιήθηκε σε νερό, καθώς η ίδια η δραστική είναι πολύ ευδιάλυτη. Αντίθετα, το Li_2CO_3 έχει πολύ μικρότερη υδατοδιαλυτότητα, γι' αυτό ήταν απαραίτητη η διαλυτοποίηση του σκευάσματος σε αραιό δ/μα HCl κάτι που αποδείχθηκε ότι δεν παρεμποδίζει τον προσδιορισμό.

Δοκιμάστηκε επιπλέον, η διαλυτοποίηση των σκευασμάτων σε δ/μα CH_3COOH 0,01 M αλλά και στην κινητή φάση. Τα αποτελέσματα όμως, του ελέγχου περιεκτικότητας της πρώτης ύλης δε διαφοροποιήθηκαν σημαντικά. Επομένως η επιλογή του μέσου διαλυτοποίησης των σκευασμάτων παρέμεινε η αρχική, κυρίως λόγω του χαμηλότερου κόστους των αντιδραστηρίων.

5. Ο χρόνος κατακράτησης του Li^+ στη στήλη C_{18} ήταν $t_R=5,584(\pm 0,043)$ min, ενώ και ο συντελεστής ασυμμετρίας των κορυφών είχε τιμή πολύ κοντά στη μονάδα, $A_s=1,29(\pm 0,12)$. Σημειώνεται ότι τόσο ο παράγοντας διαχωριστότητας δύο ουσιών, R_s , όσο και ο συντελεστής ασυμμετρίας, A_s , που αναφέρθηκε παραπάνω, υπολογίζονταν αυτόματα από το λογισμικό Class-4VP του ανιχνευτή, αλλά μπορούν να υπολογιστούν και από τις αντίστοιχες σχέσεις τους:

$$R_s = \frac{1,18 \cdot [(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_{0,5B} + W_{0,5A}} \quad (5.5)$$

όπου $W_{0,5}$: είναι το εύρος της κορυφής στο $\frac{1}{2}$ του ύψους της και

$$A_s = \frac{BC}{AC} \quad (5.6)$$

εάν θεωρήσουμε ότι η κορυφή χωρίζεται στα δύο με μία νοητή γραμμή που ξεκινάει από το peak της κορυφής μέχρι τη γραμμή βάσης, AC είναι η απόσταση σε mm από την αρχή της κορυφής μέχρι τη νοητή κεντρική γραμμή και BC η απόσταση από τη γραμμή μέχρι το τέλος της κορυφής. Οι αποστάσεις μετρώνται στο 10% του ύψους της κορυφής.

6. Τα ανθρακικά ιόντα $-\text{CO}_3^{2-}$ στις παρούσες συνθήκες (διαλύτες, θερμοκρασία εξάτμισης) ήταν πτητικά και δεν ανιχνεύονταν στο χρωματογράφημα, αντίθετα από τα θειικά ιόντα $-\text{SO}_4^{2-}$ που έδιναν μια επιπλέον κορυφή στα 2,00 min περίπου.

7. Η ανάκτηση του Li_2CO_3 από το σκεύασμα Milithin® με την προτεινόμενη τεχνική της προσθήκης γνωστής ποσότητας, έδωσε σχετικά αυξημένα αποτελέσματα (~111%). Γι' αυτό το λόγο η ακρίβεια της μεθόδου ελέγχθηκε και με μια εναλλακτική τεχνική, παραλλαγή της τεχνικής πολλαπλής προσθήκης γνωστών ποσοτήτων. Ζυγίστηκε μια ποσότητα του σκευάσματος, m, και πολλαπλάσιες ποσότητες αυτής π.χ. 2m, 3m κ.ο.κ. Για κάθε μία

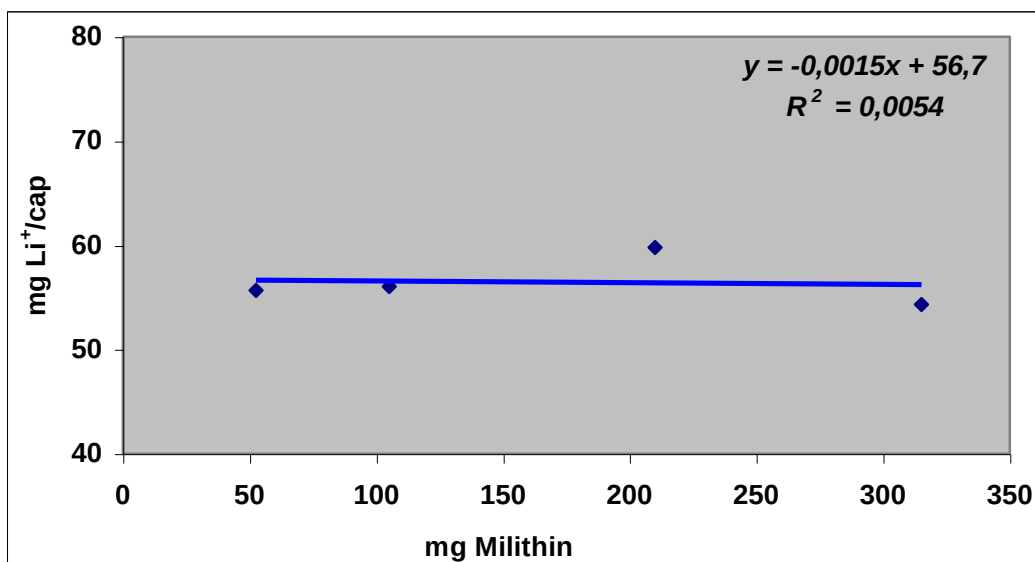
ζύγιση εφαρμόστηκε η ίδια κατεργασία, συμπεριλαμβανομένων και των ίδιων αραιώσεων, και προσδιορίστηκε η ποσότητα δραστικής στο τελικό διάλυμα. Κατασκευάστηκε διάγραμμα της υπολογισμένης ποσότητας δραστικής σε σχέση με τις ζυγισμένες ποσότητες m, 2m, 3m κ.ό.κ. Κάνοντας αναγωγή του αποτελέσματος ανά βάρος καψακίου, θα έπρεπε η καμπύλη του διαγράμματος να είναι ευθεία παράλληλη στον άξονα x.

Τα αποτελέσματα του εν λόγω πειράματος για το σκεύασμα Li_2CO_3 παρατίθενται περιληπτικά στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 5.6: Αποτελέσματα ανάκτησης Li_2CO_3 από το σκεύασμα Milithin[®] με την τεχνική των πολλαπλών ζυγίσεων/προσθηκών.

Ποσότητα δείγματος (mg)	Περιεκτικότητα Li^+ (mg/cap)
0,5m = 52,5	55,7(±3,2)
m = 105	56,04(±0,68)
2m = 210	59,8(±1,2)
3m = 315	54,296(±0,049)

Η καμπύλη του διαγράμματος που προέκυψε έχει τη μορφή του σχήματος 5.6.



Σχήμα 5.6: Καμπύλη πειράματος ανάκτησης Li_2CO_3 από το σκεύασμα Milithin[®] με την τεχνική των πολλαπλών ζυγίσεων/προσθηκών.

Η ευθεία που προέκυψε από το διάγραμμα $\log A = -0,015 \cdot \log C + 56,7$ δείχνει ότι, ανεξαρτήτως της ζυγισμένης ποσότητας σκευάσματος, η περιεκτικότητα ιόντων Li^+ ανά καψάκιο παρέμενε πρακτικά σταθερή και ίση με 56,7 mg Li^+ /cap, που ήταν πολύ κοντά στην ονομαστική περιεκτικότητα του σκευάσματος.

5.6. Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC-ELSD για τον Προσδιορισμό Αλάτων του Λιθίου σε Φαρμακευτικά Σκευάσματα με το Μηχανισμό Κατιονανταλλαγής (Ion-Exchange Chromatography)

5.6.1. Εισαγωγή – Γενικά για το μηχανισμό ιοντανταλλαγής^[1,2]

Οι μηχανισμοί ιοντανταλλαγής βασίζονται στις ισορροπίες ανταλλαγής μεταξύ των ιόντων στο διάλυμα της κινητής φάσης με τα ακινητοποιημένα, αντίθετου φορτίου, ιόντα στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας της διαφορετικής συγγένειας που έχουν τα ιόντα του δείγματος και τα ιόντα του εκλουστικού με αυτά της στατικής φάσης. Οι φυσικές ουσίες με ιονανταλλακτικές ιδιότητες, όπως οι άργιλοι και οι ζεόλιθοι, που χρησιμοποιούνταν παλιότερα, αντικαταστάθηκαν αργότερα από τις συνθετικές ιονανταλλακτικές ρητίνες που χρησιμοποιούνται έως σήμερα.

Οι τελευταίες είναι συμπολυμερή δίκτυα (π.χ. στυρένιο/διβινυλοβενζόλιο ή αιθυλβινυλοβενζόλιο/διβινυλοβενζόλιο, όπως η στήλη της παρούσας εργασίας, κ.ά.) στα οποία είναι χημικά ακινητοποιημένες οι ιονανταλλακτικές ομάδες. Για τον προσδιορισμό κατιόντων, οι πιο συνηθισμένες είναι η σουλφονική, $-\text{SO}_3^-\text{H}^+$, και η καρβοξυλική, $-\text{COO}^-\text{H}^+$, ομάδα, ενώ για τον προσδιορισμό ανιόντων χρησιμοποιούνται τριτοταγείς ή πρωτοταγείς αμινομάδες ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$ και $-\text{NH}_3^+\text{OH}^-$, αντίστοιχα).

Στην περίπτωση αντίδρασης ενός μονοφορτισμένου ιόντος M^+ με μια καρβοξυλιωμένη ρητίνη, όπως αυτή της στήλης CS14 της παρούσας εργασίας, η σταθερά ισορροπίας K , της αντίδρασης ιονανταλλαγής έχει τη μορφή:

$$\frac{[\text{RCOO}^-\text{M}^+]_s \cdot [\text{H}^+]_{\text{aq}}}{[\text{RCOO}^-\text{H}^+]_s \cdot [\text{M}^+]_{\text{aq}}} \approx \frac{[\text{RCOO}^-\text{M}^+]_s}{[\text{M}^+]_{\text{aq}}} = K \quad (5.5)$$

όπου $[\text{RCOO}^-\text{M}^+]_s$ και $[\text{RCOO}^-\text{H}^+]_s$ είναι οι συγκεντρώσεις, σωστότερα οι ενεργότητες, των M^+ και H^+ στη στερεά φάση. Όταν η K έχει μεγάλη τιμή, υπάρχει ισχυρή τάση κατακράτησης του M^+ από τη στήλη, ενώ το αντίθετο συμβαίνει όταν η K είναι μικρή. Τα πολυφορτισμένα ιόντα έχουν την τάση να κατακρατούνται ισχυρότερα από τα μονοφορτισμένα, ενώ για ιόντα με το ίδιο φορτίο, οι μεταξύ τους διαφορές σχετίζονται κυρίως με το μέγεθος του εφυδατωμένου ιόντος.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν περισσότερο το διαχωρισμό των ιόντων των αναλυτών είναι το είδος και η συγκέντρωση των ιόντων της κινητής φάσης, η θερμοκρασία, η ταχύτητα ροής, το είδος και η συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη του εκλουστικού. Γενικά, αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων της κινητής φάσης δρα ανταγωνιστικά με τα ιόντα της στατικής φάσης, ελαττώνοντας την κατακράτηση του αναλύτη. Κατ' επέκταση, η μεταβολή της τιμής pH, επιδρά στην εκλεκτικότητα του διαχωρισμού. Στο μηχανισμό κατιονανταλλαγής, αύξηση της τιμής pH, μειώνει την κατακράτηση, ενώ το αντίθετο συμβαίνει στο μηχανισμό ανιονανταλλαγής. Η αύξηση της θερμοκρασίας, εκτός του ότι ελαττώνει το ιξώδες του εκλουστικού, επιταχύνει το ρυθμό ανταλλαγής ιόντων μεταξύ

στατικής και κινητής φάσης που οδηγεί σε μεγαλύτερη απόδοση της στήλης και καλύτερο διαχωρισμό. Τέλος, η παρουσία οργανικού διαλύτη επηρεάζει το διαχωρισμό του αναλύτη στους μεικτούς μηχανισμούς κατακράτησης, όπου συνυπάρχουν και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

5.6.2. Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια

5.6.2.1. HPLC – ELSD (Υποκ. 3.1 & 3.2)

Χρησιμοποιήθηκε η κατιονανταλλακτική στήλη CS14 IonPac® διαστάσεων 250 x 4 mm της Dionex.

5.6.2.2. Γυάλινα σκεύη – Ογκομετρικά όργανα (Υποκ. 3.4)

5.6.2.3. Διαλύτες – Αντιδραστήρια

A) Διαλύτες

Νερό κατάλληλο για HPLC (βλ. εδάφιο 3.3.1.)

B) Υγρά αντιδραστήρια

i) Τριφθοροξικό οξύ, TFA, καθαρότητας $\geq 98\%$, MW:114,02 g·mol⁻¹, d:1,48 g·mL⁻¹ (Riedel-de-Haën, Seelze, Germany)

ii) Υδροχλωρικό οξύ, HCl, περιεκτικότητας 37%, d:1,19 g·mL⁻¹ (Merck, Darmstadt, Germany)

Γ) Στερεά αντιδραστήρια

Βλέπε 5.5.2.3. παρ.γ

5.6.3. Πειραματική πορεία

5.6.3.1. Παρασκευή διαλυμάτων

➤ Διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions)

Παρασκευάστηκαν δ/τα παρακαταθήκης των LiOH, NaCl, KCl και RbCl όπως έχει περιγραφεί στην παρ.5.5.3.1. σε ογκομετρικές φιάλες των 100 mL με τελική συγκέντρωση ιόντων ίση με 1000 μg·mL⁻¹ τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή δ/τος μίγματος ιόντων.

Σε δύο ογκομετρικές φιάλες των 100 mL ζυγίστηκε ποσότητα Li₂CO₃ ίση με 0,075 g και αντίστοιχα ποσότητα Li₂SO₄ ίση με 0,0825 g. Οι δύο ουσίες διαλύθηκαν σε δ/μα TFA 0,02 M με τη βοήθεια λουτρού υπερήχων για περίπου 5 min ή μέχρις ότου τα διαλύματα να είναι διαυγή. Τα διαλύματα φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και είναι σταθερά για διάστημα τουλάχιστον 2 εβδομάδων.

➤ Διαλύματα εργασίας

Με κατάλληλες αραιώσεις των διαλυμάτων παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν τα διαλύματα εργασίας των προτύπων ουσιών Li_2CO_3 και Li_2SO_4 σε συγκεντρώσεις 0,5, 1,0, 3,0, 5,0 και 8,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ λιθίου. Η τελική αραιώση έγινε στην κινητή φάση.

➤ Διάλυμα μείγματος ιόντων

Παρασκευάστηκε με τον τρόπο που περιγράφεται στο εδάφιο 5.5.3.1. με τελική αραιώση στην κινητή φάση, δηλ. σε δ/μα TFA.

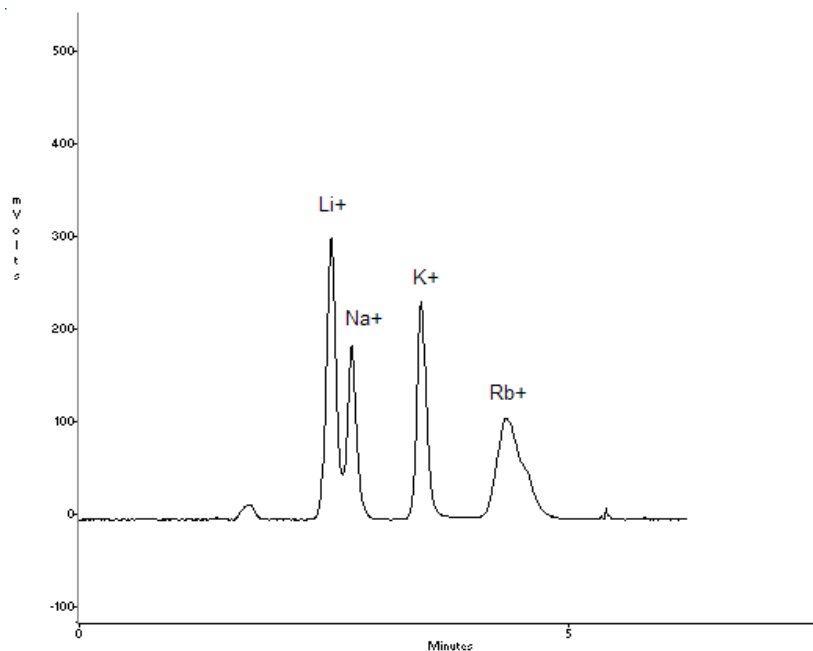
5.6.3.2. Δοκιμές βελτιστοποίησης μεθόδου διαχωρισμού

Για το διαχωρισμό των ιόντων με το μηχανισμό κατιονανταλλαγής, παρασκευάστηκε δ/μα TFA συγκέντρωσης 0,1 M ή 7,7 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{pH}\approx 1,5$). Για την εύρεση της κατάλληλης κινητής φάσης, το δ/μα αυτό αραιώθηκε με νερό σε διάφορες αναλογίες. Οι κινητές φάσεις που προέκυψαν παρατίθενται στον πίνακα 5.7.

Πίνακας 5.7: Δοκιμές κινητών φάσεων για διαχωρισμό των ιόντων με χρωματογραφία κατιονανταλλαγής

Κινητή Φάση	Αναλογία	Τελική συγκέντρωση TFA ($\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$)
TFA:H ₂ O	90:10	6,93
TFA:H ₂ O	60:40	4,62
TFA:H ₂ O	40:60	3,08
TFA:H₂O	20:80	1,54
TFA:H ₂ O	10:90	0,77
TFA:H ₂ O	15:85	1,15

Η συγκέντρωση του TFA που πέτυχε το βέλτιστο διαχωρισμό του μίγματος των ιόντων ήταν, όπως φαίνεται στον πίνακα, στα 1,54 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$. Το χρωματογράφημα που το αποδεικνύει ακολουθεί στο σχήμα 5.7.



Σχήμα 5.7: Χρωματογράφημα μίγματος κατιόντων με μηχανισμό κατιονανταλλαγής και ισοκρατική έκλουση με κινητή φάση δ/τη TFA. Οι χρόνοι κατακράτησης των ιόντων ήταν: Li^+ : $t_R=2,60$ min, Na^+ : $t_R=2,81$ min, K^+ : $t_R=3,52$ min και Rb^+ : $t_R=4,40$ min.

Μετά την ολοκλήρωση των δοκιμών βελτιστοποίησης, οι πειραματικές συνθήκες που διαμορφώθηκαν για τον προσδιορισμό του λιθίου με το μηχανισμό κατιονανταλλαγής, ήταν οι εξής:

Πίνακας 5.8: Πειραματικές συνθήκες χρωματογράφησης

Σύστημα HPLC – ELSD	
Στήλη	Ion Pac CS14 (250 x 4 mm)
Κινητή φάση	TFA 1,54 mL·L ⁻¹
Ταχύτητα ροής κινητής φάσης	0,9 mL·min ⁻¹
Θερμοκρασία ανιχνευτή	70 °C
Ευαισθησία (gain) ανιχνευτή	12
Πίεση φέροντος αερίου	3,5 bar

5.6.3.3. Κατασκευή καμπύλης αναφοράς – Επικύρωση μεθόδου

Κάθε ένα από τα διαλύματα εργασίας εισήχθη στο σύστημα HPLC-ELSD τουλάχιστον τρεις φορές και μετρήθηκε το σήμα απόκρισης, A, του ανιχνευτή. Με βάση αυτές τις μετρήσεις κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς, για κάθε μία από τις ενώσεις, με

τη γραμμική της μορφή (Εξ. 1.11), και υπολογίστηκαν οι τιμές των συντελεστών $\log a$ και b καθώς και ο συντελεστής συσχέτισης, r^2 .

Η κατασκευή των καμπυλών αναφοράς και τα στοιχεία επικύρωσης της μεθόδου (επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα, ακρίβεια, LOD και LOQ) έχουν περιγραφεί στην παρ. 5.5.3.3. και υπολογίστηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο.

5.6.3.4. Κατεργασία σκευασμάτων και προετοιμασία δειγμάτων

- Σκεύασμα Li_2CO_3
- Σκεύασμα Li_2SO_4

Παρά το γεγονός ότι η μέθοδος προσδιορισμού των αλάτων του λιθίου ήταν διαφορετική, ο τρόπος κατεργασίας των σκευασμάτων, όπως προτάθηκε (εδάφιο 5.5.3.4.), ήταν κατάλληλος για εφαρμογή με την κατιονανταλλακτική στήλη. Οι τελικές αραιώσεις των διαλυμάτων, όμως, έγιναν σε δ/μα TFA, σε συγκεντρώσεις που βρίσκονταν στην περιοχή εργασίας της καμπύλης αναφοράς.

5.6.4. Αποτελέσματα

5.6.4.1. Καμπύλες αναφοράς Li_2CO_3 και Li_2SO_4 – Επικύρωση

Οι καμπύλες αναφοράς που ελήφθησαν και για τις δύο ουσίες σε τρεις διαδοχικές ημέρες, με τους συντελεστές $\log a$ και b , παρουσιάζονται ακολούθως. Παρουσιάζονται ακόμη περιληπτικά τα δεδομένα από την επικύρωση της μεθόδου, τα σχετικά με την επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα, καθώς και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Όπου N στους πίνακες, είναι τα σημεία της καμπύλης αναφοράς και n είναι οι επαναλήψεις για κάθε μία συγκέντρωση διαλύματος.

Πίνακας 5.9: Καμπύλες αναφοράς Li_2CO_3 – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου

Ημέρα	Εξίσωση ευθείας	r^2 ($N \geq 4$, $n \geq 4$)	%RSD (0,5 – 8,0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1 ^η	$\log A = 5,793(\pm 0,028) + 1,262(\pm 0,046) \cdot \log C$	0,998	0,85 – 4,1
2 ^η	$\log A = 5,756(\pm 0,016) + 1,270(\pm 0,033) \cdot \log C$	0,9996	0,39 – 2,4
3 ^η	$\log A = 6,0307(\pm 0,0050) + 1,017(\pm 0,010) \cdot \log C$	0,99995	2,6 – 5,3
Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα			
Interday %RSD του $\log a$		2,5	
Interday %RSD του b		10	
LOQ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		0,24	
LOD ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		0,098	

Όμοια, για το Li_2SO_4 τα αντίστοιχα δεδομένα είναι:

Πίνακας 5.10.: Καμπύλες αναφοράς Li_2SO_4 – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου.

Ημέρα	Εξίσωση ευθείας	r^2 ($N \geq 4$, $n \geq 4$)	%RSD (0,5 – 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1 ^η	$\log A = 5,6749(\pm 0,0062) + 1,273(\pm 0,012) \cdot \log C$	0,99992	0,98 – 3,9
2 ^η	$\log A = 5,991(\pm 0,043) + 0,961(\pm 0,073) \cdot \log C$	0,997	2,1 – 3,2
3 ^η	$\log A = 5,952(\pm 0,029) + 1,005(\pm 0,049) \cdot \log C$	0,998	1,1 – 4,2
Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα			
Interday %RSD του loga		2,9	
Interday %RSD του b		10	
LOQ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		0,22	
LOD ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		0,090	

Τα αποτελέσματα της επικύρωσης της μεθόδου κρίθηκαν ικανοποιητικά. Το σχετικά μεγάλο %RSD της τιμής του συντελεστή b κατά τη μελέτη της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγικότητας, οφειλόταν στο γεγονός ότι η τιμή του b εξαρτάται από παράγοντες που σχετίζονται περισσότερο με τη λειτουργία του ανιχνευτή (π.χ. θερμοκρασία θαλάμου εξάτμισης, εκνέφωση κ.ά.) και οι οποίοι δεν είναι απόλυτα ελεγχόμενοι, παρά με το χημικό σύστημα. Ικανοποιητικά χαμηλά ήταν και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου, χαμηλότερα μάλιστα από τα αντίστοιχα του προσδιορισμού του λιθίου με το μηχανισμό ιοντικών ζευγών.

5.6.4.2. Έλεγχος περιεκτικότητας σε δραστική – Έλεγχος ανάκτησης

Για τον προσδιορισμό του λιθίου στο σκεύασμα Milithin[®] εισήχθησαν στο σύστημα HPLC-ELSD με τη σειρά τα εξής διαλύματα:

- Placebo: 30 mg
- Placebo + std Li_2CO_3 : 30 mg + 75 mg
- Σκεύασμα Li_2CO_3 : 105 mg
- Σκεύασμα Li_2CO_3 + std Li_2CO_3 : 105 mg + 75 mg

κατεργασμένα όπως περιγράφηκε (εδάφιο 5.5.3.4.) και αραιωμένα σε κινητή φάση δ/μα TFA.

Όμοια, για τον προσδιορισμό του λιθίου στο σκεύασμα Lithiofor[®] ενέθηκαν τα διαλύματα:

- Placebo: 42,5 mg

- Placebo + std Li_2SO_4 : 42,5 mg + 82,5 mg
- Σκεύασμα Li_2SO_4 : 125 mg
- Σκεύασμα Li_2SO_4 + std Li_2SO_4 : 125 mg + 82,5 mg

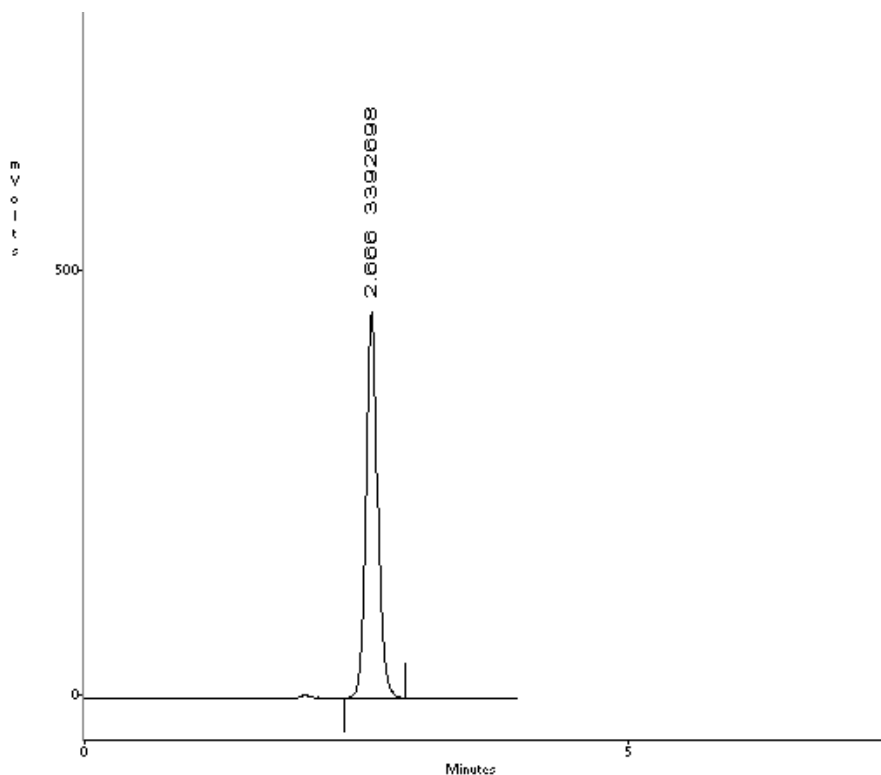
κατεργασμένα όπως περιγράφηκε παραπάνω και αραιωμένα σε δ/μα TFA.

Όλα τα αποτελέσματα του προσδιορισμού των αλάτων του λιθίου, καθώς και τα αποτελέσματα του πειράματος ανάκτησης παρατίθενται στον πίνακα 5.11:

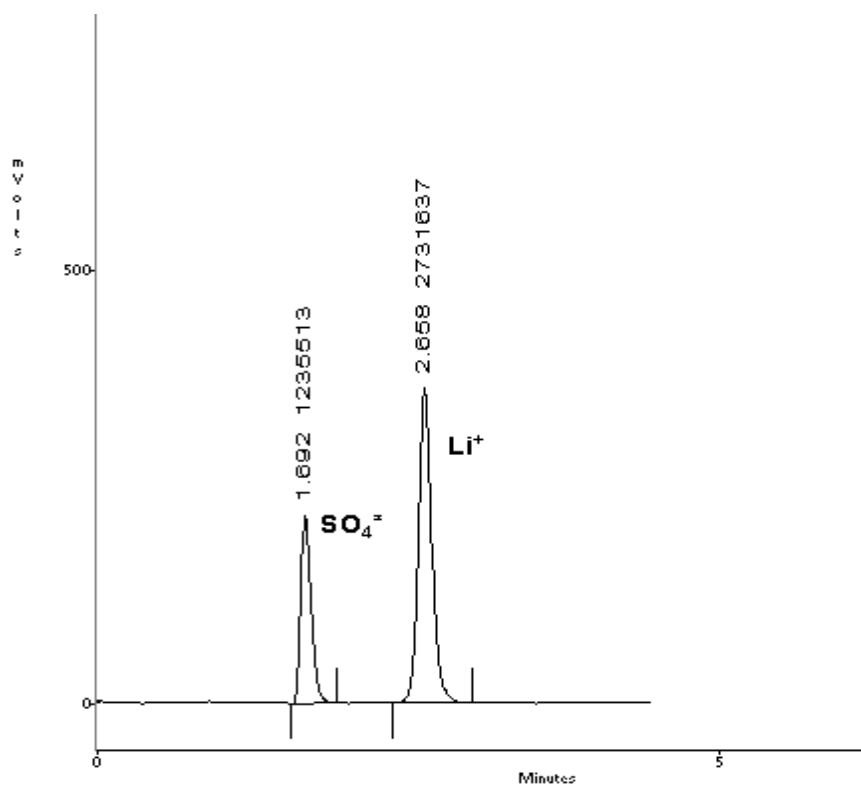
Πίνακας 5.11: Αποτελέσματα ελέγχου περιεκτικότητας λιθίου στα σκευάσματα – Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης.

Σκεύασμα Milithin® (Li_2CO_3)			
Ονομαστική περιεκτικότητα: 56,37 mg Li^+ / καψάκιο			
Δείγμα	Περιεκτικότητα Li^+ (mg/cap)	Περιεκτικότητα %	
Milithin	57,4(±1,1)	101,8(±1,9)	
	C_o (mg Li^+/100mL)	C_{sp} (mg Li^+/100mL)	% Ανάκτηση (Εξ.5.2)
Milithin + Li_2CO_3	14,34	27,61	97,11
Σκεύασμα Lithiofor® (Li_2SO_4)			
Ονομαστική περιεκτικότητα: 83,32 mg Li^+ / δισκίο			
Δείγμα	Περιεκτικότητα Li^+ (mg/tab)	Περιεκτικότητα %	
Lithiofor	88,9(±1,2)	106,7(±1,5)	
	C_o (mg Li^+/100mL)	C_{sp} (mg Li^+/100mL)	% Ανάκτηση (Εξ.5.2)
Lithiofor + Li_2SO_4	11,11	20,68	96,07

Ακολουθούν τυπικά χρωματογραφήματα του προσδιορισμού των αλάτων του λιθίου με το μηχανισμό κατιονανταλλαγής.



Σχήμα 5.8: Χρωματογράφημα σκευάσματος Li_2CO_3 αναλυμένου με μηχανισμό κατιονανταλλαγής και ισοκρατική έκλουση με δ/μα TFA. Χρόνος κατακράτησης ιόντων Li^+ : $t_R=2,66$ min.



Σχήμα 5.9: Χρωματογράφημα σκευάσματος Li_2SO_4 αναλυμένου με μηχανισμό κατιονανταλλαγής και ισοκρατική έκλουση με δ/μα TFA. Χρόνος κατακράτησης ιόντων Li^+ : $t_R=2,65$ min.

5.6.5. Συμπεράσματα – Συζήτηση

1. Από τη σύγκριση των χρωματογραφημάτων 5.1 και 5.7 φαίνεται ξεκάθαρα ότι ο διαχωρισμός των κατιόντων των αλκαλίων ήταν πιο αποτελεσματικός με την κατιονανταλλακτική στήλη παρά με τη στήλη C_{18} . Οι παράγοντες διαχωρισμού των αλκαλίων με τη στήλη CS14 ήταν, με τη σειρά που εκλούονταν τα ιόντα, $RS_{Na^+}=0,89$, $RS_K^+=3,05$ και $RS_{Rb^+}=2,47$.

Πιο σταθερή ήταν και η γραμμή βάσης σε όλα τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν με την εν λόγω μέθοδο.

2. Η κινητή φάση που αποτελείται από αραιό δ/μα TFA, ήταν πολύ απλή, με τιμή $pH \sim 1,8$, απόλυτα συμβατή με τη στήλη η οποία, σύμφωνα με τον κατασκευαστή της, μπορεί να αντέξει και σε πιο ακραίες τιμές pH .

3. Η κατεργασία των δειγμάτων ήταν απλή και γρήγορη. Σημαντικά μικρότερος και εξαιρετικά επαναλήψιμος από μέτρηση σε μέτρηση, σε σχέση με τη στήλη C_{18} , ήταν και ο χρόνος κατακράτησης των ιόντων Li^+ στη στήλη CS14 ($t_R=2,6596(\pm 0,0036)$ min). Ο δε παράγοντας ασυμμετρίας των κορυφών ήταν $As=1,108(\pm 0,029) \rightarrow 1$.

4. Το Li_2CO_3 έδωσε μία μόνο κορυφή, αυτή των ιόντων Li^+ καθώς τα ανθρακικά ιόντα εξατμίζονταν, ενώ αντίθετα, το Li_2SO_4 έδωσε και δεύτερη κορυφή, των θειικών ιόντων στα 1,692 min, όμοια όπως και με τη στήλη C_{18} .

5. Τα έκδοχα των σκευασμάτων παρέμεναν αδιάλυτα κατά την προκατεργασία των δειγμάτων, όπως απέδειξαν και οι μετρήσεις στα placebo δείγματα.

6. Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους, παρατηρήθηκε ότι συμφωνούν σχετικά ως προς την περιεκτικότητα των φαρμακευτικών σκευασμάτων σε δραστικές ουσίες. Για το σκεύασμα Milithin[®] η περιεκτικότητά του σε Li_2CO_3 με το μηχανισμό ιοντικών ζευγών και κατιονανταλλαγής, ήταν αντίστοιχα 102,85% και 101,76%, με τη δεύτερη μέθοδο να εμφανίζει πιο αποδεκτά αποτελέσματα ανάκτησης (~97%) γεγονός που υποδηλώνει μικρότερο συστηματικό σφάλμα. Το σκεύασμα Lithiofor[®] εμφάνισε, και με τις δύο μεθόδους, υψηλά σχετικά ποσοστά περιεκτικότητας της δραστικής (106-110%). Παρά το γεγονός ότι δοκιμάστηκαν κι άλλα μέσα διαλυτοποίησης του Lithiofor, τα ποσοστά περιεκτικότητας σε Li_2SO_4 παρέμειναν πρακτικά τα ίδια. Η τιμή της ανάκτησης (>96%) αποδεικνύει ότι δεν υπήρχε σημαντικό συστηματικό σφάλμα.

5.7. Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC-ELSD για τον Προσδιορισμό του Λιθίου σε Βιολογικά Δείγματα Πλάσματος Αίματος και Ούρων

5.7.1. Εισαγωγή

Το μικρό εύρος μεταξύ των θεραπευτικών και των τοξικών επιπέδων του λιθίου στον οργανισμό, καθιστά απαραίτητη τη συνεχή παρακολούθηση (monitoring) του ασθενούς που ακολουθεί θεραπεία με λίθιο έτσι ώστε να παραμείνουν τα επίπεδα του στοιχείου μέσα στα επιτρεπτά όρια, καθώς οποιαδήποτε παρέκκλιση μπορεί να δημιουργήσει σοβαρές παρενέργειες.

Η μέτρηση του λιθίου γίνεται σήμερα με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας ατομικής απορρόφησης, κατά κύριο λόγο στο πλάσμα αίματος και δευτερευόντως στα ούρα του ασθενούς. Στο υποκεφάλαιο που ακολουθεί, περιγράφονται οι προσπάθειες για τον προσδιορισμό του λιθίου σε πλάσμα και ούρα με τη μέθοδο HPLC-ELSD. Και στις δύο περιπτώσεις, τα υποστρώματα προήλθαν από υγιή άτομα που δεν ακολουθούν θεραπεία με λίθιο ή άλλα φάρμακα.

5.7.2. Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια

5.7.2.1. HPLC – ELSD (Υποκ. 3.1 & 3.2)

5.7.2.2. Γυάλινα σκεύη – Ογκομετρικά όργανα (Υποκ. 3.4)

5.7.2.3. Διαλύτες – Αντιδραστήρια

A) Διαλύτες

- i) Νερό κατάλληλο για HPLC (εδάφιο 3.3.1).
- ii) Ακετονιτρίλιο HPLC καθαρότητας 99,9% (Lab Scan, Dublin Ireland)

B) Υγρά αντιδραστήρια

Περιγράφονται στις παρ.5.5.2.3 (B) και 5.6.2.3. (B)

Γ) Στερεά αντιδραστήρια

Ανθρακικό λίθιο, Li_2CO_3 , αναλυτικής καθαρότητας, Mr:73,89 (Merck)

5.7.3. Προσπάθεια προσδιορισμού λιθίου σε πλάσμα αίματος

Το πλάσμα αίματος είναι το υπερκείμενο υγρό συστατικό του αίματος με αντιπηκτικό, που προκύπτει μετά από φυγοκέντρηση και απομάκρυνση των εμμόρφων συστατικών, μέσα στο οποίο ρέουν τα κύτταρα, ερυθρά και λευκά. Έχει κίτρινο χρώμα, αποτελεί το 55% περίπου του συνολικού όγκου του αίματος και περιέχει νερό σε ποσοστό 90%. Περιέχει ακόμη διαλυμένες πρωτεΐνες (αλβουμίνη, γλοβουλίνη, αντισώματα κ.ά), γλυκόζη, παράγοντες πήξης του αίματος, μεταλλικά ιόντα και ηλεκτρολύτες (Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , κ.ά), ορμόνες και διοξειδιο του άνθρακα. Περιέχει ακόμη τα συστατικά που προέρχονται από εξωγενείς παράγοντες, όπως είναι οι μικροοργανισμοί και οι φαρμακευτικές ουσίες. Η πυκνότητα του πλάσματος είναι περίπου $1,025 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1[233]}$. Πρόκειται, επομένως για ένα

περιβάλλον πολύπλοκο, πολύ πλούσιο σε διαφορών ειδών ουσίες με διαφορετική χημική συμπεριφορά.

Τα θεραπευτικά όρια του λιθίου, στο πλάσμα του αίματος, κυμαίνονται από 0,5 – 1,25 mEq·L⁻¹ που ισοδυναμεί με 3,47 – 8,67 μg·mL⁻¹ Li⁺. Ο έλεγχος της μεθόδου έγινε με προσθήκη (spiking) ποσότητας λιθίου σε «καθαρό» πλάσμα και η ποσότητα αυτή κυμαίνεται στα παραπάνω όρια.

Αρχικά, έγινε καταβύθιση των πρωτεϊνών του πλάσματος με ACN. Η καταβύθιση έγινε με προσθήκη του δ/τη ACN στο δοχείο όπου βρισκόταν το πλάσμα. Το μίγμα αφέθηκε λίγα min μέχρι να ολοκληρωθεί η αντίδραση και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε προκειμένου να απομακρυνθεί το σχηματιζόμενο ίζημα. Ο προσδιορισμός του λιθίου έγινε στο υπερκείμενο δ/μα πλάσματος που θεωρητικά είναι πλέον απαλλαγμένο από τις πρωτεΐνες του.

Προκειμένου να βρεθεί η ποσότητα ACN που προκαλεί τη βέλτιστη καταβύθιση, δοκιμάστηκαν οι εξής αναλογίες:

i) πλάσμα : ACN σε αναλογία 1 : 3 v/v και

ii) πλάσμα : ACN σε αναλογία 1 : 1 v/v

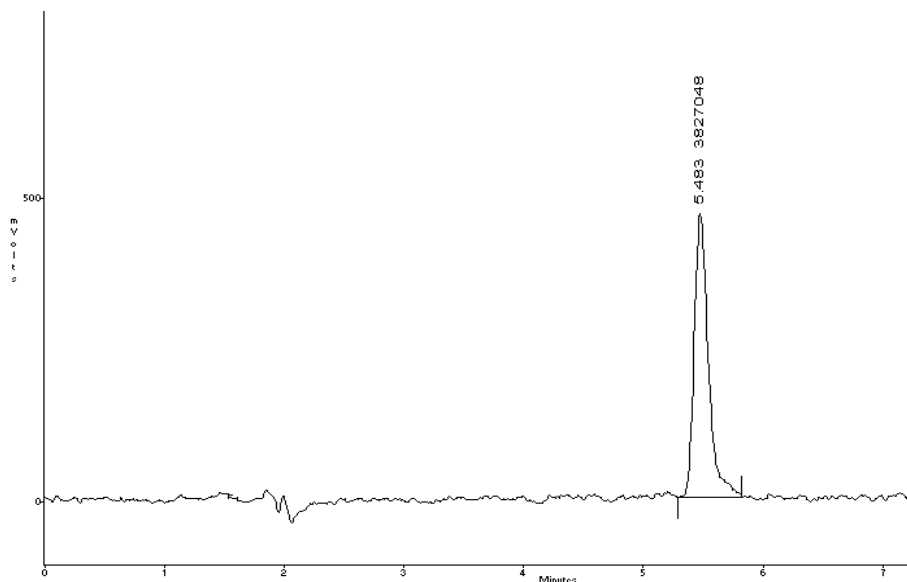
όπου η αναλογία 1 : 3 προκάλεσε μεγαλύτερη καταβύθιση πρωτεϊνών.

Έγινε εμβολιασμός δείγματος πλάσματος με πρότυπο δ/μα Li⁺ αρχικής συγκέντρωσης 10 μg·mL⁻¹ έτσι, ώστε η τελική συγκέντρωση του μετάλλου να βρίσκεται εντός των αποδεκτών θεραπευτικών ορίων και κατόπιν αναλύθηκε το δείγμα με τις δύο προτεινόμενες μεθόδους προσδιορισμού του λιθίου. Οι αναλογίες των μιγμάτων του πλάσματος στα οποία προσδιορίστηκε το λίθιο και ενδεικτικά χρωματογραφήματα από τις λαμβανόμενες μετρήσεις τους παρατίθενται στους πίνακες 5.12-5.13 και στα σχήματα που ακολουθούν ως εξής:

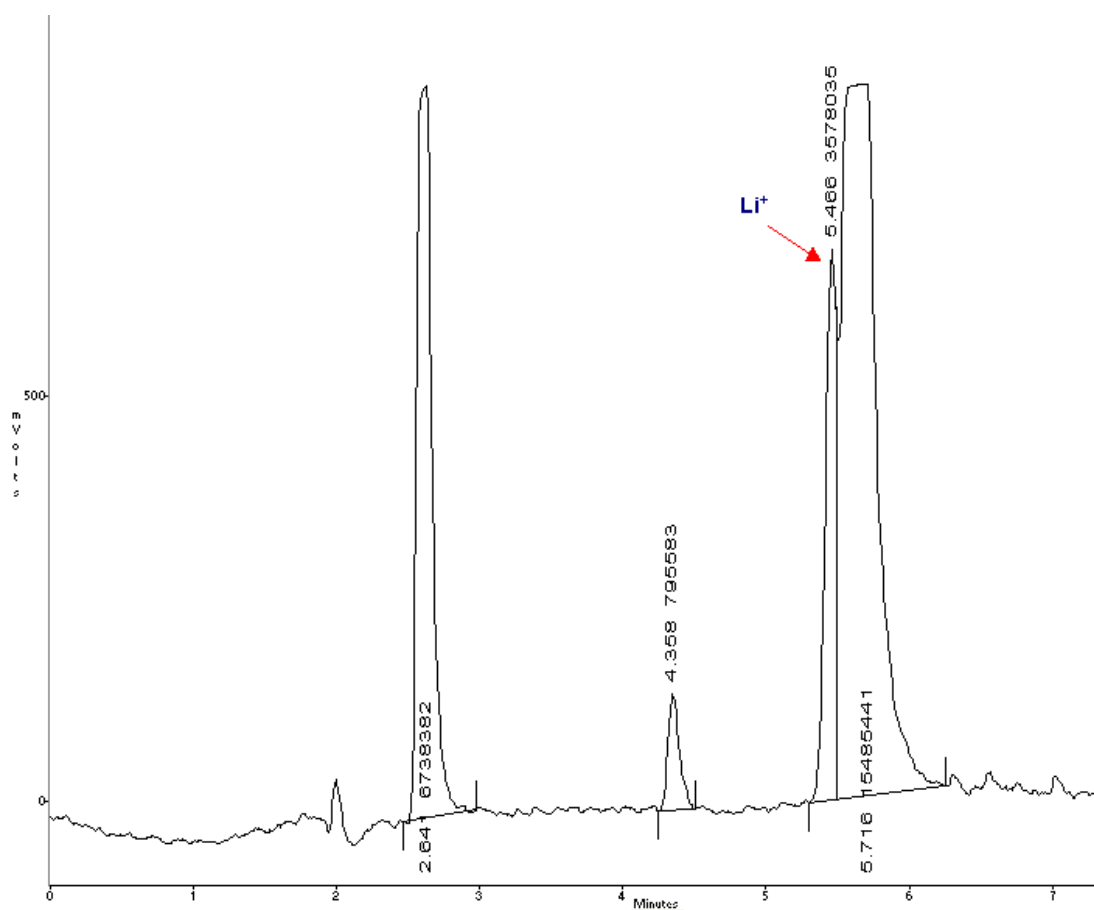
Πίνακας 5.12: Παρασκευή δειγμάτων για προσδιορισμό του λιθίου σε πλάσμα αίματος με μηχανισμό ion-pair και στήλη C₁₈.

α/α δείγματος	Δ/μα Li ⁺ (mL) ^a	Πλάσμα (mL)	Διαλύτης (mL)	Τελική συγκέντρωση Li ⁺ (μg·mL ⁻¹)
1 (blank)	0,4	-	H ₂ O : 0,6	4
2	0,4	0,1	H ₂ O : 0,5	4
3	0,1	0,4	H ₂ O : 0,5	1
4	0,1	0,5	ACN : 1,4	0,5

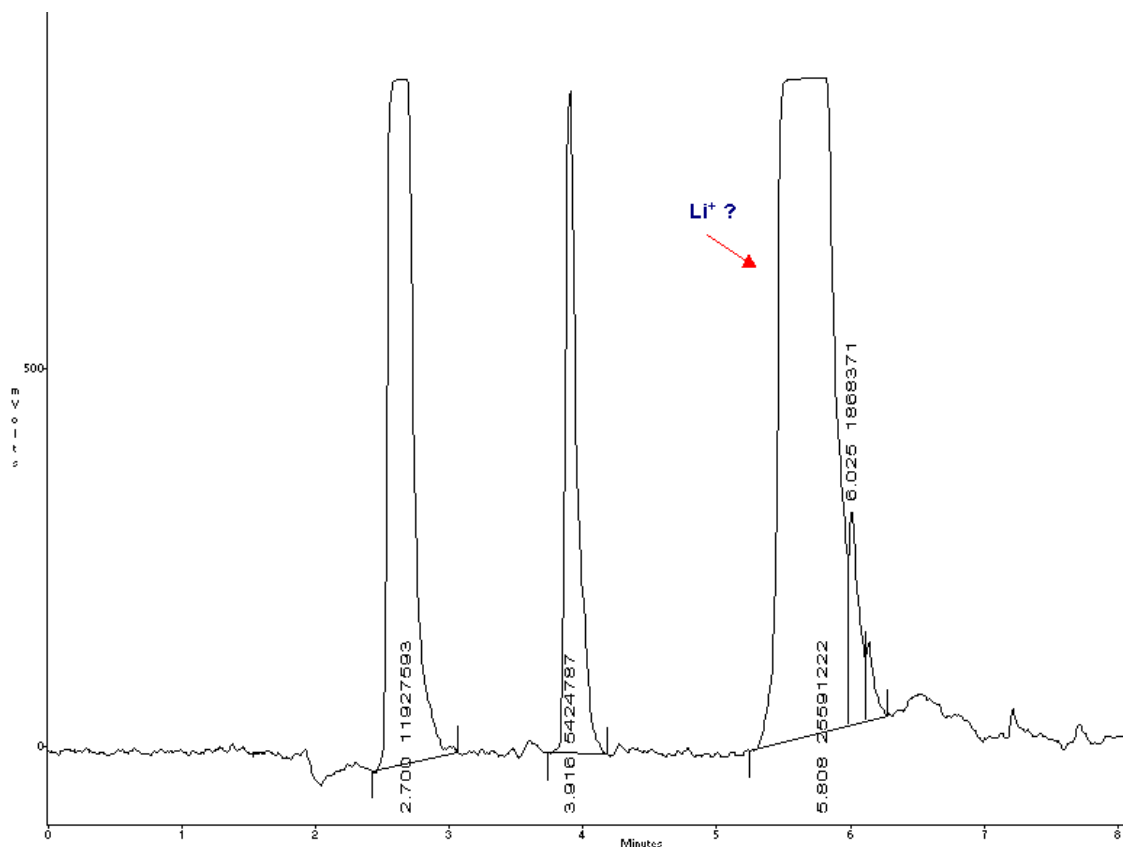
a: αρχική συγκέντρωση πρότυπου δ/τος Li⁺ 10 μg·mL⁻¹



Σχήμα 5.10:Χρωματογράφημα δείγματος 1 (*blank*) πρότυπου δ/τος Li^+ με στήλη C_{18} και μηχανισμό RP-ion-pair (ισοκρατική έκλουση με μίγμα NFPA: CH_3COOH 90:10 v/v).



Σχήμα 5.11:Χρωματογράφημα δείγματος 2 πλάσματος αίματος τελικής συγκέντρωσης Li^+ ίσης με $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ με στήλη C_{18} (ισοκρατική έκλουση με μίγμα NFPA: CH_3COOH 90:10 v/v).



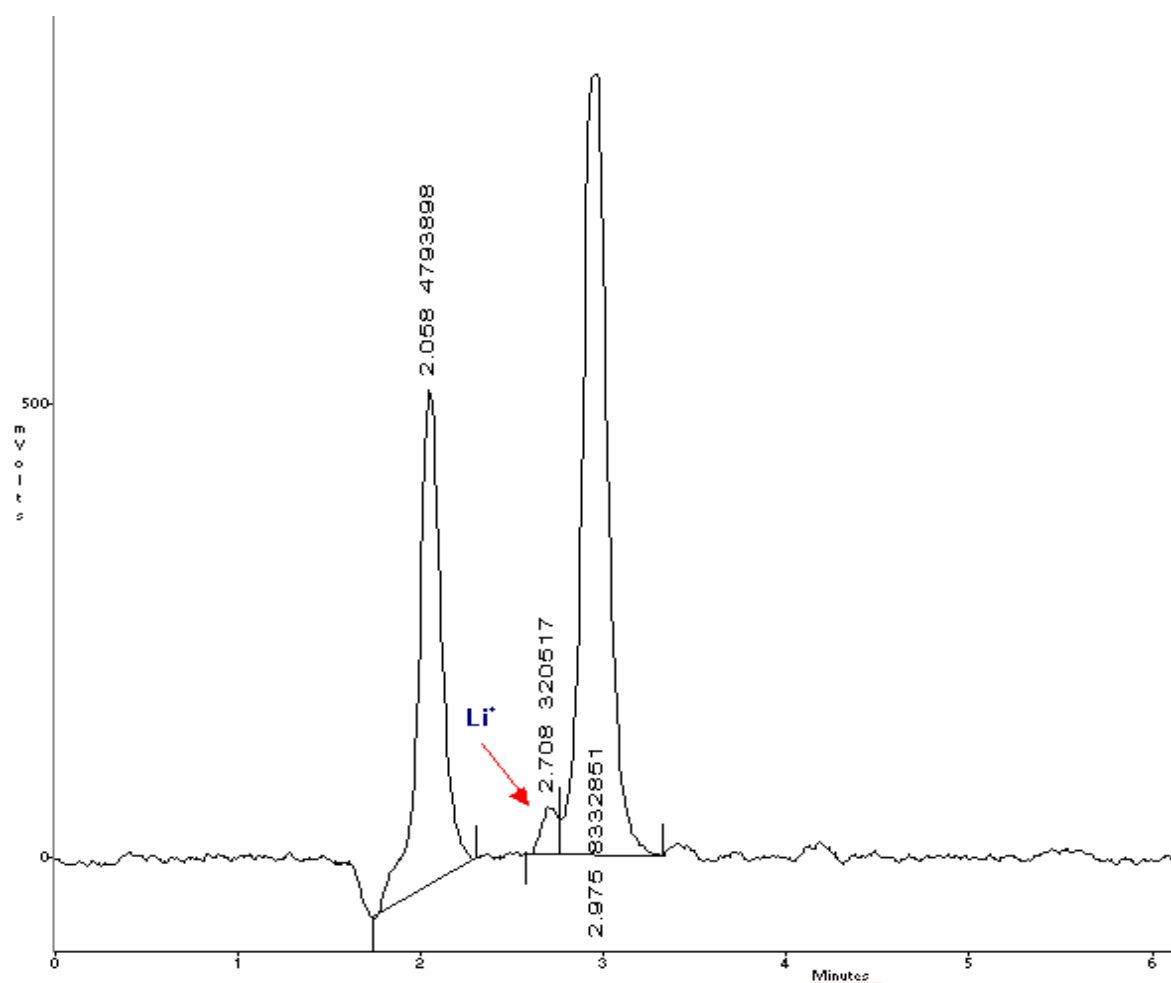
Σχήμα 5.12: Χρωματογράφημα δείγματος 3 πλάσματος αίματος τελικής συγκέντρωσης Li^+ ίσης με $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ με στήλη C_{18} (ισοκρατική έκλουση με μίγμα NFPA: CH_3COOH 90:10 v/v).

Όμοια, τα αποτελέσματα με τη στήλη CS14 και το μηχανισμό κατιονανταλλαγής είναι:

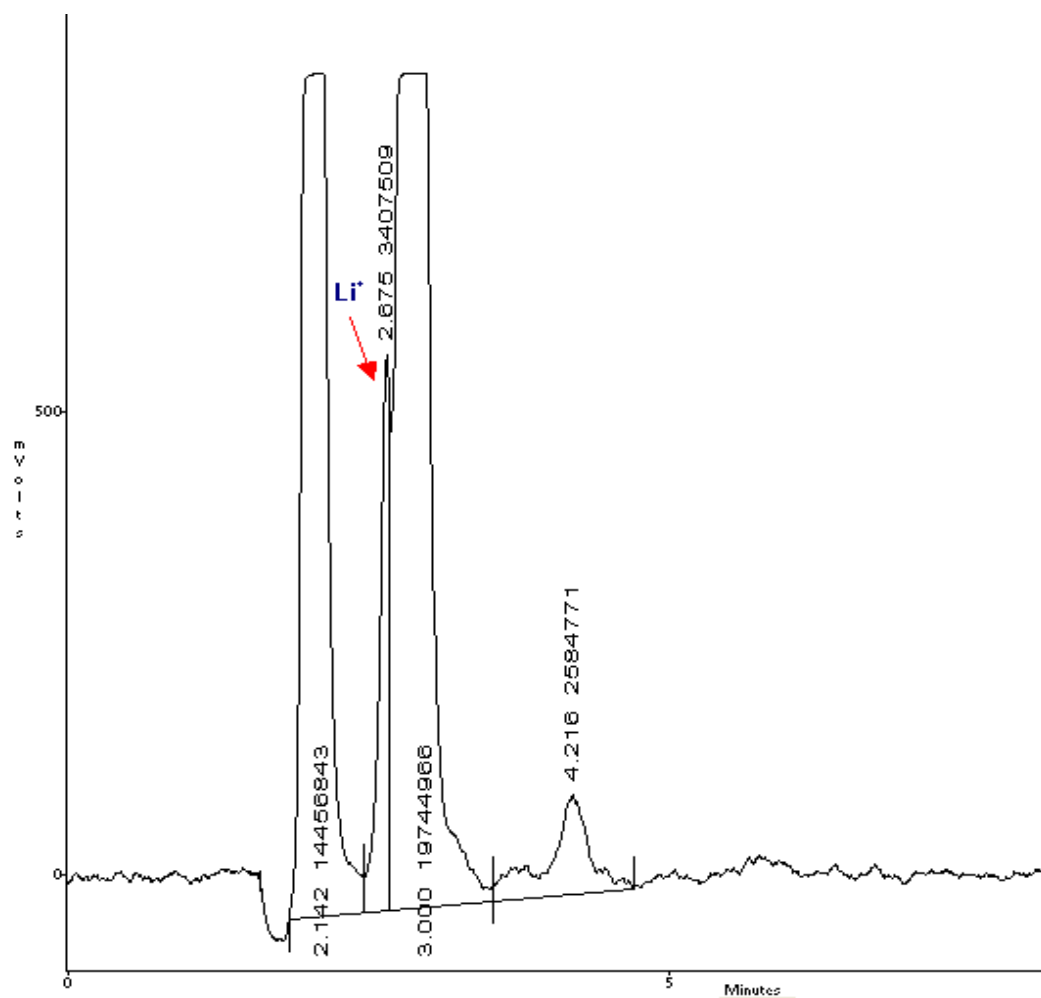
Πίνακας 5.13: Παρασκευή δειγμάτων για προσδιορισμό του λιθίου σε πλάσμα αίματος με μηχανισμό κατιονανταλλαγής και στήλη CS14.

α/α δείγματος	Δ/μα Li^+ (mL) ^a	Πλάσμα (mL)	Διαλύτης (mL)	Τελική συγκέντρωση Li^+ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	0,1	0,05	H_2O : 1,85	0,5
2	0,2	0,2	H_2O : 0,2	3,3
3	0,25	0,1	H_2O : 0,25	4,2

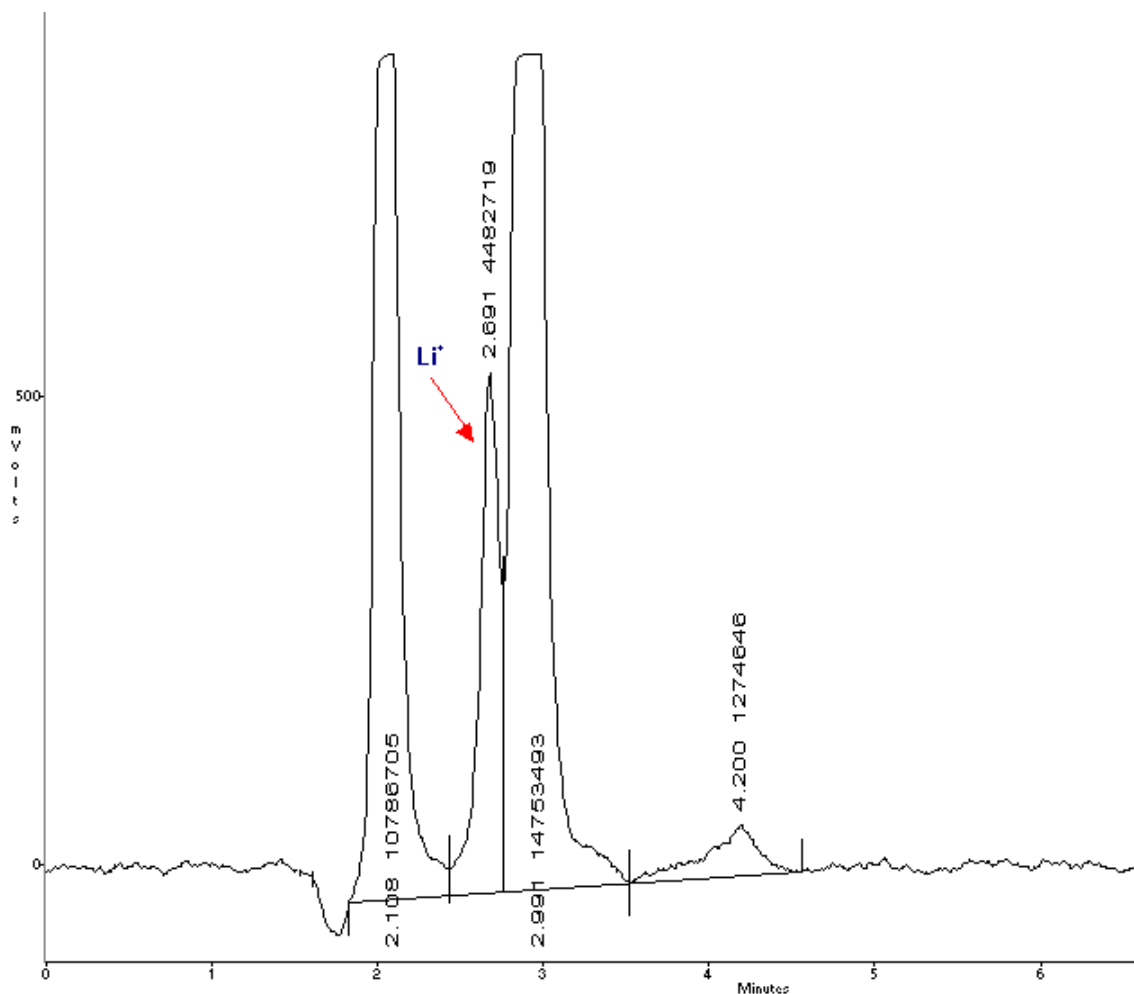
a: αρχική συγκέντρωση πρότυπου δ/τος Li^+ $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$



Σχήμα 5.13: Χρωματογράφημα δείγματος 1 πλάσματος αίματος τελικής συγκέντρωσης Li^+ ίσης με $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ με στήλη CS14 (ισοκρατική έκλουση με δ/μα TFA $1,54 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$). Η πολύ μικρή κορυφή του λιθίου εκλούεται στα 2,71 min.



Σχήμα 5.14:Χρωματογράφημα δείγματος 2 πλάσματος αίματος τελικής συγκέντρωσης Li^+ ίσης με $3,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ με στήλη CS14 (ισοκρατική έκλουση με $\delta/\mu\alpha$ TFA). Η κορυφή του λιθίου στα 2,71 min υπερκαλύπτεται από τη διπλανή της.



Σχήμα 5.15:Χρωματογράφημα δείγματος 3 πλάσματος αίματος τελικής συγκέντρωσης Li^+ ίσης με $4,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ με στήλη CS14 (ισοκρατική έκλουση με δ/μα TFA). Η κορυφή του λιθίου στα 2,71 min, μεγαλύτερη από ότι στα προηγούμενα δείγματα, επίσης υπερκαλύπτεται από τη διπλανή της.

Από την εξέταση όλων των χρωματογραφημάτων φαίνεται ότι ο προσδιορισμός του λιθίου σε πλάσμα αίματος ήταν αδύνατος και με τις δύο προτεινόμενες μεθόδους, καθώς η συγκέντρωση των ιόντων-ηλεκτρολυτών που φυσιολογικά υπάρχουν στο πλάσμα αίματος και που εκλούονταν σε χρόνους πολύ κοντά με του λιθίου, ήταν πολύ μεγάλη, τόσο ώστε οι κορυφές τους να υπερκαλύπτουν, και με τις δύο στήλες, την κορυφή του λιθίου. Μία προκατεργασία που θα αραιώνει τις συγκεντρώσεις κυρίως νατρίου και καλίου θα ήταν χωρίς όφελος καθώς θα προκαλούσε αντίστοιχα αραιώση και της, ούτως ή άλλως, μικρής συγκέντρωσης του λιθίου σε ένα πραγματικό δείγμα ασθενούς.

5.7.4. Προσπάθεια προσδιορισμού λιθίου σε ούρα

Τα ούρα, όπως και το πλάσμα, είναι ένα πολύπλοκο δείγμα. Δε διαθέτουν μεγάλο ποσοστό πρωτεϊνών, αντίθετα από το πλάσμα, περιέχουν όμως μεταβολίτες, αποτέλεσμα των χημικών διεργασιών του οργανισμού, ουρία, διαλυμένα άλατα και οργανικές ενώσεις. Αποτελούνται κατά 95% από νερό και αν δεν υπάρχει κάποια φλεγμονή των νεφρών ή του ουροποιητικού συστήματος, τα ούρα είναι πρακτικώς αποστειρωμένα. Η ποιότητα των ούρων, συμπεριλαμβανομένου του χρώματος, επηρεάζεται από τον τρόπο διατροφής, τη λήψη φαρμάκων, το ποσοστό ενυδάτωσης του οργανισμού και την ύπαρξη ασθενειών. Το pH των ούρων κυμαίνεται μεταξύ 6,5 και 7,4 και η πυκνότητά τους είναι λίγο μεγαλύτερη από $1,0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ [234].

Σε ασθενείς που ακολουθούν θεραπεία με λίθιο, αυτό ανιχνεύεται στα ούρα τους μετά από περίπου 24 ώρες από τη λήψη, σε αντίθεση με το πλάσμα, όπου ανιχνεύεται μετά από 1 - 4 ώρες. Η ποσότητα λιθίου όμως που φτάνει στα ούρα είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη στο πλάσμα, αποτέλεσμα της απέκκρισής του στα νεφρά (βλ. Υποκ. 5.4).

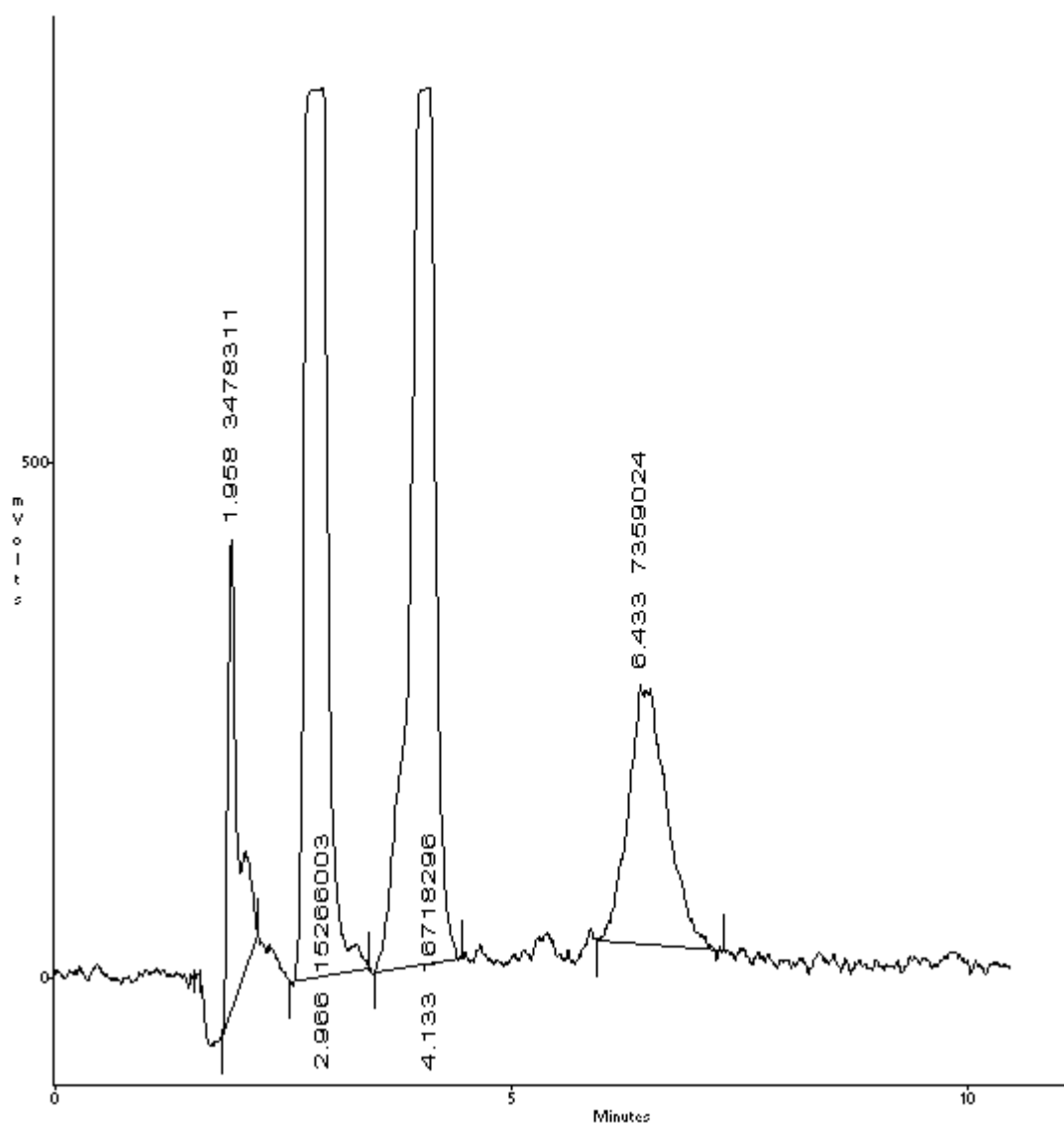
Για τον προσδιορισμό του λιθίου στα ούρα, αρχικά προστέθηκε ACN για την καταβύθιση των ελάχιστων πρωτεϊνών. Η ποσότητα ιζήματος που σχηματίστηκε, παρότι πολύ μικρή, απομακρύνθηκε με φυγοκέντρηση και διήθηση με φίλτρα. Στο υπερκείμενο διάλυμα προστέθηκε υπολογισμένη ποσότητα προτύπου διαλύματος Li^+ αρχικής συγκέντρωσης $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ και το μίγμα αναλύθηκε στο σύστημα HPLC-ELSD με στήλη κατιονανταλλαγής.

Πίνακας 5.14: Παρασκευή δειγμάτων για προσδιορισμό του λιθίου σε ούρα με μηχανισμό κατιονανταλλαγής και στήλη CS14.

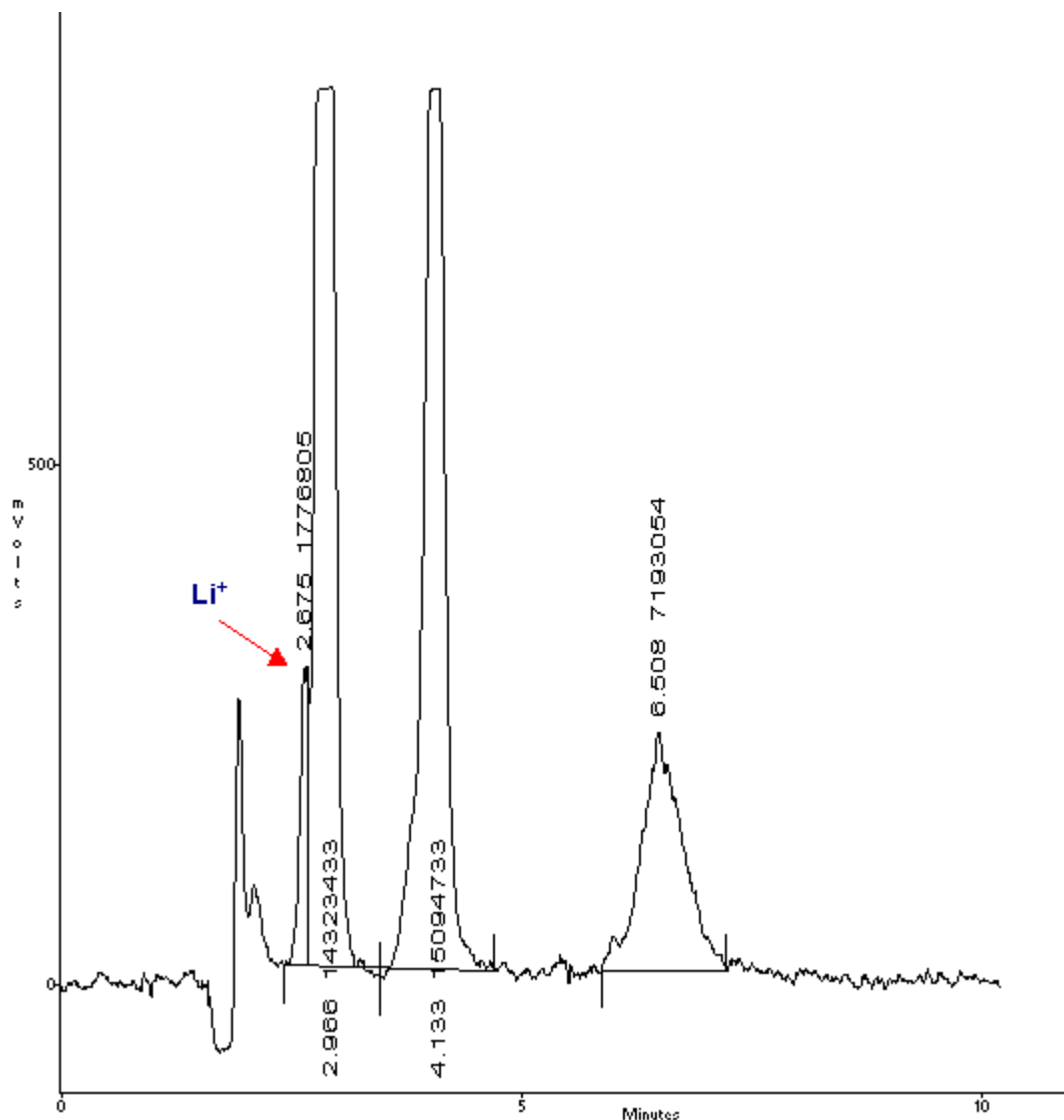
α/α δείγματος	Δ/μα Li^+ (mL)	Ούρα (mL)	Διαλύτης (mL)	Τελική συγκέντρωση Li^+ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
blank	-	0,2	H_2O : 0,8	-
1	0,1 ^a	0,2	H_2O : 0,7	0,5
2	0,1 από πολύ πυκνό δ/μα	0,2	H_2O : 0,7	> 10

a: αρχική συγκέντρωση πρότυπου δ/τος Li^+ $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις των παραπάνω διαλυμάτων είναι τα ακόλουθα:



Σχήμα 5.16:Χρωματογράφημα δείγματος *blank* ούρων με στήλη CS14 (ισοκρατική έκλουση με δ/μα TFA 1,54 mL·L⁻¹).



Σχήμα 5.17:Χρωματογράφημα δείγματος 2 ούρων μεγάλης συγκέντρωσης $\text{Li}^+ > 10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ με στήλη CS14. Η κορυφή του λιθίου εκλούεται στα 2,71 min, αλλά καλύπτεται από τη διπλανή μεγάλης συγκέντρωσης κορυφή.

Από τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων ούρων φαίνεται ότι, όπως και στην περίπτωση του πλάσματος, τα συνυπάρχοντα και συνεκλούμενα ιόντα-ηλεκτρολύτες του δείγματος ούρων είχαν πολύ υψηλή συγκέντρωση και υπερκάλυπταν την κορυφή του λιθίου, το οποίο δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί με την προτεινόμενη μέθοδο. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις, μάλιστα, η κορυφή του λιθίου ήταν πρακτικά αόρατη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΓΙΛΙΟΥ ΚΑΙ ΜΑΓΝΗΣΙΟΥ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

6.1. Εισαγωγή

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται η ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού του αργιλίου, ενός στοιχείου του οποίου είναι γνωστή η φαρμακευτική δράση, κυρίως ως αντιόξινο για την ανακούφιση των συμπτωμάτων της δυσπεψίας και του έλκους. Χρησιμοποιείται ακόμη ως ρυθμιστής των επιπέδων του φωσφόρου στον οργανισμό, σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση παρ' ότι οι σχετικά υψηλές δόσεις αργιλίου που χρειάζονται οι συγκεκριμένοι ασθενείς για τη ρύθμιση του φωσφόρου τους, σε συνδυασμό με την ενδεχόμενη τοξικότητα του Al, τείνουν να οδηγήσουν στη σταδιακή αντικατάστασή του από άλλες φαρμακευτικές ουσίες που ασκούν ρυθμιστική δράση στα επίπεδα φωσφόρου.

Οι κυριότερες ενώσεις με τις οποίες χρησιμοποιείται το αργίλιο ως φάρμακο είναι το υδροξείδιο του αργιλίου, $\text{Al}(\text{OH})_3$, το φωσφορικό αργίλιο, AlPO_4 και το αργιλοπυριτικό νάτριο. Οι ενώσεις του αργιλίου σπάνια χορηγούνται μόνες τους, αλλά συνήθως συνυπάρχουν με ενώσεις του μαγνησίου, όπως είναι το MgCO_3 , το $\text{Mg}(\text{OH})_2$ και το τριπυριτικό μαγνήσιο, οι οποίες μειώνουν τα φαινόμενα δυσκοιλιότητας που μπορεί να προκαλέσει μόνο του το αργίλιο.

Στη συνέχεια περιγράφεται η μέθοδος για τον προσδιορισμό του αργιλίου σε 3 φαρμακευτικά σκευάσματα. Τα δύο από αυτά βρίσκονται στην ίδια στερεή μορφή, ως μασώμενα δισκία, ενώ το τρίτο έχει τη μορφή εναιωρήματος. Όλα όμως περιέχουν μίγμα του $\text{Al}(\text{OH})_3$ με άλλες ουσίες για αποτελεσματικότερη αντιόξινη δράση. Αναπτύχθηκαν δύο μέθοδοι προσδιορισμού του μετάλλου, εκ των οποίων η μία εφαρμόστηκε στα στερεά και η άλλη στο υγρό σκεύασμα.

6.2. Υδροξείδιο Αργιλίου

6.2.1. Χαρακτηριστικά – Ιδιότητες – Εμπορική ονομασία^[104,105,130, 235]

Το $\text{Al}(\text{OH})_3$ και έχει μοριακό βάρος 77,99. Πρόκειται για μια άσπρη, άοσμη, άγευστη και άμορφη σκόνη που είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό και την αιθανόλη. Διαλύεται σε διαλύματα ισχυρών ανόργανων οξέων (π.χ. HCl και H_2SO_4) και υδροξειδίων των αλκαλίων. Σχηματίζει πηκτή (gel) κατά την παρατεταμένη επαφή με το νερό. Απορροφά τα οξέα και το CO_2 . Πρέπει να φυλάσσεται σε αεροστεγή δοχεία σε θερμοκρασία μικρότερη από 30 °C.

Στο εμπόριο τα διάφορα σκευάσματα του υδροξειδίου του αργιλίου κυκλοφορούν με τη μορφή απλών ή μασώμενων δισκίων, ως καψάκια ή ως εναιωρήματα με τις ονομασίες Aludrox[®], Gaviscon[®], Maalox[®], Simeco[®], Mucaine[®], Mucogel[®], κ.ά.

6.2.2. Φαρμακοκινητική δράση

Η δράση του υδροξειδίου του αργιλίου εστιάζεται κυρίως στο στομάχι, όπου η ουσία εξουδετερώνει τα οξέα του, αυξάνοντας την τιμή pH και μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο το αίσθημα καούρας. Μερικώς μπορεί να μετατραπεί, παρουσία του HCl του στομάχου, σε $AlCl_3$. Παρότι όλη η γαστρεντερική οδός θεωρείται αδιαπέραστη για τις ενώσεις του αργιλίου, αυτό δεν είναι τελείως αληθές. Μπορεί να παρατηρηθεί μερική απορρόφηση των διαλυτών αλάτων του αργιλίου και απέκκρισή τους στα ούρα. Είναι ακόμη πιθανή η αλληλεπίδραση με φωσφορικά ιόντα, οπότε σχηματίζονται αδιάλυτα φωσφορικά άλατα ή ανθρακικά άλατα και άλατα των λιπαρών οξέων. Όλα αυτά τα παράγωγα απεκκρίνονται με τα κόπρανα. Μελέτες της συμπεριφοράς των $Al(OH)_3$, $Al_2(CO_3)_3$ και γλυκινικού αργιλίου έδειξαν ότι μετά από χορήγηση των παραπάνω ενώσεων, τα επίπεδα αργιλίου αυξήθηκαν και στο πλάσμα και στα ούρα και επίσης ότι είναι πιθανότερο η απορρόφηση να συμβαίνει στο όξινο περιβάλλον του στομάχου ή του δωδεκαδάκτυλου παρά σε οποιοδήποτε άλλο σημείο της γαστρεντερικής οδού^[236].

6.2.3. Έλεγχοι πρώτης ύλης σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία^[130]

Το υδροξείδιο του αργιλίου αναφέρεται στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία ως ένυδρο οξείδιο του αργιλίου (Aluminium Oxide, Hydrated) και ισοδυναμεί με όχι λιγότερο από 47% και όχι περισσότερο από 60% Al_2O_3 .

Περίληπτικά, οι δοκιμές που προτείνονται για τον έλεγχο του υδροξειδίου του αργιλίου περιλαμβάνουν:

4. Ταυτοποίηση δραστικής ουσίας

Ποσότητα της ουσίας διαλύεται σε νερό και αναμιγνύεται με δ/μα αραιού HCl και θειακεταμιδίου. Στο μίγμα προστίθεται σε σταγόνες αραιό δ/μα NaOH οπότε σχηματίζεται λευκό ζελατινώδες ίζημα που επαναδιαλύεται με επιπλέον προσθήκη υδροξειδίου του νατρίου (αντίδραση του αργιλίου).

5. Έλεγχοι καθαρότητας

- 5.1. *Διάλυμα ελέγχου:* Παρασκευάζεται με διάλυση της ουσίας σε δ/μα υδροχλωρικού οξέος και θέρμανση σε υδατόλουτρο. Ο οπαλισμός και το χρώμα του δ/τος δεν πρέπει να είναι εντονότερα από τα αντίστοιχα δ/τος αναφοράς.
- 5.2. *Αλκαλικές προσμίξεις:* Ποσότητα της ουσίας διαλύεται σε νερό ελεύθερο CO_2 και διηθείται. Στο διήθημα προστίθεται δείκτης φαινολοφθαλεΐνη. Αν εμφανιστεί ερυθροϊώδης χροιά θα πρέπει να εξαφανιστεί με την προσθήκη μικροποσοτήτων HCl.
- 5.3. *Ικανότητα εξουδετέρωσης:* Ποσότητα της ουσίας αναμιγνύεται με νερό και προθερμασμένο δ/μα HCl υπό συνεχή ανάδευση. Το pH του δ/τος μετά από 10, 15

και 20 min δεν είναι μικρότερο από 1,8, 2,3 και 3,0 και ποτέ δεν πρέπει να υπερβεί την τιμή 4,5. Προστίθεται προθερμασμένο δ/μα HCl, ακολουθεί ανάδευση για 1 ώρα και κατόπιν ογκομέτρηση με δ/μα NaOH μέχρι τελικής τιμής pH 3,5 που πρέπει να αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη κατανάλωση mL δ/τος NaOH έτσι, ώστε η πρώτη ύλη να ανταποκρίνεται στον έλεγχο.

- 5.4. *Χλωριούχα*: Ποσότητα της ουσίας μετά από θέρμανση με αραιό δ/μα HNO₃ και νερό πρέπει να ανταποκρίνεται στον έλεγχο ορίου για τα χλωριούχα (1%).
- 5.5. *Θειικά*: Το δ/μα ελέγχου πρέπει να ανταποκρίνεται στον έλεγχο ορίου για τα θειικά (1%).
- 5.6. *Αρσενικό*: Πρέπει να ανταποκρίνεται στον έλεγχο ορίου για το αρσενικό (4 μg·mL⁻¹).
- 5.7. *Βαρέα μέταλλα*: Ποσότητα του δ/τος ελέγχου εξουδετερώνεται με πυκνή αμμωνία χρησιμοποιώντας δείκτη δ/μα κίτρινο του μετανιλίου. Το μίγμα πρέπει να ανταποκρίνεται στον έλεγχο ορίου Α της Φαρμακοποιίας για τα βαρέα μέταλλα (60 μg·mL⁻¹) χρησιμοποιώντας ως πρότυπο δ/μα Pb συγκέντρωσης 1 μg·mL⁻¹.
- 5.8. *Έλεγχος μικροβιακού φορτίου*: Το ολικό φορτίο δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 10³ μικροοργανισμούς ανά g. Πρέπει επίσης να ανταποκρίνεται στον έλεγχο για εντεροβακτήρια και αρνητικά κατά gram βακτήρια, καθώς και στον έλεγχο για *Escherichia coli*.

6. Έλεγχος περιεκτικότητας πρώτης ύλης (Assay)

Πραγματοποιείται με διάλυση ορισμένης ποσότητας της ουσίας σε δ/μα HCl. Ακολουθεί θέρμανση σε υδατόλουτρο, προσθήκη νερού και δ/τος αμμωνίας μέχρι σχηματισμού λευκού ιζήματος. Το ίζημα επαναδιαλύεται με την ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα δ/τος HCl και ακολουθεί ογκομέτρηση του αργιλίου με πρότυπο δ/μα EDTA.

1 mL δ/τος EDTA συγκέντρωσης 0,1 M ισοδυναμεί με 5,098 mg Al₂O₃.

6.3. Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC-ELSD για τον Προδιορισμό Αργιλίου και Μαγνησίου σε Στερεά Φαρμακευτικά Σκευάσματα

6.3.1. Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια

6.3.1.1. HPLC – ELSD (Υποκ. 3.1 & 3.2)

Χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική στήλη διαχωρισμού C18 Spherisorb® 5μm ODS-2 της Waters διαστάσεων 250 x 4,6 mm.

6.3.1.2. Γυάλινα σκεύη – Ογκομετρικά όργανα (Υποκ. 3.4)

6.3.1.3. Διαλύτες – Αντιδραστήρια

A) Διαλύτες

i) Νερό κατάλληλο για HPLC (εδάφιο 3.3.1.).

ii) Ακετονιτρίλιο HPLC καθαρότητας 99,9% (Lab Scan, Dublin Ireland)

B) Υγρά αντιδραστήρια

- i) Τριφθοροξικό οξύ, TFA, καθαρότητας $\geq 98\%$, MW:114,02 g·mol⁻¹, d:1,48 g·mL⁻¹ (Riedel-de-Haën, Seelze, Germany)
- ii) Υδροχλωρικό οξύ, HCl, περιεκτικότητας 37%, d:1,19 g·mL⁻¹ (Merck, Darmstadt, Germany)
- iii) Νιτρικό οξύ, HNO₃, αναλυτικής καθαρότητας, περιεκτικότητας 65%, d:1,395 g·mL⁻¹ (Panreac Quimica, Barcelona, Spain)
- iv) Θειικό οξύ, H₂SO₄, αναλυτικής καθαρότητας, περιεκτικότητας 95-97%, d:1,84 g·mL⁻¹ (Merck)

Γ) Στερεά αντιδραστήρια

- i) Νιτρικό αργίλιο, Al(NO₃)₃·9H₂O, καθαρότητας $\geq 98,5\%$, Mr:375,13 (Merck)
- ii) Χλωριούχο Μαγνήσιο, MgCl₂·6H₂O, καθαρότητας 99-101%, Mr:203,30 (Riedel-de-Haën)

6.3.2. Πειραματική πορεία

6.3.2.1. Περιγραφή σκευασμάτων

Τα δύο φαρμακευτικά σκευάσματα που βρίσκονται σε στερεή μορφή είναι το Maalox Plus® chew.tabs και το Aludrox® chew.tabs.

Τα *Maalox Plus*® είναι στρογγυλά μασώμενα δισκία (*chewable tablets*) διπλού χρώματος, μισό λευκό και μισό κίτρινο, με ανάγλυφο το όνομα του φαρμάκου και την επωνυμία της εταιρίας. Περιέχει ως δραστικά συστατικά 200 mg ξηράς πηκτής υδροξειδίου του αργιλίου, 200 mg υδροξειδίου του μαγνησίου (ή 83,38 mg Mg²⁺) και 25 mg διμεθικόνης ανά δισκίο. Σύμφωνα με τη U.S.P., 1 mg ξηράς πηκτής υδροξειδίου του αργιλίου ισοδυναμεί με 0,765 mg Al(OH)₃, επομένως τα 200 mg αντιστοιχούν σε 153 mg Al(OH)₃ (ή 52,93 mg Al³⁺)^[105].

Η διμεθικόνη είναι ένα πολυ(διμεθυλοσιλοξάνιο) με μοριακό τύπο [—(CH₃)₂SiO—]_n προϊόν υδρόλυσης και πολυσυμπύκνωσης του διχλωροδιμεθυλοπυριτίου και του χλωροτριμεθυλοπυριτίου και σε συνδυασμό με τα άλλα δύο συστατικά του σκευάσματος, ανακουφίζει τον οργανισμό από το αίσθημα μετεωρισμού (φούσκωμα). Στα έκδοχα του σκευάσματος αναφέρονται η μαννιτόλη, σάκχαρη ζαχαροπλαστικής, yellow lake blend, νατριούχος σακχαρίνη, σορβιτόλη, άρωμα λεμονιού, swiss cream, τάλκη, στεατικό μαγνήσιο, άμυλο αραβοσίτου, κιτρικό οξύ και δεξτρόζη. Το μέσο βάρος κάθε δισκίου είναι W_{tab} = 1,2227(±0,0034) g.

Τα *Aludrox*® είναι στρογγυλά λευκά μασώμενα δισκία με εγκάρσια εγκοπή και ανάγλυφο το λογότυπο της παρασκευάστριας εταιρίας. Τα δραστικά του συστατικά είναι υδροξείδιο του αργιλίου, Al(OH)₃, και υδροξείδιο του μαγνησίου, Mg(OH)₂, σε ονομαστικές περιεκτικότητες 233,0 και 83,46 mg, αντίστοιχα ανά δισκίο, ή 80,62 mg Al³⁺ και 34,79 mg Mg²⁺ ανά δισκίο. Ως έκδοχα χρησιμοποιούνται σάκχαρη ζαχαροπλαστικής, άμυλο

αραβοσίτου, τάλκη, στεατικό ασβέστιο, νατριούχο σακχαρίνη, υδρογονωμένα φυτικά έλαια, άρωμα και έλαιο μέντας. Το τελευταίο δίνει στο σκεύασμα τη χαρακτηριστική του γεύση. Από τη ζύγιση 10 δισκίων, το μέσο βάρος κάθε δισκίου είναι $W_{\text{tab}} = 0,9013(\pm 0,0017)$ g.

6.3.2.2. Παρασκευή διαλυμάτων

➤ Διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions)

Ζυγίστηκε ποσότητα $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ίση με 0,6952 g και διαλύθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL με αραιό δ/μα TFA. Η διάλυση του νιτρικού αργιλίου έγινε ως εξής: αρχικά προστέθηκαν σταγόνες πυκνού TFA (6-7 σταγόνες) μέχρι πλήρους διάλυσης της σκόνης και μέχρι να σταματήσει ο αφρισμός και κατόπιν συμπληρώθηκε ο όγκος με νερό. Με αυτήν τη διαδικασία αποφεύχθηκε ο σχηματισμός ζελατινώδους ιζήματος $\text{Al}(\text{OH})_3$ που θα σχηματιζόταν εάν διαλυόταν το αντιδραστήριο απευθείας σε νερό. Η τελική συγκέντρωση του δ/τος ήταν $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ως προς Al^{3+} .

Ζυγίστηκε ποσότητα $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ίση με 0,4181 g και διαλύθηκε σε νερό σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL μέχρι τελικής συγκέντρωσης $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ως προς Mg^{2+} .

Η διάλυση των ουσιών, όταν απαιτούνταν, υποβοηθούνταν με τη χρήση λουτρού υπερήχων για περίπου 5 min ή μέχρις ότου τα διαλύματα να είναι διαυγή.

Όλα τα διαλύματα φυλάσσονταν σταθερά σε θερμοκρασία δωματίου και ήταν σταθερά για διάστημα μεγαλύτερο των δύο εβδομάδων.

➤ Διαλύματα εργασίας

Με κατάλληλες αραιώσεις των διαλυμάτων παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν τα διαλύματα εργασίας των Al^{3+} και Mg^{2+} σε συγκεντρώσεις 1, 3, 5, 10, 15 και $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Η τελική αρραίωση έγινε στην κινητή φάση.

6.3.2.3. Δοκιμές βελτιστοποίησης μεθόδου διαχωρισμού

Όλες οι δοκιμές για την εύρεση του κατάλληλου χρωματογραφικού συστήματος που διαχωρίζει τα δραστικά κατιόντα των σκευασμάτων, παρατίθενται στον πίνακα 6.1. που ακολουθεί. Παρασκευάστηκε δ/μα TFA συγκέντρωσης 0,05 M ή $3,85 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\text{pH} \approx 2,0$) το οποίο αραιώθηκε με νερό σε διάφορες αναλογίες, ενώ δοκιμάστηκε και η προσθήκη του οργανικού διαλύτη ACN. Για κάθε μία από τις αραιώσεις των διαλυτών, ενέθηκε διάλυμα που περιέχει μίγμα των 2 δραστικών κατιόντων και ελήφθη το αντίστοιχο χρωματογράφημα. Η τονισμένη με τη σκίαση είναι η κινητή φάση που τελικά επιλέχθηκε, διότι επιτυγχάνει το βέλτιστο δυνατό διαχωρισμό των ιόντων του μίγματος. Ήταν η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε, στη συνέχεια, για να προσδιοριστεί το μίγμα αργιλίου – μαγνησίου στα στερεά φαρμακευτικά σκευάσματα.

Πίνακας 6.1: Δοκιμές κινητών φάσεων για διαχωρισμό των ιόντων Al^{3+} και Mg^{2+} .

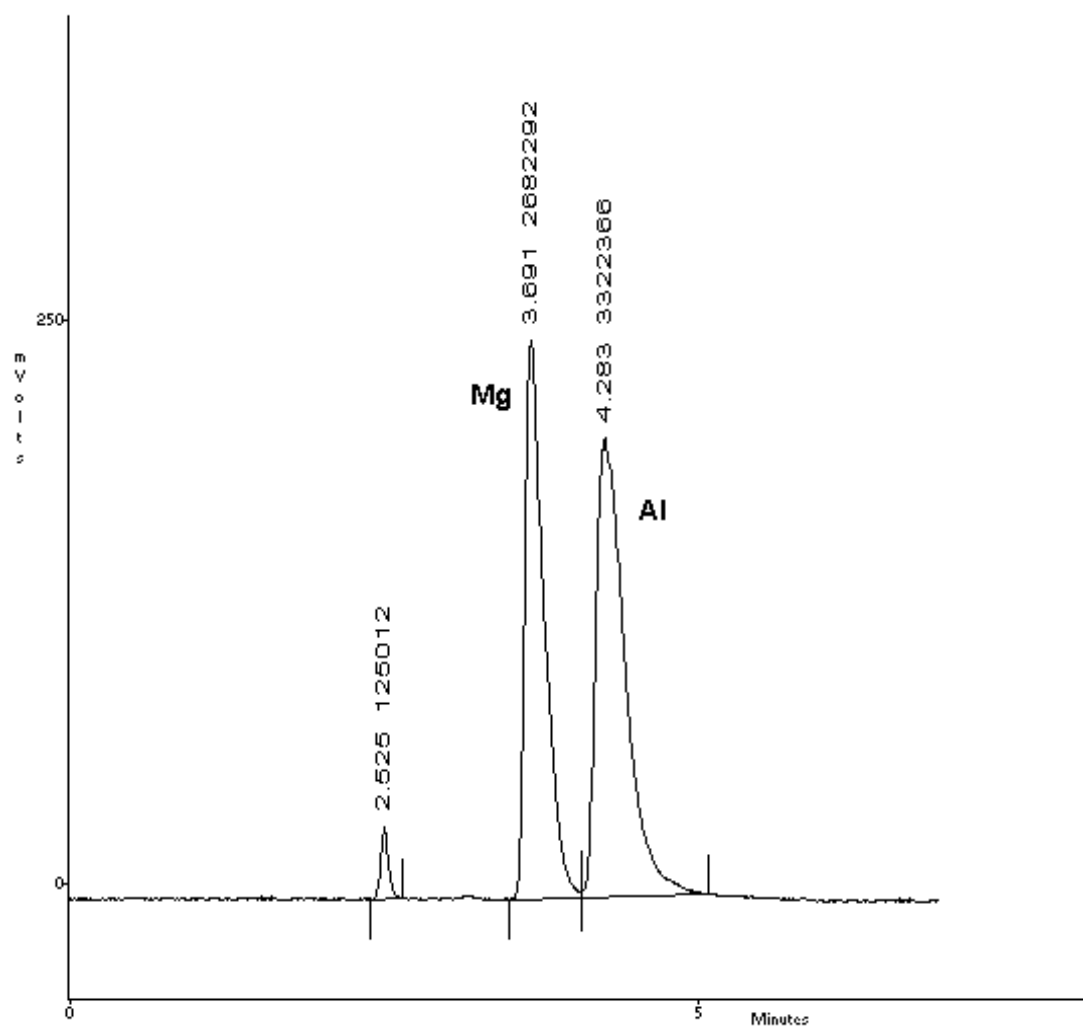
Κινητή Φάση Α	Κινητή Φάση Β	Κινητή Φάση Γ	Αναλογία Α:Β:Γ (v/v/v)	Ταχύτητα ροής κινητής φάσης (mL·min ⁻¹)
TFA ¹	H ₂ O	-	50:50	1,0
TFA	H ₂ O	-	30:70	1,0
TFA	H ₂ O	-	20:80	1,0
TFA	H ₂ O	-	15:85	1,0
TFA	H ₂ O	-	10:90	0,9
TFA	H ₂ O	ACN	10:80:10	0,9
TFA	H₂O	ACN	11:84:5	0,9
TFA	H ₂ O	ACN	15:80:5	0,9
TFA	H ₂ O	ACN	10:70:20	0,9

1:αρχική συγκέντρωση δ/τος TFA 0,05 M ή 3,85 mL·L⁻¹

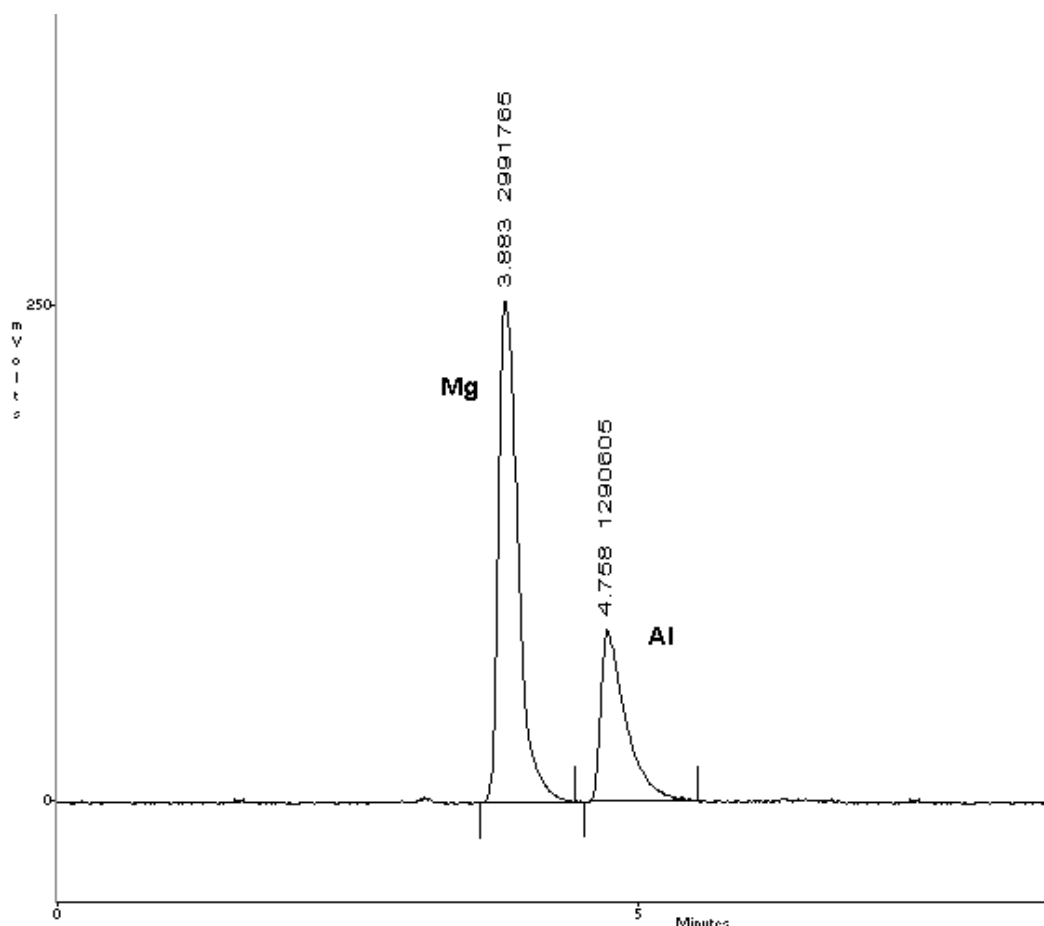
Έτσι, οι πειραματικές συνθήκες που προέκυψαν για τον προσδιορισμό του αργιλίου είναι περιληπτικά:

Πίνακας 6.2: Πειραματικές συνθήκες χρωματογράφησης

Σύστημα HPLC – ELSD	
Στήλη	ODS-2 C18 (250 x 4,6 mm)
Κινητή φάση	TFA (0,45 mL·L ⁻¹):ACN 95:5
Ταχύτητα ροής κινητής φάσης	0,9 mL·min ⁻¹
Θερμοκρασία ανιχνευτή	70 °C
Ευαισθησία (gain) ανιχνευτή	12
Πίεση φέροντος αερίου	3,5 bar



Σχήμα 6.1: Χρωματογράφημα μίγματος Mg – Al με στήλη C18 και κινητή φάση δ/μα TFA συγκέντρωσης $0,385 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$. Οι χρόνοι έκλουσης των ιόντων ήταν Mg^{2+} : $t_R=3,69 \text{ min}$ και Al^{3+} : $t_R=4,28 \text{ min}$. Ο παράγοντας διαχωριστότητας ήταν $R_s=1,58$.



Σχήμα 6.2: Χρωματογράφημα μίγματος Mg – Al με στήλη C18 και κινητή φάση μίγμα TFA (0,45 mL·L⁻¹):ACN 95:5 (v/v). Οι χρόνοι έκλουσης των ιόντων ήταν Mg²⁺: t_R=3,88 min και Al³⁺: t_R=4,76 min. Ο παράγοντας διαχωριστότητας ήταν Rs=2,34.

Από την εξέταση των χρωματογραφημάτων φαίνεται ότι η παρουσία ακετονιτριλίου, σε μικρό ποσοστό, 5%, στην κινητή φάση, βελτίωσε σημαντικά τη διαχωριστότητα μεταξύ των δύο κορυφών του μίγματος των ιόντων (οι συντελεστές διαχωριστότητας είναι 1,58 και 2,34 απουσία και παρουσία ακετονιτριλίου, αντίστοιχα).

6.3.2.4. Κατασκευή καμπύλης αναφοράς – Επικύρωση μεθόδου

Κάθε ένα από τα διαλύματα εργασίας εισήχθει στο σύστημα HPLC-ELSD τρεις φορές τουλάχιστον και μετρήθηκε το σήμα απόκρισης, A, του ανιχνευτή. Ακολούθως, κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς, για κάθε μία από τις ενώσεις, με τη γραμμική της μορφή (Εξ. 1.11) και υπολογίστηκαν οι τιμές των συντελεστών loga και b καθώς και ο συντελεστής συσχέτισης, r².

Η επικύρωση της μεθόδου περιλαμβάνει τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας, της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, έλεγχο της ακρίβειας και εύρεση των LOD και LOQ όπως έχουν ήδη περιγραφεί αναλυτικά στο εδάφιο 5.5.3.3. Ο έλεγχος της ακρίβειας

για τον υπολογισμό της ανάκτησης, έγινε με τη μέθοδο των πολλαπλών ζυγίσεων για το ένα σκεύασμα και με τη μέθοδο προσθήκης γνωστής ποσότητας για το άλλο.

6.3.2.5. Κατεργασία σκευασμάτων και προετοιμασία δειγμάτων

➤ Maalox Plus® chewable tabs: Τουλάχιστον 10 δισκία Maalox Plus® κονιοποιήθηκαν σε γουδί και ομογενοποιήθηκαν. Ζυγίστηκε ποσότητα σκόνης ίση με 250 g σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL (Διάλυμα Α) και προστέθηκε διαλύτης για τη διαλυτοποίηση της δραστικής ουσίας. Επειδή η διαλυτοποίηση του σκευάσματος αποδείχθηκε δύσκολη, δοκιμάστηκαν διάφοροι διαλύτες και διαφορετικά πρωτόκολλα. Όλα τα πρωτόκολλα διαλυτοποίησης και τα αποτελέσματά τους παρατίθενται αναλυτικά στο εδάφιο 6.3.3.2.

Το διαλυμένο προϊόν διηθήθηκε σε φίλτρα Millipore και 1 mL από το διήθημα αραιώθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL με την κινητή φάση. Έγινε έγχυση στο σύστημα HPLC-ELSD.

Σε δύο διαφορετικές ογκομετρικές φιάλες των 100 mL ζυγίστηκε ποσότητα σκόνης ίση με 350 mg (Διάλυμα Β) και 500 mg (Διάλυμα Γ) αντίστοιχα, και προστέθηκε ο διαλύτης διαλυτοποίησης που επελέγη μετά από τις δοκιμές διαλυτοποίησης. Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο της μεθόδου και προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα των ιόντων μαγνησίου και αργιλίου. Τα διαλύματα Α, Β και Γ μαζί, χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ανάκτησης της μεθόδου.

➤ Aludrox® chewable tabs: Τουλάχιστον 10 δισκία σκευάσματος κονιοποιήθηκαν και ομογενοποιήθηκαν. Ζυγίστηκε ποσότητα της σκόνης ίση με 300 mg σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και διαλύθηκε με 1 mL πυκνού TFA. Το μίγμα θερμανθηκε για λίγα min και κατόπιν αραιώθηκε με νερό μέχρι πλήρωσης του όγκου. Ακολούθησε διήθηση με φίλτρα Millipore. 1 mL από το διήθημα αραιώθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL με κινητή φάση και εισήχθη στο χρωματογράφο.

Σε δεύτερη ογκομετρική φιάλη των 100 mL ζυγίστηκε ποσότητα σκευάσματος ίση με 300 mg, προστέθηκαν σταγόνες πυκνού TFA, ακολούθησε θέρμανση και κατόπιν προστέθηκαν 0,25 mL πρότυπου δ/τος Mg (αρχικής συγκέντρωσης 500 mg·mL⁻¹) και 0,5 mL πρότυπου δ/τος Al (αρχικής συγκέντρωσης 500 mg·mL⁻¹). Το μίγμα συμπληρώθηκε μέχρις όγκου με νερό, διηθήθηκε και ακολούθησε αραιώση 1 mL στα 25 mL με κινητή φάση. Το δ/μα χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ανάκτησης.

6.3.3. Αποτελέσματα

6.3.3.1. Καμπύλες αναφοράς Al³⁺ και Mg²⁺ – Επικύρωση

Ελήφθησαν οι καμπύλες αναφοράς για τα δύο δραστικά ιόντα σε τρεις διαδοχικές ημέρες. Από αυτές προέκυψαν οι συντελεστές loga και b, καθώς και τα στατιστικά δεδομένα για την επικύρωση της μεθόδου που σχετίζονται με την επαναληψιμότητα, την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Όλα τα αποτελέσματα για τα δύο ιόντα παρουσιάζονται περιληπτικά στους πίνακες 6.3 και 6.4.

Πίνακας 6.3: Καμπύλες αναφοράς Mg^{2+} – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου

Ημέρα	Εξίσωση ευθείας	r^2 ($N \geq 4$, $n \geq 4$)	%RSD (1 – 20 $\mu g \cdot mL^{-1}$)
1 ^η	$\log A = 5,098(\pm 0,032) + 1,347(\pm 0,030) \cdot \log C$	0,9995	1,1 – 2,8
2 ^η	$\log A = 5,192(\pm 0,015) + 1,288(\pm 0,014) \cdot \log C$	0,9998	1,3 – 2,1
3 ^η	$\log A = 5,088(\pm 0,029) + 1,356(\pm 0,028) \cdot \log C$	0,9996	0,50 – 3,8
Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα			
Interday %RSD του $\log a$		1,1	
Interday %RSD του b		2,8	
LOQ ($\mu g \cdot mL^{-1}$)		1,0	
LOD ($\mu g \cdot mL^{-1}$)		0,42	

Ομοίως για το αργίλιο τα αντίστοιχα δεδομένα έχουν ως εξής:

Πίνακας 6.4: Καμπύλες αναφοράς Al^{3+} – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου

Ημέρα	Εξίσωση ευθείας	r^2 ($N \geq 4$, $n \geq 4$)	%RSD (1 – 20 $\mu g \cdot mL^{-1}$)
1 ^η	$\log A = 4,715(\pm 0,025) + 1,386(\pm 0,024) \cdot \log C$	0,9997	0,95 – 3,3
2 ^η	$\log A = 4,7874(\pm 0,0024) + 1,3463(\pm 0,0022) \cdot \log C$	0,999997	0,95 – 3,9
3 ^η	$\log A = 4,697(\pm 0,021) + 1,385(\pm 0,019) \cdot \log C$	0,9998	0,39 – 5,1
Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα			
Interday %RSD του $\log a$		1,0	
Interday %RSD του b		1,6	
LOQ ($\mu g \cdot mL^{-1}$)		2,5	
LOD ($\mu g \cdot mL^{-1}$)		1,1	

Αξιολογώντας τα στοιχεία επικύρωσης της προτεινόμενης μεθόδου, παρατηρήθηκε ότι δίνει επαναλήψιμες μετρήσεις, τόσο μέσα στην ίδια μέρα, όσο και μεταξύ διαδοχικών ημερών. Σχετικά χαμηλά ήταν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου, όπως προέκυψαν από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

6.3.3.2. Δοκιμές διαλυτοποίησης *Maalox Plus® chew.tabs* – Αποτελέσματα

Στον πίνακα 6.5 παρατίθενται τα πρωτόκολλα διαλυτοποίησης του σκευάσματος Maalox Plus® και τα αποτελέσματα της κάθε διαδικασίας. Με τη σκίαση απεικονίζεται το πρωτόκολλο διαλυτοποίησης που έδωσε τα πιο αποδεκτά αποτελέσματα.

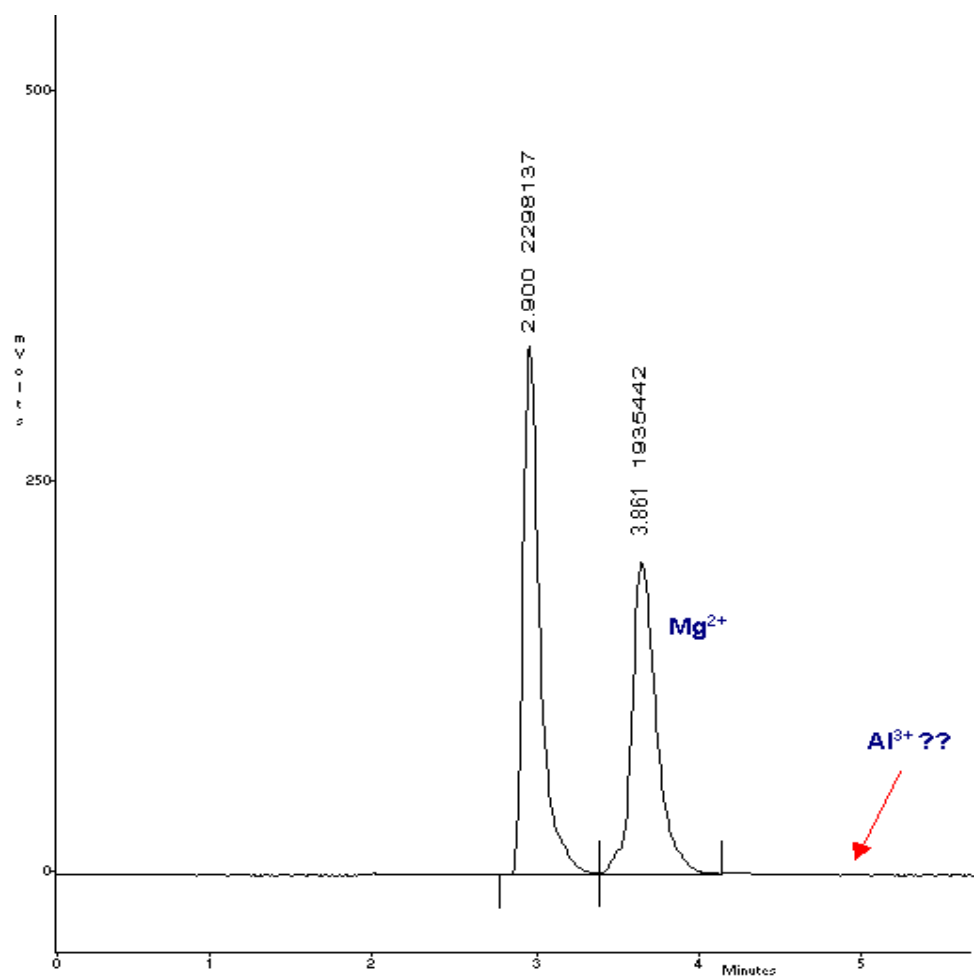
Σύμφωνα με την Αμερικάνικη Φαρμακοποιία, η αποδεκτή περιεκτικότητα σε δραστική ουσία για τα δισκία αργιλίου-μαγνησίου κυμαίνεται από 90,0-115,0%. Έτσι, αξιολογώντας τα αποτελέσματα, η διάλυση σε πυκνό διάλυμα θειικού οξέος που ακολουθείται από θέρμανση και αραίωση στη συνέχεια με νερό, έδωσε ποσοστά που ανταποκρίνονται στις παραπάνω προδιαγραφές ως προς το αργίλιο. Τα υψηλότερα ποσοστά περιεκτικότητας του μαγνησίου (118%) οφείλονταν στο γεγονός ότι το μαγνήσιο στο συγκεκριμένο σκεύασμα δε συμμετείχε μόνο ως δραστική ουσία, αλλά και ως έκδοχο (στεατικό μαγνήσιο, βλ. εδάφιο 6.3.2.1.). Έτσι, η επίδραση του πολύ ισχυρού θειικού οξέος είχε ως αποτέλεσμα τον προσδιορισμό του ολικού μαγνησίου του σκευάσματος.

Η διαδικασία διαλυτοποίησης που περιελάμβανε παραμονή του διαλύματος για μία νύχτα και μέτρηση την επομένη, δεν έδινε τα ίδια αποδεκτά αποτελέσματα όταν εφαρμόστηκε εκ νέου με καινούρια ζύγιση σκευάσματος και εφαρμογή του πρωτοκόλλου. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα του πίνακα, επομένως, μπορούν να θεωρηθούν τυχαία.

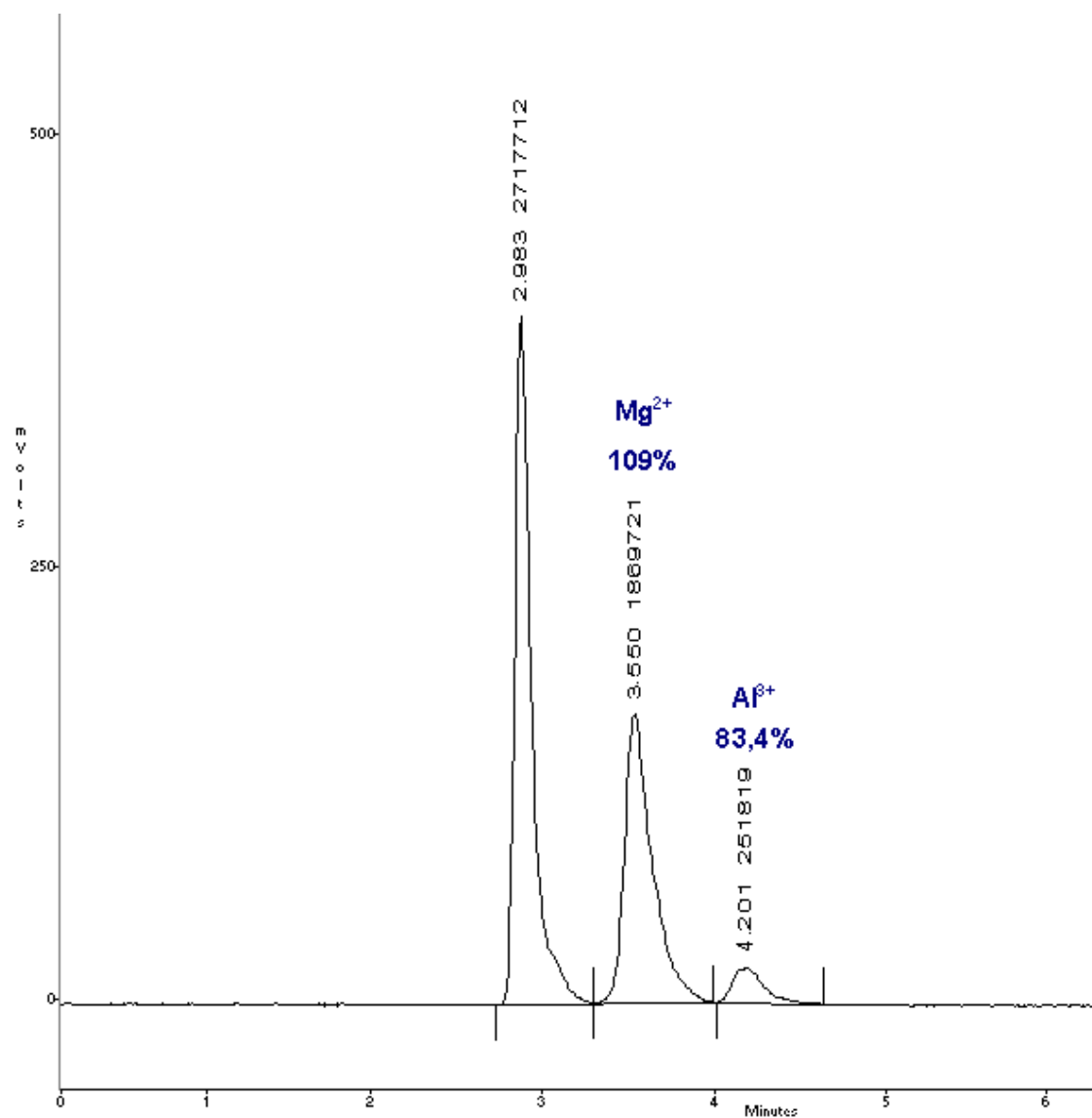
Ακολουθούν, αναλυτικά τα πρωτόκολλα διαλυτοποίησης που εφαρμόστηκαν και ενδεικτικά χρωματογραφήματα στα οποία απεικονίζονται μερικά από τα αποτελέσματα του πίνακα 6.5.

Διαλύτης	Βήμα 1° Ποσότητα δ/τη	Βήμα 2°	Βήμα 3°	Βήμα 4°	Βήμα 5°	Αποτελέσματα
TFA – H ₂ O	30-70 (v/v) μέχρι πλήρωσης του όγκου	Λουτρό υπερήχων	Αραίωση 1 mL → 25 mL με κινητή φάση	-	-	Mg: 108,5% Δεν εκλούεται το Al
π. δ/μα TFA	1 mL	Θέρμανση για 10 min	Συμπλήρωση όγκου με H ₂ O	Αραίωση 1 mL → 25 mL	-	Mg: 76,2% Al: 86,6%
π. δ/μα TFA	1 mL	Θέρμανση για 10 min	Συμπλήρωση όγκου με H ₂ O	Αραίωση 1 mL → 25 mL	Παραμονή για 1 νύχτα	Mg: 97,3% Al: 104,3%
π. δ/μα TFA	1 mL	Λουτρό υπερήχων	Συμπλήρωση όγκου με H ₂ O	Αραίωση 1 mL → 25 mL	-	Mg: 109,0% Al: 83,4%
π. δ/μα HNO ₃	Σταγόνες	Συμπλήρωση όγκου με H ₂ O	Λουτρό υπερήχων	Αραίωση 1 mL → 25 mL	-	Δε λαμβάνονται καθαρές κορυφές
π. δ/μα HCl	1 mL	Συμπλήρωση όγκου με H ₂ O	Λουτρό υπερήχων	Αραίωση 1 mL → 25 mL	-	Δεν εκλούεται το Al
π. δ/μα H ₂ SO ₄ (3,6 M)	Σταγόνες	Θέρμανση για 10 min	Συμπλήρωση όγκου με H ₂ O	Αραίωση 1 mL → 25 mL	-	Mg: 118,6% Al: 114,3%

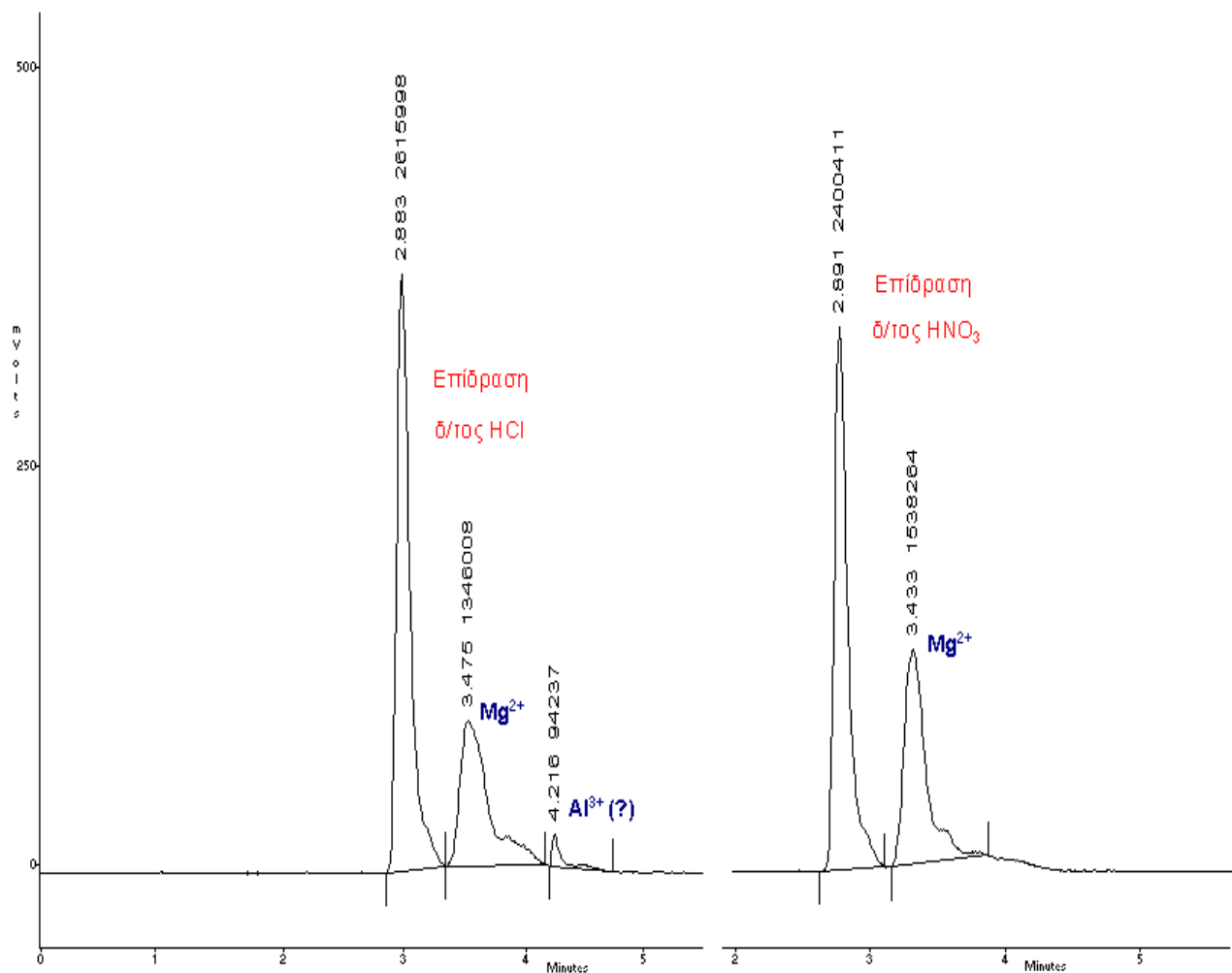
Πίνακας 6.5: Πρωτόκολλα διαλυτοποίησης Maalox Plus® chew.tabs



Σχήμα 6.3: Χρωματογράφημα σκευάσματος Maalox Plus[®] που διαλυτοποιήθηκε σε δ/μα TFA – H₂O 30-70 (v/v) βάσει του πρωτοκόλλου του πίνακα 6.5. Με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, το αργίλιο παρέμενε δεσμευμένο στο σκεύασμα.



Σχήμα 6.4: Χρωματογράφημα σκευάσματος Maalox Plus[®] που διαλυτοποιήθηκε σε πυκνό TFA με τη βοήθεια λουτρού υπερήχων, βάσει του πρωτοκόλλου του πίνακα 6.5. Με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, το αργίλιο εκλουόταν σε μικρό ποσοστό, 83,4%, ενώ η διαλυτοποίηση του μαγνησίου ήταν εντός των προδιαγραφών.



Σχήμα 6.5: Δύο χρωματογραφήματα σκευάσματος Maalox Plus®. Αριστερά φαίνεται σκεύασμα που διαλυτοποιήθηκε με την επίδραση πυκνού HCl και τη βοήθεια λουτρού υπερήχων, όπου δεν εκλουόταν το αργίλιο. Δεξιά είναι σκεύασμα που διαλύθηκε σε σταγόνες πυκνού HNO₃ όπου και πάλι φαίνεται ότι δεν εκλουόταν το αργίλιο ενώ και η κορυφή του μαγνησίου δεν ήταν καθαρή.

6.3.3.3. Έλεγχος περιεκτικότητας σε δραστική ουσία – Έλεγχος ανάκτησης

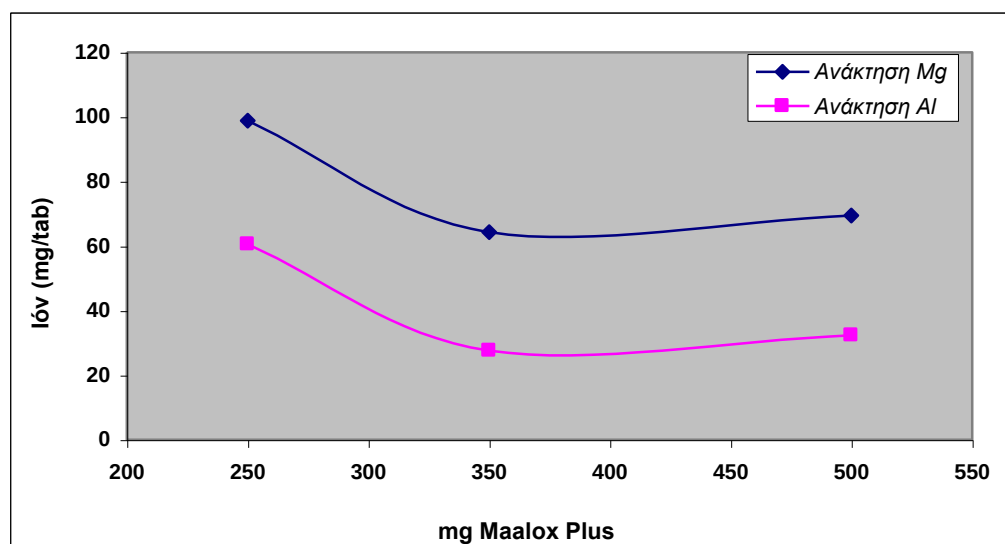
Ενέθηκαν τα διαλύματα Α, Β και Γ (βλ. εδάφιο 6.3.2.5.) του σκευάσματος Maalox Plus® στο σύστημα HPLC-ELSD και μετρήθηκε το σήμα απόκρισής τους. Κάθε διάλυμα μετρήθηκε τρεις φορές τουλάχιστον. Από τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν οι περιεκτικότητες σε Mg/tab και Al/tab εκφρασμένες σε mg ιόντος/tab, αλλά και σε ποσοστό επί τοις εκατό, ενώ η σύγκριση των αποτελεσμάτων των τριών διαλυμάτων εξήγαγε συμπεράσματα για την ανάκτηση της μεθόδου. Τα αποτελέσματα είχαν ως εξής:

Πίνακας 6.6: Αποτελέσματα περιεκτικότητας δραστικών συστατικών σκευάσματος Maalox Plus® – Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης.

Ονομαστική περιεκτικότητα μαγνησίου: 83,38 mg Mg ²⁺ / δισκίο		
Διάλυμα	Περιεκτικότητα Mg ²⁺ (mg/tab)	Περιεκτικότητα %
A	98,8(±1,3)	118,6(±1,5)
B	64,26(±0,63)	77,07(±0,75)
Γ	69,423(±0,074)	83,261(±0,089)

Ονομαστική περιεκτικότητα αργιλίου: 52,93 mg Al ³⁺ / δισκίο		
Διάλυμα	Περιεκτικότητα Al ³⁺ (mg/tab)	Περιεκτικότητα %
A	60,52(±0,88)	114,3(±1,7)
B	27,64(±0,41)	52,21(±0,78)
Γ	32,35(±0,27)	61,11(±0,51)

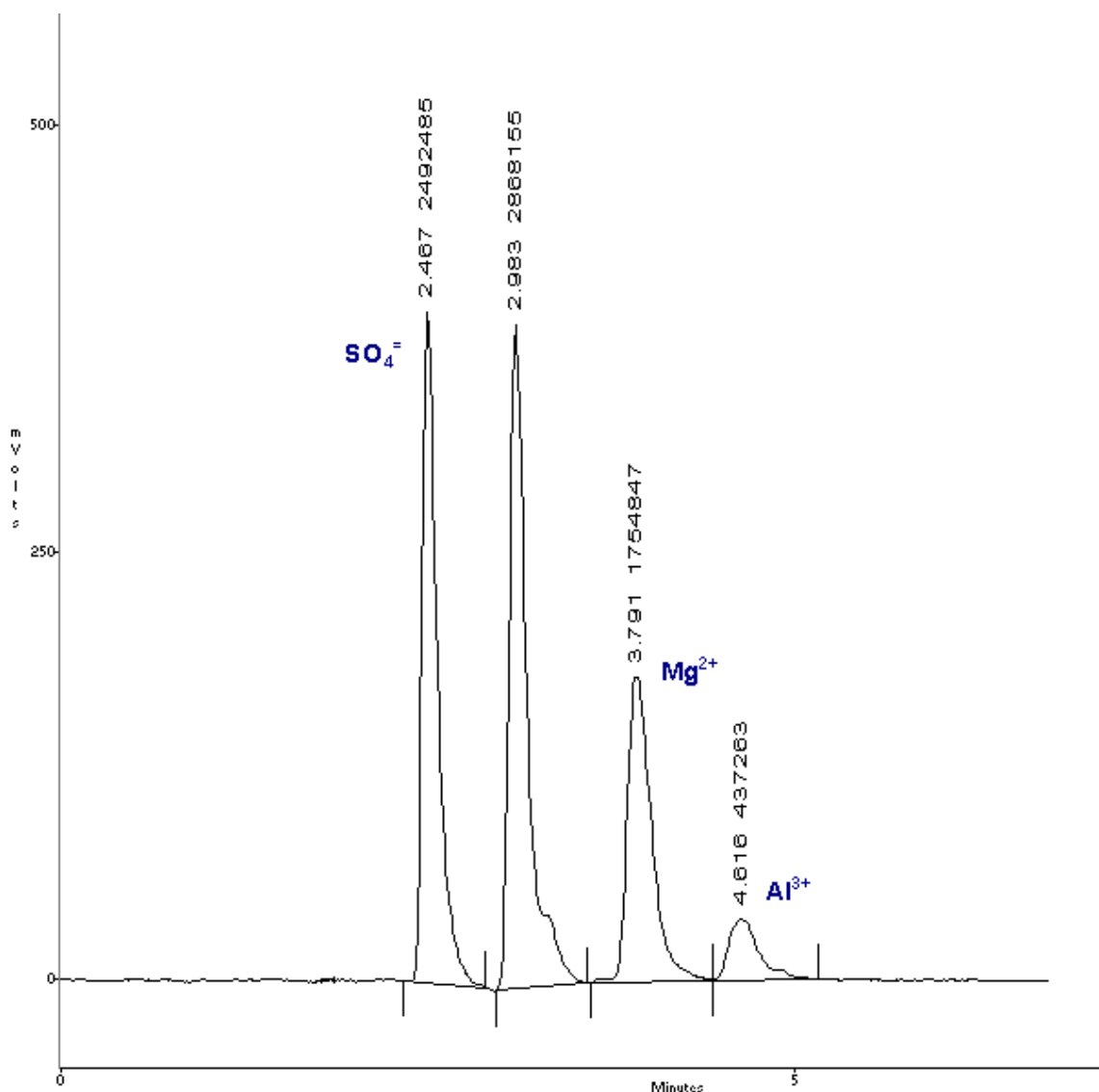
Με βάση τον πίνακα προκύπτει το διάγραμμα του σχήματος 6.6 στο οποίο απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ανάκτησης του σκευάσματος.



Σχήμα 6.6: Καμπύλη πειράματος ανάκτησης μαγνησίου – αργιλίου από το σκεύασμα Maalox Plus® με την τεχνική των πολλαπλών μεταβαλλόμενων ζυγίσεων.

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων του πίνακα 6.6, αλλά και του σχήματος 6.6 δε βοηθά στην εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για την ύπαρξη ή όχι συστηματικών σφαλμάτων της μεθόδου. Ιδανικά, θα έπρεπε η περιεκτικότητα του σκευάσματος σε

δραστικά συστατικά να είναι σταθερή, ανεξάρτητα της ποσότητας σκόνης που ζυγίστηκε, και οι καμπύλες του διαγράμματος να είναι ευθείες παράλληλες στον άξονα x. Η ανομοιογένεια των μετρήσεων είναι πιθανή ένδειξη ανομοιογένειας του σκευάσματος.



Σχήμα 6.7: Χρωματογράφημα σκευάσματος Maalox Plus[®] (250 mg στα 100 mL) που έχει υποστεί διαλυτοποίηση με πυκνό δ/μα H_2SO_4 (3,6 M) και προσδιορίστηκε με στήλη C18 και κινητή φάση μίγμα TFA (0,45 mL·L⁻¹):ACN 95:5 (v/v). Καταγράφηκε μια επιπλέον κορυφή στα 2,47 min που αποδίδεται στα ιόντα SO_4^{2-} .

Για το σκεύασμα Aludrox[®] τα αποτελέσματα από τον υπολογισμό της περιεκτικότητας και της ανάκτησης παρατίθενται στον πίνακα 6.7.

Πίνακας 6.7.: Αποτελέσματα περιεκτικότητας δραστικών συστατικών σκευάσματος Aludrox[®] – Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης

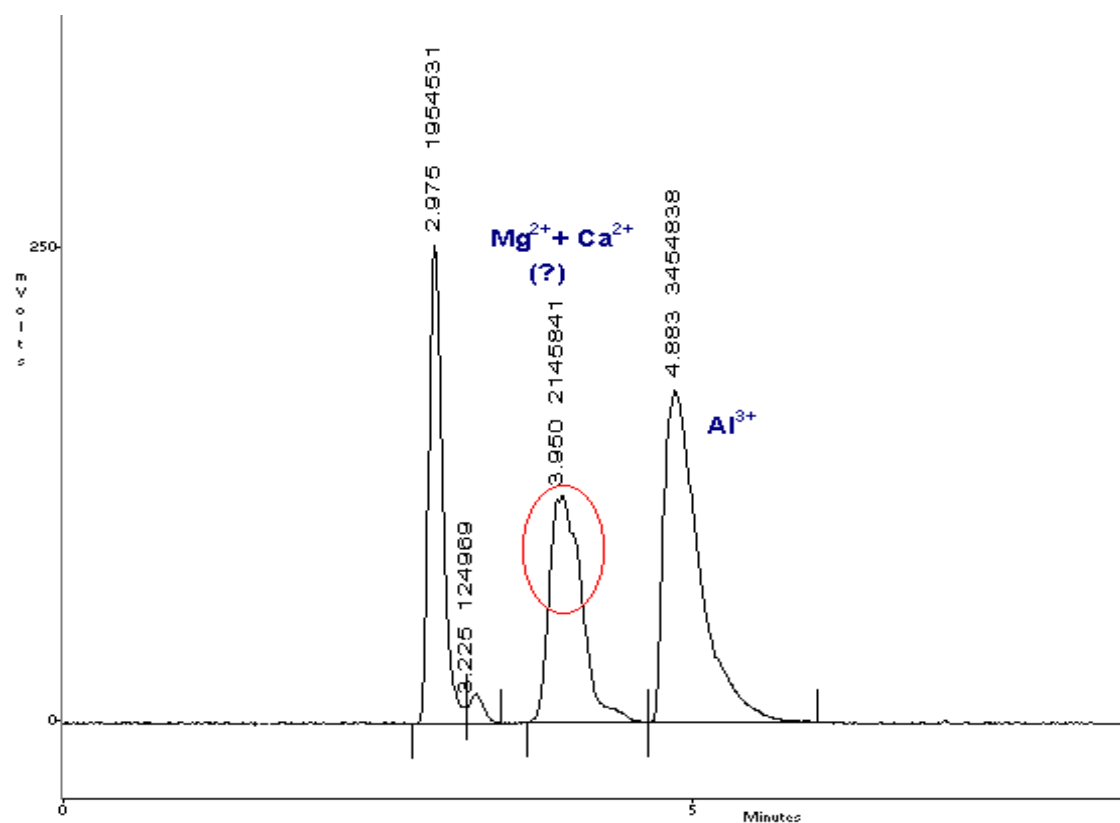
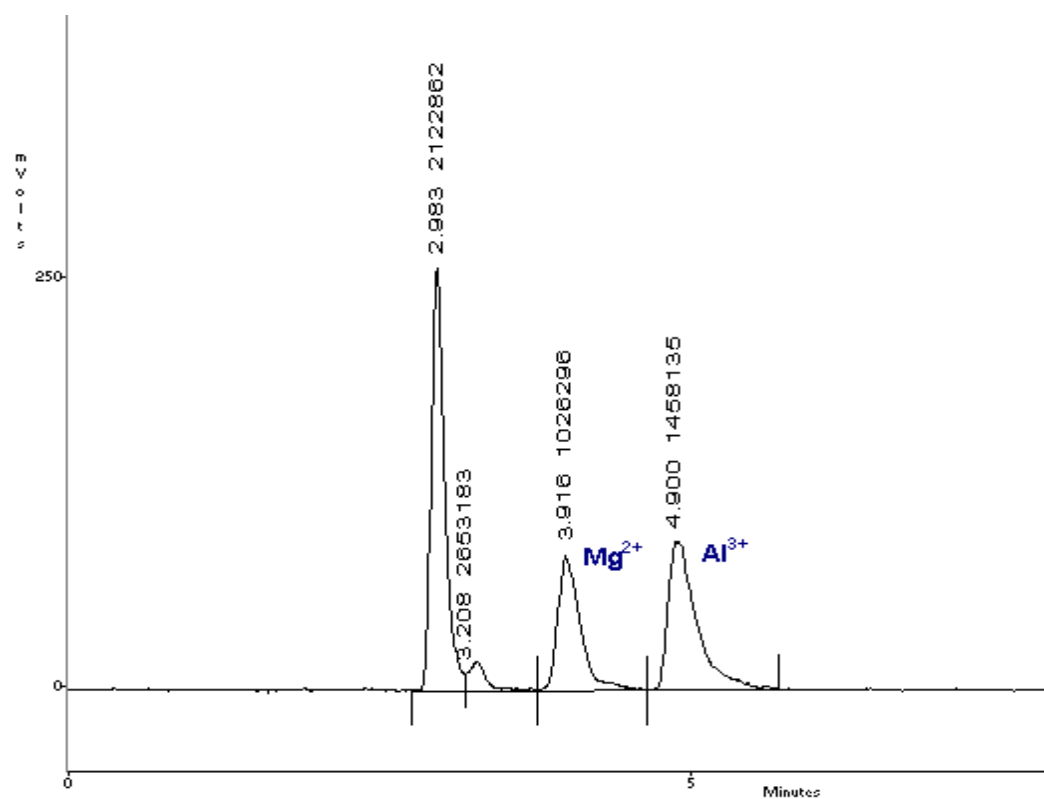
Ονομαστική περιεκτικότητα: 34,79 mg Mg^{2+} / δισκίο

Περιεκτικότητα (mg/tab)			Περιεκτικότητα %
32,4(±1,1)			93,1(±3,0)
$\Delta C_{Mg^{2+}} (\mu g \cdot mL^{-1})$	$C_o (\mu g Mg^{2+} / mL)$	$C_{sp} (\mu g Mg^{2+} / mL)$	% Ανάκτηση ¹
5	4,32	8,47	90,9
Ονομαστική περιεκτικότητα: 80,62 mg Al³⁺ / δισκίο			
Περιεκτικότητα (mg/tab)			Περιεκτικότητα %
82,2(±2,3)			102,0(±2,8)
$\Delta C_{Al^{3+}} (\mu g \cdot mL^{-1})$	$C_o (\mu g Al^{3+} / mL)$	$C_{sp} (\mu g Al^{3+} / mL)$	% Ανάκτηση ¹
10	10,97	20,99	100,1

1: ο υπολογισμός της ανάκτησης γίνεται με τον ελαστικό τύπο (βλ. Εξ. 5.2.)

Οι περιεκτικότητες που βρέθηκαν για το σκεύασμα Aludrox® chew.tabs στα δραστικά συστατικά $Mg(OH)_2$ και $Al(OH)_3$ συμφωνούν απόλυτα με τις προδιαγραφές της U.S.P. για τη συγκεκριμένη φαρμακοτεχνική μορφή (Μονογραφία: Alumina and Magnesia Tablets), που ορίζει τις επιτρεπόμενες τιμές να κυμαίνονται μεταξύ 90,0 και 110,0%. Η χαμηλή ανάκτηση ωστόσο του μαγνησίου, περίπου 90,0%, υποδηλώνει σφάλμα της μεθόδου στον προσδιορισμό του στοιχείου. Το σφάλμα πιθανόν οφείλεται στην ύπαρξη του εκδόχου στεατικό ασβέστιο. Το ασβέστιο, με τη συγκεκριμένη μέθοδο, εκλούεται μαζί με το μαγνήσιο και δεν κατέστη δυνατός ο διαχωρισμός τους με τη στήλη C18 κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες. Ενδέχεται, βέβαια, το έκδοχο στεατικό ασβέστιο να παραμένει αδιάλυτο κατά την κατεργασία του σκευάσματος, η μορφή της κορυφής όμως του χρωματογραφήματος δεν επιτρέπει να βγουν ασφαλή συμπεράσματα για τον προσδιορισμό του μαγνησίου (Σχ.6.8).

Αντίθετα, τα αποτελέσματα του ελέγχου περιεκτικότητας του αργιλίου είναι σχεδόν 100% τα οποία, σε συνδυασμό με την ανάκτηση του αργιλίου, υποδεικνύουν ότι η προτεινόμενη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του στοιχείου στο σκεύασμα.



Σχήμα 6.8: Χρωματογραφήματα σκευάσματος Aludrox® για έλεγχο της περιεκτικότητας σε δραστική ουσία (πάνω) και υπολογισμό της ανάκτησης (κάτω) προσδιορισμένα με στήλη C18 και κινητή φάση μίγμα TFA (0,45 mL·L⁻¹):ACN 95:5 (v/v). Επισημαίνεται η κορυφή του μαγνησίου που είναι δύσκολο να αξιολογηθεί.

6.3.4. Συμπεράσματα – Συζήτηση

1. Η ύπαρξη ταυτόχρονα δύο δραστικών στο ίδιο σκέυασμα καθόρισε πολλές από τις επιμέρους παραμέτρους της μεθόδου κυρίως όσον αφορά την προκατεργασία των δειγμάτων. Ο συμπροσδιορισμός των δύο κατιόντων και ο διαχωρισμός τους στη στήλη κατέστη δυνατός παρουσία ACN (βλ. § 6.3.2.3.). Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι οι παράγοντες διαχωριστότητας R_s των δύο στοιχείων, χωρίς και με ACN, ήταν 1,58 και 2,34, αντίστοιχα.

Σε επόμενο υποκεφάλαιο, ωστόσο, αναπτύχθηκε ακριβής μέθοδος η οποία αφορά στον προσδιορισμό του μαγνησίου.

2. Ο χρόνος έκλουσης του αργιλίου ήταν $t_R=4,70(\pm 0,11)$ min και ο παράγοντας ασυμμετρίας των κορυφών του ήταν $As=2,24(\pm 0,14)$. Οι αντίστοιχες τιμές για το μαγνήσιο ήταν $t_R=3,857(\pm 0,087)$ min και $As=1,61(\pm 0,11)$.

3. Η προκατεργασία του δείγματος Maalox Plus[®] απαιτούσε μεγάλη προσοχή, καθώς χρησιμοποιήθηκαν ισχυρά οξέα και θέρμανση. Η χρήση δε του H_2SO_4 δημιούργησε μια επιπλέον κορυφή, αυτή των θειικών ιόντων στα 2,47 min περίπου, που δεν παρεμπόδισε όμως τον προσδιορισμό αργιλίου και μαγνησίου (βλ. σχ. 6.7). Αντίθετα, η προκατεργασία του σκευάσματος Aludrox[®] ήταν απλή και γρήγορη χωρίς «κρίσιμα βήματα».

4. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στα διαφορετικά χαρακτηριστικά του κάθε σκευάσματος. Το Maalox Plus[®] είναι ένα διφασικό δισκίο με περισσότερα έκδοχα μερικά εκ των οποίων, όπως το χρώμα, μπορεί να επηρεάσουν την κατεργασία του δείγματος. Άγνωστο επίσης είναι το πώς συμπεριφέρθηκε η διμεθικόνη, που είναι μια πολυμερής ένωση, στην επίδραση των οξέων κατά τη διαλυτοποίηση και εάν επηρέασε την απελευθέρωση των υπόλοιπων δραστικών συστατικών. Τέλος, το Maalox Plus[®] περιέχει, κατά δήλωση, ξηρά πηκτική υδροξειδίου του αργιλίου που είναι ενδεχομένως διαφορετική από την πρώτη ύλη του δεύτερου σκευάσματος, που αναφέρεται ως «aluminium hydroxide» χωρίς κάποια άλλη διευκρίνιση, και ίσως να απαιτείται διαφορετική διαδικασία προκατεργασίας ώστε να απελευθερώνεται κάθε φορά επαναλήψιμα η ίδια ποσότητα δραστικών συστατικών.

5. Στα παραπάνω πιθανώς οφείλονταν τα αποτελέσματα της ανάκτησης του Maalox Plus[®] που εμφανίζουν ασυνέχεια, ενδεικτική ίσως της ανομοιογένειας του σκευάσματος κι όχι σφάλματος της μεθόδου προσδιορισμού.

6.4. Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC-ELSD για τον Προσδιορισμό Αργιλίου και Μαγνησίου σε Υγρό Φαρμακευτικό Σκεύασμα

6.4.1. Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια

6.4.1.1. HPLC – ELSD (Υποκ. 3.1 & 3.2)

Χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική στήλη διαχωρισμού C18 Spherisorb® 5µm ODS-2 της Waters διαστάσεων 250 x 4,6 mm.

6.4.1.2. Γυάλινα σκεύη – Ογκομετρικά όργανα (Υποκ. 3.4)

6.4.1.3. Διαλύτες – Αντιδραστήρια

A) Διαλύτες

- i) Νερό κατάλληλο για HPLC (εδάφιο 3.3.1.).
- ii) Ακετονιτρίλιο HPLC καθαρότητας 99,9% (Lab Scan, Dublin Ireland)

B) Υγρά αντιδραστήρια

- i) Τριφθοροξικό οξύ, TFA, καθαρότητας $\geq 98\%$, MW:114,02 g·mol⁻¹, d:1,48 g·mL⁻¹ (Riedel-de-Haën, Seelze, Germany)
- ii) Παγόμορφο οξικό οξύ, CH₃COOH, καθαρότητας $\geq 99.7\%$, MW: 60,05 g·mol⁻¹, d:1,05 g·mL⁻¹ (Panreac, Barcelona, Spain)
- iii) Εννεαφθοροπεντανοϊκό οξύ, NFPA, καθαρότητας $\geq 97\%$, MW:264,05 g·mol⁻¹, d:1,71 g·mL⁻¹ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- iv) Υδροχλωρικό οξύ, HCl, περιεκτικότητας 37%, d:1,19 g·mL⁻¹ (Merck, Darmstadt, Germany)

Γ) Στερεά αντιδραστήρια

- i) Νιτρικό αργίλιο, Al(NO₃)₃·9H₂O, καθαρότητας $\geq 98,5\%$, Mr:375,13 (Merck)
- ii) Χλωριούχο Μαγνήσιο, MgCl₂·6H₂O, καθαρότητας 99-101%, Mr:203,30 (Riedel-de-Haën)

6.4.2. Πειραματική πορεία

6.4.2.1. Περιγραφή σκευάσματος

Το υγρό φαρμακευτικό σκεύασμα έχει την επωνυμία Maalox® or.susp. Είναι ένα γαλακτώδες πόσιμο εναιώρημα (*oral suspension*). Περιέχει ως δραστική μίγμα υγρής πηκτής υδροξειδίου του αργιλίου και πάστας υδροξειδίου του μαγνησίου. Σε κάθε κουταλάκι εναιωρήματος (5 mL) αντιστοιχούν 114 mg Al₂O₃ (ή 60,33 mg Al³⁺) και 200 mg Mg(OH)₂ (ή 83,38 mg Mg²⁺). Η πυκνότητα του εναιωρήματος υπολογίζεται ότι είναι ίση με 1,035 g·mL⁻¹. Ως έκδοχα χρησιμοποιούνται τα συντηρητικά μεθυλοπαραπένιο και

προτυλοπαραπένιο καθώς και νατριούχος σακχαρίνη, κιτρικό οξύ, υγρή σορβιτόλη, μαννιτόλη, έλαιο μέντας, υδροξείδιο του νατρίου και πυκνό υδροχλωρικό οξύ.

6.4.2.2. Παρασκευή διαλυμάτων

- Διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions)
- Διαλύματα εργασίας

Η παρασκευή των διαλυμάτων παρακαταθήκης και εργασίας έχει περιγραφεί αναλυτικά στο εδάφιο 6.3.2.2. Οι τελικές αραιώσεις των διαλυμάτων έγιναν στην κινητή φάση που επιλέχθηκε για τον προσδιορισμό του αργιλίου στο εναιώρημα.

6.4.2.3. Δοκιμές βελτιστοποίησης μεθόδου διαχωρισμού

Παρασκευάστηκε δ/μα NFPA συγκέντρωσης 0,02 M ή 3,08 mL·L⁻¹ και δ/μα CH₃COOH συγκέντρωσης 0,01 M ή 0,572 mL·L⁻¹, τα οποία αναμίχθηκαν μεταξύ τους σε διάφορες αναλογίες, αλλά και με ACN, προκειμένου να βρεθεί η σύσταση της κινητής φάσης που διαχωρίζει τα δραστικά ιόντα του εναιωρήματος, Για κάθε μίγμα, εισήχθη στο χρωματογράφο πρότυπο διάλυμα των ιόντων Mg – Al και ελήφθη το αντίστοιχο χρωματογράφημα. Όλες οι δοκιμές φαίνονται στον πίνακα 6.8 που ακολουθεί.

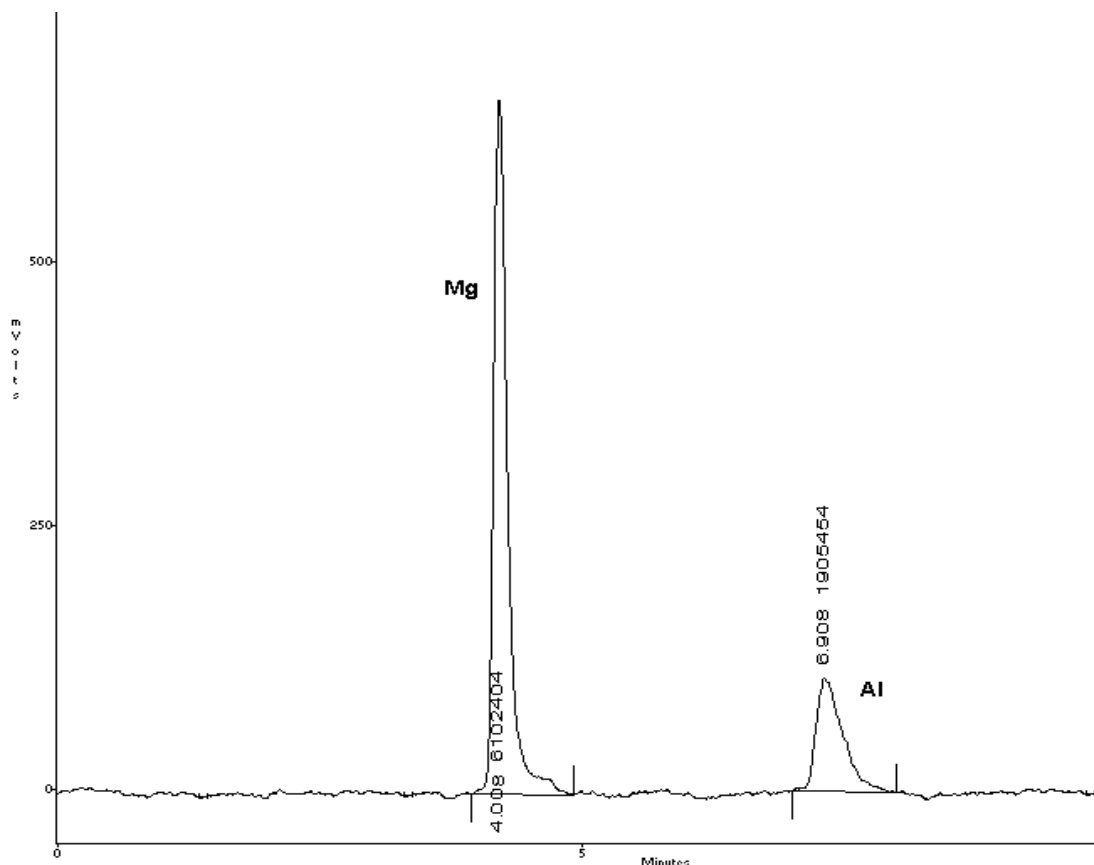
Πίνακας 6.8: Δοκιμές κινητών φάσεων για διαχωρισμό των ιόντων Al³⁺ και Mg²⁺ στο εναιώρημα.

Κινητή Φάση Α	Κινητή Φάση Β	Κινητή Φάση Γ	Αναλογία Α:Β:Γ (ν/ν/ν)
NFPA ¹	CH ₃ COOH ²	-	90:10
NFPA	CH ₃ COOH	-	70:30
NFPA	CH ₃ COOH	ACN	60:30:10
NFPA	CH ₃ COOH	ACN	70:10:20
NFPA	-	ACN	80:20
NFPA	H ₂ O	ACN	50:20:30
NFPA	H ₂ O	ACN	40:30:30
NFPA	H₂O	ACN	40:20:40
NFPA	H ₂ O	ACN	35:30:35

1: αρχική συγκέντρωση δ/τος NFPA 0,02 M ή 3,08 mL·L⁻¹

2: αρχική συγκέντρωση δ/τος CH₃COOH 0,01 M ή 0,572 mL·L⁻¹

Η σκιασμένη είναι η κινητή φάση που επιλέχθηκε για τον προσδιορισμό του μίγματος αργιλίου – μαγνησίου στο εναιώρημα.



Σχήμα 6.9: Χρωματογράφημα μίγματος Mg – Al με στήλη C18 και κινητή φάση μίγμα NFPA (2,05 mL·L⁻¹):ACN 60:40 (v/v). Οι χρόνοι έκλουσης των ιόντων ήταν Mg²⁺: t_R=4,40 min και Al³⁺: t_R=7,51 min. Ο παράγοντας διαχωριστότητας ήταν Rs=7,21.

Οι πειραματικές συνθήκες, περιληπτικά, που αφορούν στον προσδιορισμό του αργιλίου είναι:

Πίνακας 6.9: Πειραματικές συνθήκες χρωματογράφησης

Σύστημα HPLC – ELSD	
Στήλη	ODS-2 C18 (250 x 4,6 mm)
Κινητή φάση	NFPA (2,05 mL·L ⁻¹):ACN 60:40
Ταχύτητα ροής κινητής φάσης	1,0 mL·min ⁻¹
Θερμοκρασία ανιχνευτή	70 °C
Ευαισθησία (gain) ανιχνευτή	12
Πίεση φέροντος αερίου	3,5 bar

6.4.2.4. Κατασκευή καμπύλης αναφοράς – Επικύρωση μεθόδου

Μετρήθηκαν τα σήματα απόκρισης, A, των διαλυμάτων εργασίας στο σύστημα HPLC-ELSD τουλάχιστον τρεις φορές το καθένα, κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αναφοράς και έγινε η επικύρωση της μεθόδου με τον τρόπο που έχει ήδη περιγραφεί σε προηγούμενες παραγράφους.

Ο έλεγχος της ακρίβειας για τον υπολογισμό της ανάκτησης, έγινε με τη μέθοδο των πολλαπλών μεταβαλλόμενων δειγμάτων του εναιωρήματος, αλλά και με τη μέθοδο της προσθήκης γνωστής ποσότητας πρότυπου διαλύματος.

6.4.2.5. Κατεργασία σκευάσματος – Προετοιμασία δειγμάτων

➤ Maalox® oral suspension: Μετά από ισχυρή ανακίνηση, σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL ελήφθησαν, υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση, 2 mL εναιωρήματος (Διάλυμα Α). Προστέθηκε 1,5 mL πυκνού TFA και το μίγμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για περίπου 5 min. Στη συνέχεια αραιώθηκε με νερό μέχρι πλήρωσης του όγκου. Το διαλυμένο προϊόν διηθήθηκε σε φίλτρα Millipore και 5,0 mL διηθήματος αραιώθηκαν στα 25 mL με κινητή φάση. Ακολούθησε δεύτερη αραιώση 1,0 mL στα 10 mL με την κινητή φάση. Έγινε εισαγωγή στο σύστημα HPLC-ELSD.

Ταυτόχρονα, σε δύο άλλες φιάλες των 100 mL έγιναν δειγματοληψία 3 και 4 mL εναιωρήματος (Διαλύματα Β και Γ, αντίστοιχα), και αφού ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως παραπάνω, τα διαλύματα μετρήθηκαν στην HPLC. Τα διαλύματα Α, Β και Γ χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο της περιεκτικότητας αλλά και της ανάκτησης.

➤ Παρασκευάστηκε λευκό δείγμα (placebo) του εναιωρήματος. Τα στερεά έκδοχα αναμίχθηκαν με μικρή ποσότητα HCl και νερού και, υπό συνεχή ανάδευση, όγκος ίσος με 2 mL διαλύθηκε σε πυκνό TFA, αναδεύτηκε σε λουτρό υπερήχων και αραιώθηκε με νερό σε φιάλη των 100 mL. Το μίγμα διηθήθηκε και 2,0 mL του διηθήματος αραιώθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL με κινητή φάση.

6.4.3. Αποτελέσματα

6.4.3.1. Καμπύλες αναφοράς Al^{3+} και Mg^{2+} – Επικύρωση

Οι καμπύλες αναφοράς για τα δύο δραστικά ιόντα σε τέσσερις διαδοχικές ημέρες με τους συντελεστές log a και b, αλλά και τα δεδομένα για την επικύρωση της μεθόδου (επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα, όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης), παρουσιάζονται στους πίνακες 6.10 και 6.11. Με N συμβολίζονται τα σημεία της καμπύλης αναφοράς και με n οι επαναλήψεις για κάθε μία συγκέντρωση διαλύματος.

Πίνακας 6.10: Καμπύλες αναφοράς Mg^{2+} – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου

Ημέρα	Εξίσωση ευθείας	r^2 (N≥4, n≥4)	%RSD (1 – 20 µg · mL ⁻¹)
1 ^η	$\log A = 5,8948(\pm 0,0084) + 1,184(\pm 0,013) \cdot \log C$	0,9998	0,56 – 5,2
2 ^η	$\log A = 5,9557(\pm 0,0062) + 1,1402(\pm 0,0094) \cdot \log C$	0,99993	0,092 – 2,6
3 ^η	$\log A = 5,927(\pm 0,024) + 1,102(\pm 0,037) \cdot \log C$	0,998	0,60 – 2,8
4 ^η	$\log A = 5,937(\pm 0,034) + 1,088(\pm 0,053) \cdot \log C$	0,998	0,43 – 5,4
Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα			
Interday %RSD του log a		0,43	
Interday %RSD του b		3,8	
LOQ (µg·mL ⁻¹)		0,58	
LOD (µg·mL ⁻¹)		0,23	

Πίνακας 6.11: Καμπύλες αναφοράς Al³⁺ – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου

Ημέρα	Εξίσωση ευθείας	r^2 (N≥4, n≥4)	%RSD (1 – 20 µg · mL ⁻¹)
1 ^η	$\log A = 5,610(\pm 0,018) + 1,114(\pm 0,028) \cdot \log C$	0,9994	1,0 – 5,9
2 ^η	$\log A = 5,446(\pm 0,022) + 1,271(\pm 0,033) \cdot \log C$	0,9993	0,44 – 4,0
3 ^η	$\log A = 5,465(\pm 0,015) + 1,274(\pm 0,023) \cdot \log C$	0,9996	0,091 – 8,1
4 ^η	$\log A = 5,424(\pm 0,024) + 1,350(\pm 0,037) \cdot \log C$	0,9992	0,18 – 3,1
Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα			
Interday %RSD του log a		1,5	
Interday %RSD του b		7,9	
LOQ (µg·mL ⁻¹)		0,63	
LOD (µg·mL ⁻¹)		0,23	

Τα αποτελέσματα της επικύρωσης της μεθόδου και για τα δύο στοιχεία έδωσαν πολύ καλά αποτελέσματα. Οι μετρήσεις ήταν επαναλήψιμες, τόσο μέσα στην ίδια ημέρα όσο και σε διαδοχικές ημέρες. Αξιοσημείωτο ήταν ότι με τη χρήση του NFPA τα όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με τη μέθοδο με το TFA. Συγκεκριμένα, με το NFPA, τα LOD_{Mg} και LOQ_{Mg} μειώθηκαν περίπου στο μισό ενώ τα LOD_{Al} και LOQ_{Al} μειώθηκαν σχεδόν τέσσερις φορές.

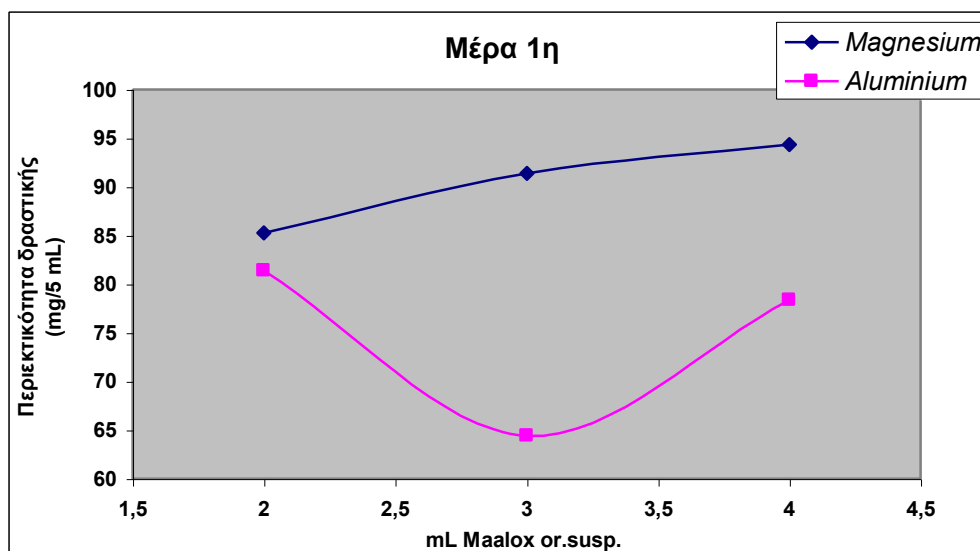
6.4.3.2. Έλεγχος περιεκτικότητας σε δραστική ουσία – Έλεγχος ανάκτησης

Εισηχθησαν στο σύστημα HPLC-ELSD τα διαλύματα Α, Β και Γ του σκευάσματος Maalox® or.susp. και μετρήθηκε το σήμα απόκρισης. Η μέτρηση κάθε διαλύματος έγινε τρεις φορές τουλάχιστον. Από τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν οι περιεκτικότητες σε mg Mg/5 mL και mg Al/5 mL εναιωρήματος, αλλά και σε ποσοστό επί τοις εκατό. Τα αποτελέσματα των τριών διαλυμάτων μαζί εξάγουν συμπεράσματα για την ανάκτηση της μεθόδου. Λόγω της ανομοιογένειας των αποτελεσμάτων, ο υπολογισμός της περιεκτικότητας και της ανάκτησης έγινε από πολλαπλά δείγματα. Όλα τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 6.12.

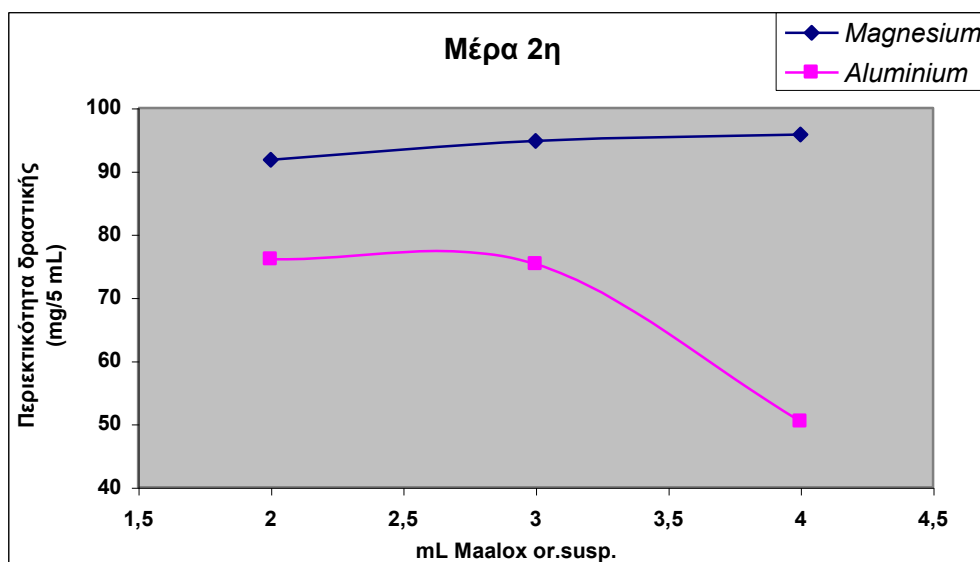
Πίνακας 6.12: Αποτελέσματα περιεκτικότητας δραστικών συστατικών σκευάσματος εναιωρήματος – Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης.

Ονομαστική περιεκτικότητα μαγνησίου: 83,38 mg Mg²⁺ / 5 mL				
Διάλυμα	Μέρα 1^η		Μέρα 2^η	
	Περιεκτικότητα Mg²⁺		Περιεκτικότητα Mg²⁺	
	mg/5 mL	%	mg/5 mL	%
A	85,27(±0,58)	102,27(±0,69)	91,8(±2,5)	110,1(±3,0)
B	91,4(±2,4)	109,6(±2,9)	94,79(±0,84)	113,7(±1,0)
Γ	94,4(±1,1)	113,2(±1,3)	95,8(±1,2)	114,9(±1,4)
Ονομαστική περιεκτικότητα αργιλίου: 60,33 mg Al³⁺ / 5 mL				
Διάλυμα	Μέρα 1^η		Μέρα 2^η	
	Περιεκτικότητα Al³⁺		Περιεκτικότητα Al³⁺	
	mg/5 mL	%	mg/5 mL	%
A	81,4(±2,8)	134,4(±4,7)	76,06(±0,63)	126,1(±1,0)
B	64,43(±0,38)	106,79(±0,63)	75,3(±1,4)	124,8(±2,4)
Γ	78,3(±2,0)	129,9(±3,4)	50,407(±0,043)	83,552(±0,071)

Στα διαγράμματα που ακολουθούν φαίνονται παραστατικά οι διακυμάνσεις των αποτελεσμάτων για τις δύο δραστικές ουσίες του σκευάσματος.



Σχήμα 6.10: Διάγραμμα απεικόνισης των αποτελεσμάτων της ανάκτησης των δραστικών ουσιών με την τεχνική των πολλαπλών μεταβαλλόμενων την 1^η μέρα εκτέλεσης της δοκιμής.



Σχήμα 6.11: Διάγραμμα απεικόνισης των αποτελεσμάτων της ανάκτησης των δραστικών ουσιών με την τεχνική των πολλαπλών μεταβαλλόμενων δειγμάτων τη 2^η μέρα εκτέλεσης της δοκιμής.

Για να θεωρηθεί η δοκιμή επιτυχημένη θα έπρεπε, ανεξαρτήτως του όγκου του δείγματος που λαμβάνεται, η περιεκτικότητα σε δραστικά συστατικά να είναι σταθερή. Ωστόσο, η εξέταση των δεδομένων του πίνακα 6.12 και των διαγραμμάτων, έδειξε μεγάλη ανομοιομορφία των αποτελεσμάτων ειδικά σε ό,τι σχετίζεται με τον προσδιορισμό του αργιλίου, γεγονός που μπορεί να είναι ενδεικτικό της ανομοιογένειας του σκευάσματος, η οποία εξάλλου είναι εύκολα αντιληπτή και από την οπτική εξέταση του εναιωρήματος. Φαίνεται, μάλιστα, ότι ούτε η ισχυρή ανακίνηση, ούτε η συνεχής ανάδευση κατά τη δειγματοληψία ήταν ικανά να εξασφαλίσουν αξιόπιστα αποτελέσματα. Αντίθετα, η

περιεκτικότητα σε μαγνήσιο ακολουθούσε ανοδική τάση ανάλογη με τον όγκο δείγματος που αναλυόταν κάθε φορά.

Λόγω αδυναμίας εξαγωγής συμπερασμάτων, δοκιμάστηκε ο υπολογισμός της ανάκτησης και με τη μέθοδο της προσθήκης γνωστών ποσοτήτων πρότυπου διαλύματος. Η παρασκευή των διαλυμάτων έγινε ως εξής:

➤ 2 mL εναιωρήματος + 1,5 mL π. TFA $\Rightarrow$ λουτρό υπερήχων για ~5 min $\Rightarrow$ αραίωση με νερό μέχρι πλήρωσης του όγκου (100 mL). **Διάλυμα Sol A**

➤ 2 mL εναιωρήματος + 1,5 mL π. TFA + 3 mL πρότυπου δ/τος μαγνησίου ($C_{std}=6,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) + 3 mL πρότυπου δ/τος αργιλίου ($C_{std}=7,50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) $\Rightarrow$ λουτρό υπερήχων για ~5 min $\Rightarrow$ αραίωση με νερό μέχρι πλήρωσης του όγκου (100 mL). **Διάλυμα Sol B**

➤ 2 mL εναιωρήματος + 1,5 mL π. TFA + 5 mL πρότυπου δ/τος μαγνησίου ($C_{std}=6,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) + 5 mL πρότυπου δ/τος αργιλίου ($C_{std}=7,50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) $\Rightarrow$ λουτρό υπερήχων για ~5 min $\Rightarrow$ αραίωση με νερό μέχρι πλήρωσης του όγκου (100 mL). **Διάλυμα Sol C**

➤ 2 mL εναιωρήματος + 1,5 mL π. TFA + 10 mL πρότυπου δ/τος μαγνησίου ($C_{std}=6,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) + 10 mL πρότυπου δ/τος αργιλίου ($C_{std}=7,50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) $\Rightarrow$ λουτρό υπερήχων για ~5 min $\Rightarrow$ αραίωση με νερό μέχρι πλήρωσης του όγκου (100 mL). **Διάλυμα Sol D**

Οι τελικές αραιώσεις των διαλυμάτων εργασίας έγιναν όπως έχει περιγραφεί στο εδάφιο 6.4.2.5. Για πληρέστερη εικόνα των αποτελεσμάτων, η δοκιμή εκτελέστηκε σε δύο διαφορετικές συσκευασίες από διαφορετικές παρτίδες του ίδιου σκευάσματος (Lot.no.122 και Lot.no.147) που αγοράστηκαν από διαφορετικά φαρμακεία της ίδιας περιοχής. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον ακόλουθο πίνακα:

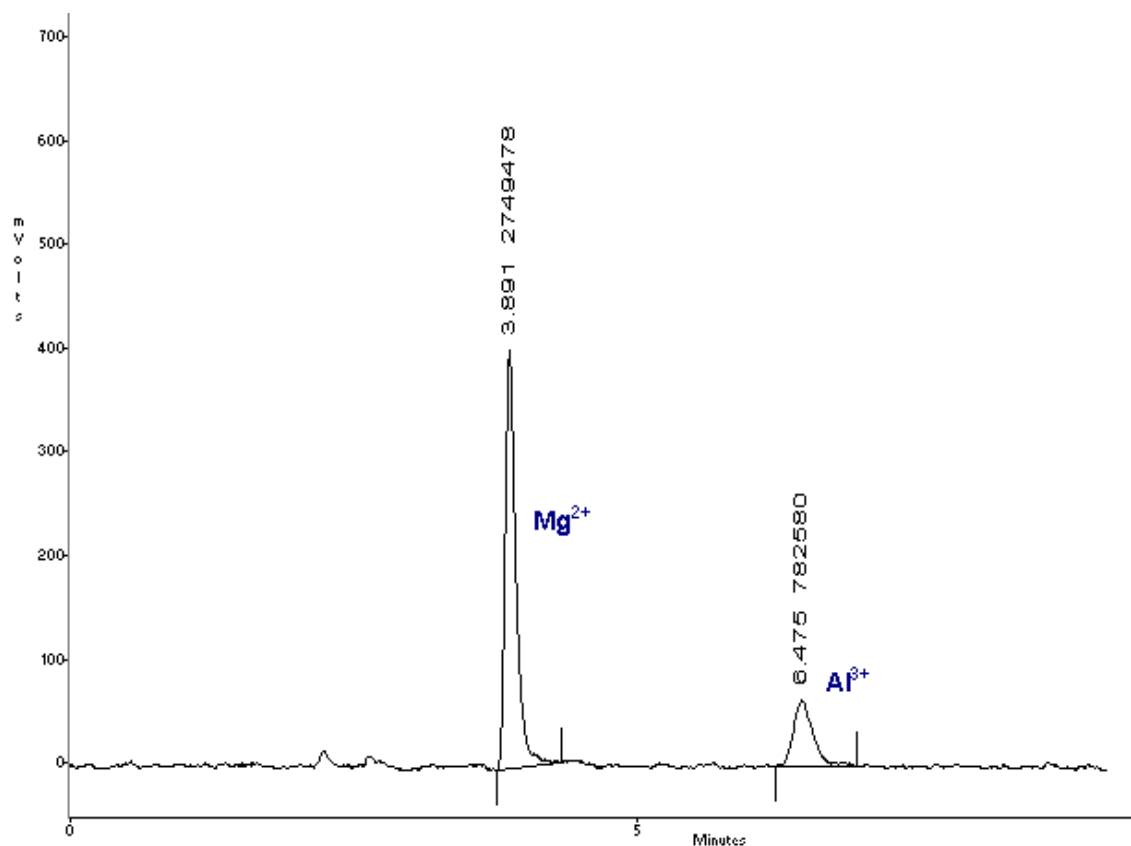
Πίνακας 6.13: Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης σκευάσματος Maalox[®] or.susp.

Αριθμός παρτίδας (Lot No)	Δραστικό ιόν	% περιεκτικότητα		% A ν ά κ τ η σ η ¹	
		Sol A	Sol B	Sol C	Sol D
122	Mg ²⁺	103,4(±1,7)	121,60	98,14	120,13
	Al ³⁺	139,1(±5,7)	100,93	94,94	110,50
147	Mg ²⁺	99,9(±2,6)	102,99	90,81	108,38
	Al ³⁺	95,9(±1,0)	111,98	95,95	104,94
147 (Μέρα 2 ^η)	Mg ²⁺	89,3(±2,6)	97,32	102,67	112,30
	Al ³⁺	111,3(±2,8)	101,29	92,76	102,21

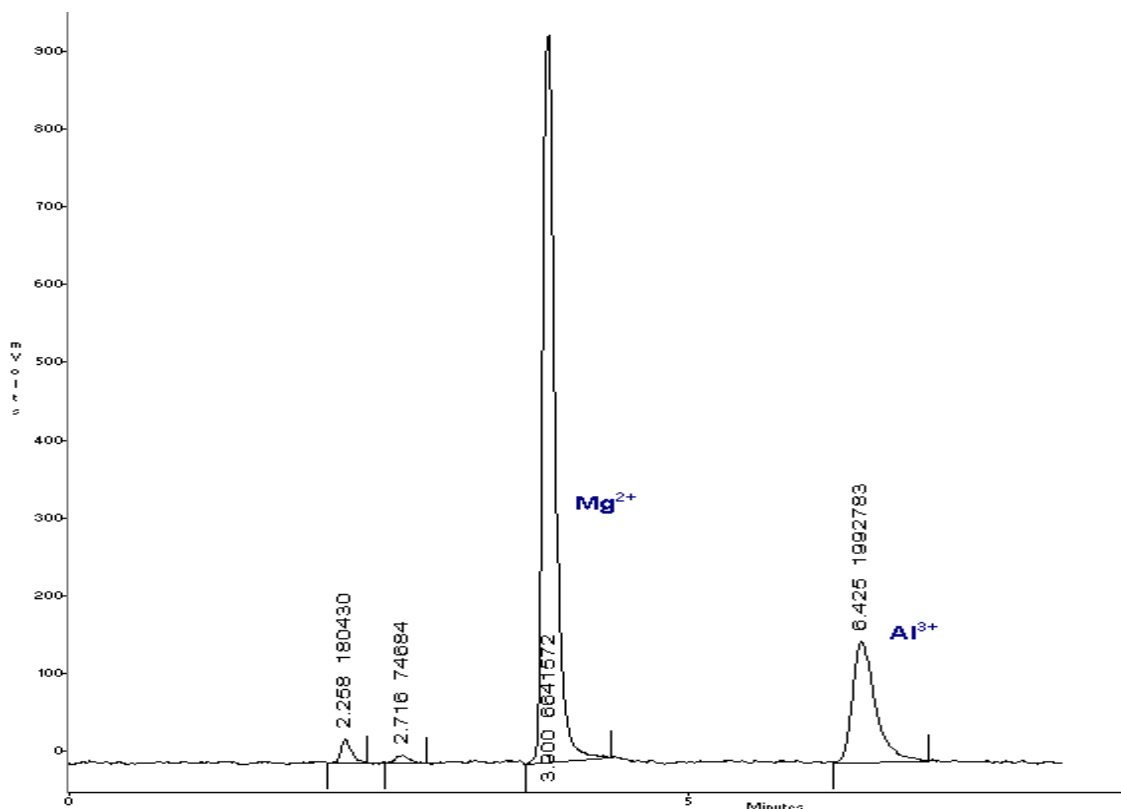
1: ο υπολογισμός της ανάκτησης έγινε με τον αυστηρό τύπο (βλ. Εξ. 5.1)

Τα αποτελέσματα, περιεκτικότητας και ανάκτησης, του πίνακα 6.13 ήταν ενδεικτικά του ότι η φύση του δείγματος δε βοηθούσε να ληφθούν επαναλήψιμα αποτελέσματα. Έτσι, ενώ προέκυψαν μετρήσεις της περιεκτικότητας εκτός προδιαγραφών, τα αντίστοιχα ποσοστά ανάκτησης υποδηλώνουν την έλλειψη συστηματικού σφάλματος και αντίστροφα. Μάλιστα, ακόμη και για σκεύασμα της ίδιας παρτίδας που μετρήθηκε με την ίδια διαδικασία, δύο διαδοχικές ημέρες, τα αποτελέσματα παρουσίασαν μεταξύ τους σημαντικές διακυμάνσεις. Ωστόσο μεταξύ των δύο παρτίδων, η παρτίδα No.147 εμφάνισε σαφώς ικανοποιητικότερα αποτελέσματα. Επιλέχθηκε για τον υπολογισμό της % ανάκτησης να χρησιμοποιηθεί ο αυστηρός τύπος (Εξ. 5.1) για να υπάρχει ακριβέστερη εικόνα, εννοείται όμως ότι με την εξίσωση 5.2 η % ανάκτηση είναι βελτιωμένη προς πιο αποδεκτές τιμές.

Η ανομοιογένεια που χαρακτηρίζει το δείγμα αναγκάζει τη U.S.P. να θεσπίσει πιο διευρυμένα όρια προδιαγραφών περιεκτικότητας που κυμαίνονται από 90,0 ως 110,0% και σε κάποιες περιπτώσεις μέχρι 115,0%.



Σχήμα 6.12.: Χρωματογράφημα σκευάσματος Maalox[®] or.susp. (2 mL→100 mL) με στήλη C18 και κινητή φάση NFPA (2,05 mL·L⁻¹):ACN 60:40 (v/v).



Σχήμα 6.13.: Χρωματογράφημα σκευάσματος Maalox® or.susp. (2 mL→100 mL) εμβολιασμένου με 5 mL πρότυπου δ/τος Mg ($C_{std}=6,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) και 5 mL πρότυπου δ/τος Al ($C_{std}=7,50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) με στήλη C18 και κινητή φάση NFPA (2,05 mL·L⁻¹):ACN 60:40 (v/v).

6.4.4. Συμπεράσματα – Συζήτηση

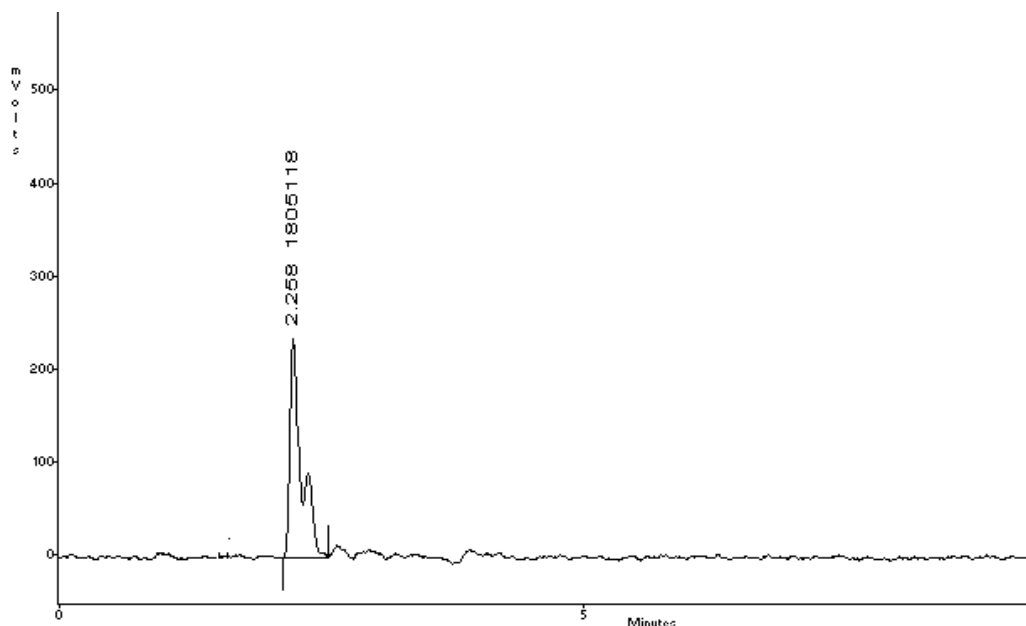
1. Οι δοκιμές της κινητής φάσης έδειξαν ότι μια πολύ μικρή μεταβολή της ποσότητας NFPA στην κινητή φάση (περίπου 5%) επηρέασε σε μεγάλο βαθμό την έκλουση του αργιλίου, το οποίο με λιγότερο NFPA στην κινητή φάση κατακρατούνταν περισσότερη ώρα στη στήλη. Αντίθετα η κορυφή του μαγνησίου παρέμενε ανεπηρέαστη από μια τέτοια μεταβολή. Αυτό συμβαίνει διότι το αργίλιο, ως τρισθενές, σχηματίζει πολύ πιο ισχυρά σύμπλοκα με το NFPA από ό,τι το μαγνήσιο.

2. Ο χρόνος έκλουσης του αργιλίου με αυτή τη μέθοδο ήταν $t_R=6,78(\pm 0,26) \text{ min}$ και ο παράγοντας ασυμμετρίας των κορυφών του ήταν $As=1,74(\pm 0,15)$. Οι αντίστοιχες τιμές του μαγνησίου ήταν $t_R=4,02(\pm 0,12) \text{ min}$ και $As=1,48(\pm 0,16)$.

3. Η μέθοδος διαλυτοποίησης των δραστικών συστατικών του σκευάσματος ήταν απλή. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτούνταν μόνο κατά τη δειγματοληψία που πρέπει να γίνεται υπό συνεχή ισχυρή ανάδευση με στεγνά σιφώνια τα οποία κατόπιν έπρεπε να πλένονται με το δ/τη διάλυσης ώστε να παραλαμβάνεται όλη, κατά το δυνατόν, η ποσότητα δείγματος.

4. Οι αραιώσεις του δείγματος placebo κατά την κατεργασία των διαλυμάτων δεν ήταν οι ίδιες όπως του εναιωρήματος. Αυτό συνέβη διότι η παρασκευή του ψευδοφαρμάκου έγινε κατά προσέγγιση κι όχι σύμφωνα με τις πραγματικές αναλογίες των

εκδόχων στο σκεύασμα καθώς αυτές ήταν άγνωστες. Επομένως, με οποιαδήποτε αραίωση μπορούσε να αποδειχτεί η ύπαρξη ή όχι παρεμποδίσεων από τα έκδοχα. Για το εν λόγω σκεύασμα δεν υπήρχαν παρεμποδίσεις από τα έκδοχα όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα.



Σχήμα 6.14: Χρωματογράφημα placebo σκευάσματος Maalox[®] or.susp. με στήλη C18 και κινητή φάση NFPA (2,05 mL·L⁻¹):ACN 60:40 (v/v).

5. Η ανομοιογένεια των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι αντικατοπτρίζει την ανομοιογένεια του δείγματος γι' αυτό η ανάκτηση της μεθόδου υπολογίστηκε με διάφορες τεχνικές χωρίς, ωστόσο, τα αποτελέσματα να είναι επαναλήψιμα, από μέρα σε μέρα, ούτε καν για την ίδια συσκευασία φαρμάκου.

6. Η μέθοδος προσδιορισμού του αργιλίου παρουσία NFPA στην κινητή φάση, υπερτερεί έναντι της προηγούμενης με το TFA στο ότι τα όρια ανίχνευσης ήταν σημαντικά χαμηλότερα (βλ.εδαφιο 6.4.3.1.), ενώ ο χρόνος έκλουσης του στοιχείου στα 7 min περίπου, επέτρεψε το διαχωρισμό από άλλα βασικά και πολύ κοινά μέταλλα που όπως έχει φανεί από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα και θα φανεί και σε επόμενα, εκκλύονται κατά κανόνα νωρίτερα, όπως π.χ. το μαγνήσιο, το νάτριο, το κάλιο.

7. Τέλος, έγιναν προσπάθειες για τον προσδιορισμό του αργιλίου και με τη στήλη κατιονανταλλαγής CS14. Όμως τα οξέα που χρησιμοποιήθηκαν (TFA, NFPA) σχηματίζουν όλα διαλυτά ανιονικά σύμπλοκα με το αργίλιο και η κατιονανταλλακτική στήλη τα εκλύει πολύ γρήγορα, σχεδόν ταυτόχρονα με τα έκδοχα των σκευασμάτων καθιστώντας δύσκολο το διαχωρισμό τους. Ο προσδιορισμός των ανιονικών συμπλόκων απαιτεί μία στήλη ανιονανταλλαγής που όμως δεν ήταν διαθέσιμη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΕ ΕΝΕΣΙΜΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ

7.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφονται μέθοδοι προσδιορισμού του ψευδαργύρου, ενός μετάλλου που αποτελεί σημαντικό ιχνοστοιχείο του οργανισμού και συνδέεται με πολλές από τις βασικές ανθρώπινες λειτουργίες, κυρίως μέσα από τη δράση των πρωτεϊνών που καλούνται μεταλλοθειονίνες. Περισσότερες λεπτομέρειες για το βιολογικό ρόλο του ψευδαργύρου έχουν αναφερθεί στο κεφάλαιο 2.

Ο ρόλος του ψευδαργύρου στη σταθεροποίηση του μορίου της ινσουλίνης είναι εξαιρετικά σπουδαίος. Η ορμόνη, δημιουργώντας σύμπλοκο με τον ψευδάργυρο, σχηματίζει εξαμερές, μια ανενεργό, αλλά πολύ σταθερή μορφή, και με αυτή τη μορφή αποθηκεύεται στο σώμα, οπότε διασπάται στα ενεργά μονομερή ανάλογα με τις απαιτήσεις του οργανισμού. Κάθε φορά που το πάγκρεας εκκρίνει ινσουλίνη, παρατηρείται ελάττωση της συγκέντρωσης του Zn σε αυτό.

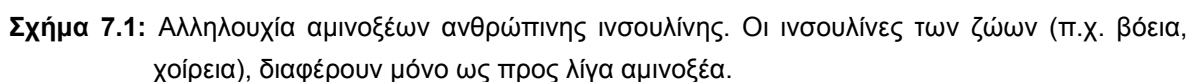
Εξαιτίας αυτής της αξιοσημείωτης σταθερότητας, πολλά ενέσιμα φαρμακευτικά σκευάσματα ινσουλίνης περιέχουν την ανενεργό εξαμερή μορφή της ορμόνης, η οποία απελευθερώνεται ελεγχόμενα στον οργανισμό ώστε να παρέχεται παρατεταμένη δράση.

Οι μέθοδοι που περιγράφονται στο κεφάλαιο για τον προσδιορισμό του μετάλλου είναι δύο. Η πρώτη βασίστηκε στο μηχανισμό ιοντικών ζευγών (ion-pair mechanism) και η δεύτερη στο μηχανισμό κατιονανταλλαγής (ion-exchange interactions). Παράλληλα, στο κεφάλαιο, γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων από τις δύο μεθόδους με αυτά που ελήφθησαν με εφαρμογή της μεθόδου αναφοράς για τον προσδιορισμό του ψευδαργύρου, που είναι η Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης.

7.2. ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ

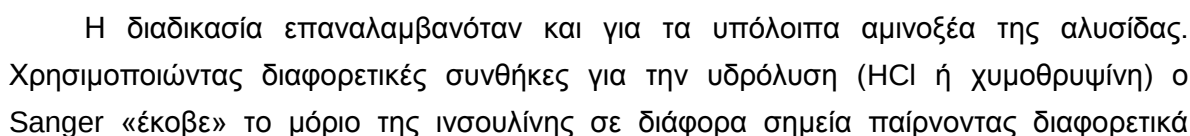
7.2.1. Δομή ινσουλίνης^[237,238]

Η ινσουλίνη είναι μια πολυπεπτιδική ορμόνη, μία πρωτεΐνη σχετικά μικρού μεγέθους, με μοριακό βάρος περίπου 6000 Daltons. Αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες, τις Α και Β, με συνολικά 51 αμινοξέα, από τα οποία 21 βρίσκονται στην αλυσίδα Α και 30 στη Β. Διαθέτει τρεις δισουλφιδικές γέφυρες (-S-S-), οι δύο εκ των οποίων συγκρατούν τις αλυσίδες μεταξύ τους (σχ.7.1).



Όταν βρίσκονται σε διάλυμα, τα μόρια της ινσουλίνης σχηματίζουν διμερή εξαιτίας των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των C-τελικών άκρων των Β αλυσίδων, ενώ παρουσία ιόντων Zn σχηματίζουν εξαμερή. Τα μονομερή και διμερή διαχέονται γρήγορα στο αίμα, αντίθετα με τα εξαμερή, με αποτέλεσμα η ινσουλίνη που περιέχει εξαμερή σε μεγάλη αναλογία, να απορροφάται καθυστερημένα από τον οργανισμό.

Η δομή της ινσουλίνης, με την αλληλουχία των αμινοξέων προσδιορίστηκε από τον καθηγητή Frederick Sanger στο Πανεπιστήμιο του Cambridge στα μέσα του 50' και αποτελούσε έναν πραγματικό άθλο για την εποχή. Η μέθοδος βασίστηκε στη χρήση του αντιδραστηρίου 1-φθορο-2,4-δινιτροβενζολίου (FDNB, ή αντιδραστήριο Sanger) το οποίο αντιδρά με την ελεύθερη αμινομάδα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας σε ήπιες συνθήκες. Με υδρόλυση αποσπάται το 2,4-δινιτροφαίνυλο παράγωγο του πρώτου αμινοξέος (βλ. αντιδράσεις) η ταυτότητα του οποίου προσδιορίστηκε με χρωματογραφία χάρτη^[237].



πεπτιδία τα οποία διαχώριζε και καθάριζε με χρωματογραφία δύο διαστάσεων (ηλεκτροφόρηση ως προς τη μία διάσταση και χρωματογραφία χάρτη ως προς την άλλη). Κατόπιν προσδιόριζε την αλληλουχία των επιμέρους πεπτιδίων κατά τα γνωστά.

7.2.3. Βιολογικός ρόλος ινσουλίνης^[109,237,238]

Η ινσουλίνη παράγεται στα β-κύτταρα που αποτελούν το 60-85% των κυττάρων των ενδοκρινών περιοχών του παγκρέατος (νησίδες Langerhans). Η έκκρισή της είναι αποτέλεσμα διέγερσης που προκαλούν τα μόρια της γλυκόζης και το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα και η δράση της είναι αναβολική. Μαζί με τη γλυκαγόνη, που επίσης παράγεται στο πάγκρεας και της οποίας η δράση είναι καταβολική, ρυθμίζουν τη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα σε μια στενή περιοχή (70-110 mg·dL⁻¹). Μεγάλη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, αυξάνει την έκκριση της ινσουλίνης. Η ινσουλίνη, με τη σειρά της, διευκολύνει την πρόσληψη γλυκόζης, που αποτελεί την κύρια πηγή χημικής ενέργειας, από τα κύτταρα του οργανισμού (μυϊκά, λιπώδη κύτταρα, ερυθρά αιμοσφαίρια).

Η ινσουλίνη, επιπλέον, βοηθά στην αποθήκευση της γλυκόζης στα κύτταρα και στο ήπαρ με τη μορφή γλυκογόνου για μελλοντική χρήση. Εάν και το ήπαρ «κορεστεί», η γλυκόζη αποθηκεύεται στα λιπώδη κύτταρα για τη σύνθεση λιπαρών οξέων, γλυκερόλης και τριγλυκεριδίων και επομένως εμπλέκεται στους μηχανισμούς συσσώρευσης λίπους στο σώμα. Ακόμη, η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη αμινοξέων για το σχηματισμό πρωτεϊνών και επομένως ενισχύει τους μηχανισμούς αντιγραφής του DNA. Βοηθά στην πρόσληψη καλίου, μειώνοντας τη συγκέντρωσή του στο αίμα, χαλαρώνει το μυϊκό τόνο και βοηθά στη έκκριση HCl οξέος από τα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου.

Η έλλειψη της ινσουλίνης (π.χ. σε καταστάσεις νηστείας), οδηγεί σε κατανάλωση και αλλοίωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, ενώ η μειωμένη έκκρισή της, λόγω δυσλειτουργίας του παγκρέατος ή η αδυναμία των κυττάρων να τη χρησιμοποιήσουν σωστά, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη (diabetes mellitus, τύπου I και II) που αποτελεί, χωρίς αμφιβολία, τη σημαντικότερη μεταβολική νόσο του ανθρώπου. Ουσιαστικά, ο διαβητικός οργανισμός αδυνατεί να μεταβολίσει την τροφή ώστε να ανανεώσει τους ιστούς του κι έτσι, ενώ ο ασθενής μπορεί να τρέφεται κανονικά, τα κύτταρα στην πραγματικότητα λιμοκτονούν. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ινσουλίνη και σχετιζόμενες πρωτεΐνες παράγονται στον εγκέφαλο και μειωμένα επίπεδά τους σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου Alzheimer^[239,240].

7.2.4. Βιομηχανική παραγωγή ινσουλίνης^[104,237,241]

Η φαρμακευτική εταιρία Eli Lilly ήταν η πρώτη, και επί χρόνια η μοναδική, που παρασκεύαζε ινσουλίνη με τη διαδικασία της εκχύλισης κυρίως από χοίρειο και λιγότερο από βόειο πάγκρεας και καθαρισμό, στη συνέχεια, με σειρά βιοχημικών επεξεργασιών («συμβατικές» ινσουλίνες, conventional insulins).

Σήμερα, ωστόσο, η ινσουλίνη παράγεται σε βιομηχανική κλίμακα και με προσιτό κόστος, με βιοτεχνολογικές μεθόδους, με την τεχνολογία του *ανασυνδυσασμένου DNA*

(*recombinant DNA*). Η λεγόμενη και «ανθρώπινη ινσουλίνη» παράγεται από γενετικώς τροποποιημένα βακτήρια *Escherichia coli* ή κύτταρα ζύμης *Saccharomyces Cerevisiae*, αλλά και ημισυνθετικά, με ενζυμική τροποποίηση της χοίρειας ινσουλίνης, με αποτέλεσμα η χημική δομή της να προσομοιάζει με αυτή του ανθρώπινου παγκρέατος. Ως πλεονέκτημα αναφέρεται η ελαχιστοποίηση των αλλεργικών αντιδράσεων, ιδιαίτερα σε υπερευαίσθητους ασθενείς, και η χαμηλή ανοσογονικότητά της.

Τα τελευταία 10 χρόνια κυκλοφορούν στο εμπόριο οι «τροποποιημένες» ινσουλίνες. Πρόκειται για νεότερους τύπους ινσουλινών που προέρχονται από ανασυνδυασμένη «ανθρώπινη» ινσουλίνη στην οποία έχουν προκληθεί αλλαγές στην αλληλουχία των αμινοξέων, σε περιοχές χωρίς δραστική σημασία, και άρα η δομή τους διαφέρει από τη φυσική ανθρώπινη ινσουλίνη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η *ινσουλίνη Lispro* (Σχ.7.2) που προέρχεται από την αντιστροφή στην αλληλουχία των αμινοξέων από Pro-Lys σε Lys-Pro. Αυτή η μικρή τροποποίηση αποσταθεροποιεί το διμερές προς τα δραστικά μονομερή τα οποία απορροφούνται ταχύτερα και έτσι η συνολική δράση της ινσουλίνης διαρκεί λιγότερο.



Σχήμα 7.2: Τροποποιημένη ινσουλίνη Lispro.

7.2.5. Διάφοροι τύποι ινσουλίνης

1. Ινσουλίνη βραχείας δράσης: Η έναρξη της δράσης της είναι ταχεία, περίπου 30 min μετά τη χορήγηση και το μέγιστο της δράσης της είναι 2-4 ώρες μετά. Χορηγείται ενδοφλέβια και υποδόρια. Στις ινσουλίνες βραχείας δράσης ανήκει και η ινσουλίνη Lispro που δρα ακόμη ταχύτερα (15 min μετά τη χορήγηση), αλλά και άλλες τροποποιημένες ινσουλίνες (insulin aspart, insulin glulisine, κ.ά.).

2. Ινσουλίνη ενδιάμεσης δράσης και διφασική: Η δράση της αρχίζει 1-2 ώρες μετά τη χορήγηση. Σε μίγμα με ινσουλίνη ταχείας δράσης, και οι δύο διατηρούν τις ιδιότητές τους. Εδώ ανήκει η ισοφανική ινσουλίνη (εναιώρημα διαλυτής ινσουλίνης με πρωταμίνη) και η άμορφη ψευδαργυρούχος ινσουλίνη (insulin zinc suspension amorphous), καθώς επίσης και το ψευδαργυρούχο εναιώρημα κρυσταλλικής ινσουλίνης (insulin zinc suspension crystalline). Αυτές οι δύο μορφές μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ανεξάρτητα, είτε σε συνδυασμό (30% άμορφη – 70% κρυσταλλική).

3. Ινσουλίνη παρατεταμένης δράσης: Χορηγούνται μόνο υποδόρια και δρουν 20-30 ώρες μετά τη χορήγηση. Περιλαμβάνουν την πρωταμινική ψευδαργυρούχο ινσουλίνη

και το εναιώρημα κρυσταλλικής ινσουλίνης με ψευδάργυρο (Ultralente) που αποτελείται από μεγαλύτερους κρυστάλλους γεγονός που επιβραδύνει την απορρόφησή της.

7.3. Περιγραφή Σκευάσματος – Έλεχοι Φαρμακοποιίας

7.3.1. Περιγραφή ενέσιμου σκευάσματος

Το σκεύασμα στο οποίο εφαρμόστηκε η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού του ψευδαργύρου έχει την εμπορική ονομασία Humulin® Lente της εταιρίας Lilly. Πρόκειται για εναιώρημα ινσουλίνης ενδιάμεσης δράσης (βλ. παραπάνω) και η δραστική του ουσία είναι «ανθρώπινη» ψευδαργυρική ινσουλίνη, τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA, αποτελούμενη κατά 30% από άμορφη και 70% από κρυσταλλική ινσουλίνη.

Κάθε 1 mL εναιωρήματος περιέχει 100 IU ανθρώπινης ψευδαργυρικής ινσουλίνης (international units, 100 IU=3,47 mg human insulin^[130]) και 0,164 mg ZnO (ή 0,1318 mg Zn²⁺). Στα έκδοχα του σκευάσματος περιλαμβάνονται τα οξικό νάτριο, χλωριούχο νάτριο, μεθυλο-παρα-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ, υδροχλωρικό οξύ, υδροξείδιο του νατρίου και ενέσιμο ύδωρ.

Φέρεται σε γυάλινα φιαλίδια των 10 mL για χορήγηση υποδόρια ή ενδομυϊκά.

7.3.2. Έλεγχοι πρώτης ύλης σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία

Περίληπτικά, οι έλεγχοι που περιλαμβάνει η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία για τον έλεγχο πρώτης ύλης του συγκεκριμένου τύπου ινσουλίνης είναι:

1. Παρασκευή

Το εναιώρημα παρασκευάζεται αναμιγνύοντας ενέσιμο ψευδαργυρούχο εναιώρημα κρυσταλλικής και άμορφης ινσουλίνης σε αναλογία 7:3. Η παρασκευή του ακολουθεί όλες τις πρακτικές με τις οποίες παρασκευάζονται τα ενέσιμα σκευάσματα, όπως η προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων και συντηρητικών, η προσθήκη παραγόντων που ρυθμίζουν το pH και την ισοτονικότητα του διαλύματος με αυτή του αίματος, η αποστείρωση με μικροδιήθηση και η χρήση ασεπτικών συνθηκών.

2. Χαρακτηριστικά

Το εναιώρημα είναι άσπρου χρώματος κι όταν παραμένει σε ηρεμία, σχηματίζεται άσπρο ίζημα που κατακάθεται, ενώ το υπερκείμενο υγρό είναι άχρωμο ή σχεδόν άχρωμο. Εάν τα σωματίδια του ιζήματος εξεταστούν στο μικροσκόπιο φαίνονται ως ρομβοεδρικοί κρύσταλλοι με διάμετρο που κυμαίνεται από 10 έως 40 μm ενώ δεν έχουν ομοιόμορφο σχήμα.

3. Ταυτοποίηση

Η ταυτοποίηση, όπως και ο έλεγχος περιεκτικότητας πρώτης ύλης, ως προς την ινσουλίνη, διεξάγονται με υδροχρωματογραφία με κινητή φάση μίγμα διαλυτών Α και Β σε αναλογία 42:58. Ο διαλύτης Α είναι μίγμα άνυδρου θειικού νατρίου σε νερό και φωσφορικού οξέος με προσθήκη αιθανολαμίνης για ρύθμιση του pH. Ο διαλύτης Β είναι

ακετονιτρίλιο που έχει ρυθμιστεί στους 20 °C περίπου. Ο προσδιορισμός γίνεται με στήλη C18 που θερμοστατείται στους 40 °C, ροή κινητής φάσης 1 mL·min⁻¹ και η ανίχνευση γίνεται με φασματοφωτόμετρο UV-Vis στα 214 nm.

4. Έλεγχοι

4.1. Ινσουλίνη μη εκχυλιζόμενη με ρυθμιστικό διάλυμα ακετόνης:

Μετά τη διενέργεια της απαραίτητης δοκιμής το ποσοστό της πρέπει να κυμαίνεται από 63 έως 77%.

4.2. Ολικός ψευδάργυρος:

Παρασκευάζεται διάλυμα ελέγχου (test solution). Όγκος σκευάσματος που περιέχει 200 IU ινσουλίνης διαλύεται σε 25 mL διαλύματος HCl συγκέντρωσης 0,01 M. Εάν είναι απαραίτητο ακολουθεί αραίωση σε μια κατάλληλη συγκέντρωση ψευδαργύρου.

Παρασκευάζονται διαλύματα αναφοράς με αραίωση πρότυπου πυκνού διαλύματος Zn (5 mg·mL⁻¹) σε διάλυμα HCl 0,01M μέχρι τελικών συγκεντρώσεων 0,40, 0,80, 1,00, 1,20 και 1,60 μg·mL⁻¹.

Τα διαλύματα μετρώνται με Φασματοφωτομετρία Ατομικής Απορρόφησης στα 213,9 nm χρησιμοποιώντας λυχνία κοίλης καθόδου-Zn και φλόγα αέρα-ακετυλένιο. Για κάθε 100 IU ινσουλίνης, ο ολικός ψευδάργυρος πρέπει να κυμαίνεται από 0,12 έως 0,25 mg.

4.3. Ψευδάργυρος στο υπερκείμενο διάλυμα:

Παρασκευάζεται διάλυμα ελέγχου (test solution). Φυγοκεντρείται το σκεύασμα και 1 mL από το υπερκείμενο υγρό διαλύεται στα 25 mL με νερό. Εάν είναι απαραίτητο ακολουθεί αραίωση σε μια κατάλληλη συγκέντρωση ψευδαργύρου.

Παρασκευάζονται διαλύματα αναφοράς όπως παραπάνω.

Η μέτρηση των διαλυμάτων γίνεται όπως στον ολικό ψευδάργυρο. Ο έλεγχος είναι αποδεκτός εάν το ποσοστό διαλυμένου ψευδαργύρου αντιστοιχεί στο 20-65% του ολικού.

Ο έλεγχος αυτός είναι ίδιος και για την Αμερικάνικη Φαρμακοποιία.

7.4. Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC-ELSD για τον Προσδιορισμό Ψευδαργύρου σε Σκεύασμα Ινσουλίνης με Μηχανισμό Κατιονανταλλαγής (Cation – Exchange)

7.4.1. Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια

7.4.1.1. HPLC – ELSD (Υποκ. 3.1 & 3.2)

Χρησιμοποιήθηκε κατιονανταλλακτική στήλη CS14 IonPac® διαστάσεων 250 x 4 mm της Dionex.

7.4.1.2. Γυάλινα σκεύη – Ογκομετρικά όργανα (Υποκ. 3.4)

7.4.1.3. Διαλύτες – Αντιδραστήρια

A) Διαλύτες

Νερό κατάλληλο για HPLC (εδάφιο 3.3.1.).

B) Υγρά αντιδραστήρια

Τριφθοροξικό οξύ, TFA, καθαρότητας $\geq 98\%$, MW:114,02 g·mol⁻¹, d:1,48 g·mL⁻¹ (Riedel-de-Haën, Seelze, Germany)

Γ) Στερεά αντιδραστήρια

i) Οξειδίο ψευδαργύρου, ZnO, αναλυτικής καθαρότητας, Mr:81,37 (Mallinckrodt Chemical Works, St Louis, U.S.A.)

ii) Χλωριούχο Νάτριο, NaCl, καθαρότητας $\geq 99,5\%$, Mr:58,44 (Merck)

7.4.2. Πειραματική πορεία

7.4.2.1. Παρασκευή διαλυμάτων

➤ Διάλυμα παρακαταθήκης (stock solution)

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL ζυγίστηκε ποσότητα ZnO ίση με 0,1244 g και διαλύθηκε σε υδατικό δ/μα TFA συγκέντρωσης 0,4 M (ή 30.8 mL·L⁻¹). Η συγκέντρωση του πυκνού πρότυπου διαλύματος ήταν 1000 μg·mL⁻¹ ως προς Zn²⁺. Το διάλυμα φυλάχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και ήταν σταθερό για διάστημα 3 εβδομάδων τουλάχιστον.

➤ Διαλύματα εργασίας

Με τις κατάλληλες, διαδοχικές αραιώσεις του διαλύματος παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν τα διαλύματα εργασίας του ψευδαργύρου σε συγκεντρώσεις 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 και 20,0 μg·mL⁻¹. Η τελική αραιώση έγινε στην κινητή φάση. Τα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.

7.4.2.2. Δοκιμές βελτιστοποίησης μεθόδου διαχωρισμού

Οι κινητές φάσεις που δοκιμάστηκαν προκειμένου να βρεθεί η κατάλληλη που εκλούει τον ψευδάργυρο σε ικανοποιητικό χρόνο παρατίθενται στον πίνακα 7.1 που ακολουθεί. Για τις δοκιμές αυτές, παρασκευάστηκε πυκνό διάλυμα TFA συγκέντρωσης 0,05 M (ή 3,85 mL·L⁻¹) και αραιώθηκε με νερό σε διάφορες αναλογίες.

Πίνακας 7.1: Δοκιμές κινητών φάσεων για τον προσδιορισμό του ψευδαργύρου με χρωματογραφία κατιονανταλλαγής

Διαλύτης	Αναλογία	Τελική συγκέντρωση TFA (mL·L ⁻¹)
TFA:H ₂ O	70:30	2,695

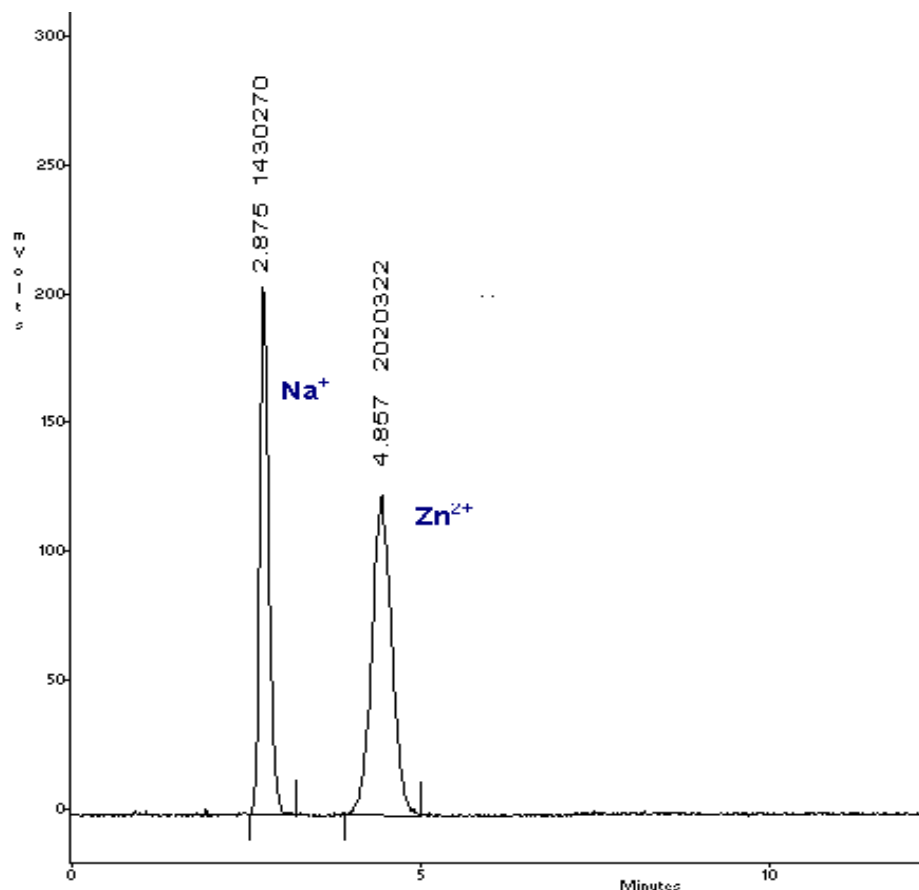
TFA:H ₂ O	60:40	2,31
TFA:H ₂ O	50:50	1,925
TFA:H ₂ O	40:60	1,54
TFA:H₂O	35:65	1,35
TFA:H ₂ O	30:70	1,155

Η κινητή φάση που επιλέχθηκε για τον προσδιορισμό του ψευδαργύρου στο ενέσιμο σκεύασμα ινσουλίνης ήταν δ/μα TFA συγκέντρωσης 1,35 mL·L⁻¹. Έτσι, μετά την ολοκλήρωση των δοκιμών, οι τελικές συνθήκες εκτέλεσης του πειράματος ήταν:

Πίνακας 7.2: Πειραματικές συνθήκες χρωματογράφησης

Σύστημα HPLC – ELSD	
Στήλη	Ion Pac CS14 (250 x 4 mm)
Κινητή φάση	TFA 1,35 mL·L ⁻¹
Ταχύτητα ροής κινητής φάσης	1,0 mL·min ⁻¹
Θερμοκρασία ανιχνευτή	70 °C
Ευαισθησία (gain) ανιχνευτή	12
Πίεση φέροντος αερίου	3,5 bar

Σημειώνεται ότι, προκειμένου να βρεθεί η κατάλληλη κινητή φάση για τον προσδιορισμό του ψευδαργύρου, παρασκευάστηκε και ένα μίγμα Zn – Na συγκέντρωσης 10 μg·mL⁻¹ ως προς το κάθε ιόν μεμονωμένα, και ελέγχθηκε εάν η επιλεγόμενη κινητή φάση επιτυγχάνει ικανοποιητικό διαχωρισμό των δύο μετάλλων. Αυτό έγινε διότι το νάτριο εμπεριέχεται στα έκδοχα του σκευάσματος. Ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα του μίγματος των δύο στις συνθήκες του πειράματος είναι το ακόλουθο:



Σχήμα 7.3: Χρωματογράφημα μίγματος Zn – Na με κινητή φάση δ/μα TFA 1,35 mL·L⁻¹. Χρόνος κατακράτησης ιόντων Na⁺: t_R=2,87 min και Zn²⁺: t_R=4,86 min.

7.4.2.3. Καμπύλη αναφοράς – Επικύρωση μεθόδου

Τα διαλύματα εργασίας του πρότυπου δ/τος ZnO εισήχθησαν στο σύστημα HPLC-ELSD και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αναφοράς σε τρεις διαδοχικές ημέρες με υπολογισμό των συντελεστών loga και b. Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων που προέκυψαν, υπολογίστηκαν και τα στοιχεία επικύρωσης της μεθόδου κατά τα γνωστά.

7.4.2.4. Κατεργασία σκευάσματος – Δοκιμές διαλυτοποίησης

Το πρώτο απαραίτητο βήμα για την κατεργασία του σκευάσματος ήταν η καταβύθιση του πρωτεϊνικού τμήματος του φαρμάκου. Η καταβύθιση επετεύχθη με την προσθήκη TFA. Το TFA μπορεί ταυτόχρονα να εκχυλίσει τον ψευδάργυρο από το μόριο της ινσουλίνης και να τον μετατρέψει στη διαλυτή μορφή του.

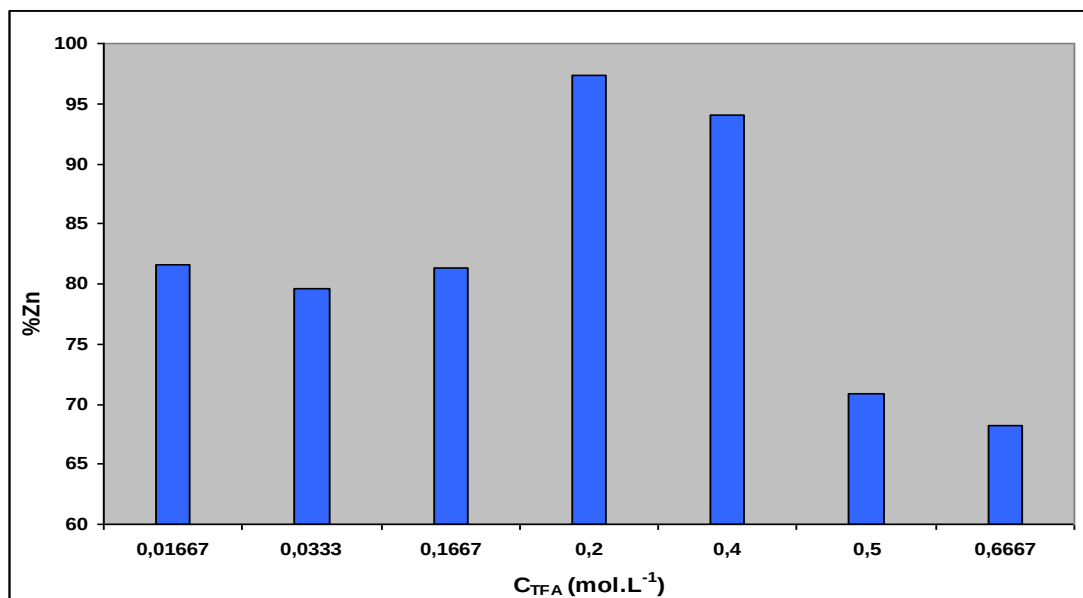
Παρατηρήθηκε, ωστόσο, ότι υπάρχει μια βέλτιστη τιμή συγκέντρωσης του διαλύματος TFA στην οποία επιτυγχάνεται η μέγιστη διαλυτοποίηση του μετάλλου από το φάρμακο. Για την εύρεση της βέλτιστης αυτής τιμής, παρασκευάστηκαν πυκνά δ/τα του οξέος σε διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις. Ελήφθη ποσότητα του εναιωρήματος ίση με 3 mL, υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση, και τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα. Προστέθηκε ποσότητα δ/τος του οξέος και το μίγμα ανακινήθηκε ισχυρά σε συσκευή

Vortex. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε, ακολούθησε διήθηση με φίλτρα Millipore 0,45 μ και η τελική αραιώση του διηθήματος έγινε σε ογκομετρικές φιάλες των 20 mL με κινητή φάση.

Τα διαλύματα που προέκυψαν εισήχθησαν στο σύστημα HPLC – ELSD. Τα αποτελέσματα της μελέτης διαλυτοποίησης δίνονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 7.3 και παραστατικά στο διάγραμμα του σχήματος 7.4.

Πίνακας 7.3: Δοκιμές διαλυτοποίησης σκευάσματος Humulin® Lente.

Τελική συγκέντρωση TFA στο μίγμα του δείγματος (M)	Διαδικασία	% ανάκτηση Zn (ημέρα 1 ^η)	% ανάκτηση Zn (ημέρα 2 ^η)
0,0167	Ανάμιξη (Vortex) ↓ Φυγοκέντρωση ↓ Διήθηση ↓ Αραίωση	81,6($\pm$ 5,7)	-
0,033		79,6($\pm$ 4,5)	-
0,167		81,3($\pm$ 3,0)	-
0,2		97,4($\pm$ 1,1)	98,0($\pm$ 2,5)
0,4		94,0($\pm$ 3,5)	91,2($\pm$ 2,5)
0,5		70,8($\pm$ 3,1)	-
0,667		68,23($\pm$ 0,37)	-



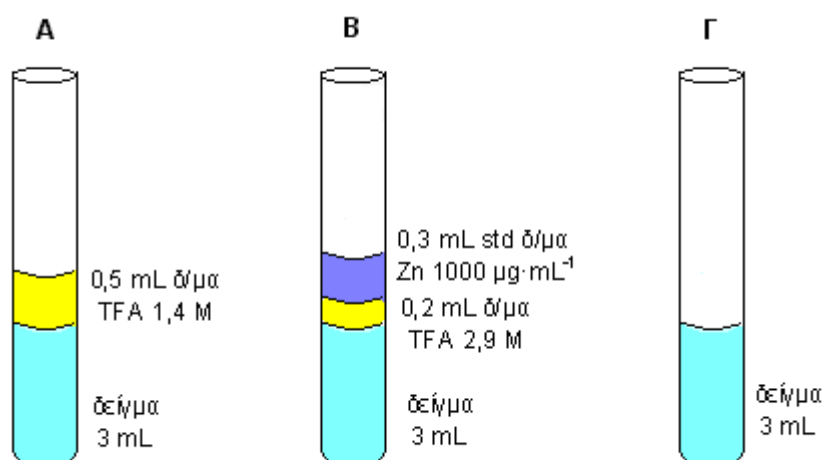
Σχήμα 7.4: Διάγραμμα των αποτελεσμάτων της ανάκτησης του ψευδαργύρου μετά τις δοκιμές διαλυτοποίησης του σκευάσματος Humulin® Lente.

Είναι προφανές ότι όταν η τελική συγκέντρωση του δ/τος TFA στο μίγμα του εναιωρήματος ήταν 0,2 M, η διαλυτοποίηση του ψευδαργύρου ήταν η μέγιστη, γεγονός

που παρατηρήθηκε και τις δύο ημέρες που επαναλήφθηκαν οι μετρήσεις. Επομένως, μετά την ολοκλήρωση των δοκιμών, το πρωτόκολλο επεξεργασίας του σκευάσματος διαμορφώθηκε τελικά ως εξής:

Από ένα φιαλίδιο σκευάσματος ινσουλίνης των 10 mL, ελήφθησαν υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση 3 φορές από 3 mL κάθε φορά, και τοποθετήθηκαν σε τρεις διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας περιείχε (Σχ.7.5):

- σωλήνας Α : 3 mL δείγματος ινσουλίνης + 0,5 mL δ/τος TFA αρχικής συγκέντρωσης 1,4 M $\Rightarrow V_{\text{τελ}} = 3,5 \text{ mL}$
- σωλήνας Β : 3 mL δείγματος ινσουλίνης + 0,2 mL δ/τος TFA αρχικής συγκέντρωσης 2,9 M + 0,3 mL πρότυπου δ/τος Zn συγκέντρωσης $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \Rightarrow V_{\text{τελ}} = 3,5 \text{ mL}$
- σωλήνας Γ : 3 mL δείγματος ινσουλίνης



Σχήμα 7.5: Διαγραμματικό σχήμα των δειγμάτων σκευάσματος για τον προσδιορισμό του ψευδαργύρου.

Το δείγμα Α χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του ολικού ψευδαργύρου στο σκεύασμα, το δείγμα Β για τον υπολογισμό της ανάκτησης και τον έλεγχο της ακρίβειας της μεθόδου και το δείγμα Γ για τον υπολογισμό του ψευδαργύρου στο υπερκείμενο διάλυμα. Η συγκέντρωση του πυκνού διαλύματος TFA που επιλέχθηκε για την αραίωση των δειγμάτων Α και Β ήταν τέτοια ώστε η τελική συγκέντρωση TFA στο μίγμα των 3,5 mL να είναι 0,2 M. Στο δείγμα Γ δεν προστέθηκε κανένας διαλύτης.

Τα τρία δείγματα αναμίχθηκαν ισχυρά σε συσκευή Vortex, στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν και τέλος διηθήθηκαν από μικροφίλτρα. 1 mL από το προκύπτον διήθημα αραιώθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 20 mL με κινητή φάση.

7.4.3. Αποτελέσματα

7.4.3.1. Καμπύλες αναφοράς ZnO – Επικύρωση

Οι καμπύλες αναφοράς των προτύπων δ/των ZnO μετά τις μετρήσεις για τρεις διαδοχικές ημέρες, αλλά και τα στατιστικά στοιχεία που αφορούν στην επικύρωση της προτεινόμενης μεθόδου, παρατίθενται συγκεντρωτικά στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 7.4: Καμπύλες αναφοράς ZnO – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου

Ημέρα	Εξίσωση ευθείας	r^2 (N≥4, n≥4)	% RSD (1 – 20 µg·mL ⁻¹)
1 ^η	$\log A = 4,510(\pm 0,042) + 1,049(\pm 0,064) \cdot \log C$	0,996	2,7 – 9,2
2 ^η	$\log A = 4,600(\pm 0,054) + 0,973(\pm 0,083) \cdot \log C$	0,993	1,1 – 4,7
3 ^η	$\log A = 4,416(\pm 0,046) + 1,137(\pm 0,070) \cdot \log C$	0,996	1,1 – 8,3
Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα			
Interday %RSD του loga		2,0	
Interday %RSD του b		7,8	
LOQ (µg·mL ⁻¹)		0,84	
LOD (µg·mL ⁻¹)		0,32	

Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου ήταν ικανοποιητικές, όπως προκύπτει από τις τυπικές αποκλίσεις των συντελεστών loga και b, αλλά και από την %RSD των ίδιων συντελεστών για τρεις ημέρες. Ικανοποιητικά χαμηλά ήταν και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

7.4.3.2. Έλεγχος περιεκτικότητας σε δραστική ουσία – Έλεγχος ανάκτησης

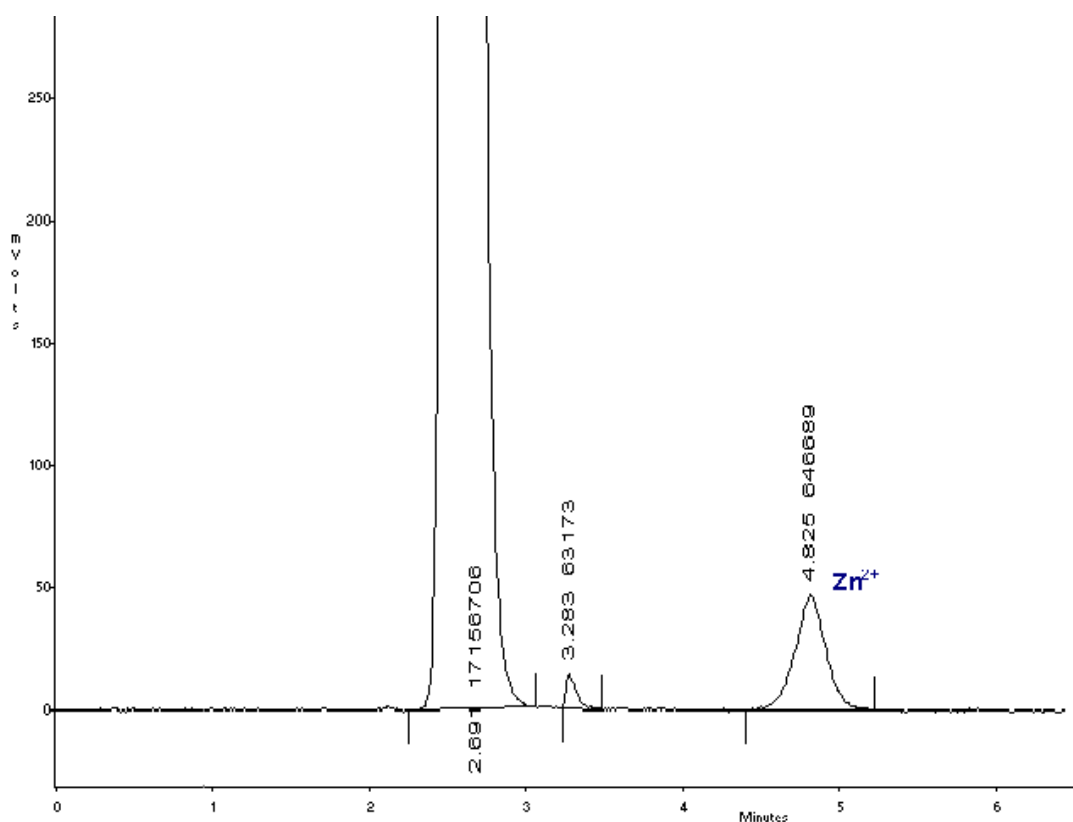
Τα δείγματα εισήχθησαν στο σύστημα HPLC-ELSD, τουλάχιστον τρεις φορές το καθένα και μετρήθηκαν οι αποκρίσεις τους. Υπολογίστηκε η ολική περιεκτικότητα του σκευάσματος σε ψευδάργυρο και ο διαλυμένος ψευδάργυρος στο υπερκείμενο διάλυμα του εναιωρήματος. Υπολογίστηκε, τέλος, η %ανάκτηση του ψευδαργύρου με την οποία ελέγχθηκε η ακρίβεια της προτεινόμενης μεθόδου. Όλα τα παραπάνω παρατίθενται συγκεντρωτικά.

Πίνακας 7.5: Αποτελέσματα ελέγχου περιεκτικότητας ολικού και διαλυμένου ψευδαργύρου στο σκεύασμα – Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης

Σκεύασμα Humulin® Lente
Ονομαστική περιεκτικότητα: 131,8 µg Zn ²⁺ / mL εναιωρήματος

Δείγμα	Περιεκτικότητα Zn^{2+} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Περιεκτικότητα %	
A (Ολικός Zn)	130,4($\pm 6,5$)	98,9($\pm 4,9$)	
Γ (Διαλυμένος Zn)	57,50($\pm 0,35$)	43,64($\pm 0,26$)	
	C_o ($\mu\text{g Zn}^{2+}/\text{mL}$)	C_{sp} ($\mu\text{g Zn}^{2+}/\text{mL}$)	% Ανάκτηση (Εξ.5.2)
B (Ανάκτηση)	8,69	16,52	107,6

Ακολουθεί χαρακτηριστικό χρωματογράφημα του σκευάσματος όπου έχει προσδιοριστεί ο ψευδάργυρος με την εν λόγω μέθοδο.



Σχήμα 7.6: Χρωματογράφημα σκευάσματος Humulin® Lente αναλυμένου με στήλη CS14 και κινητή φάση δ/μα TFA 1,35 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$.

7.4.4. Συμπεράσματα – Συζήτηση

1. Η μέθοδος προσδιορισμού του ψευδαργύρου με στήλη CS14 και μηχανισμό κατιονανταλλαγής ήταν απλή και γρήγορη.

2. Η προκατεργασία των δειγμάτων δεν είχε πολύπλοκα βήματα. Ιδιαίτερη προσοχή, όμως, πρέπει να δίνεται κατά τη δειγματοληψία η οποία συνιστάται να γίνεται

υπό συνεχή ανάδευση του εναιωρήματος ώστε να λαμβάνεται πάντα, κατά το δυνατόν, ομοιόμορφο δείγμα.

3. Κατά τη δειγματοληψία του εναιωρήματος, ανεξάρτητα από τον αρχικό όγκο δείγματος που λαμβάνεται προκειμένου να γίνει η ανάλυση (1, 2, 3 κ.ο.κ mL), φαίνεται ότι το «σημείο κλειδί» της διαδικασίας είναι η συγκέντρωση του δ/τος TFA στο οποίο διαλύεται το φάρμακο. Από τα αποτελέσματα (βλ. πίν.7.3 και σχ.7.4.) φαίνεται ότι για τελική συγκέντρωση δ/τος TFA 0,2 M επετεύχθη η βέλτιστη διαλυτοποίηση του οξειδίου του ψευδαργύρου. Προφανώς η αραιότερη συγκέντρωση δεν επαρκούσε ώστε να μετατρέψει όλο το ZnO στο αντίστοιχο άλας και έτσι να το απομακρύνει από το μόριο της ινσουλίνης. Άγνωστο είναι ωστόσο γιατί τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά όταν η συγκέντρωση TFA υπερέβαινε τα 0,2 M και πως το πυκνότερο διάλυμα αλληλεπιδρά με τον αναλύτη. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης δ/τη TFA στο τελικό μίγμα δείγματος, $C_{\text{TEΛ}}$, ελήφθη υπόψη και η συγκέντρωση δ/τη TFA που ενδεχομένως υπάρχει σε κάποιο άλλο από τα συστατικά του μίγματος (π.χ. το πυκνό πρότυπο δ/μα Zn που προστίθεται στο μίγμα για το πείραμα ανάκτησης, ήταν διαλυμένο σε δ/μα TFA 0,4 M), οπότε τότε η $C_{\text{TEΛ}}$ δίνεται από τη σχέση της αραιώσης $C_1V_1 + C_2V_2 = C_{\text{TEΛ}}V_{\text{TEΛ}}$.

4. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου μέσα στην ίδια ημέρα, αλλά και μεταξύ ημερών, ήταν ικανοποιητική. Ο χρόνος έκλουσης του ψευδαργύρου ήταν $t_R=4,64(\pm 0,22)$ min και ο παράγοντας ασυμμετρίας των κορυφών του ήταν $As=0,984(\pm 0,091)$.

5. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου ήταν σχετικά χαμηλά, αν και όχι τόσο χαμηλά, όσο με τη μέθοδο της Φασματομετρίας Ατομικής Απορρόφησης που είναι της τάξης των ppb.

6. Τα αποτελέσματα για την περιεκτικότητα του Humulin® Lente σε ψευδάργυρο βρίσκονταν εντός των οριζόμενων από τη Φαρμακοποιία προδιαγραφών, και ως προς τον ολικό ψευδάργυρο και ως προς το διαλυμένο (20 – 65 % του ολικού).

7.4.5. Προσδιορισμός ψευδαργύρου με Φασματοφωτομετρία Ατομικής Απορρόφησης – Σύγκριση αποτελεσμάτων

Το φιαλίδιο ινσουλίνης (Lot No Z32007) στο οποίο εφαρμόστηκε η προτεινόμενη μέθοδος, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο και για τον προσδιορισμό του ψευδαργύρου με τη μέθοδο αναφοράς, AAS.

Η διαδικασία έγινε ως εξής^[242]:

➤ Παρασκευή διαλυμάτων

Παρασκευάστηκε σειρά προτύπων διαλυμάτων ZnCl_2 σε συγκεντρώσεις 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 και 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ σε διαλύτη δ/μα HCl 0,1 M.

Από το φιαλίδιο ελήφθησαν 3 mL εναιωρήματος και φυγοκεντρήθηκαν στις 4000 rpm επί 5 min ή μέχρι το υπερκείμενο υγρό να είναι διαυγές. 1 mL από το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL όπου προστέθηκαν 5 mL δ/τος HCl 0,1 M και όλο αραιώθηκε με ύδωρ μέχρι τη χαραγή (δ/μα Α). 1,0 mL από το υπόλοιπο εναιώρημα μεταφέρθηκε σε δεύτερη ογκομετρική των 50 mL, προστέθηκαν 5 mL δ/τος HCl 0,1 M και αραιώθηκε μέχρι τη χαραγή (δ/μα Β).

➤ Μέτρηση διαλυμάτων – Προσδιορισμός Zn

Όλα τα διαλύματα μετρήθηκαν στα 213,9 nm με λυχνία κοίλης καθόδου Zn και φλόγα αέρα – ακετυλενίου. Από τη μέτρηση του $\delta/\text{τος B}$ και τη συγκέντρωση X που προέκυψε, υπολογίστηκε η ποσότητα του ολικού ψευδάργυρου στο σκεύασμα (mg Zn/100 IU), ενώ από το $\delta/\mu\text{A}$, υπολογίστηκε το ποσοστό ελεύθερου ψευδάργυρου.

Τα αποτελέσματα από τις δύο μεθόδους για το ίδιο φιαλίδιο Humulin® Lente ήταν:

Πίνακας 7.6: Σύγκριση αποτελεσμάτων προσδιορισμού του Zn

	Μέθοδος AAS	Μέθοδος HPLC – ELSD
% Ελεύθερος Zn	46,58	43,64
Ολικός Zn (mg/100 IU)	0,15	0,13

Τα αποτελέσματα της μεθόδου HPLC – ELSD ήταν ελαφρώς χαμηλότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα της μεθόδου AAS, ωστόσο, ήταν εντός των προδιαγραφών.

Αποδείχθηκε ότι η μέθοδος HPLC – ELSD, παρότι υστερεί σημαντικά σε ευαισθησία σε σχέση με την AAS, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του ψευδάργυρου σε ένα σκεύασμα, όπως το ψευδαργυρούχο εναιώρημα ινσουλίνης δίνοντας αξιόπιστα αποτελέσματα. Παρ' όλα αυτά, με κατάλληλη προκατεργασία των δειγμάτων (π.χ. προσυγκέντρωση) θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και σε περιπτώσεις όπου η περιεκτικότητα του στοιχείου είναι ακόμη χαμηλότερη.

7.5. Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC-ELSD για τον Προσδιορισμό Ψευδαργύρου σε Σκεύασμα Ινσουλίνης με Μηχανισμό Ιοντικών Ζευγών (Ion – Pair)

7.5.1. Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια

7.5.1.1. HPLC – ELSD (Υποκ. 3.1 & 3.2)

Χρησιμοποιήθηκε αναλυτική στήλη διαχωρισμού C18 Spherisorb® 5µm ODS-2 διαστάσεων 250 x 4,6 mm (Waters).

7.5.1.2. Γυάλινα σκεύη – Ογκομετρικά όργανα (Υποκ. 3.4)

7.5.1.3. Διαλύτες – Αντιδραστήρια

A) Διαλύτες

- i) Νερό κατάλληλο για HPLC (εδάφιο 3.3.1.).
- ii) Ακετονιτρίλιο HPLC καθαρότητας 99,9% (Lab Scan, Dublin Ireland)

B) Υγρά αντιδραστήρια

- i) Τριφθοροξικό οξύ, TFA, καθαρότητας $\geq 98\%$, MW:114,02 g·mol⁻¹, d:1,48 g·mL⁻¹ (Riedel-de-Haën, Seelze, Germany)
- ii) Παγόμορφο οξικό οξύ, CH₃COOH, καθαρότητας $\geq 99.7\%$, MW: 60,05 g·mol⁻¹, d:1,05 g·mL⁻¹ (Panreac, Barcelona, Spain)
- iii) Εννεαφθοροπεντανοϊκό οξύ, NFPA, καθαρότητας $\geq 97\%$, MW:264,05 g·mol⁻¹, d:1,71 g·mL⁻¹ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)

Γ) Στερεά αντιδραστήρια

Βλέπε εδάφιο 7.4.1.3. (Γ).

7.5.2. Πειραματική πορεία

7.5.2.1. Παρασκευή διαλυμάτων

- Διάλυμα παρακαταθήκης (stock solution)
- Διαλύματα εργασίας

Παρασκευάστηκαν τα διαλύματα όπως έχει περιγραφεί στο εδάφιο 7.4.2.1.

7.5.2.2. Δοκιμές βελτιστοποίησης μεθόδου διαχωρισμού

Όλες οι δοκιμές κινητής φάσης για τον προσδιορισμό του ψευδαργύρου στο σκεύασμα ινσουλίνης με το μηχανισμό ιοντικών ζευγών, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 7.7 που ακολουθεί.

Πίνακας 7.7: Δοκιμές κινητών φάσεων για τον προσδιορισμό του Zn.

α/α	Διαλύτης Α	Διαλύτης Β	Διαλύτης Γ	Αναλογία διαλυτών (v/v/v)
1	ACN	TFA ¹	-	50:50
2	ACN	TFA ¹	-	40:60
3	ACN	TFA ¹	-	20:80

4	ACN	NFPA ²	-	50:50
5	NFPA	CH ₃ COOH ³	-	50:50
6	NFPA	CH ₃ COOH	ACN	70:20:10
7	NFPA	CH ₃ COOH	-	30:70
8	NFPA	TFA ¹	ACN	50:30:20
9	NFPA	TFA ¹	ACN	70:30
10	NFPA	TFA ⁴	ACN	30:50:20
11	NFPA	TFA ⁴	-	70:30
12	NFPA	TFA ⁴	-	30:70
13	NFPA	TFA ⁴	ACN	40:40:20
14	NFPA	TFA ⁴	ACN	35:35:30
15	NFPA	TFA ⁴	ACN	60:6:34
16	NFPA	TFA ⁴	ACN	70:6:24
17	NFPA	TFA ⁴	ACN	65:5:30
18	NFPA	TFA⁴	ACN	68:5:27

1: δ/μα TFA με pH=3 με προσθήκη σταγόνων TFA και ρύθμιση με pHμετρο

2: η αρχική συγκέντρωση δ/τος NFPA ήταν 0,02 M ή 3,08 mL·L⁻¹

3: η αρχική συγκέντρωση δ/τος CH₃COOH είναι 0,01 M ή 0,572 mL·L⁻¹

4: η αρχική συγκέντρωση δ/τος TFA είναι 0,05 M ή 3,85 mL·L⁻¹ (pH~1,5)

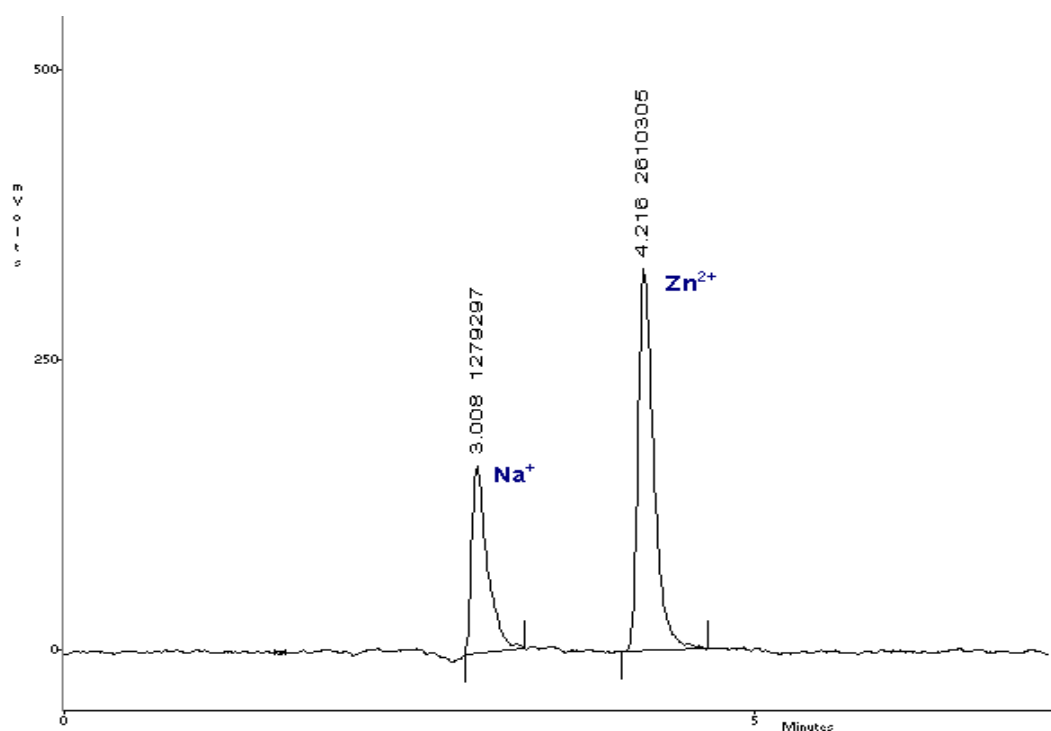
Η σύσταση της κινητής φάσης που τελικά επιλέχθηκε για τον προσδιορισμό του ψευδαργύρου, μαζί με τις λοιπές πειραματικές συνθήκες, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 7.8.

Πίνακας 7.8.: Πειραματικές συνθήκες χρωματογράφησης.

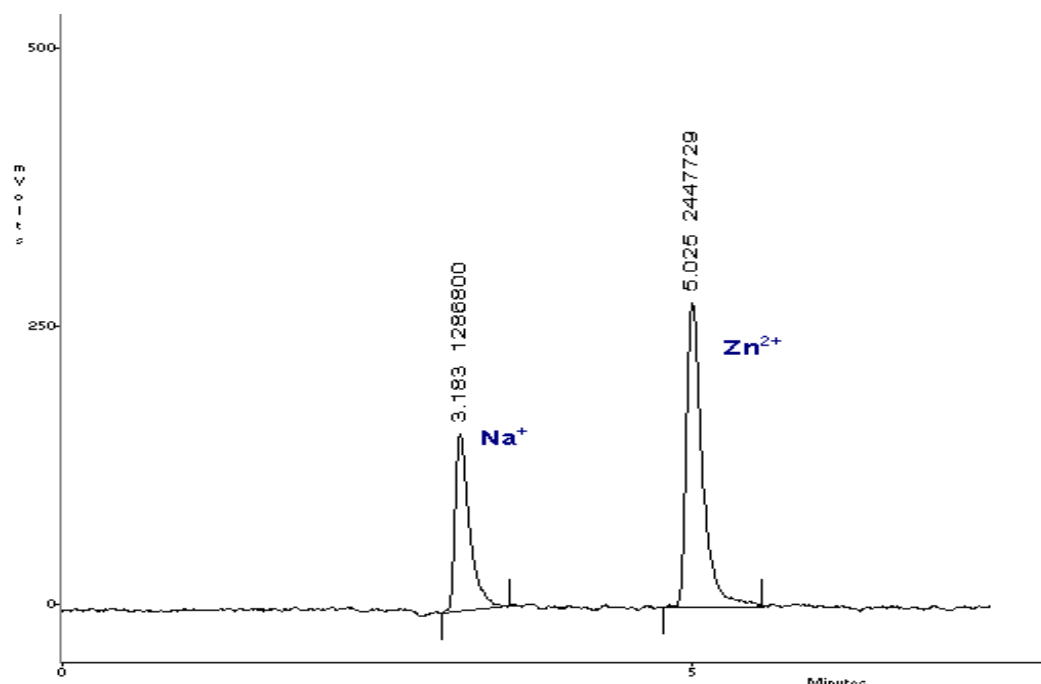
Σύστημα HPLC – ELSD	
Στήλη	ODS-2 C18 (250 x 4,6 mm)
Κινητή φάση	NFPA:TFA:ACN (68:5:27 v/v/v)
Ταχύτητα ροής κινητής φάσης	1 mL·min ⁻¹
Θερμοκρασία ανιχνευτή	70 °C

Ευαισθησία (gain) ανιχνευτή	12
Πίεση φέροντος αερίου	3,5 bar

Όμοια, όπως στην περίπτωση του προσδιορισμού με στήλη κατιονανταλλαγής, χρησιμοποιήθηκε ένα μίγμα των ιόντων Zn – Na προκειμένου να ελεγχθεί η καταλληλότητα της κινητής φάσης για τον προσδιορισμό του ψευδαργύρου (βλ.εδάφιο 7.4.2.2). Χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα του παραπάνω μίγματος, συναρτήσει της σύστασης της κινητής φάσης, είναι τα ακόλουθα:



Σχήμα 7.7: Χρωματογράφημα μίγματος Zn – Na με κινητή φάση μίγμα NFPA:TFA:ACN 65:5:30 v/v/v (δοκιμή α/α 17 βλ.πίν.7.7). Χρόνος κατακράτησης ιόντων Na^+ : $t_R=3,01$ min και Zn^{2+} : $t_R=4,22$ min.



Σχήμα 7.8: Χρωματογράφημα μίγματος Zn – Na με κινητή φάση μίγμα NFPA:TFA:ACN 68:5:27 v/v/v (δοκιμή α/α 18 βλ.πίν.7.7). Χρόνος κατακράτησης ιόντων Na^+ : $t_R=3,18$ min και Zn^{2+} : $t_R=5,03$ min.

Από τα χρωματογραφήματα φαίνεται καθαρά ότι μια μικρή μόνο μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης ως προς την αναλογία του NFPA, επηρέαζε αρκετά το χρόνο κατακράτησης του ψευδαργύρου. Αύξηση στην ποσότητα του NFPA κατά 3%, καθυστερούσε την έκλουση του ψευδαργύρου κατά 1 λεπτό περίπου, ενώ δεν επιδρούσε πρακτικά καθόλου στην έκλουση του νατρίου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το NFPA σχηματίζει πολύ πιο σταθερά σύμπλοκα με το «μεγάλο» ιόν του ψευδαργύρου παρά με το «μικρό» νάτριο, τα οποία σύμπλοκα συγκρατούνταν ισχυρά στη στήλη

7.5.2.3. Καμπύλη αναφοράς – Επικύρωση μεθόδου (βλ. § 7.4.2.3)

7.5.2.4. Κατεργασία σκευάσματος και προετοιμασία δειγμάτων

Το πρωτόκολλο προκατεργασίας των δειγμάτων για τον προσδιορισμό του ψευδαργύρου με το μηχανισμό ιοντικών ζευγών, ήταν ακριβώς το ίδιο που έχει προταθεί στη μέθοδο κατιονανταλλαγής. Ευνόητο είναι ότι οι τελικές αραιώσεις των διαλυμάτων γίνονταν στην κινητή φάση που επελέγη για προσδιορισμό με τη στήλη C18 (βλ.παρ. 7.4.2.4.)

7.5.3. Αποτελέσματα

7.5.3.1. Καμπύλες αναφοράς Zn – Επικύρωση

Στον πίνακα 7.9 παρατίθενται οι καμπύλες αναφοράς του πρότυπου ZnO και τα δεδομένα που προέκυψαν από τη διαδικασία επικύρωσης της μεθόδου προσδιορισμού.

Πίνακας 7.9.: Καμπύλες αναφοράς Zn – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου.

Ημέρα	Εξίσωση ευθείας	r^2 ($N \geq 4$, $n \geq 4$)	% RSD (1 – 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1 ^η	$\log A = 5,297(\pm 0,028) + 1,225(\pm 0,031) \cdot \log C$	0,9994	0,25 – 8,0
2 ^η	$\log A = 5,448(\pm 0,039) + 1,107(\pm 0,047) \cdot \log C$	0,997	1,2 – 7,1
3 ^η	$\log A = 5,276(\pm 0,042) + 1,231(\pm 0,046) \cdot \log C$	0,998	1,3 – 3,4
Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα			
Interday %RSD του loga		1,8	
Interday %RSD του b		5,9	
LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		0,42	
LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		0,15	

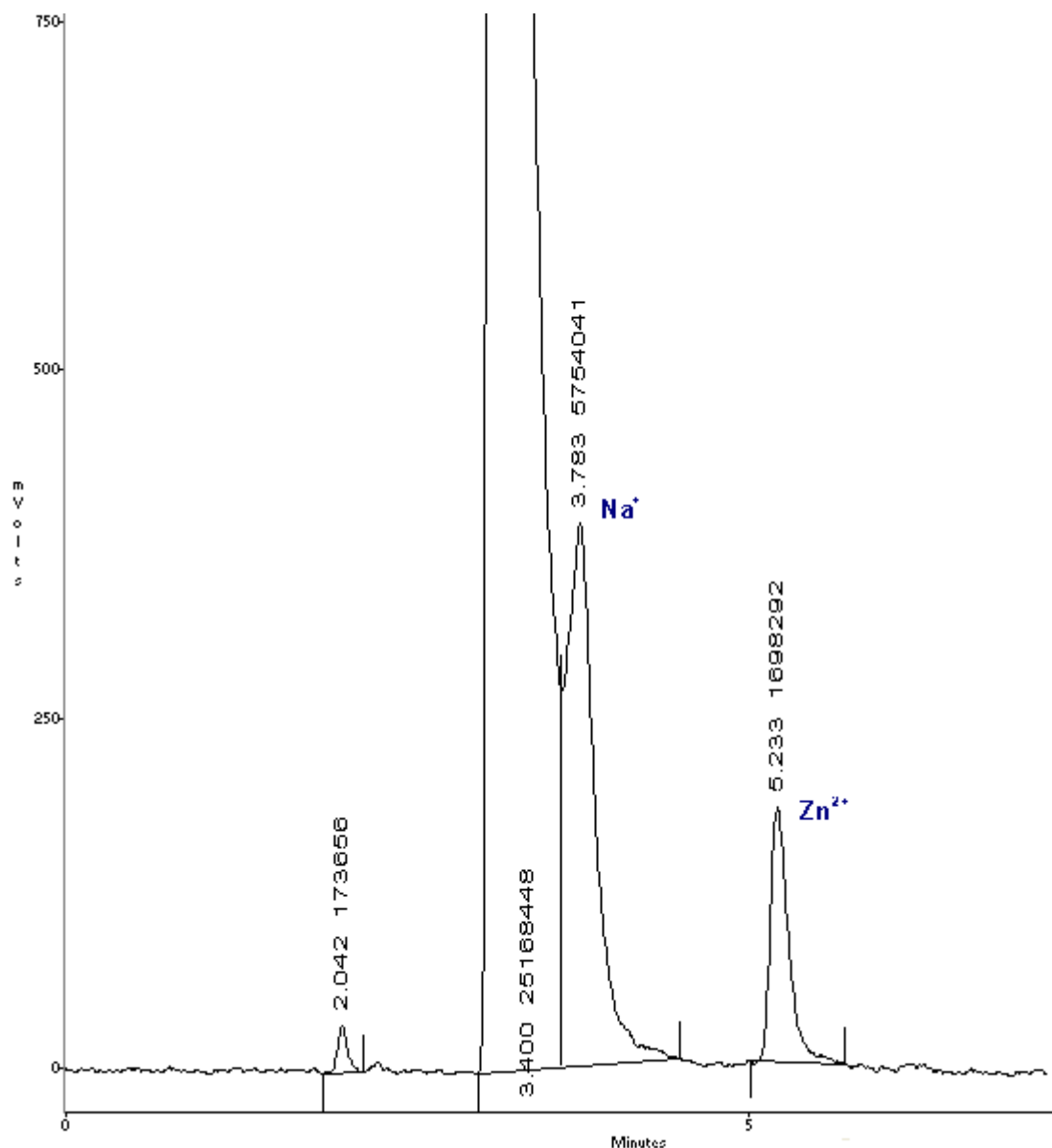
Η μέθοδος ήταν επαναλήψιμη για μετρήσεις τόσο της ίδιας ημέρας όσο και μεταξύ διαδοχικών ημερών. Τα δε όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης ήταν ικανοποιητικά χαμηλά.

7.5.3.2. Έλεγχος περιεκτικότητας σε δραστική ουσία – Έλεγχος ανάκτησης

Τα δείγματα εισήχθησαν στο σύστημα HPLC-ELSD και μετρήθηκαν οι αποκρίσεις τους τουλάχιστον τρεις φορές το καθένα. Τα αποτελέσματα του ελέγχου της περιεκτικότητας σε ψευδάργυρο, στο ολικό μίγμα και το υπερκείμενο διάλυμα, καθώς και τα αποτελέσματα της ανάκτησης παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 7.10: Αποτελέσματα ελέγχου περιεκτικότητας ολικού και διαλυμένου ψευδαργύρου στο σκεύασμα – Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης.

Σκεύασμα Humulin® Lente			
Ονομαστική περιεκτικότητα: 131,8 $\mu\text{g Zn}^{2+}$ / mL εναιωρήματος			
Δείγμα	Περιεκτικότητα Zn^{2+} ($\mu\text{g/mL}$)	Περιεκτικότητα %	
A (Ολικός Zn)	136,7($\pm 3,5$)	103,7($\pm 2,6$)	
Γ (Διαλυμένος Zn)	58,7($\pm 1,3$)	44,6($\pm 1,0$)	
	C_o ($\mu\text{g Zn}^{2+}/\text{mL}$)	C_{sp} ($\mu\text{g Zn}^{2+}/\text{mL}$)	% Ανάκτηση (Εξ. 5.2)
B (Ανάκτηση)	5,86	10,40	102,5



Σχήμα 7.9: Χρωματογράφημα σκευάσματος Humulin® Lente αναλυμένου με κινητή φάση μίγμα NFPA:TFA:ACN 68:5:27 v/v/v. Χρόνος έκλουσης των ιόντων Na^+ : $t_R=3,78$ min και Zn^{2+} : $t_R=5,23$ min.

7.5.4. Συμπεράσματα – Συζήτηση

1. Η μέθοδος προσδιορισμού του ψευδαργύρου με στήλη C18 και μηχανισμό ιοντικών ζευγών ήταν απλή και γρήγορη. Τα αδιάλυτα συστατικά του μίγματος δεν προκάλεσαν παρεμποδίσεις στην εκλουόμενη κορυφή του ψευδαργύρου.
2. Ο χρόνος έκλουσης του ψευδαργύρου ήταν $t_R=5,34(\pm 0,14)$ min και ο παράγοντας ασυμμετρίας των κορυφών του ήταν $As=1,64(\pm 0,13)$.
3. Τα αποτελέσματα της περιεκτικότητας του σκευάσματος στο στοιχείο ήταν εντός των προδιαγραφών της Φαρμακοποιίας, τόσο ως προς τον ολικό ψευδάργυρο, όσο και ως

προς το διαλυμένο (20 – 65 % του ολικού). Όμοια, οι τιμές της ανάκτησης δηλώνουν ότι η προτεινόμενη μέθοδος ήταν ακριβής.

4. Η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού του ψευδαργύρου με το μηχανισμό ιοντικών ζευγών πλεονεκτεί έναντι της μεθόδου κατιονανταλλαγής στο ότι έχει αξιοσημείωτα χαμηλότερα, σχεδόν κατά 50%, όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Συγκεκριμένα, με τη μέθοδο μηχανισμού ιοντικών ζευγών οι τιμές ήταν LOQ: 0,42 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ και LOD: 0,15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ενώ με τη στήλη κατιονανταλλαγής οι τιμές ήταν 0,84 και 0,32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ αντίστοιχα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΤΙΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΧΡΩΜΙΟΥ/ΧΡΩΜΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΝΕΡΟ

8.1. Εισαγωγή^[96]

Το νερό είναι το αγαθό του πλανήτη στο οποίο συχνά αποδίδονται χαρακτηρισμοί όπως «υπέρτατο» και «η πηγή της ζωής», αν και ο άνθρωπος έχει πολλές φορές την τάση να ξεχνάει τη σπουδαιότητά του στους ζωντανούς οργανισμούς. Το νερό στη γη (θάλασσες, ποτάμια, λίμνες, πάγοι) καλύπτει το 75% της επιφάνειάς της. Αντιπροσωπεύει το 95% του βάρους πολλών φυτών. Το ανθρώπινο σώμα αποτελείται κατά 70% από νερό, εκ του οποίου τα $\frac{2}{3}$ περίπου βρίσκονται στον ενδοκυττάριο χώρο. Το υπόλοιπο $\frac{1}{3}$ βρίσκεται έξω από τα κύτταρα, στα υγρά που περιβάλλουν τους ιστούς και στο αίμα. Οι βιολογικές διεργασίες στηρίζονται σε χημικές αντιδράσεις που όχι μόνο πραγματοποιούνται σε υδατικό περιβάλλον, αλλά πολλές φορές το νερό είναι το ίδιο ένα από τα αντιδρώντα

Το φυσικό νερό δεν είναι καθαρή ουσία. Αποτελείται σε μεγάλο ποσοστό από ύδωρ, τη χημική ένωση H_2O , ή οξείδιο του υδρογόνου, που είναι το πιο σημαντικό από τα οξείδια. Εκτός αυτού, περιέχει κι ένα πλήθος άλλων ουσιών (βλ.υποκεφ.8.2.) που άλλες είναι διαλυμένες κι άλλες αιωρούμενες. Για να χαρακτηριστεί πόσιμο, θα πρέπει να πληροί συγκεκριμένες προδιαγραφές που ορίζονται κατά κανόνα από διεθνείς οργανισμούς, όπως ο WHO, βασίζονται σε επιστημονικά δεδομένα και συχνά, οι προδιαγραφές αυτές αλλάζουν, συνήθως προς το αυστηρότερο, όταν νέα δεδομένα έρθουν στο φως.

Στο πρώτο μέρος του παρόντος κεφαλαίου περιγράφεται η ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού μερικών από τα πιο σημαντικά ιόντα που φυσιολογικά βρίσκονται στο πόσιμο νερό, όπως τα Na^+ , K^+ , Mg^{2+} και Ca^{2+} . Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε εμφιαλωμένα νερά που πωλούνται στην ελληνική αγορά, αλλά και σε ένα δείγμα φυσιολογικού ορού. Στο δεύτερο μέρος, περιγράφεται η ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού του χρωμίου και των χρωμικών ιόντων, που απαντώνται στο νερό ως αποτέλεσμα μόλυνσης, κυρίως από βιομηχανικά λύματα, και αποτελούν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία (βλ. εδάφιο 2.5.2.). Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγματα από το δίκτυο ύδρευσης δύο πόλεων, της Αθήνας και της Θήβας, που αποτελούν αστικά κέντρα διαφορετικού, βεβαίως, μεγέθους και δραστηριοτήτων, βρίσκονται όμως σε ζώνη «υψηλού κινδύνου», καθώς ισαπέχουν από την επιβαρυνόμενη περιοχή της βιομηχανικής ζώνης των Οиноφύτων και του ποταμού Ασωπού.

8.2. Γενικά για το Νερό – Χαρακτηριστικά Ποιότητας Πόσιμου Νερού

8.2.1. Συστατικά του φυσικού νερού^[176]

Το φυσικό νερό περιέχει διάφορες ουσίες, άλλες αιωρούμενες και άλλες διαλυμένες. Το είδος και η συγκέντρωσή τους εξαρτώνται από τη σύσταση του εδάφους και υπεδάφους της περιοχής, τις κλιματικές μεταβολές, το είδος της χλωρίδας και πανίδας.

Πίνακας 8.1: Ουσίες που φυσιολογικά απαντώνται στο φυσικό νερό^[96]

Αιωρούμενες ουσίες	Διαλυμένες ουσίες	Προέλευση
Σκόνη	H^+ , HCO_3^- , O_2 , N_2 , CO_2 , SO_2	Ατμόσφαιρα
Άμμος, άργιλος, άλλα σωματίδια	Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , F^- , Cl^- , NO_3^- , HCO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-}	Πετρώματα και ορυκτά από τα οποία διέρχεται το νερό
Βακτήρια, μικροοργανισμοί, ζωύφια, αδιάλυτες οργανικές ενώσεις	H^+ , Na^+ , NH_4^+ , Cl^- , HCO_3^- , NO_3^- , N_2 , O_2 , CO_2 , H_2S , CH_4 , οργανικές ενώσεις ενδεχομένως οσμηρές ή έγχρωμες	Επικοινωνία με θαλασσινό νερό, ζωντανοί οργανισμοί και προϊόντα αποσύνθεσης

Στις μέρες μας, ωστόσο, απαντώνται στο φυσικό νερό και πολλά άλλα συστατικά, που είναι αποτέλεσμα της ανθρώπινης δραστηριότητας, μερικά από τα οποία απειλούν, σε μικρό ή μεγάλο βαθμό, την ανθρώπινη υγεία και τη βιωσιμότητα των οικοσυστημάτων. Τέτοια συστατικά είναι ο υδράργυρος, ο μόλυβδος, το κάδμιο, τα χρωμικά ιόντα, οι πολυχλωριωμένες ενώσεις, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, τα εντομοκτόνα, τα φυτοφάρμακα, τα προϊόντα πετρελαίου κ.ά.

Στον πίνακα 8.2. παρατίθενται κάποιες από αυτές τις χημικές ενώσεις και οι συγκεντρώσεις στις οποίες συνήθως ανιχνεύονται στο πόσιμο νερό. Αναφέρεται ακόμη η μέγιστη συγκέντρωση της κάθε ουσίας για την οποία το νερό είναι κατάλληλο προς κατανάλωση και τα μέγιστα ανεκτά ημερήσια επίπεδα πρόσληψης της ουσίας (από νερό, τροφή, κ.ά.) στα οποία ο ανθρώπινος οργανισμός, αν εκτεθεί, δεν εμφανίζει κανενός είδους βλάβη. Παρατίθενται ακόμη τα συνηθέστερα προβλήματα που προκαλούν στην ανθρώπινη υγεία οι υψηλές συγκεντρώσεις των εν λόγω ενώσεων, κυρίως μετά από μακροχρόνια έκθεση. Τέλος δίνονται οι μέθοδοι με τις οποίες ανιχνεύονται αυτές οι ουσίες και τα όρια ανίχνευσής τους. Τα στοιχεία βασίζονται σε πίνακα οδηγιών του Π.Ο.Υ. που καταρτίστηκε στη Γενεύη το 2008 (Guidelines for Drinking-water Quality)^[176]. Με βάση και τις κατευθύνσεις του Π.Ο.Υ. κάθε κράτος θεσπίζει νομοθεσία που ορίζει τις προδιαγραφές για το πόσιμο νερό που παρέχεται από το δίκτυο ύδρευσης ή ως εμφιαλωμένο αλλά και του νερού που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία, τις καλλιέργειες κ.τ.λ.

Ένωση	Συγκέντρωση που συνήθως απαντάται στο νερό	Αποδεκτές τιμές βάσει οδηγιών WHO	Ανεκτά ημερήσια επίπεδα πρόσληψης (TDI)	Προκαλεί	Παρατηρήσεις
Acrylamide	-	0,5 µg/L	-	Καρκίνο, μεταλλάξεις	LOD:0,032 µg/L (GC) 0,2 µg/L (HPLC)
Ammonia (NH ₃ & NH ₄ ⁺)	0,2 – 3 mg/L (αναλόγως της περιοχής)	-	-	>1,5 mg/L άσχημη οσμή >35 mg/L άσχημη γεύση	Είναι ένδειξη μόλυνσης από αποχετεύσεις ή βακτήρια
Arsenic	< 1-2 µg/L	0,01 mg/L	15 µg/kg βάρος σώματος / εβδομάδα*	Δερματικές αλλοιώσεις, καρκίνο	LOD: 0,1µg/L (ICP/MS;) 2 µg/L (HG-AAS ή FAAS)
Benzene	<5 µg/L	0,01 mg/L	-	Καρκίνο, παθήσεις του ΚΝΣ	LOD:0,2 µg/L (GC)
Bromates	2 – 293 µg/L (αναλόγως της περιοχής)	0,01 mg/L	-	Πιθανό καρκινογόνο	LOD: 1,5 µg/L (IC) 3,0 µg/L (ICP-MS)
Cadmium	< 1 µg/L	3 µg/L	1 µg/kg βάρος σώματος	Βλάβες στα νεφρά, πιθανό καρκινογόνο	LOD: 0,01 µg/L (ICP-MS) 2 µg/L (FAAS)
CCl ₄	< 5 µg/L	4 µg/L	1,4 µg/kg βάρος σώματος	Βλάβες σε συκώτι – νεφρά, πιθανό καρκινογόνο	LOD: 0,1–0,3 µg/L (GC)
Chlorides	-	-	-	> 250 mg/L άσχημη γεύση	-
Chlorine	0,2–1 mg/L	5 mg/L	150 µg/kg βάρους σώματος	-	LOD: 0,01 µg/L (HPLC) 0,2 mg/L (IC)
Chromium	< 2 µg/L	0.05 mg/L (total chromium)	-	Καρκινογόνο (το Cr(IV))	LOD: 0,05–0,2 µg/L (AAS) (total chromium)
Copper	από ≤0,005 έως >30 mg/L	2 mg/L	10 mg/ημέρα (στους ενήλικες)	Αλλοίωση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του νερού	LOD: 0,02–0,1 µg/L (ICP-MS) 0,5 µg/L (FAAS)
DDT & μεταβολίτες	0,01 µg/L (παρ' ότι έχει απαγορευτεί)	1 µg/L	-	Καρκινογόνο, καθυστερεί την ανάπτυξη	LOD: 0,011 µg/L (GC με ECD)
CH ₂ Cl ₂	< 1 µg/L	0,02 mg/L	6 µg/kg βάρους σώματος	Πιθανό καρκινογόνο	LOD: 0,3 µg/L (GC-MS)
EDTA	10–30 µg/L	0,6 mg/L (ελεύθερου EDTA)	2,5 mg/kg βάρους σώματος (ως πρόσθετο τροφίμων)	Δεσμεύει χρήσιμα μέταλλα για τον οργανισμό	LOD: 1 µg/L (ποτενσιομετρία)
Fluoride	10 mg/L (αναλόγως της περιοχής)	1,5 mg/L	0,5–1,0 mg/L	Τοξική φθορίωση σκελετού & δοντιών (αλλοίωση)	LOD: 0,01 mg/L (IC)
Iodine	-	Δεν έχουν οριστεί	17 µg/kg βάρους σώματος	-	Χρησιμοποιείται για απολύμανση του νερού
Iron	0,5 – 50 mg/L	Δεν έχουν οριστεί	2 mg/l (μόνο για το νερό)	Αλλοίωση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του νερού	-
Lead	< 5 µg/L	0,01 mg/L	3,5 µg/kg βάρους σώματος βρέφους 5 kg	Καθυστερεί τη σωματική & νοητική ανάπτυξη, βλάβες στο ΚΝΣ	LOD: 1 µg/L (AAS)
Manganese	1 – 200 µg/L	0,4 mg/L	60 µg/kg βάρους σώματος	Βλάβες στο ΚΝΣ	LOD: 0,01 µg/L (AAS) 0,05 µg/L (ICP-MS)
Mercury	< 0,5 µg/L ανόργανου Hg	6 µg/L ανόργανου Hg	2 µg/kg βάρους σώματος	Βλάβες στα νεφρά	LOD: 0,05 µg/L (CV-AAS) 0,6 µg/L (ICP)
Nickel	<0,02 mg/L	0,07 mg/L	12 µg/kg βάρους σώματος	Αλλεργικές αντιδράσεις κατά την επαφή	LOD: 0,1 mg/L (ICP-MS) 0,5 mg/L (FAAS)
NO ₃ – NO ₂	< 10 mg/L	50 mg/L (για NO ₃) 3 mg/L (για NO ₂)**	0–3,7 mg/kg (NO ₃) 0–0,07 mg/kg (NO ₂)	Μεθαιμογλοβιναιμία που οδηγεί σε κυάνωση (blue-baby syndrome)	LOD: 22 µg/L για NO ₃ 35 µg/L για NO ₂ (IC)
PAHs (κυρίως benzo[a]pyrene)	0–5 ng/L έως 10 µg/L	0,7 µg/L	-	Υποπτα για καρκινογένεση	LOD: 0,01 µg/L (GC-MS)
Selenium	< 0,01 mg/L	0,01 mg/L	4 µg/kg βάρους σώματος	Επηρεάζει νύχια, μαλλιά και συκώτι	LOD: 0,5 µg/L (HG-AAS)
Sodium	< 20 mg/L (αναλόγως της περιοχής)	Δεν έχουν οριστεί	Δεν έχουν οριστεί	> 200 mg/L αλλοιώνει τη γεύση	-
Styrene	< 1 µg/L	0,02 mg/L	7,7 µg/kg βάρους σώματος	Πιθανό μεταλλαξιογόνο	LOD: 0,3 µg/L (GC-MS)
Sulfate	-	-	Δεν έχει οριστεί	> 250 mg/L στομαχικές διαταραχές και διάβρωση στο δίκτυο ύδρευσης	-
Toluene	Λίγα mg	0,7 mg/L	223 µg/kg βάρους σώματος	Πιθανό καρκινογόνο, τερατογόνο	LOD: 0,13 µg/L (GC-FID) 6 µg/L (GC-MS)
Vinyl chloride	10 µg/L	0,3 µg/L	-	Καρκινογόνο, βλάβη στο DNA	LOD: 0,01 µg/L (GC-ECD-MS)

* Η αναφορά γίνεται για ενήλικα με βάρος σώματος 60 kg.

**Αφορά βρέφη που τρέφονται με μπιμπερό και εκτίθενται στις ουσίες για μικρό χρονικό διάστημα.

8.2.2. Σκληρότητα

Η σκληρότητα του νερού εκφράζεται ως η συγκέντρωση των αλάτων ασβεστίου και μαγνησίου, όπως τα $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ και $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$ (παροδική σκληρότητα) καθώς και τα διαλυτά χλωριούχα και θειικά άλατα των κατιόντων αυτών (μόνιμη σκληρότητα)^[96]. Συγκέντρωση Ca^{2+} πάνω από $100\text{--}300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, μπορεί να αλλοιώσει τη γεύση του νερού, αναλόγως και του ανιόντος. Η αντίστοιχη συγκέντρωση Mg^{2+} είναι λίγο χαμηλότερη^[176].

Νερό που περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις των παραπάνω αλάτων χαρακτηρίζεται «σκληρό» και η χρόνια χρήση μπορεί να προκαλέσει καταστροφές στις σωληνώσεις του δικτύου αλλά και προβλήματα υγείας (πέτρες στα νεφρά, καρδιαγγειακά προβλήματα).

8.2.3. pH

Δεν υπάρχει επιδημιολογικό δεδομένο που να δείχνει ότι κάποια τιμή pH του νερού προκαλεί βλάβη στην υγεία, παρ' όλα αυτά η μέτρησή του αποτελεί μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους ποιοτικού ελέγχου του νερού. Η βέλτιστη τιμή pH του πόσιμου νερού έχει οριστεί ότι πρέπει να κυμαίνεται από 6,5 έως 9,5^[176].

8.2.4. Χρώμα

Το πόσιμο νερό φυσιολογικά είναι άχρωμο. Εάν παρατηρείται χρώμα, πιθανόν οφείλεται σε παρουσία οργανικής ύλης από τα εδάφη όπου διέρχεται, στην υψηλή συγκέντρωση μετάλλων (π.χ. σίδηρο), σε διάβρωση των σωληνώσεων ή σε μόλυνση από λύματα. Σε κάθε περίπτωση απαιτείται άμεσα διερεύνηση και επίλυση.

Για τη μέτρηση του χρώματος χρησιμοποιείται διεθνώς η μονάδα TCU (True Colour Unit). Οι περισσότεροι άνθρωποι διακρίνουν το χρώμα του νερού σε ένα γεμάτο ποτήρι όταν είναι μεγαλύτερο από 15 TCU^[176].

8.2.5. Θολερότητα

Η θολερότητα προκαλείται από αιωρούμενα σωματίδια, κυρίως λόγω ανεπαρκούς φιλτραρίσματος στις δεξαμενές, τα οποία αλλοιώνουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του νερού κι ευνοούν την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Τα ίδια τα σωματίδια ενδέχεται να μην προκαλούν καμία βλάβη στην υγεία, ωστόσο, για να μπορεί να εφαρμοστεί αποτελεσματικά το πρόγραμμα απολύμανσης του νερού, έχει οριστεί ότι η μέση τιμή θολερότητας πρέπει να είναι κάτω από 0,1 NTU (Nephelometric Turbidity Units)^[176].

8.2.6. Θερμοκρασία

Η υψηλή θερμοκρασία του νερού εκτός του ότι το κάνει δυσάρεστο στην πόση, ευνοεί την ανάπτυξη μικροοργανισμών και ενισχύει την οσμή, τη γεύση και το χρώμα που ενδεχομένως έχει ήδη το νερό.

8.2.7. Μικροβιακοί παράγοντες

Παθογενή βακτήρια (*Legionella*, *E-coli*, *Vibrio cholerae*), ιοί (enteroviruses, Hepatitis A virus) και παράσιτα (*Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*) μπορούν, μέσω του πόσιμου νερού, να μεταδώσουν σοβαρές ασθένειες και να εξαπλώσουν επιδημίες μεγάλης κλίμακας. Κάποια μάλιστα εμφανίζουν αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα στις μεθόδους απολύμανσης ή μπορεί να δημιουργήσουν αποικίες, ιδιαίτερα σε παλιά δίκτυα ύδρευσης, και κάποια άλλα «τρέφονται» από το νερό για να πολλαπλασιαστούν. Η αποτελεσματική προστασία του νερού από μικροβιακούς παράγοντες, είναι καίριας σημασίας, ξεκινά από την προστασία και τον έλεγχο των πηγών όπου προέρχεται το νερό και παρακολουθεί όλα τα στάδια επεξεργασίας και διανομής μέχρι τον καταναλωτή.

8.2.8. Ραδιενεργοί παράγοντες

Η ανίχνευση ραδιενεργών συστατικών στο πόσιμο νερό, κυρίως ραδιενεργά ισότοπα μετάλλων που βρίσκονται στο υπέδαφος (Ra, U, Cs), είναι πολύ πιθανή, η συγκέντρωσή τους, όμως, είναι συνήθως εξαιρετικά χαμηλή και άρα αβλαβής. Εάν, ωστόσο, για κάποιο λόγο από φυσικές διεργασίες ή ατύχημα, οι συγκεντρώσεις αυτές αυξηθούν, ο κίνδυνος για την υγεία των καταναλωτών είναι τεράστιος.

8.3. Διαδικασίες Καθαρισμού Νερού

Οι συνηθέστερες διεργασίες καθαρισμού του νερού, μηχανικές και χημικές, προκειμένου αυτό να καταστεί πόσιμο, είναι οι εξής:

1. *Διήθηση (Filtration)* μέσα από άμμο SiO_2 , κεραμικά φίλτρα, φίλτρα μεμβρανών ή αντίστροφης ώσμωσης. Αναλόγως του μεγέθους των πόρων της μεμβράνης υπάρχει δυνατότητα για μικρο-, νανο- ή υπερ- διήθηση.
2. *Κροκίδωση/Νιφάδωση/Καθίζηση (Coagulation/Flocculation/Sedimentation)* που συνήθως γίνεται με την προσθήκη χημικού αντιδραστήριου το οποίο σχηματίζει ίζημα με τα ανεπιθύμητα συστατικά του νερού και διευκολύνει την απομάκρυνσή τους.
3. *Αερισμός (Aeration)* με στόχο την απομάκρυνση δυσάρεστων οσμών και πτητικών συστατικών.
4. Επίδραση *ενεργοποιημένης αλουμίνας (activated alumina)* που βοηθά στην απομάκρυνση στοιχείων όπως το αρσενικό και το φθόριο και *ενεργοποιημένου άνθρακα (activated carbon)* για την απομάκρυνση οργανικών ενώσεων, όπως είναι τα χλωροβενζόλια και το τολουόλιο.
5. *Ιοντανταλλαγή (Ion-exchange)* που εφαρμόζεται προκειμένου να απομακρυνθούν ιοντισμένα συστατικά του νερού. Η κατιονανταλλαγή χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση κάποιων βαρέων μετάλλων, ενώ η ανιονανταλλαγή είναι κατάλληλη για την απομάκρυνση των νιτρικών ενώσεων.
6. *Οξειδωση (Advanced Oxidation)*

7. Απολύμανση (Disinfection) που γίνεται με τη χρήση χλωρίνης, όζοντος ή ακόμη και με ακτινοβολία UV προκειμένου να καταστραφούν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί.

Αναλόγως της πηγής προέλευσης του νερού και της χρήσης για την οποία προορίζεται, υφίσταται μία ή, συνήθως, συνδυασμό των παραπάνω διεργασιών.

8.4. Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC-ELSD για τον Προσδιορισμό των Κατιόντων του Πόσιμου Νερού με Μηχανισμό Κατιονανταλλαγής (Cation-Exchange)

8.4.1. Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια

8.4.1.1. HPLC – ELSD (Υποκ. 3.1 & 3.2)

Χρησιμοποιήθηκε κατιονανταλλακτική στήλη CS14 IonPac[®] διαστάσεων 250 x 4 mm της Dionex.

8.4.1.2. Γυάλινα σκεύη – Ογκομετρικά όργανα (Υποκ. 3.4)

8.4.1.3. Διαλύτες – Αντιδραστήρια

A) Διαλύτες

Νερό κατάλληλο για HPLC που παρασκευάζεται με συσκευή Αντίστροφης Ώσμωσης (εδάφιο 3.3.1.).

B) Υγρά αντιδραστήρια

Τριφθοροξικό οξύ, TFA, καθαρότητας $\geq 98\%$, MW:114,02 g·mol⁻¹, d:1,48 g·mL⁻¹ (Riedel-de-Haën, Seelze, Germany)

Γ) Στερεά αντιδραστήρια

i) Χλωριούχο Νάτριο, NaCl, καθαρότητας $\geq 99,5\%$, Mr:58,44 (Merck)

ii) Χλωριούχο Κάλιο, KCl, καθαρότητας $\geq 99\%$, Mr:74,55 (Merck)

iii) Χλωριούχο Μαγνήσιο, MgCl₂·6H₂O, καθαρότητας 99-101%, Mr:203,30 (Riedel-de-Haën)

iv) Ανθρακικό Ασβέστιο, CaCO₃, καθαρότητας $\geq 99\%$, Mr :100,09 (Merck)

8.4.2. Πειραματική πορεία

8.4.2.1. Παρασκευή διαλυμάτων

➤ Διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions)

Για την παρασκευή των πυκνών διαλυμάτων παρακαταθήκης ζυγίστηκαν 0,1271 g NaCl, 0,0954 g KCl, 0,4182 g MgCl₂·6H₂O και 0,1249 g CaCO₃. Όλα τα αντιδραστήρια ξεχωριστά διαλύθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 100 mL με νερό, εκτός από το CaCO₃ το οποίο αρχικά διαλύθηκε με σταγόνες TFA και κατόπιν αραιώθηκε με νερό. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων ήταν 500 μg·mL⁻¹ ως προς συγκέντρωση των κατιόντων και

όχι των ενώσεων. Τα διαλύματα φυλάχθηκαν στις ογκομετρικές φιάλες, σε θερμοκρασία δωματίου, και ήταν σταθερά για 2 -3 εβδομάδες.

➤ Διαλύματα εργασίας

Με κατάλληλες αραιώσεις από τα διαλύματα παρακαταθήκης, παρασκευάστηκαν τα διαλύματα εργασίας, που αποτελούσαν μίγματα των τεσσάρων ιόντων, όπου η συγκέντρωση του κάθε ιόντος ήταν 1, 3, 5, 10 και 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Τα δ/τα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς. Οι τελικές αραιώσεις έγιναν στην κινητή φάση σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL.

8.4.2.2. Δοκιμές βελτιστοποίησης μεθόδου

Για την εύρεση της κινητής φάσης που διαχωρίζει το μίγμα των ιόντων του νερού, παρασκευάστηκε πυκνό διάλυμα TFA συγκέντρωσης 0,05 M (ή $3,85 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$) και αραιώθηκε με νερό σε διάφορες συγκεντρώσεις. Οι κινητές φάσεις που εξετάστηκαν και οι τελικές συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος φαίνονται στους πίνακες που ακολουθούν:

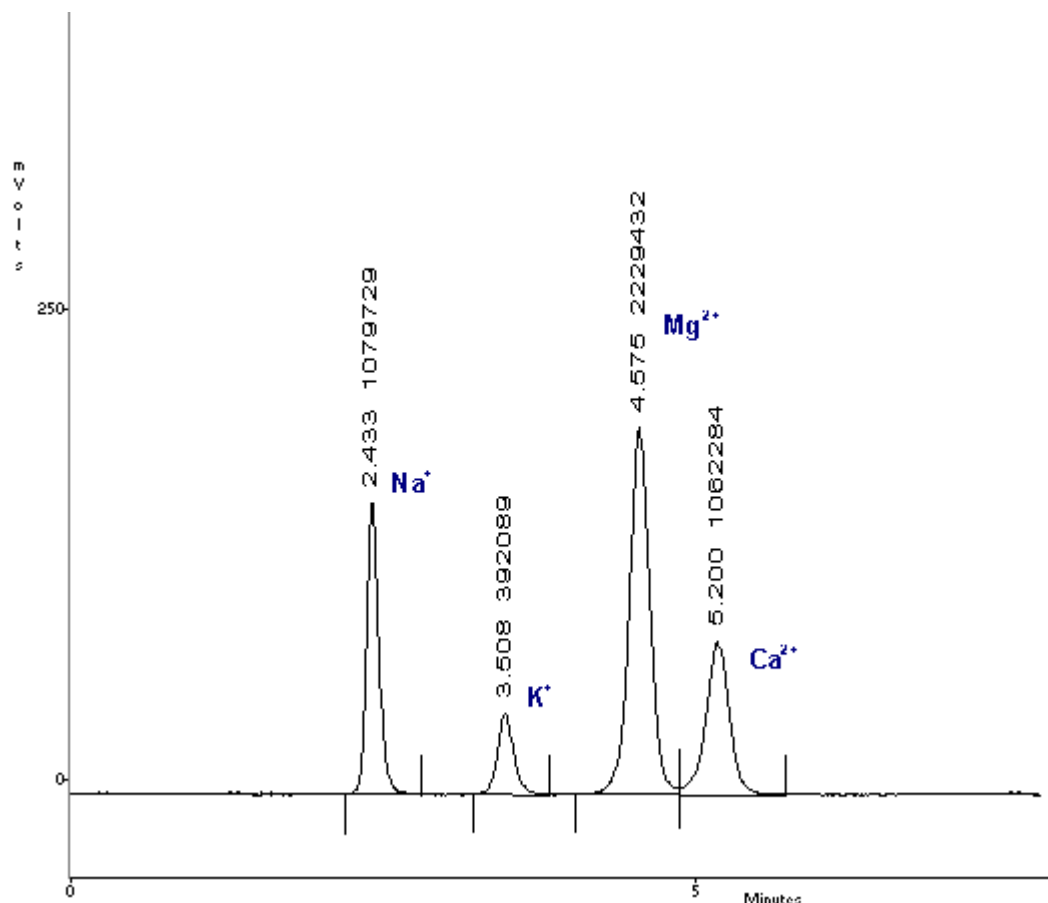
Πίνακας 8.3: Δοκιμές κινητών φάσεων για το διαχωρισμό των ιόντων του νερού.

Διαλύτης	Αναλογία	Τελική συγκέντρωση TFA ($\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ροή κινητής φάσης ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)
TFA:H ₂ O	10:90	0,385	1,0
TFA:H ₂ O	20:80	0,77	1,0
TFA:H ₂ O	40:60	1,54	0,9
TFA:H ₂ O	35:65	1,347	1,0
TFA:H₂O	30:70	1,155	1,2

Πίνακας 8.4: Πειραματικές συνθήκες χρωματογράφησης.

Σύστημα HPLC – ELSD	
Στήλη	Ion Pac CS14 (250 x 4 mm)
Κινητή φάση	TFA $1,155 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$
Ταχύτητα ροής κινητής φάσης	$1,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Θερμοκρασία ανιχνευτή	70 °C
Ευαισθησία (gain) ανιχνευτή	12
Πίεση φέροντος αερίου	3,5 bar

Ενδεικτικό χρωματογράφημα διαχωρισμού του μίγματος των ιόντων δίνεται στο επόμενο σχήμα:



Σχήμα 8.1: Χρωματογράφημα πρότυπου μίγματος των κατιόντων του νερού με στήλη CS14 και κινητή φάση δ/μα TFA συγκέντρωσης $1,155 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$. Οι χρόνοι κατακράτησης των ιόντων ήταν Na^+ : $t_R=2,43 \text{ min}$, K^+ : $t_R=3,51 \text{ min}$, Mg^{2+} : $t_R=4,57 \text{ min}$ και Ca^{2+} : $t_R=5,20 \text{ min}$. Η συγκέντρωση όλων των ιόντων ήταν $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

8.4.2.3. Καμπύλη αναφοράς – Επικύρωση μεθόδου

Τα διαλύματα εργασίας του μίγματος των 4 ιόντων μετρήθηκαν τέσσερις διαφορετικές ημέρες στο σύστημα HPLC-ELSD και κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς του κάθε ιόντος. Υπολογίστηκαν οι συντελεστές $\log a$ και b καθώς και τα δεδομένα επικύρωσης της μεθόδου (επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα, LOD και LOQ) κατά τα γνωστά.

8.4.2.4. Κατεργασία δειγμάτων

Εξετάστηκαν 4 δείγματα νερών. Το ένα ήταν απεσταγμένο νερό που παράχθηκε στο εργαστήριο με τον τρόπο που έχει περιγραφεί στο κεφ.3 και χρησιμοποιήθηκε ως λευκό διάλυμα. Τα υπόλοιπα 2 δείγματα ήταν εμφιαλωμένα φυσικά μεταλλικά νερά γνωστών εταιριών που πωλούνται στην ελληνική αγορά. Το 4^ο δείγμα ήταν ένα ανθρακούχο φυσικό μεταλλικό νερό (σόδα). Τέλος, η μέθοδος εφαρμόστηκε και σε ενέσιμο διάλυμα φυσιολογικού ορού που χρησιμοποιείται στα νοσοκομεία για ενδοφλέβια χορήγηση με την

επωνυμία Lactated Ringer's Injection® της εταιρίας Fresenius – Kabi. Η σύσταση καθενός από τα παραπάνω δείγματα σε ιόντα φαίνεται στον πίνακα 8.4.

Πίνακας 8.5: Χημική σύσταση δειγμάτων σε $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Δείγμα	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na^+	K^+	NH_4^+	Li^+	HCO_3^-	F^-	Cl^-	$\text{SO}_4^{=}$	NO_3^-	NO_2^-	pH	Σκληρό- τητα
Απεσταγμένο νερό	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,8 ¹	-
ΖΑΓΟΡΙ®	69,5	3,3	2,5	1,1	0,0	-	225	0,15	5,1	14,4	2,98	0,0	7,42 ²	227
ΙΟΛΗ®	47	25,9	6,7	1	<0,2	-	262	-	6,91	9,99	9,15	<0,05	7,5 ²	-
ΣΟΥΡΩΤΗ®	177	55	56	11	0,50	0,26	760	0,2	70	-	<1,0	-	-	-
Lactated Ringer's Inj.	2990	-	156,4	54,1	-	-	-	-	3864	-	-	-	-	-
Νερό ΕΥΔΑΠ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,3 ¹	-

1: το pH μετρήθηκε με pHμετρο στο εργαστήριο

2: το pH αναγράφεται στην ετικέτα από τη συσκευάστρια εταιρία

Οι τιμές του πίνακα είναι οι ονομαστικές, όπως αναφέρονταν στις ετικέτες των προϊόντων. Η παύλα (-) σημαίνει ότι το αντίστοιχο ιόν είτε δεν ανιχνεύεται στο δείγμα ή δε γίνεται καμία αναφορά από τη συσκευάστρια εταιρία. Στο απεσταγμένο νερό θεωρήθηκε ότι, εφ' όσον η ιονανταλλαγή ήταν επιτυχής, η τιμή όλων των ιόντων ήταν μηδενική. Στο νερό του δικτύου της ΕΥΔΑΠ δεν απουσιάζουν τα ιόντα, απλώς δεν ήταν γνωστές οι τιμές της συγκέντρωσής τους κατά τη δειγματοληψία.

Τα δείγματα νερών διηθήθηκαν από φίλτρα Millipore 0,45 μ για απομάκρυνση τυχόν μικροσωματιδίων και σκόνης και στη συνέχεια 10 mL από κάθε δείγμα αραιώθηκε σε ογκομετρικές φιάλες των 25 mL με κινητή φάση. Το αεριούχο νερό ΣΟΥΡΩΤΗ®, πριν από οποιαδήποτε άλλη κατεργασία, τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για αρκετή ώρα, έως ότου απομακρυνθεί όλο το αέριο και σταματήσει ο αφρισμός, και κατόπιν διηθήθηκε και αραιώθηκε όπως τα υπόλοιπα δείγματα.

8.4.3. Αποτελέσματα

8.4.3.1. Καμπύλες αναφοράς ιόντων – Επικύρωση

Οι καμπύλες αναφοράς του κάθε ιόντος χωριστά και τα στατιστικά στοιχεία που αφορούν στην επικύρωση της μεθόδου ως προς αυτό το ιόν, παρατίθενται στους επόμενους πίνακες (8.5 – 8.8).

Πίνακας 8.6: Καμπύλες αναφοράς Na⁺ – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου.

Ημέρα	Εξίσωση ευθείας	r^2 (N≥4, n≥4)	% RSD (1 – 15 µg·mL ⁻¹)
1 ^η	$\log A = 4,7933(\pm 0,0016) + 1,2769(\pm 0,0016) \cdot \log C$	0,9999992	1,9 – 4,0
2 ^η	$\log A = 4,8268(\pm 0,0023) + 1,2510(\pm 0,0023) \cdot \log C$	0,999998	2,1 – 3,8
3 ^η	$\log A = 4,594(\pm 0,032) + 1,411(\pm 0,033) \cdot \log C$	0,9997	0,95 – 4,9
4 ^η	$\log A = 4,630(\pm 0,026) + 1,399(\pm 0,026) \cdot \log C$	0,9998	2,3 – 6,5
Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα			
Interday %RSD του loga		2,5	
Interday %RSD του b		6,2	
LOQ (µg·mL ⁻¹)		2,3	
LOD (µg·mL ⁻¹)		0,96	

Πίνακας 8.7: Καμπύλες αναφοράς K⁺ – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου.

Ημέρα	Εξίσωση ευθείας	r^2 (N≥4, n≥4)	% RSD (1 – 15 µg·mL ⁻¹)
1 ^η	$\log A = 4,482(\pm 0,017) + 1,276(\pm 0,017) \cdot \log C$	0,999991	0,83 – 3,1
2 ^η	$\log A = 4,457(\pm 0,033) + 1,307(\pm 0,034) \cdot \log C$	0,9997	1,5 – 4,4
3 ^η	$\log A = 4,0487(\pm 0,0082) + 1,4980(\pm 0,0084) \cdot \log C$	0,99998	0,26 – 4,1
4 ^η	$\log A = 4,2144(\pm 0,0044) + 1,3667(\pm 0,0045) \cdot \log C$	0,999995	1,0 – 4,1
Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα			
Interday %RSD του loga		4,8	
Interday %RSD του b		7,2	
LOQ (µg·mL ⁻¹)		2,6	
LOD (µg·mL ⁻¹)		1,1	

Πίνακας 8.8: Καμπύλες αναφοράς Mg^{2+} – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου.

Ημέρα	Εξίσωση ευθείας	r^2 ($N \geq 4$, $n \geq 4$)	% RSD (1 – 15 $\mu g \cdot mL^{-1}$)
1 ^η	$\log A = 5,1613(\pm 0,0060) + 1,3080(\pm 0,0061) \cdot \log C$	0,99998	1,5 – 2,7
2 ^η	$\log A = 5,170(\pm 0,033) + 1,283(\pm 0,033) \cdot \log C$	0,9997	0,76 – 3,4
3 ^η	$\log A = 4,854(\pm 0,029) + 1,487(\pm 0,029) \cdot \log C$	0,9998	1,9 – 3,7
4 ^η	$\log A = 4,864(\pm 0,029) + 1,491(\pm 0,029) \cdot \log C$	0,9998	0,98 – 3,1
Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα			
Interday %RSD του $\log a$		3,5	
Interday %RSD του b		8,1	
LOQ ($\mu g \cdot mL^{-1}$)		0,32	
LOD ($\mu g \cdot mL^{-1}$)		0,14	

Πίνακας 8.9: Καμπύλες αναφοράς Ca^{2+} – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου.

Ημέρα	Εξίσωση ευθείας	r^2 ($N \geq 4$, $n \geq 4$)	% RSD (1 – 15 $\mu g \cdot mL^{-1}$)
1 ^η	$\log A = 4,814(\pm 0,042) + 1,329(\pm 0,042) \cdot \log C$	0,9995	2,1 – 3,7
2 ^η	$\log A = 4,902(\pm 0,065) + 1,246(\pm 0,066) \cdot \log C$	0,9996	0,56 – 3,8
3 ^η	$\log A = 4,438(\pm 0,010) + 1,564(\pm 0,010) \cdot \log C$	0,99998	0,78 – 4,8
4 ^η	$\log A = 4,504(\pm 0,039) + 1,515(\pm 0,040) \cdot \log C$	0,9997	0,19 – 2,9
Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα			
Interday %RSD του $\log a$		4,9	
Interday %RSD του b		10	
LOQ ($\mu g \cdot mL^{-1}$)		1,4	
LOD ($\mu g \cdot mL^{-1}$)		0,59	

Η επικύρωση της μεθόδου που αφορά στον ταυτόχρονο προσδιορισμό των τεσσάρων βασικών κατιόντων που απαντώνται στο πόσιμο νερό, έδειξε ότι η αναπαραγωγιμότητα των μετρήσεων, όπως εκφράζεται από τις τυπικές αποκλίσεις των

συντελεστών $\log a$ και b και της επαναληψιμότητας ήταν πολύ καλή. Ικανοποιητικά χαμηλά ήταν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, όχι όμως τόσο για τα μονοσθενή Na^+ και K^+ , όσο για τα δισθενή Mg^{2+} και Ca^{2+} .

8.4.3.2. Έλεγχος περιεκτικότητας ιόντων στα νερά – Ανάκτηση

Όλα τα δείγματα νερών μετρήθηκαν τρεις φορές τουλάχιστον και από τα εμβαδά των κορυφών που προέκυψαν, υπολογίστηκε η περιεκτικότητά τους ως προς τα τέσσερα βασικά κατιόντα. Στη συνέχεια προστέθηκαν στα δείγματα καθορισμένες, γνωστές ποσότητες προτύπων διαλυμάτων Na^+ , K^+ , Mg^{2+} και Ca^{2+} και υπολογίστηκε η επί τοις εκατό ανάκτηση, %R, της μεθόδου. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρατίθενται συγκεντρωτικά στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 8.10: Αποτελέσματα μετρήσεων κατιόντων του νερού – Ανάκτηση

Ιόν		Απεσταγμένο νερό	ΙΟΛΗ®	ΖΑΓΟΡΙ®	ΣΟΥΡΩΤΗ®	Νερό ΕΥΔΑΠ
Na^+	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0,879($\pm 0,075$)	5,63($\pm 0,24$)	2,90($\pm 0,27$)	67,03($\pm 0,47$)	3,895($\pm 0,082$)
	%ονομαστική τιμή	-	83,9($\pm 3,8$)	116(± 11)	119,70($\pm 0,85$)	-
	%R ^a	-	95,9	96,5	104,3	-
K^+	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1,16($\pm 0,24$)	1,68($\pm 0,18$)	1,123($\pm 0,082$)	10,98($\pm 0,66$)	1,250($\pm 0,040$)
	%ονομαστική τιμή	-	168(± 14)	102,1($\pm 7,4$)	99,8($\pm 5,9$)	-
	%R ^a	-	101,8	91,8	101,6	-
Mg^{2+}	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Δεν ανιχνεύεται	20,80($\pm 0,21$)	3,04($\pm 0,11$)	56,65($\pm 0,97$)	4,81($\pm 0,55$)
	%ονομαστική τιμή	-	80,31($\pm 0,82$)	92,2($\pm 3,4$)	103,0($\pm 1,8$)	-
	%R ^a	-	103,5	93,3	98,5	-
Ca^{2+}	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Δεν ανιχνεύεται	54,73($\pm 0,56$)	77,5($\pm 2,3$)	164,54($\pm 0,95$)	42,47($\pm 0,47$)
	%ονομαστική τιμή	-	116,4($\pm 1,2$)	111,5($\pm 3,4$)	92,96($\pm 0,53$)	-
	%R ^a	-	96,8	105,5	104,4	-

a: ο υπολογισμός των ανακτήσεων γίνεται με τον ελαστικό τύπο (βλ.Εξ..5.2)

Από τις τιμές του πίνακα παρατηρείται ότι οι τιμές της % περιεκτικότητας ήταν, σε αρκετές περιπτώσεις, σημαντικά διαφορετικές από τις ονομαστικές περιεκτικότητες των ιόντων των εμφιαλωμένων νερών και κυμαίνονταν από 80 έως και 170% περίπου επί της

ονομαστικής περιεκτικότητας. Τέτοια αποτελέσματα δεν πρέπει να θεωρούνται απίθανα καθώς η ετικέτα της φιάλης για ένα προϊόν, όπως το εμφιαλωμένο νερό, δεν ανταποκρίνεται πάντα στη δεδομένη παρτίδα.

Αντίθετα, οι τιμές των ανακτήσεων ήταν σχετικά ικανοποιητικές και για κάποια ιόντα οριακά αποδεκτές. Αιτία ήταν η εγγενής αδυναμία της προτεινόμενης μεθόδου να μετρήσει πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, ιδιαίτερα των ιόντων που έχουν μικρό συντελεστή απόκρισης, όπως το νάτριο και το κάλιο και στα οποία εμφανίζεται πιο έντονο το πρόβλημα. Είναι χαρακτηριστικό μάλιστα ότι για δύο από τα δείγματα (ΖΑΓΟΡΙ® και ΙΟΛΗ®) οι αρχικές συγκεντρώσεις των ιόντων νατρίου και καλίου στο «πυκνό» δείγμα ήταν ήδη χαμηλότερες από τα υπολογισμένα LOQ της μεθόδου.

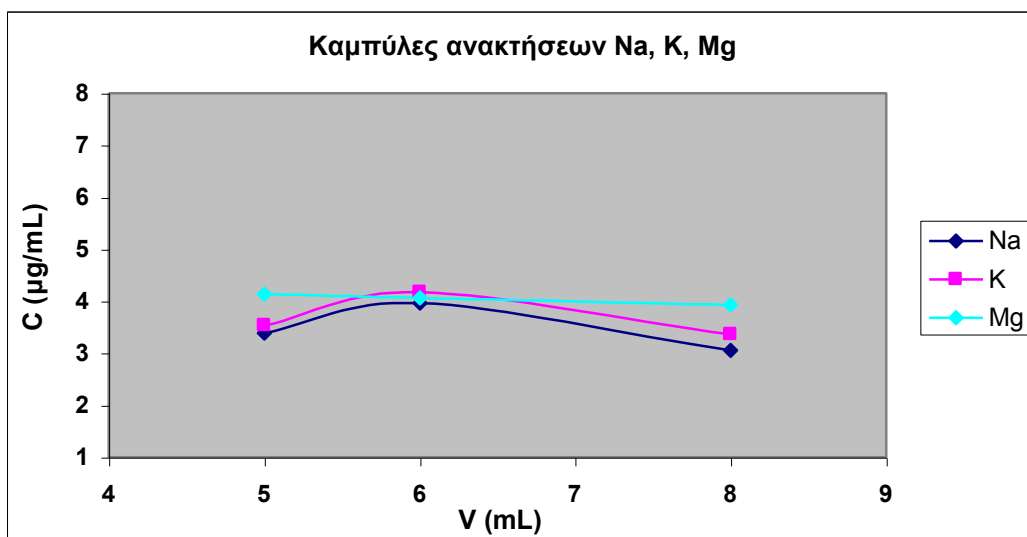
Για το λόγο αυτό, ελέγχθηκε η ανάκτηση της μεθόδου με εναλλακτικό τρόπο, με ανάλυση μεταβαλλόμενων διαφορετικών ποσοτήτων δείγματος νερού στα οποία εφαρμόστηκε η μέθοδος προσδιορισμού των ιόντων. Ο έλεγχος της ανάκτησης εφαρμόστηκε στο νερό ΖΑΓΟΡΙ®.

Αναλυτικά, έγινε δειγματοληψία, μετά από διήθηση με φίλτρα Millipore 0,45 μ, όγκων ίσων με 5, 6 και 8 mL δείγματος και αραιώθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 25 mL με κινητή φάση. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των δειγμάτων παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα:

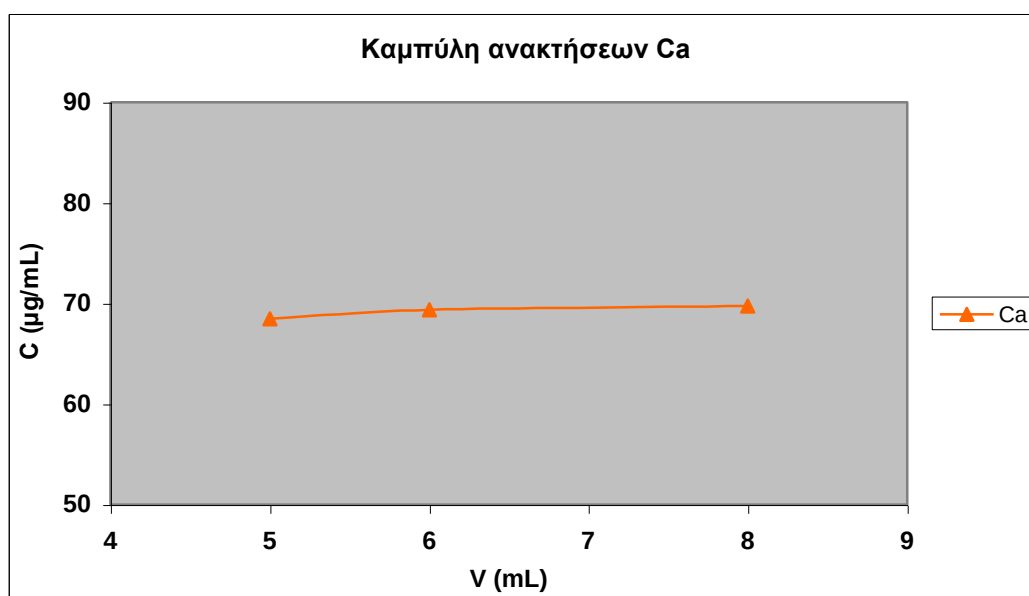
Πίνακας 8.11: Αποτελέσματα ελέγχου ανάκτησης στο νερό ΖΑΓΟΡΙ®.

Όγκος δείγματος (mL)	Na ⁺ (μg·mL ⁻¹)	K ⁺ (μg·mL ⁻¹)	Mg ²⁺ (μg·mL ⁻¹)	Ca ²⁺ (μg·mL ⁻¹)
5	3,38(±0,17)	3,53(±0,12)	4,13(±0,23)	68,5(±1,3)
6	3,96(±0,23)	4,05(±0,17)	4,067(±0,048)	69,36(±0,31)
8	3,05(±0,14)	3,314(±0,059)	3,83(±0,11)	69,73(±0,87)

Με βάση τα αποτελέσματα του πίνακα κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάκτησης των κατιόντων του δείγματος.



Σχήμα 8.2: Διάγραμμα καμπυλών ανάκτησης των ιόντων νατρίου, καλίου και μαγνησίου για διαφορετικούς όγκους δείγματος νερού.



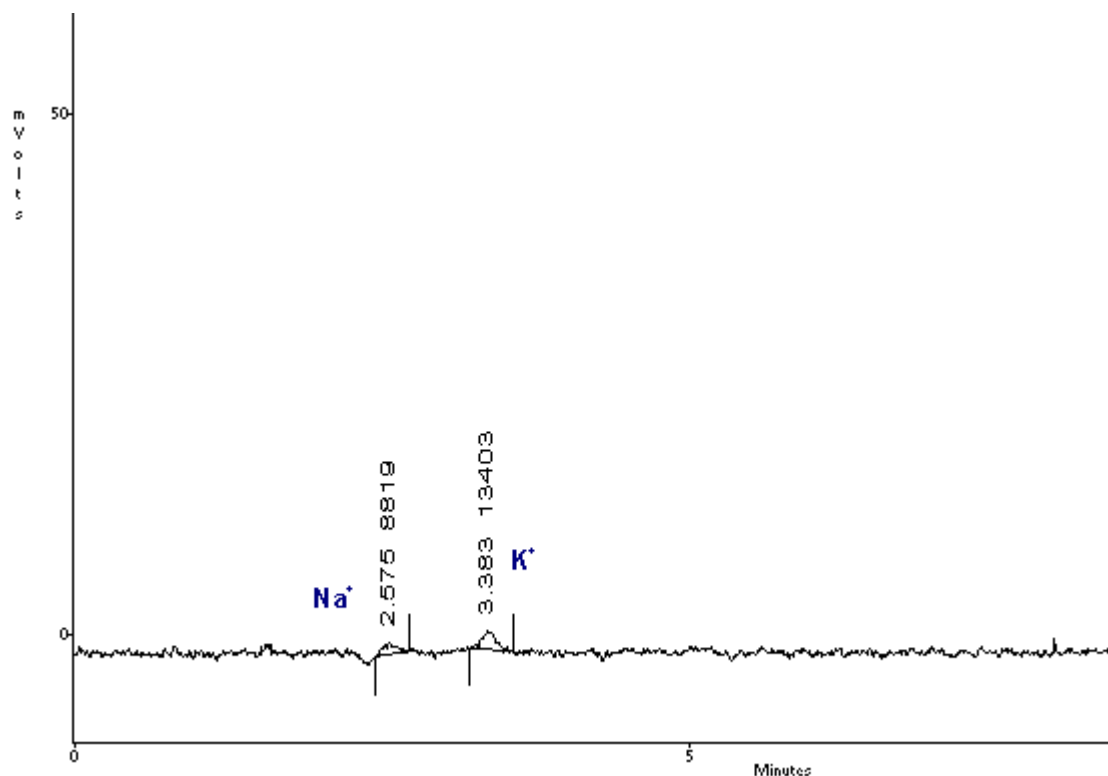
Σχήμα 8.3: Διάγραμμα καμπύλης ανάκτησης των ιόντων ασβεστίου για διαφορετικούς όγκους δείγματος νερού.

Σημείωση: Οι καμπύλες ανάκτησης κατασκευάστηκαν σε δύο διαφορετικά διαγράμματα για να είναι πιο ευκρινείς οι ευθείες των αποτελεσμάτων, λόγω μεγάλης διαφοράς στις συγκεντρώσεις των ιόντων του δείγματος.

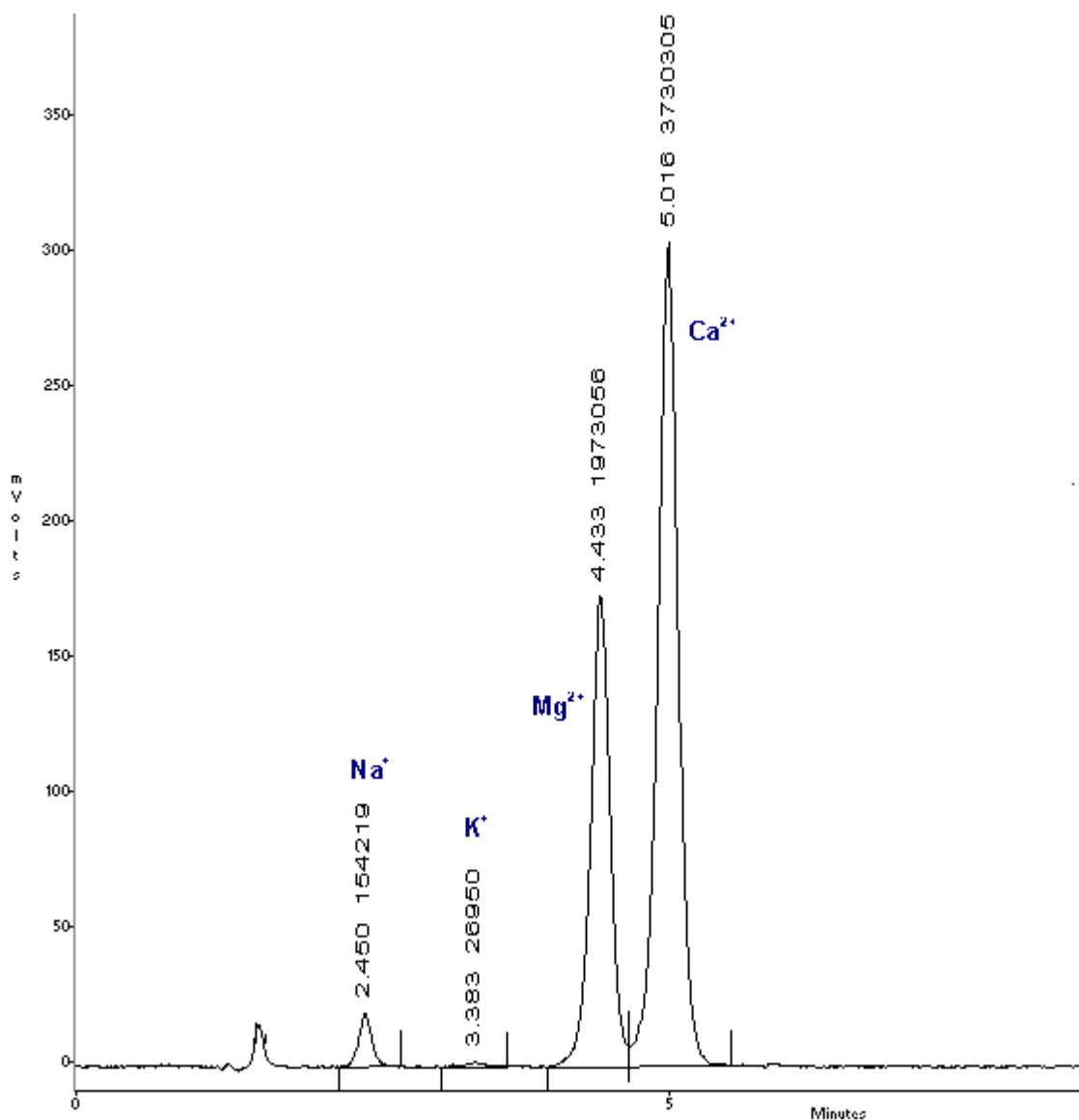
Από τα αποτελέσματα, όπως αποτυπώνονται στα διαγράμματα 8.2 και 8.3, επιβεβαιώθηκε για άλλη μια φορά ότι η μέθοδος ήταν ακριβής ως προς τους προσδιορισμούς των ιόντων μαγνησίου και ασβεστίου, καθώς οι καμπύλες ανάκτησης ήταν πρακτικά ευθείες, ενώ αντίθετα εμφάνισε σφάλμα στον προσδιορισμό νατρίου και

καλίου, των οποίων οι συγκεντρώσεις ήταν χαμηλές. Ένας σημαντικός παράγοντας σφάλματος της μεθόδου ήταν, πιθανόν, η ύπαρξη κάποιας ποσότητας ιόντων στο απεσταγμένο νερό με το οποίο κατασκευάστηκαν όλα τα διαλύματα, που ήταν μεν μικρή, ήταν όμως ικανή να δημιουργήσει διακυμάνσεις στα εξαγόμενα αποτελέσματα.

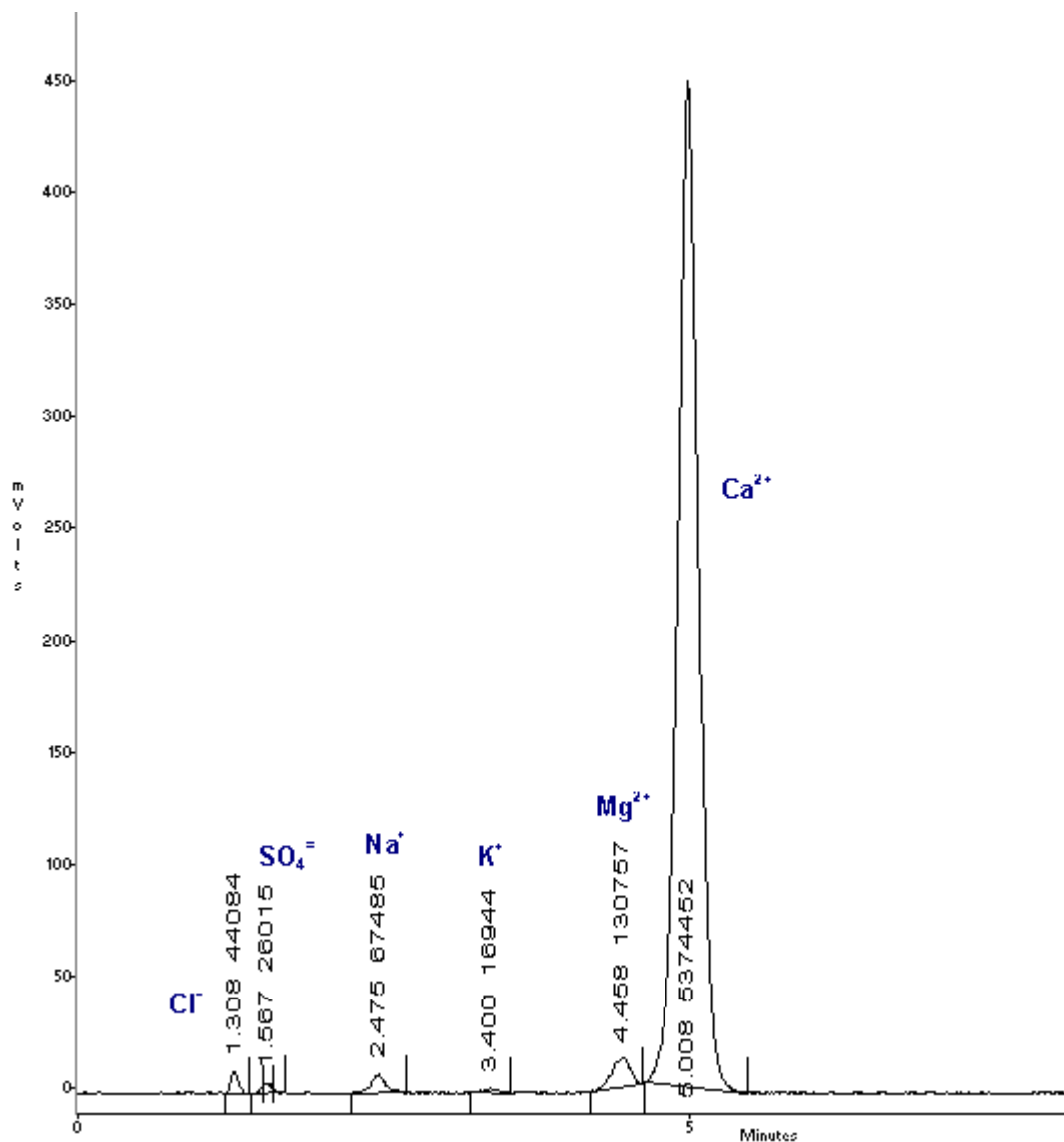
Ακολουθούν χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα όλων των δειγμάτων των νερών που ελέγχθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο.



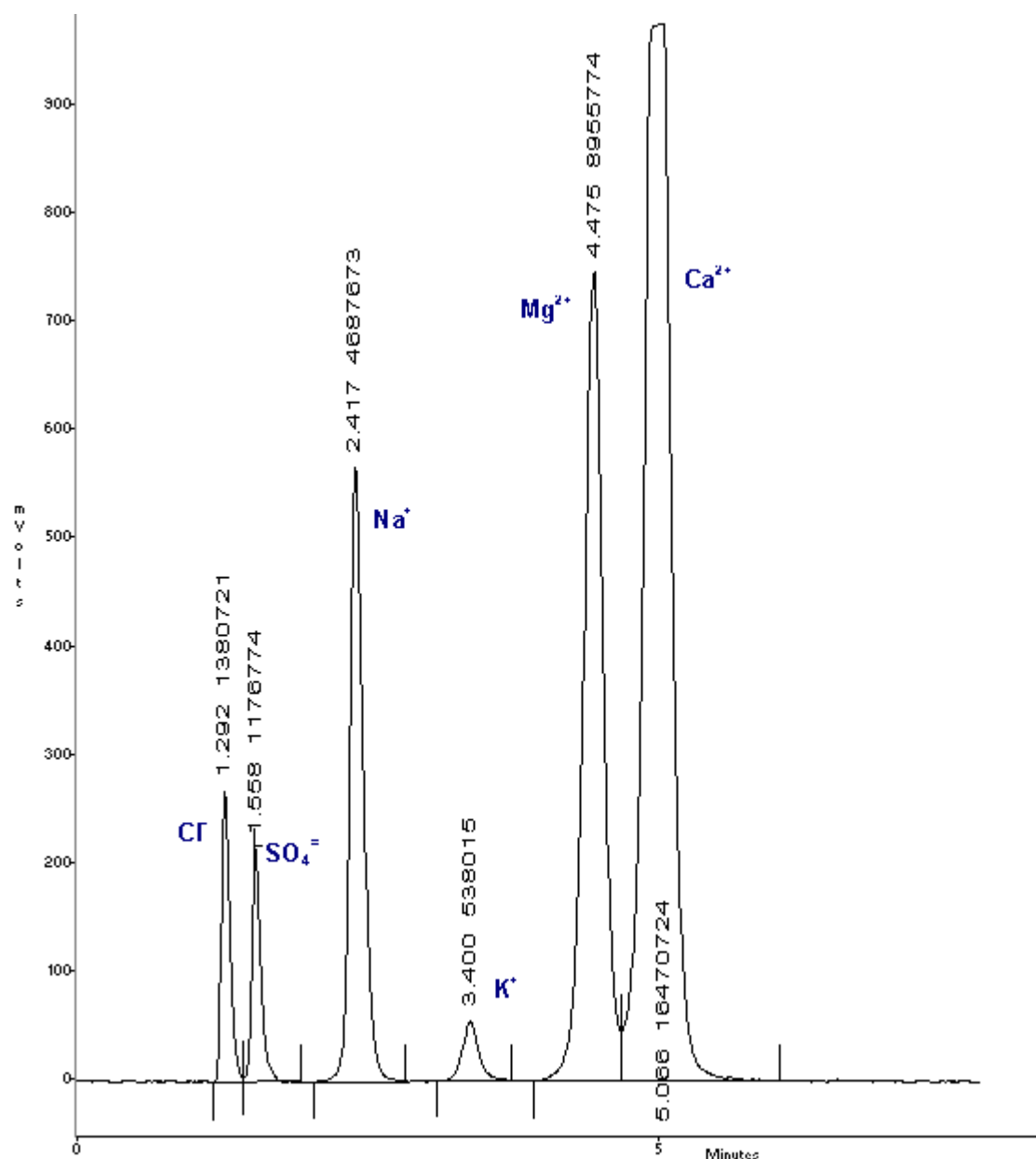
Σχήμα 8.4: Χρωματογράφημα απεσταγμένου νερού αναλυμένου με στήλη CS14 και κινητή φάση δ/μα TFA συγκέντρωσης $1,155 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$. Ανιχνεύτηκε μόνο η παρουσία μικρής ποσότητας νατρίου και καλίου.



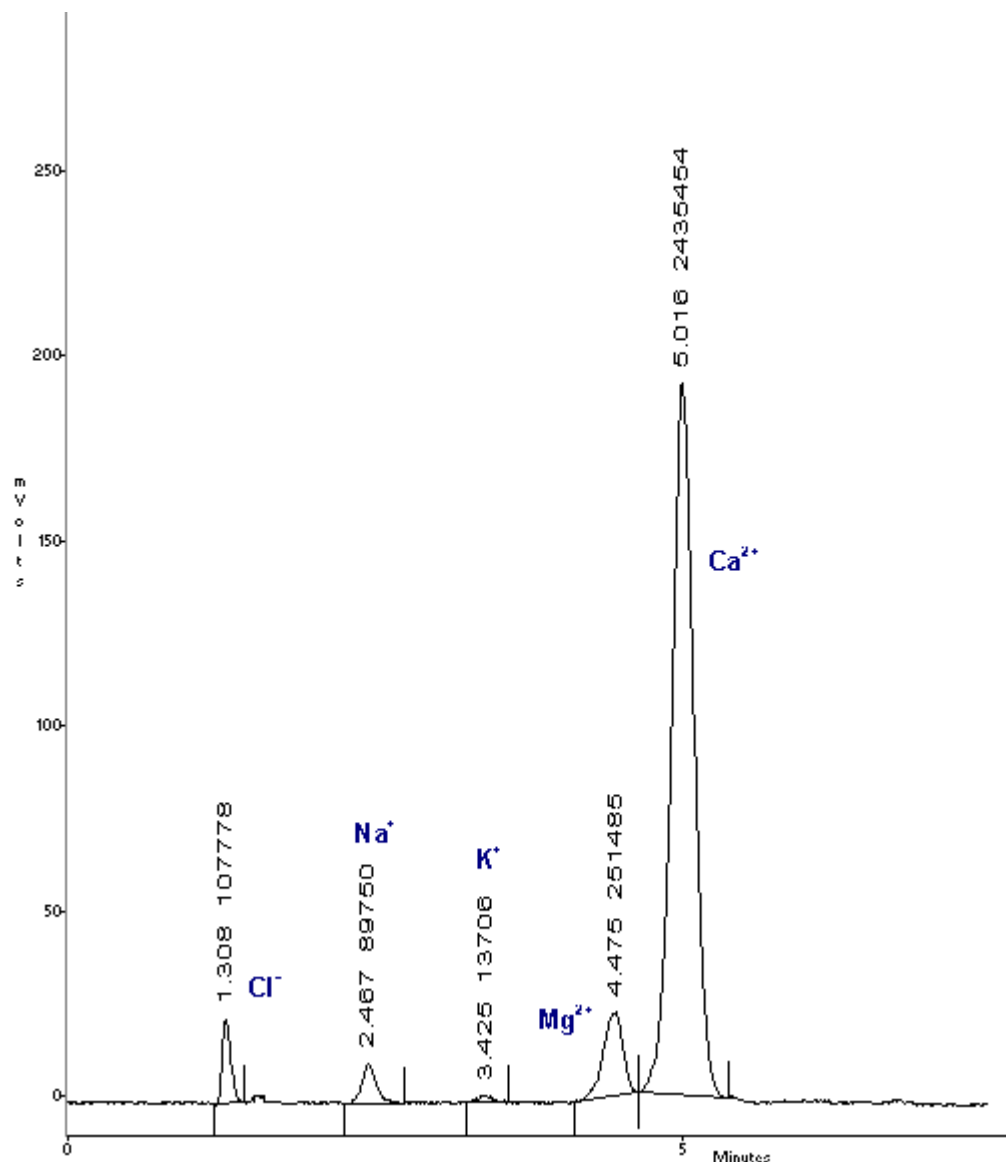
Σχήμα 8.5: Χρωματογράφημα του εμφιαλωμένου νερού ΙΟΛΗ® (αραιωμένου 10 mL → 25 mL). Πρόκειται για νερό πλούσιο κυρίως σε άλατα του μαγνησίου και του ασβεστίου, ενώ η περιεκτικότητά του σε νάτριο και κάλιο ήταν φτωχή.



Σχήμα 8.6: Χρωματογράφημα του εμφιαλωμένου νερού ΖΑΓΟΡΙ® (αραιωμένου 10 mL → 25 mL). Ήταν νερό πλούσιο σε άλατα του ασβεστίου. Αντίθετα, η περιεκτικότητά του σε νάτριο, κάλιο και μαγνήσιο ήταν μικρή.



Σχήμα 8.7: Χρωματογράφημα του ανθρακούχου νερού ΣΟΥΡΩΤΗ® (αραιωμένου 10 mL → 25 mL). Πρόκειται για νερό πολύ πλούσιο σε ασβέστιο, ενώ υψηλή ήταν και η περιεκτικότητά του σε νάτριο και μαγνήσιο. Από τα δείγματα νερών που εξετάστηκαν, είχε την υψηλότερη συγκέντρωση καλίου.



Σχήμα 8.8: Χρωματογράφημα του νερού από το δίκτυο της ΕΥΔΑΠ (αραιωμένου 10 mL → 25 mL). Το νερό της Αθήνας είχε σχετικά υψηλή συγκέντρωση ασβεστίου ενώ οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων ιόντων ήταν μικρές.

Η διαφορετική εικόνα του κάθε δείγματος είναι, βέβαια, αποτέλεσμα της διαφορετικής γεωμορφολογίας του εδάφους όπου βρίσκεται η κάθε μια πηγή. Το ΙΟΛΗ[®] προέρχεται από τα βουνά της Οίτης στη Στερεά Ελλάδα, το ΖΑΓΟΡΙ[®] από τα βουνά των Ιωαννίνων, ενώ η ΣΟΥΡΩΤΗ[®] από την ομώνυμη πηγή στην περιοχή της Θεσσαλονίκης. Αναλόγως της εποχής, των καιρικών συνθηκών ή άλλων παραγόντων η σύσταση των νερών ενδέχεται να διαφοροποιείται.

8.4.3.3. Έλεγχος περιεκτικότητας κατιόντων σε φαρμακευτικά σκευάσματα – Ανάκτηση

Η πολύ μεγάλη διαφορά στις συγκεντρώσεις των κατιόντων νατρίου, καλίου και ασβεστίου του ενέσιμου σκευάσματος ορού συν το γεγονός ότι για παρόμοιες συγκεντρώσεις καλίου και ασβεστίου, το κάλιο δίνει πολύ μικρότερη κορυφή από την αντίστοιχη του ασβεστίου, δεν επέτρεψαν να γίνει μια μοναδική αραίωση με την οποία θα προσδιοριστούν ταυτόχρονα και τα τρία ιόντα. Έτσι αραιώθηκαν 0,335 mL inj.sol. σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL για τον προσδιορισμό του νατρίου, 3,2 mL inj.sol. σε φιάλη των 50 mL για προσδιορισμό του καλίου και 4,62 mL inj.sol. σε φιάλη των 25 mL για τον προσδιορισμό του ασβεστίου. Όλες οι αραιώσεις έγιναν στην κινητή φάση ώστε η τελική συγκέντρωση των κατιόντων των δ/των μέτρησης να είναι $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Ταυτόχρονα ετοιμάστηκε μια δεύτερη σειρά διαλυμάτων στα οποία προστέθηκαν συγκεκριμένες, γνωστές ποσότητες προτύπων διαλυμάτων των τριών κατιόντων προκειμένου να υπολογιστεί η ανάκτηση. Όλα τα διαλύματα μετρήθηκαν στην HPLC-ELSD.

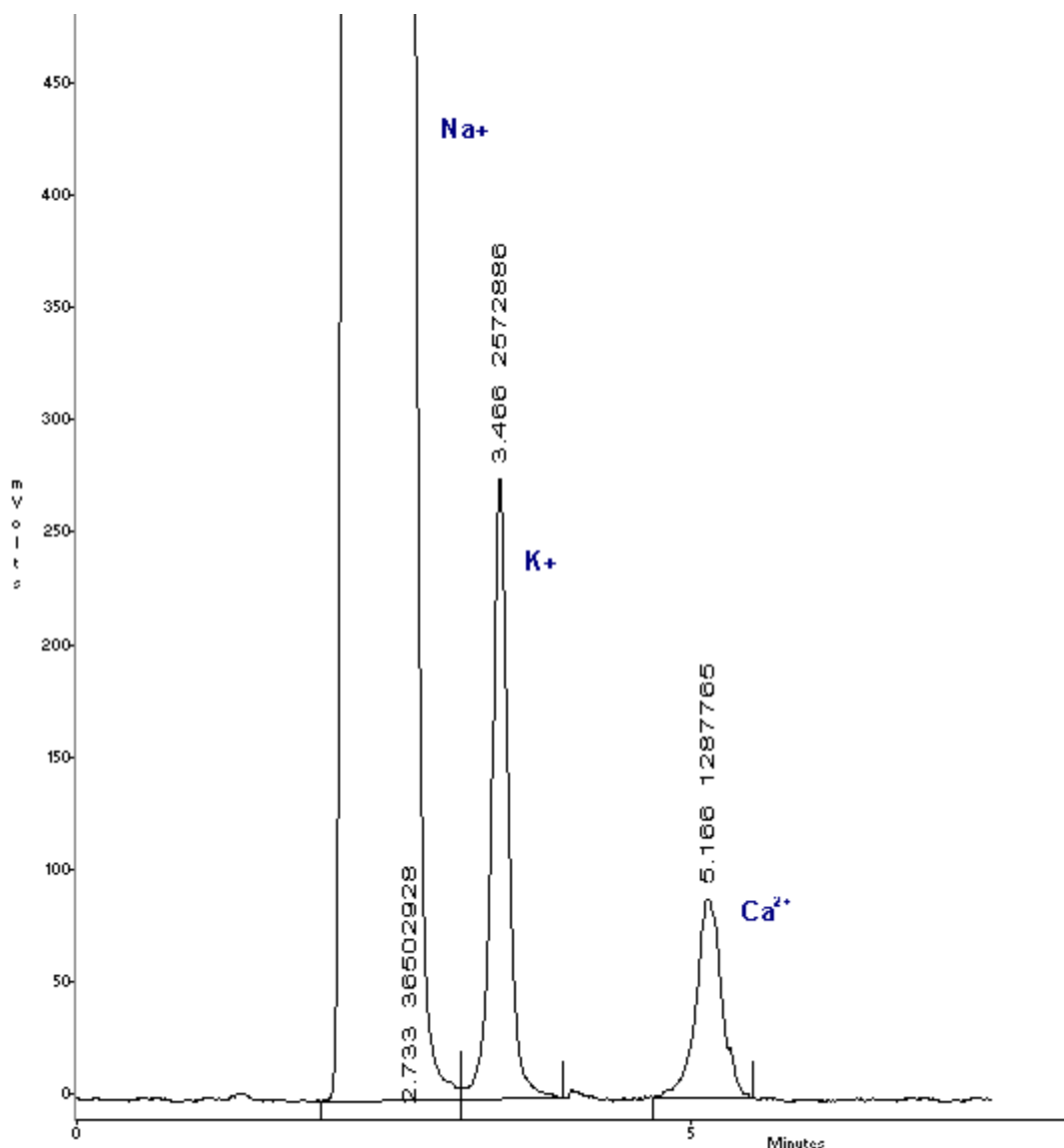
Τα αποτελέσματα για το διάλυμα του φυσιολογικού ορού παρατίθενται στον πίνακα:

Πίνακας 8.12: Αποτελέσματα μετρήσεων κατιόντων του ενέσιμου διαλύματος – Ανάκτηση

Ιόν	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺
$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2988(±51)	158,1(±4,1)	49,98(±0,29)
%ονομαστική τιμή	99,8(±1,7)	101,1(±2,7)	92,33(±0,53)
%R ^a	107,8	108,6	107,9

a: ο υπολογισμός των ανακτήσεων γίνεται με τον ελαστικό τύπο (βλ.Εξ. 5.2)

Ακολουθεί χαρακτηριστικό χρωματογράφημα του ενέσιμου σκευάσματος μετά από την κατάλληλη αραίωση, για τον προσδιορισμό του καλίου. Η εικόνα του χρωματογραφήματος έδειξε ότι θα μπορούσαν να προσδιοριστούν ταυτόχρονα κάλιο και ασβέστιο με μία μοναδική αραίωση, παρότι επιλέχθηκε διαφορετικός τρόπος. Στο χρωματογράφημα φαίνεται ακόμη η πολύ μεγάλη διαφορά στη συγκέντρωση του νατρίου σε σχέση με τα άλλα δύο ιόντα.



Σχήμα 8.9: Χρωματογράφημα φυσιολογικού ορού (αραιωμένου 1.6 mL → 25 mL) για τον προσδιορισμό του ιόντος του καλίου.

8.4.4. Συμπεράσματα – Συζήτηση

1. Τα ιόντα της II_A ομάδας που μετέχουν στον προσδιορισμό, δηλ. το μαγνήσιο και το ασβέστιο, σχηματίζουν παρουσία ιόντων φθορίου ιζήματα. Αυτό όμως δε συμβαίνει με TFA και ειδικά σε όξινο περιβάλλον σαν αυτό της μεθόδου.

2. Για την παρασκευή του πρότυπου διαλύματος Ca²⁺ ζυγίστηκε το δυσδιάλυτο στο νερό CaCO₃ το οποίο διαλύθηκε με τη βοήθεια ελάχιστου TFA, αντί να ζυγιστεί απευθείας το υδατοδιαλυτό CaCl₂. Η επιλογή αυτή οφείλεται στο ότι το CaCl₂ είναι πολύ υγροσκοπικό και επομένως δεν είναι γνωστή η καθαρότητά του.

3. Εξετάζοντας τη μορφή του χρωματογραφήματος του σχ.8.1 παρατηρήθηκε ότι παρ' όλο που η συγκέντρωση των τεσσάρων ιόντων ήταν η ίδια, το εμβαδόν της κορυφής του μαγνησίου ήταν σημαντικά μεγαλύτερο από τις κορυφές των υπολοίπων ιόντων,

γεγονός που αντανακλά και στα αποτελέσματα των LOD και LOQ του Mg^{2+} που για το ιόν μαγνησίου ήταν πολύ χαμηλότερα από ότι στα υπόλοιπα τρία ιόντα. Ο μεγαλύτερος συντελεστής απόκρισης του Mg/TFA σε σχέση με τα άλλα τρία ιόντα παρατηρήθηκε ξανά στο κεφάλαιο 4 και βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με τα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης (βλ. Σχ.4.7.).

4. Οι χρόνοι κατακράτησης του κάθε ιόντος ήταν $Na^+:t_R=2,405(\pm 0,028)$ min, $K^+:t_R=3,450(\pm 0,085)$ min, $Mg^{2+}:t_R=4,507(\pm 0,092)$ min και $Ca^{2+}:t_R=5,04(\pm 0,13)$ min. Αντίστοιχα οι παράγοντες ασυμμετρίας των κορυφών ήταν $Na^+:A_S=1,138(\pm 0,057)$, $K^+:A_S=1,09(\pm 0,15)$, $Mg^{2+}:A_S=0,946(\pm 0,047)$ και $Ca^{2+}:A_S=0,96(\pm 0,12)$.

5. Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων στην ίδια ημέρα, όπως φαίνεται από τις τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων, αλλά και η αναπαραγωγιμότητα ήταν πολύ ικανοποιητικές και για τα τέσσερα ιόντα. Η μέθοδος όμως αδυνατούσε να μετρήσει χαμηλές συγκεντρώσεις, ιδιαίτερα του νατρίου και του καλίου, γι' αυτό υστερεί σε σχέση με τη μέθοδο αναφοράς που είναι η Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης. Προτείνεται, ωστόσο, ανεπιφύλακτα στην περίπτωση που ενδιαφέρει ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των κατιόντων σε δείγμα του οποίου οι συγκεντρώσεις δεν είναι πολύ χαμηλές, καθώς πλεονεκτεί σε απλότητα, ταχύτητα και χαμηλό κόστος αντιδραστηρίων.

6. Η μέθοδος, εκτός από το φυσιολογικό ορό, δοκιμάστηκε και σε ένα ακόμη φαρμακευτικό σκεύασμα, ένα πολυβιταμινούχο διατροφικό συμπλήρωμα, το Vital® Plus Q10 που βρίσκεται με τη μορφή μαλακού καψακίου. Το σκεύασμα εκτός από τα ιόντα μαγνησίου, καλίου και ασβεστίου περιείχε ακόμη σίδηρο, φυτικά εκχυλίσματα, ένα σύμπλεγμα των βιταμινών B, βιταμίνες E, D και C και ιχνοστοιχεία όπως ψευδάργυρο, μαγγάνιο, σελήνιο χρώμιο κ.ά. Η σύσταση, όμως, του καψακίου και τα υπόλοιπα, κυρίως τα λιποδιαλυτά συστατικά του σκευάσματος δεν επέτρεψαν τη διαλυτοποίηση και απομόνωση των κατιόντων που ενδιαφέρουν τον προσδιορισμό, τουλάχιστον με τις μεθόδους διαλυτοποίησης που δοκιμάστηκαν.

8.5. Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC-ELSD για τον Προσδιορισμό Χρωμίου – Χρωμικών Ιόντων στο Πόσιμο Νερό με Μηχανισμό Κατιονανταλλαγής (Cation-Exchange Mechanism)

8.5.1. Όργανα – Συσκευές – Αντιδραστήρια

8.5.1.1. HPLC – ELSD (Υποκ. 3.1 & 3.2)

Χρησιμοποιήθηκε κατιονανταλλακτική στήλη CS14 IonPac[®] διαστάσεων 250 x 4 mm της Dionex.

8.5.1.2. Γυάλινα σκεύη – Ογκομετρικά όργανα (Υποκ. 3.4)

8.5.1.3. Διαλύτες – Αντιδραστήρια

A) Διαλύτες

Νερό κατάλληλο για HPLC (εδάφιο 3.3.1.).

B) Υγρά αντιδραστήρια

Τριφθοροξικό οξύ, TFA, καθαρότητας $\geq 98\%$, MW:114,02 g·mol⁻¹, d:1,48 g·mL⁻¹ (Riedel-de-Haën, Seelze, Germany)

Γ) Στερεά αντιδραστήρια

i) Νιτρικό χρώμιο (III), Cr(NO₃)₃·9H₂O, καθαρότητας $\geq 98,5\%$, Mr:400,14 (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany)

ii) Χρωμικό κάλιο (VI), K₂CrO₄, καθαρότητας $\geq 99,5\%$, Mr:194,20 (Merck, Germany)

iii) Χλωριούχο Νάτριο, NaCl

iv) Χλωριούχο Κάλιο, KCl

v) Χλωριούχο Μαγνήσιο, MgCl₂·6H₂O

vi) Ανθρακικό Ασβέστιο, CaCO₃, όπως παραπάνω (βλ.8.4.1.3 παρ.Γ)

8.5.2. Πειραματική πορεία

8.5.2.1. Παρασκευή διαλυμάτων

➤ Διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions)

Τα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν ως εξής: ζυγίστηκαν 0,3906 g Cr(NO₃)₃·9H₂O σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και διαλύθηκαν μέχρι συμπλήρωσης του όγκου με νερό. Επίσης ζυγίστηκαν 0,1877 g K₂CrO₄ και διαλύθηκαν με νερό σε φιάλη των 100 mL. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων ήταν 500 μg·mL⁻¹ ως προς συγκέντρωση των ιόντων Cr(III) και Cr(VI) αντίστοιχα. Ζυγίστηκαν επίσης ποσότητες NaCl, KCl, MgCl₂·6H₂O και CaCO₃ και παρασκευάστηκαν πυκνά διαλύματα των αλάτων αυτών όπως έχει περιγραφεί στο εδάφιο 8.4.2.1. σε τελικές συγκεντρώσεις 500 μg·mL⁻¹ ως προς τα κατίοντα. Όλα τα διαλύματα φυλάχθηκαν στις ογκομετρικές φιάλες, σε θερμοκρασία δωματίου και παρέμειναν σταθερά για δύο εβδομάδες τουλάχιστον.

➤ Διαλύματα εργασίας

Με κατάλληλες αραιώσεις των διαλυμάτων παρακαταθήκης, παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας τα οποία ήταν μίγματα όλων των ιόντων, και στα οποία η συγκέντρωση του Cr(VI) και του Cr(III) ήταν 5, 8, 10, 15 και 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Οι συγκεντρώσεις των υπολοίπων ιόντων του νερού ήταν 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Τα δ/τα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς. Οι τελικές αραιώσεις έγιναν στην κινητή φάση.

8.5.2.2. Δοκιμές βελτιστοποίησης μεθόδου

Παρασκευάστηκε πυκνό διάλυμα TFA συγκέντρωσης 0,05 M (ή 3,85 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$) και αραιώθηκε με νερό σε διάφορες συγκεντρώσεις. Μελετήθηκαν διάφορες συστάσεις κινητής φάσης, με διαφορετικές ροές και θερμοκρασίες εξάτμισης υπό συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης, προκειμένου να διαχωριστούν τα χρωμικά ιόντα και τα κατιόντα χρωμίου παρουσία και των υπολοίπων ιόντων του νερού. Όλες οι δοκιμές παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 8.13: Δοκιμές κινητών φάσεων για το διαχωρισμό $\text{Cr}^{3+}/\text{CrO}_4^{2-}$ και των κατιόντων του νερού με ισοκρατική έκλουση.

Διαλύτης	Αναλογία	Τελική συγκέντρωση TFA ($\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ροή κινητής φάσης ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	Θερμοκρασία ($^{\circ}\text{C}$)
TFA:H ₂ O	100:0	3,85	1,0	70
TFA:H ₂ O	80:20	3,08	1,0	70
TFA:H ₂ O	50:50	1,925	1,0	70
TFA:H ₂ O	50:50	1,925	0,5	50
TFA:H ₂ O	50:50	1,925	0,7	50
TFA:H ₂ O	20:80	0,77	0,7	50
TFA:H ₂ O	30:70	1,155	0,7	50
TFA:H ₂ O	70:30	2,695	0,7	50

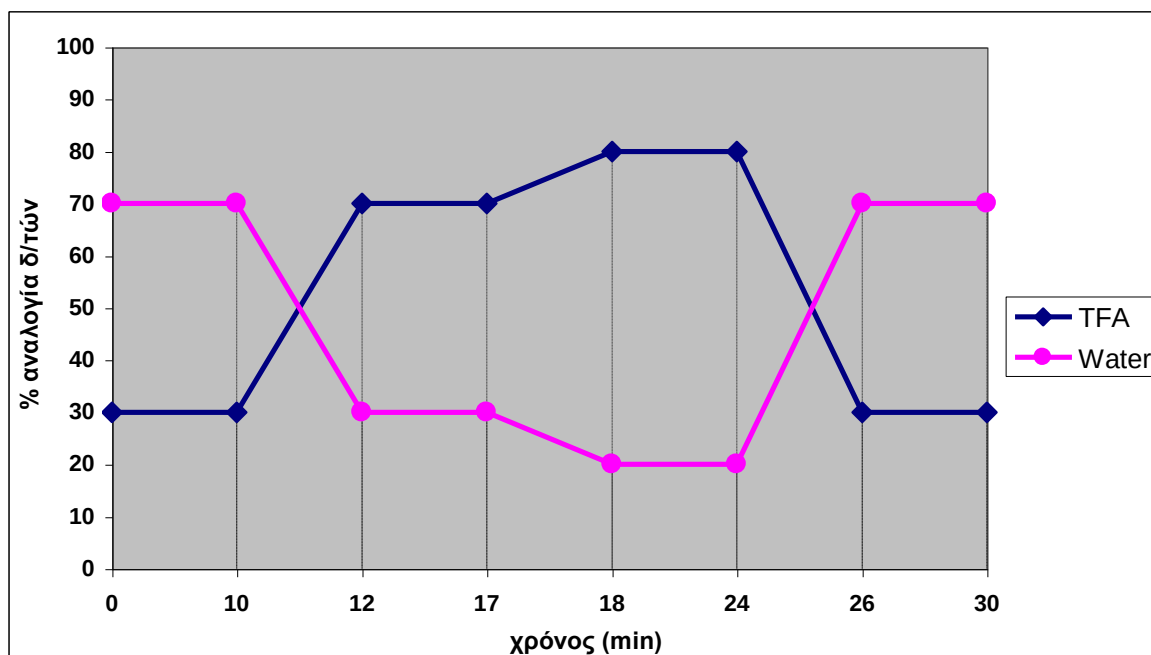
Από τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν με όλες τις παραπάνω συνθήκες προκύπτει ότι όταν η συγκέντρωση του TFA της κινητής φάσης ήταν μικρή, τα μεν χρωμικά ιόντα, CrO_4^{2-} , εκλούονταν σε χρόνο < 3 min, όπως αναμενόταν, τα δε ιόντα Cr^{3+} εκλούονταν πολύ αργά, μετά τα 30 min. Αντίθετα, όταν η συγκέντρωση του TFA της κινητής φάσης ήταν μεγαλύτερη, τα ιόντα Cr^{3+} εκλούονταν σε χρόνο μικρότερο των 10 min,

όμως τα χρωμικά ιόντα συνεκλούονταν με τα υπόλοιπα κατιόντα του νερού, Na^+ και K^+ , με κορυφές που αλληλεπικαλύπτονταν και ήταν αδύνατο να διαχωριστούν.

Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι θα έπρεπε να αναπτυχθεί ένα σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης των ιόντων. Έτσι, ξεκινώντας από μια κινητή φάση με αραιό δ/μα TFA κατά την οποία διαχωρίζονται τα CrO_4^{2-} από τα κατιόντα του νερού, σταδιακά η συγκέντρωση TFA θα έπρεπε να αυξάνει ώστε να εκλουστεί και το Cr^{3+} σε έναν εύλογο χρόνο. Μετά από δοκιμές, η μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης με το χρόνο, που έδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα, είναι αυτή που φαίνεται στον πίνακα 8.12 και απεικονίζεται και στο διάγραμμα του σχήματος 8.10. Ο δ/της Α που αναφέρεται στον πίνακα, ήταν διάλυμα TFA αρχικής συγκέντρωσης 0,05 M ή $3,85 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ και ο δ/της Β ήταν νερό.

Πίνακας 8.14: Μεταβολή σύστασης κινητής φάσης για το διαχωρισμό $\text{Cr}^{3+}/\text{CrO}_4^{2-}$ και των κατιόντων του νερού με βαθμιδωτή έκλουση.

Χρόνος (min)	Δ/της Α: TFA (%)	Δ/της Β: H_2O (%)
0 – 10	30	70
10 – 12	30 → 70	70 → 30
12 – 17	70	30
17 – 18	70 → 80	30 → 20
18 – 24	80	20
24 – 26	80 → 30	20 → 70
26 – 30	30	70
Ροή κινητής φάσης ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	0,7	
Θερμοκρασία ($^{\circ}\text{C}$)	50	
Πίεση φέροντος αερίου (bar)	3,5	

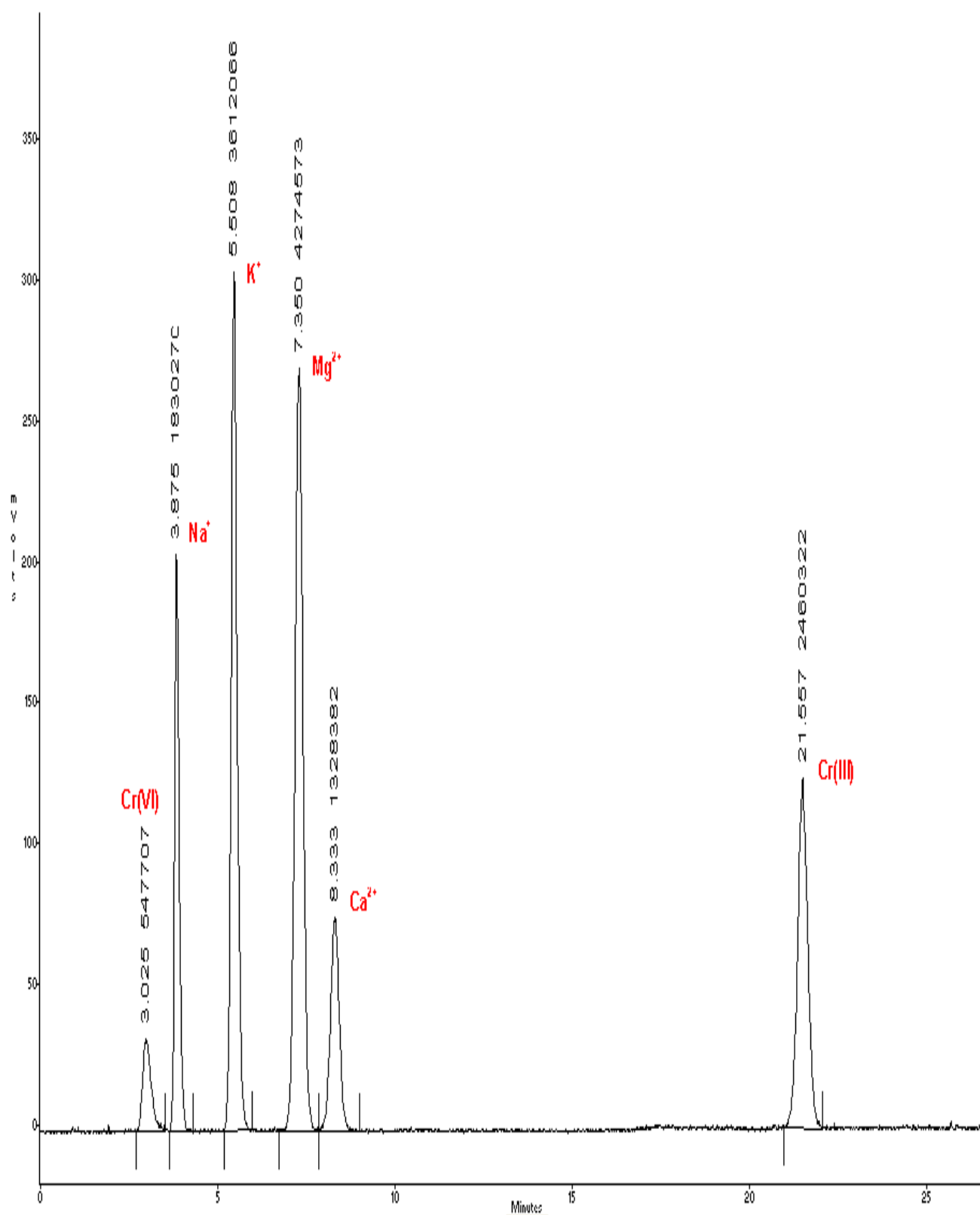


Σχήμα 8.10: Διάγραμμα προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης για το διαχωρισμό $\text{Cr}^{3+}/\text{CrO}_4^{2-}$ και των κατιόντων του νερού με στήλη CS14.

Στο σχήμα 8.11 φαίνεται χρωματογράφημα πρότυπου μίγματος $\text{CrO}_4^{2-}/\text{Cr}^{3+}$ συγκέντρωσης $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, παρουσία και των κατιόντων του νερού, στο οποίο επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός με την προτεινόμενη μέθοδο βαθμιδωτής έκλουσης. Η συγκέντρωση των υπολοίπων κατιόντων ήταν $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Η ενισχυμένη κορυφή του καλίου οφειλόταν στην παρουσία των ιόντων K^+ όχι μόνο από το KCl αλλά και από το K_2CrO_4 .

8.5.2.3. Καμπύλη αναφοράς – Επικύρωση μεθόδου

Τα διαλύματα εργασίας του μίγματος όλων των ιόντων μετρήθηκαν τρεις διαδοχικές ημέρες στο σύστημα HPLC-ELSD και κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς, μία για τα χρωμικά ιόντα Cr(VI) και μία για το Cr(III) . Στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι συντελεστές $\log a$ και b καθώς και τα δεδομένα επικύρωσης της μεθόδου (επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα, LOD και LOQ) με τον τρόπο που έχει ήδη περιγραφεί.



Σχήμα 8.11: Χρωματογράφημα πρότυπου μίγματος $\text{CrO}_4^{2-}/\text{Cr}^{3+}$ παρουσία και των υπολοίπων κατιόντων του νερού. Η συγκέντρωση των ιόντων του χρωμίου ήταν $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

8.5.2.4. Κατεργασία δειγμάτων

Ελέγχθηκαν 2 δείγματα νερών. Το ένα προερχόταν από το δίκτυο ύδρευσης της Αθήνας και το άλλο από το δίκτυο ύδρευσης της πόλης της Θήβας. Το νερό της Θήβας συλλέχθηκε από βρύση και φυλάχθηκε σε πλαστική φιάλη νερού στο ψυγείο μέχρι να ολοκληρωθούν οι μετρήσεις (περίπου 2 εβδομάδες). Το νερό της Αθήνας συλλεγόταν από τη βρύση κάθε φορά που χρειαζόταν να μετρηθεί. Πριν από κάθε αραίωση, τα δείγματα φιλτράρονταν από φίλτρα Millipore 0,45 μ για απομάκρυνση στερεών σωματιδίων. Τα δείγματα δεν αραιώνονταν αλλά οξινίζονταν με TFA μέχρις συγκέντρωσης 1,155 mL·L⁻¹ που ήταν η συγκέντρωση της κινητής φάσης, σε ογκομετρικές φιάλες των 100 mL.

Τα δύο δείγματα αρχικά μετρήθηκαν, όπως ήταν, για τυχόν ύπαρξη χρωμίου/χρωμικών. Κατόπιν, προκειμένου να προσδιοριστεί η ανάκτηση, σε ογκομετρικές φιάλες των 100 mL, που περιείχαν δείγματα νερού βρύσης ΕΥΔΑΠ, προστέθηκαν 3 και 4 mL αντίστοιχα από το κάθε πρότυπο δ/μα ώστε η τελική συγκέντρωση σε Cr(VI) και Cr(III) να είναι 15 και 20 μ g·L⁻¹ αντίστοιχα, και τα δείγματα μετρήθηκαν εκ νέου. Υπολογίστηκε το % ποσοστό της ευρεθείσας πειραματικής τιμής της συγκέντρωσης Cr(VI) και Cr(III) σε σχέση με τη θεωρητική που προστέθηκε στα δείγματα.

8.5.3. Αποτελέσματα

8.5.3.1. Καμπύλες αναφοράς ιόντων – Επικύρωση

Οι καμπύλες αναφοράς των Cr(VI) και Cr(III) καθώς και τα στατιστικά στοιχεία επικύρωσης της προτεινόμενης μεθόδου, ακολουθούν στους πίνακες 8.14 και 8.15.

Πίνακας 8.15: Καμπύλες αναφοράς Cr(VI) – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου.

Ημέρα	Εξίσωση ευθείας	r^2 (N≥4, n≥4)	% RSD (5 – 20 μ g·mL ⁻¹)
1 ^η	$\log A = 3,47(\pm 0,12) + 2,06(\pm 0,10) \cdot \log C$	0,998	0,52 – 6,5
2 ^η	$\log A = 2,882(\pm 0,088) + 2,564(\pm 0,082) \cdot \log C$	0,998	1,4 – 6,4
3 ^η	$\log A = 3,471(\pm 0,021) + 1,940(\pm 0,020) \cdot \log C$	0,9998	0,7 – 2,9
Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα			
Interday %RSD του $\log a$		10	
Interday %RSD του b		15	
LOQ (μ g·mL ⁻¹)		2,7	
LOD (μ g·mL ⁻¹)		1,5	

Πίνακας 8.16: Καμπύλες αναφοράς Cr(III) – Στατιστικά στοιχεία επικύρωσης μεθόδου.

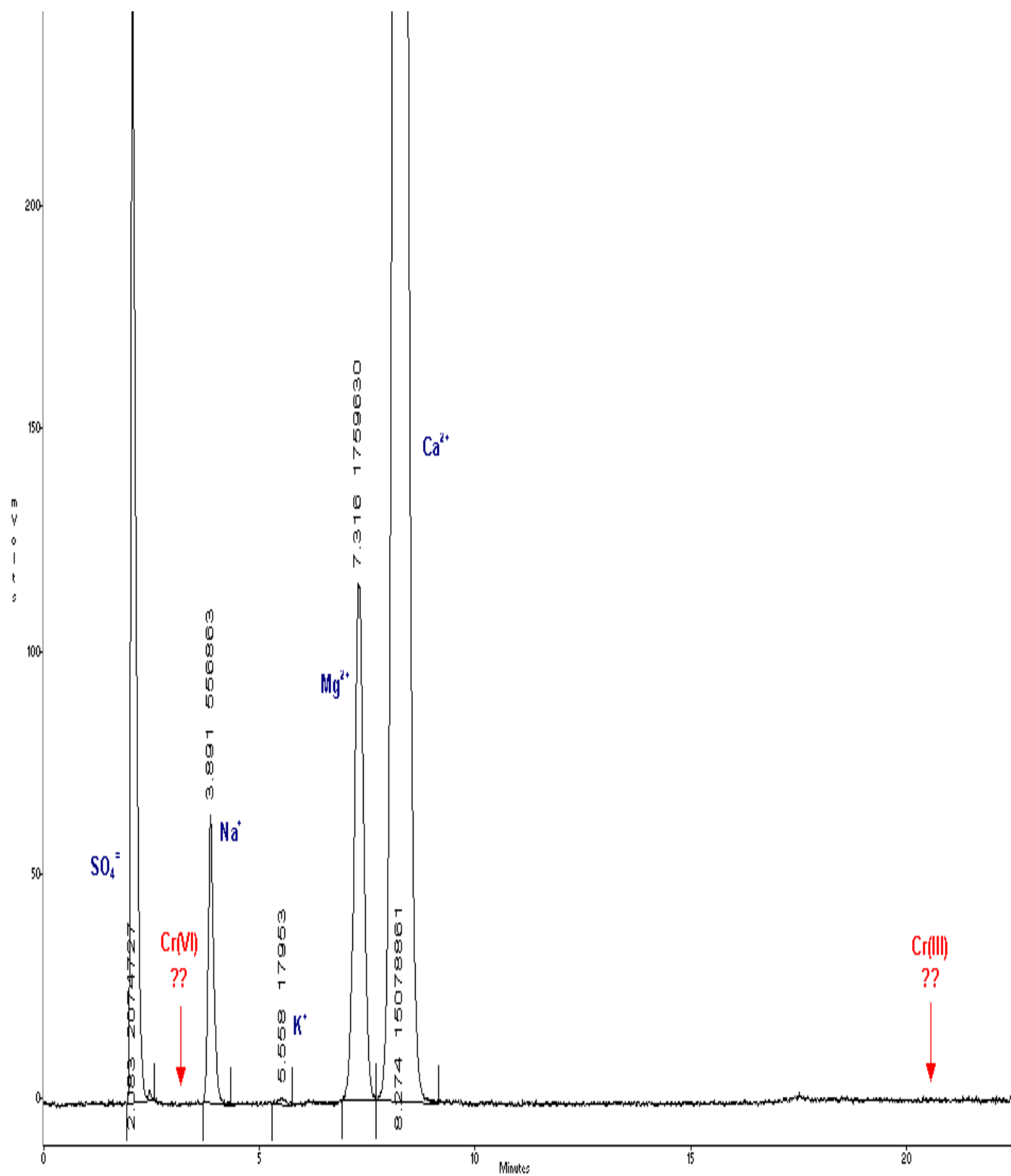
Ημέρα	Εξίσωση ευθείας	r^2 (N≥4, n≥4)	% RSD (5 –20 µg·mL ⁻¹)
1 ^η	$\log A = 4,434(\pm 0,034) + 1,629(\pm 0,029) \cdot \log C$	0,9998	0,81 – 1,9
2 ^η	$\log A = 4,34(\pm 0,11) + 1,745(\pm 0,099) \cdot \log C$	0,997	0,71 – 8,6
3 ^η	$\log A = 4,237(\pm 0,012) + 1,835(\pm 0,011) \cdot \log C$	0,99994	0,60 – 2,6
Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα			
Interday %RSD του loga		2,3	
Interday %RSD του b		5,9	
LOQ (µg·mL ⁻¹)		2,4	
LOD (µg·mL ⁻¹)		1,3	

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μέθοδος έδωσε αρκετά επαναλήψιμες μετρήσεις όσον αφορά στον προσδιορισμό των χρωμικών ιόντων, σε αντίθεση με τον προσδιορισμό του τρισθενούς χρωμίου, όπου τα αποτελέσματα ήταν περισσότερο ικανοποιητικά. Αυτό προκύπτει τόσο από τις τιμές των τυπικών αποκλίσεων των μετρήσεων, των τιμών loga και b, όσο και από τις τιμές της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγικότητας. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των χρωμικών ιόντων οφείλονται πιθανώς στο γεγονός ότι τα CrO_4^{2-} , παρουσία του TFA της κινητής φάσης, μετατρέπονται μερικώς σε $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$. Παρόλο που η τελική διάλυση στην κινητή φάση έγινε λίγο πριν την έγχυση του διαλύματος (βλ. εδάφιο 8.5.4. παρατήρηση 3), ήταν μάλλον αναπόφευκτη η έστω και μικρή συνύπαρξη των χρωμικών και των διχρωμικών ιόντων μέσα στη στήλη που προκαλεί τις μεταβολές στις μετρήσεις της απόκρισης των CrO_4^{2-} .

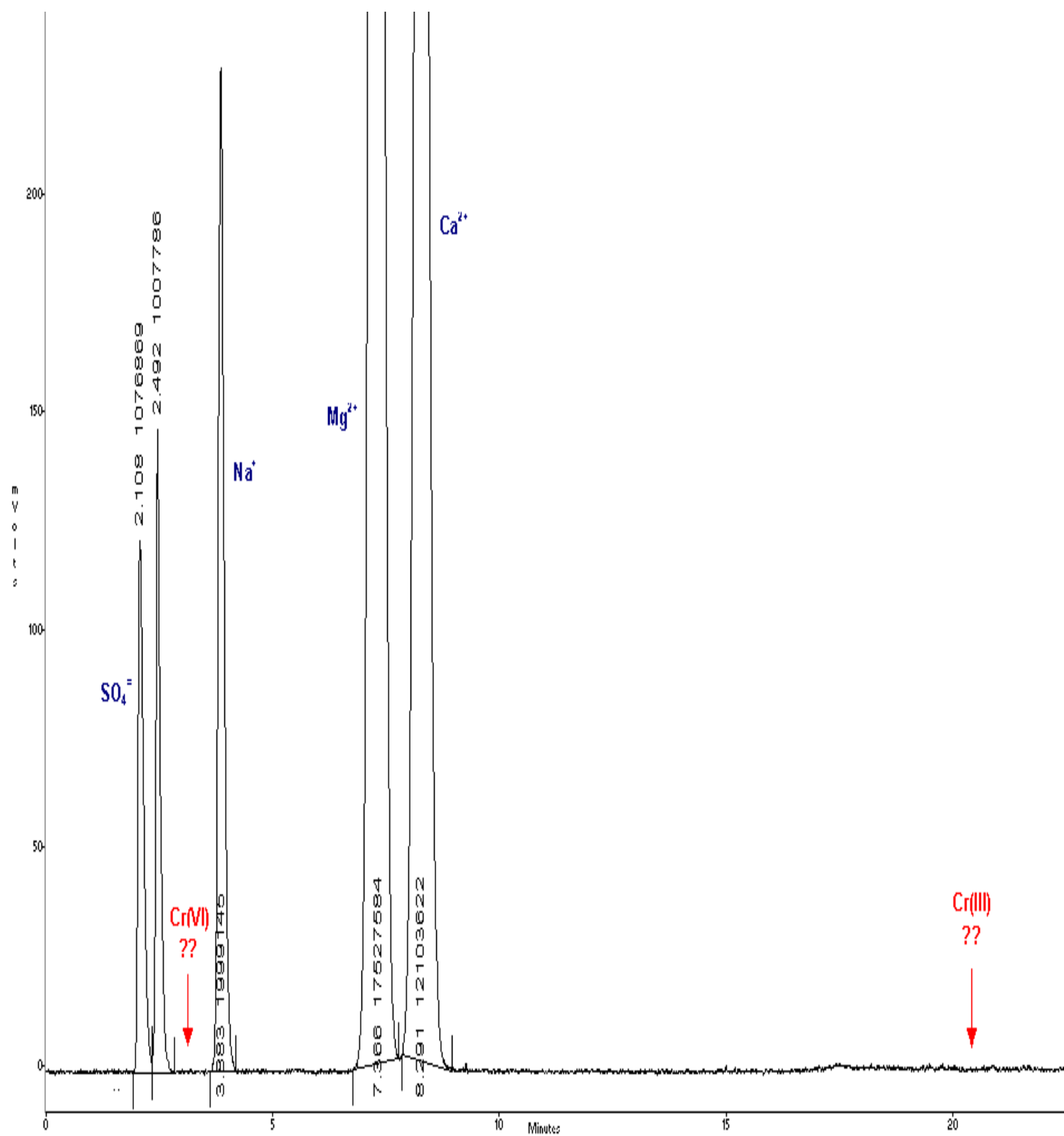
8.5.3.2. Έλεγχος περιεκτικότητας χρωμίου/χρωμικών στο πόσιμο νερό – Ανάκτηση

Τα δείγματα των νερών από τις δύο περιοχές εισήχθησαν στον HPLC-ELSD και μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις χρωμίου και χρωμικών ιόντων. Σύμφωνα με τη νομοθεσία, για να είναι το νερό κατάλληλο προς πόση, θα πρέπει οι δύο ομάδες ιόντων να απουσιάζουν.

Στα σχήματα που ακολουθούν φαίνονται τα χρωματογραφήματα από την ανάλυση των δύο δειγμάτων.



Σχήμα 8.12: Χρωματογράφημα δείγματος νερού από το δίκτυο ύδρευσης της Αθήνας οξινισμένο με TFA και αναλυμένο με στήλη CS14. Το χρώμιο και τα χρωμικά ιόντα απουσιάζουν.



Σχήμα 8.13: Χρωματογράφημα δείγματος νερού από το δίκτυο ύδρευσης της Θήβας οξινισμένο με TFA και αναλυμένο με στήλη CS14. Το χρώμιο και τα χρωμικά ιόντα απουσιάζουν.

Το pH του νερού της Αθήνας μετρήθηκε στα 7,35 ενώ της Θήβας στα 7,45. Επίσης η σύσταση των δύο δειγμάτων, δηλ. το είδος και η συγκέντρωση των αλάτων τους, ήταν διαφορετική, ωστόσο και στα δύο δείγματα φαίνεται από τις μετρήσεις ότι και το τρισθενές και το εξασθενές χρώμιο είναι μικρότερο από το LOD της μεθόδου. Η μέτρηση είχε ιδιαίτερη βαρύτητα για το δείγμα νερού από τη Θήβα που έχει κατηγορηθεί ως επικίνδυνο και ακατάλληλο καθώς προέρχεται από υπόγειες γεωτρήσεις, που έχουν πιθανώς επιμολυνθεί από την επιβαρημένη περιοχή του Ασωπού ποταμού. Μετά τα τελευταία έργα όμως (2008-2009), η Θήβα υδροδοτείται από το ίδιο δίκτυο που παρέχει νερό στην Αθήνα.

Τα αποτελέσματα της ανάκτησης της μεθόδου παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 8.17: Αποτελέσματα ανάκτησης από τον εμβολιασμό των δειγμάτων νερού της ΕΥΔΑΠ.

Χρωμικά ιόντα Cr(VI)		
C_{Cr(VI)}^{θεωρητ} (μg·mL ⁻¹)	C_{Cr(VI)}^{πειραμ} (μg·mL ⁻¹)	% ανάκτηση
15,0	14,855(±0,046)	99,03(±0,30)
20,0	20,13(±0,17)	100,67(±0,84)
Ιόντα τρισθενούς χρωμίου Cr(III)		
C_{Cr(III)}^{θεωρητ} (μg·mL ⁻¹)	C_{Cr(III)}^{πειραμ} (μg·mL ⁻¹)	% ανάκτηση
15,0	14,74(±0,22)	98,3(±1,5)
20,0	19,3(±1,1)	96,6(±5,5)

Από τα αποτελέσματα του πίνακα, με τις τιμές της ανάκτησης να κυμαίνονται σε όλες τις περιπτώσεις από 96 – 100%, προκύπτει ότι η μέθοδος προσδιορίζει με ικανοποιητική ακρίβεια τις ενώσεις και του τρισθενούς και του εξασθενούς χρωμίου,

8.5.4. Συμπεράσματα – Συζήτηση

1. Στα διαλύματά τους, τα ιόντα απαντώνται με τις εξής μορφές: τα ιόντα Cr(III) ως σύμπλοκα Cr-TFA και τα Cr(VI) ως CrO₄²⁻. Επομένως, για το διαχωρισμό χρωμίου/χρωμικών αρχικά δοκιμάστηκε η μικτή στήλη «διπλής δράσης» Hypersil DUET C₁₈/SAX της Thermo. Πρόκειται για μια στήλη που αποτελείται κατά 50% από μία υδρόφοβη στατική φάση και κατά 50% από έναν ισχυρό ανιονταλλάκτη^[243]. Σκοπός ήταν να διαχωριστούν τα χρωμικά ιόντα από το τμήμα της στήλης με τον ανιονταλλάκτη και τα κατιόντα χρωμίου μαζί με τα υπόλοιπα κατιόντα του νερού να συγκρατηθούν με τη μορφή

των ιοντικών ζευγών, από το άπολο τμήμα της στήλης. Η αποτελεσματικότητα, ωστόσο, της συγκεκριμένης στήλης αποδείχθηκε ανεπαρκής.

Επομένως, η επιλογή της στήλης CS14 στηρίχθηκε στο γεγονός ότι το ανιονικό χρωμικό ιόν, αφού αδυνατεί να συγκρατηθεί από τον κατιονανταλλάκτη στήλη, θα εκλούεται πολύ νωρίς αντίθετα με τα κατιόντα χρωμίου που εκλούνται σε μεγαλύτερο χρόνο.

2. Η μείωση της θερμοκρασίας από τους 70 °C στους 50 °C αποσκοπούσε στο να αποφευχθεί τυχόν πτητικότητα των χρωμικών ιόντων.

3. Τα ιόντα CrO_4^{2-} παρουσία TFA μετατρέπονται σταδιακά στα πολύ οξειδωτικά $\text{Cr}_2\text{O}_4^{2-}$ τα οποία αντιδρούν με τα ιόντα Cl^- . Αποτέλεσμα ήταν να παρατηρείται αύξηση της απόκρισης του χλωρίου με κορυφή που εμφανίζεται στα 2,00 min περίπου. Για να αποφευχθεί, όσο γίνεται, η εν λόγω μετατροπή, η διάλυση στην κινητή φάση γινόταν λίγο πριν την εισαγωγή των δειγμάτων στο χρωματογράφο.

4. Πολύ μεγάλη προσοχή πρέπει να δίνεται στην ποιότητα του νερού HPLC που χρησιμοποιείται για την παραγωγή όλων των διαλυμάτων και της κινητής φάσης, καθώς ένα νερό που δεν είναι επαρκώς απιονισμένο/απεσταγμένο μπορεί να προκαλέσει προβλήματα ιδιαίτερα στον προσδιορισμό του τρισθενούς χρωμίου.

5. Ο χρόνος κατακράτησης των χρωμικών ιόντων CrO_4^{2-} ήταν $t_R=3,008(\pm 0,029)$ min και ο παράγοντας ασυμμετρίας της κορυφής ήταν $A_S=1,41(\pm 0,13)$. Οι αντίστοιχες τιμές για τα ιόντα χρωμίου Cr^{3+} ήταν $t_R=21,5670(\pm 0,0072)$ min και $A_S=1,074(\pm 0,047)$.

6. Όσον αφορά στις μετρήσεις στα πραγματικά δείγματα, δεν πρέπει να αγνοηθεί το γεγονός ότι η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού του χρωμίου ήταν σημαντικά λιγότερο ευαίσθητη από τη μέθοδο αναφοράς, AAS, που φτάνει μέχρι τα $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (LOD για ολικό χρώμιο, βλ. Πίνακα 8.2). Αυτό σημαίνει ότι εάν τα ίδια δείγματα μετρούνταν με Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης, ενδεχομένως να ανιχνευόταν χρώμιο ακόμη και σε ελάχιστη συγκέντρωση. Επομένως, η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού χρωμίου/χρωμικών με HPLC-ELSD μπορεί να εφαρμοστεί είτε σε πολύ επιμολυσμένα με χρώμιο δείγματα, είτε σε δείγματα μετά από προσυγκέντρωση.

7. Παρόλο που η προτεινόμενη μέθοδος στερείται της ευαισθησίας που έχει η μέθοδος αναφοράς, το σημαντικό της πλεονέκτημα είναι ότι μπορεί να προσδιορίσει ταυτόχρονα το εξασθενές και το τρισθενές χρώμιο (speciation analysis) με μία μέτρηση (run) σε σύντομο σχετικά χρόνο (< 30 min). Εάν, μάλιστα, προηγηθεί κατάλληλη προκατεργασία των δειγμάτων, όπως η προσυγκέντρωση, τότε η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία και σε δείγματα.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Ο ανιχνευτής ELSD δίνει τη δυνατότητα να αναπτυχθούν μέθοδοι για τον προσδιορισμό κατιόντων που μέχρι τώρα προσδιορίζονταν με μεθόδους, όπως είναι η Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης ή η Ιοντική Χρωματογραφία. Αντίθετα όμως με τις δύο αυτές μεθόδους, με την HPLC-ELSD μπορεί να προσδιοριστούν ταυτόχρονα, με μία μέτρηση (run) και άλλες ενώσεις που συνυπάρχουν σε ένα δείγμα, φορτισμένες ή όχι, πολικές ή άπολες, αναλόγως βεβαίως των συνθηκών χρωματογράφησης (επιλογή στήλης, κινητής φάσης, κ.τ.λ.).
2. Στην εξίσωση ποσοτικοποίησης του ανιχνευτή φαίνεται ότι ο συντελεστής a είναι αυτός που κυρίως επηρεάζεται από το χημικό σύστημα (φύση του αναλύτη, μέγεθος σωματιδίων, σύσταση κινητής φάσης), ενώ το b επηρεάζεται από παραμέτρους που σχετίζονται με τη λειτουργία του οργάνου (θερμοκρασία θαλάμου εξάτμισης, ροή φέροντος αερίου κ.ά.).
3. Στην παρούσα εργασία φαίνεται ότι με δύο μόνο στήλες και ένα μικρό αριθμό διαλυτών, μπορούν να αναπτυχθούν μέθοδοι για ένα μεγάλο αριθμό κατιόντων από αυτά που πολύ συχνά απαντώνται σε δείγματα καθημερινής χρήσης και σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στα δείγματα αυτά, η απομόνωση των αναλυτών γίνεται με απλές και σύντομες διαδικασίες προκατεργασίας, όπως η διάλυση ή η επίδραση κάποιου οξέος.
4. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι μέθοδοι που προτείνονται δίνουν αποτελέσματα καλής επαναληψιμότητας και ικανοποιητικά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Παρόλο που για κάποια από τα εξεταζόμενα μέταλλα η ευαισθησία της HPLC-ELSD μεθόδου είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με τις μεθόδους αναφοράς, τα αποτελέσματα των μετρήσεων στα δείγματα δεν υστερούν σε αξιοπιστία. Όποτε παρατηρείται αυτός ο περιορισμός, η μέθοδος δε μπορεί να εφαρμοστεί σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις του μετάλλου, γεγονός που είναι και το μειονέκτημά της.
5. Ο ανιχνευτής ELSD μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία και για τον προσδιορισμό των διαφορετικών χημικών ενώσεων ενός μετάλλου (speciation analysis) με μία μόνο μέτρηση, όπως δείχνει η περίπτωση του προσδιορισμού Cr(VI)-Cr(III) στο πόσιμο νερό, αλλά σε υψηλή συγκέντρωση.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός όρος
Activated Alumina/Carbon	Ενεργοποιημένη/ος Αλουμίνα/Άνθρακας
Aeration	Αερισμός
Asymmetry factor	Παράγοντας Ασυμμετρίας
Atomic Mass	Ατομική Μάζα
Baseline	Γραμμή Βάσης
Blank Solution	Λευκό Διάλυμα
Cation-exchange	Κατιονανταλλαγή
Chewable tablet	Μασώμενο Δισκίο
Coagulation	Κροκίδωση
Column Chromatography	Χρωματογραφία Στήλης
Condensation Nucleation	Συμπύκνωση Πυρήνων
Counter Ion	Αντισταθμιστικό Ιόν
Detectability	Ανιχνευσιμότητα
Diabetes Melitus	Σακχαρώδης Διαβήτης
Disinfection	Απολύμανση
Elastic/Inelastic Scattering	Ελαστική/Ανελαστική Σκέδαση
Electrochemical Detector	Ηλεκτροχημικός Ανιχνευτής
Electrospray	Ηλεκτροψεκασμός
Evaporative Light Scattering Detector	Εξατμιστικός Ανιχνευτής Σκέδασης Ακτινοβολίας
Filtration	Διήθηση
Fixed Wavelength Detector	Ανιχνευτής Σταθερού Μηκούς Κύματος
Flocculation	Νιφάδωση
Flow Injection	Εισαγωγή Δείγματος σε Ροή
Fluorescence Detector	Ανιχνευτής Φθορισμού
Galvanization	Γαλβανισμός
Gas Chromatography	Αεριοχρωματογραφία
Glucose Tolerance Factor	Παράγοντας Ανοχής Γλυκόζης
High Performance Liquid Chromatography	Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
Infra-Red Detector	Ανιχνευτής Υπερύθρου

Injectable solution	Ενέσιμο Διάλυμα
Inverse Scattering Problem	Αντίστροφο Πρόβλημα Σκέδασης
Ion-pair	Ζεύγος Ιόντων
Isocratic/Gradient Elution	Ισοκρατική/Βαθμιδωτή έκλουση
Light Scattering	Σκέδαση Φωτός
Linear Least Squares Regression Analysis	Γραμμική Παλινδρόμηση Ανάλυσης Ελαχίστων Τετραγώνων
Linearity	Γραμμικότητα
Loop	Βρόχος
Mass Detector	Ανιχνευτής Μαζών
Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization	Ιοντισμός Εκρόφησης με τη βοήθεια Υλικού Μήτρας
Mobile phase	Κινητή Φάση
Nebulization	Εκνέφωση
Neutron Activation Analysis	Ανάλυση με Ενεργοποίηση Νετρονίων
Oral Suspension	Πόσιμο Εναιώρημα
Passivation	Παθητικοποίηση (μετάλλου)
Peak Area/Height/Width	Εμβαδόν/ Ύψος/Εύρος Κορυφής
Peak Purity	Καθαρότητα Κορυφής
Photo Diode-Array Detector	Ανιχνευτής Συστοιχίας Φωτοδιόδων
Placebo	Λευκό (δείγμα)
Planar Chromatography	Επίπεδη Χρωματογραφία
Pneumatic Pump	Πνευματική Αντλία
Pre/Post-column Derivatization	Παραγωγοποίηση πριν/μετά τη στήλη
Quadrupole	Τετράπολο
Quasi-general Detector	Ημι-γενικός Ανιχνευτικός
Reciprocating Pump	Παλινδρομική Αντλία
Recombinant DNA	Ανασυνδυασμένο DNA
Recovery Test	Πείραμα Ανάκτησης
Refractive Index Detector	Διαφορικός Ανιχνευτής Δείκτη Διάθλασης
Reproducibility	Αναπαραγωγιμότητα
Resolution	Διαχωριστικότητα
Response Factor	Παράγοντας Απόκρισης
Retention Time	Χρόνος έκλουσης
Scattering Centers	Κέντρα Σκέδασης

Sedimentation	Καθίζηση
Selectivity	Εκλεκτικότητα
Sensitivity	Ευαισθησία
Slope	Κλίση
Solvent Modifier	Τροποποιητής Διαλύτης
Spiked Sample	Εμβολιασμένο Δείγμα
Splitter	Βαλβίδα Διαχωρισμού
Stationary Phase	Στατική Φάση
Stock Solution	Διάλυμα Παρακαταθήκης
Suppressor	Καταστολέας
Syringe Pump	Αντλία τύπου σύριγγας
Test Solution	Διάλυμα Ελέγχου
Thermospray	Θερμοψεκασμός
Time-of-flight	Χρόνος Πτήσης
(DNA) Transcription Factor	Παράγοντας Μεταγραφής (DNA)
Ultra-Violet/Visible Detector	Ανιχνευτής Υπεριώδους/Ορατού
Validation	Επικύρωση
Variable Wavelength Detector	Ανιχνευτής Πολλαπλών Σταθερών Μηκών Κύματος

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμιο	Ανάπτυξη
AAS	Atomic Absorption Spectrometry
ACN	Acetonitrile
AES	Atomic Emission Spectrometry
ATP	Adenosine Tri-phosphoric Acid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
ET – AAS	Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry
FAAS	Flame Atomic Absorption Spectrometry
FDA	Food & Drug Administration
FIA	Flow Injection Analysis
FT	Fourier Transformation
GC	Gas Chromatography
GF-AAS	Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry
GTF	Glucose Tolerance Factor
HILIC	Hydrophilic Interaction Chromatography
HPLC και LC	High Performance Liquid Chromatography
ICP	Inductively Coupled Plasma
IR	Infra Red
IU	International Units
LOD	Limit Of Detection
LOQ	Limit Of Quantification
MS	Mass Spectrometry
NFPA	Nonafluoroacetic Acid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NTU	Nephelometric Turbidity Units
ODS	OctoDecyl Silane

PDA	Photo Diode Array
RAE	Residue After Evaporation
RID	Refractive Index Detector
RNA	Ribonucleic acid
RSD	Relative Standard Deviation
SD	Standard Deviation
SFC	Supercritical Fluid Chromatography
SPE	Solid Phase Extraction
TCU	True Color Units
TFA	Trifluoroacetic Acid
USP	United States Pharmacopoeia
UV-Vis	Ultra Violet – Visible
WHO	World Health Organization
ΕΚΠΑ	Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθήνας
ΠΟΥ	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
ΠΠ	Περιοδικός Πίνακας

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. D.A.Skoog, F.J.Holler and T.A.Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, 5^η Έκδοση, Μετάφραση: Μ.Ι.Καραγιάννης, Κ.Η.Ευσταθίου και Ν.Χανιωτάκης, Εκδόσεις Κωσταράκης, 2000, pp. 502-504, 785, 822, 844-891.
2. C.F.Poole, *The Essence of Chromatography*, Elsevier Ed, 2003, pp. 2-6.
3. Raymond P.W.Scott, *Liquid Chromatography*, Chrom-Ed Book Series, Book 3, Library4Science, 2003; www.library4science.com (τελευταία επίσκεψη 04/03/2009).
4. Ι.Ν.Παπαδογιάννης, *Διαχωριστικές Τεχνικές στην Ενόργανη Χημική Ανάλυση*, Εκδόσεις Σιμώνη-Χατζηπάντου, 1992, pp. 72, 171-198, 284-292.
5. Θ.Π.Χατζηιωάννου και Μ.Α.Κουππάρη, *Ενόργανη Ανάλυση*, Εκδόσεις Ε.Κ.Π.Α., 1991, pp. 481-487.
6. Γ.Χ.Κώνστα, *Μελέτη Επίδρασης Μοριακής Μάζας και Μοριακών Αλληλεπιδράσεων Αναλυτών στην Απόκριση Ανιχνευτή ELSD – Μελέτες και Προσδιορισμοί Συμπλόκων β-Κυκλοδεξτρίνης με HPLC-ELSD*, Διατριβή Ειδίκευσης, ΕΚΠΑ 2005.
7. <http://hplc.chem.shu.edu> (τελευταία επίσκεψη 15/01/2009).
8. www.lcresources.com/resources/getstart/ (τελευταία επίσκεψη 15/01/2009).
9. www.academysavant.com (τελευταία επίσκεψη 15/01/2009).
10. www.wikipedia.com (τελευταία επίσκεψη 22/01/2009).
11. Κ.Ευσταθίου, *Αγγλοελληνικό/Ελληνοαγγλικό Λεξικό Χημικών και Συγγενών με τη Χημεία Όρων*, Εκδόσεις ΕΚΠΑ, Αθήνα 2005, pp. 218.
12. Raymond P.W.Scott, *Liquid Chromatography Detectors*, Chrom-Ed Book Series, Book 5, Library4Science, 2003; www.library4science.com (τελευταία επίσκεψη 04/03/2009).
13. A.Tiselius and D.Claesson, *Ark.Kemi.Mineral.Geol.*, 1942, 15B (No 18).
14. Ν.Αλεξάνδρου, *Γενική Οργανική Χημεία, Δομή-Φάσματα-Μηχανισμοί*, Τεύχος Β', Εκδόσεις Ζήτη, 1996, pp.154.
15. D.L.Ford and W.J.Kennard, *J.Oil Color Chem.Assoc.*, 1966, 49, pp.299.
16. T.H.Mouery and L.E.Oppenhaimer, *Anal.Chem.*, 1984, 56, pp. 2427-2434.
17. R.M^cRae, L.C.Trugo and J.Dick, *Chromatographia*, 1982, 15(7), pp.476.
18. A.Stolyhwo, H.Colin,H. and G.Guiochon, *Anal.Chem.*, 1985, 57(7), pp.1342.
19. M.Lafosse, M.Dreux and L.Morin-Allory, *J. Chromatogr.*, 1987, 404, pp.95.
20. A.D.M^cNaught and A.Wilkinson, *IUPAC:Compendium of Chemical Terminology*, 2nd Ed., Blackwell Scien.Publications, Oxford Company, 1997; www.iupac.org/gold_book/ (τελευταία επίσκεψη 02/02/2009).
21. www.ias.ac.in/initiat/sci_ed/resources/chemistry (τελευταία επίσκεψη 05/02/2009).
22. C.F.Bohren and D.R.Huffman, *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, Wiley, 1983.
23. <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu> (τελευταία επίσκεψη 07/02/2009)
24. A.Gonis and W.H.Butler, *Multiple Scattering in Solids*, Springer, 1999
25. DoITPoMS: Teaching and Learning Packages – University of Cambridge; www.doitpoms.ac.uk (τελευταία επίσκεψη 05/02/2009).
26. R.A.Serway, *Physics*, 3rd ed, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1990.

27. P.J.Flory, *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press, Ithaca, N.Y., 1969, pp.283-289.
28. J.M.Charlesworth, *Anal.Chem.*, 1978, 50(11), pp. 1414-1420.
29. M.Kerker, *The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiations*, Academic Press, New York, 1969.
30. G.Mie, *Ann.Phys.*, Leipzig, 1908, 330, pp.377-445.
Η εργασία του Mie με τον τίτλο «Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen» βρίσκεται μεταφρασμένη στο site: <http://diogenes.iwt.uni-bremen.de/>
31. A.Stratton, *Electromagnetic Theory*, M^cGraw-Hill, New York, 1941.
32. G.R.Fowles, *Introduction to Modern Optics*, Holt, Rinehart and Winston, New York, Chapter 2, 1968.
33. K.Chadan and P.C.Sabatier, *Inverse Problems in Quantum Scattering Theory*, Springer-Verlag Publications, 1977.
34. M.Dreux, M.Lafosse and L.Morin-Allory, Reprinted from *LC-GC International*, March 1996 & June 1997 issues.
35. G.Guiochon, A.Moysan and H.Holley, *J.Liq.Chromatogr.*, 1988, 11(12), pp.2547-2570.
36. M.Righezza and G.Guiochon, *J.Liq.Chromatogr.*, 1988, 11(9-10), pp.1967-2004.
37. S.Nukiyama and Y.Tanasawa, *Trans. Soc. Mech. Eng. (Jpn)*, 1938, 4, pp.86.
38. S.Nukiyama and Y.Tanasawa, *Trans. Soc. Mech. Eng. (Jpn)*, 1940, 6, pp.117.
39. R.A.Mugele and H.D.Evans, *Ind.Eng.Chem.*, 1951, 43, pp.1317.
40. www.SofTA.corporation.com/ (τελευταία επίσκεψη 22/02/2009).
41. A.Stolyhwo, M.Martin and G.Guiochon, *J.Liq.Chromatogr.*, 1987, 10(6), pp.1237.
42. C.S.Young and J.W.Dolan, *LC-GC Europe*, April 2004 issue.
43. P.Van der Meeren, J.Vanderdeelen and L.Baert, *Anal.Chem.*, 1992, 64, pp.1058-1062.
44. Y.Mengerink, H.C.J.De Man and S.Van der Wal, *J.Chromatogr.*, 1991, 552(1-2), pp.593.
45. C.S.Young, *LC-GC, The Application Notebook-August 2002*, 2002, 22.
46. A.Canals, H.Vicente and R.F.Browner, *Spectrochim.Acta*, part B, 1990, 45B(6), pp.569.
47. R.M.Robertson, J.A.DeHaseth and R.F.Browner, *Mikrochim.Acta*, 1988, 2(1-6), pp.199.
48. P.C.Winkler, *Anal.Chem.*, 1988, 60, pp.489.
49. B.Herbreteau, *J.of High Resolut.Chromatogr.*, 1990, 13, pp.239.
50. M.Lafosse, L.Elfakir, M.Morin-Allory and J.Dreux, *J.of High Resolut.Chromatogr.*, 1992, 15, pp.312.
51. L.E.Oppenheimer and T.H.Mouery, *J.Chromatogr.*, 1985, 323(2), pp.297-304.
52. A.Stolyhwo, H.Colin, M.Martin and G.Guiochon, *J.Chromatogr.*, 1984, 288, pp.253-275.
53. M.Dreux and M.Lafosse, *Spectra 2000*, 1990, 151, pp.16.
54. F.S.Deschamps, A.Baillet and P.Chaminade, *The Analyst*, 2002, 127, pp.35-41.
55. P.B.Keady, F.R.Quant and G.J.Sem, *TSI Quarterly*, 1983, 9, pp. 3.

56. L.B.Allen and A.J.Koropchak, *Anal.Chem.*, 1993, 65, pp.841-844.
57. www.sedere.com (τελευταία επίσκεψη 05/03/2009).
58. P.H.Lambert, *Comb.Chem.High Throughput Screen*, 2001, 4(4), pp.317-32.
59. M.Buchgraber, F.Ulberth and E.Ankalm, *J.Agric.Food Chem.*, 2000, 48(8), pp.359-3363.
60. M.Dreux, E.Conrad, C.Elfakir and K.Petritis, 50th ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics, Orlando, USA, June 2-6, 2002.
61. P.Chaimbault, M.Lafosse, P.Rollin and J.Barrault; www.univ-orleans.fr/icoa/communications/ (τελευταία επίσκεψη 04/04/2009).
62. K.Petritis, I.Gillaizeau, C.Elfakir, A.Petit, N.Bongibault, W.Luijten and M.Dreux, *J.Separ.Sci.*, 2002, 25(9), pp.593-600.
63. M.B.O.Andersson and L.G.Blomberg, *J.Microcolumn Separations*, 1998, 10(3), pp.249-254.
64. J.N.IV.Alexander, *J.Microcolumn Separations*, 1998, 10(6), pp.491-502.
65. D.Guillarme, S.Rudaz, C.Schelling, M.Dreux and J.L.Veuthey, *J. Chromatogr.A*, 2008, 1192, pp.103-112.
66. B.Herbreteau, M.Lafosse, L.Morin-Allory and M.Dreux, *Chromatographia*, 1992, 33, pp.325.
67. R.McRae and J.Dick, *J. Chromatogr.*, 1981, 210, pp.138-145.
68. B.Herbreteau, V.Villette, M.Lafosse and M.Dreux, *Fresenius J.Anal.Chem.*, 1995, 351, pp.246-250.
69. Y.Wei and M.Y.Ding, *J.Liq.Chromatogr.*, 2002, 25(12), pp.1769-1778.
70. Y.Wei and M.Y.Ding, *J. Chromatogr. A*, 2002, 904, pp.113-117.
71. I.Caron, C.Elfakir, M.Dreux, *J.Liq.Chrom.& Rel.Technol.*, 1997, 20(7), pp.1015-1035.
72. V.Camel, D.Thiébaud, M.Caude and M.Dreux, *J. Chromatogr.*, 1992, 605, pp.95.
73. O.Vesterqvist, C.A.Sargent, S.C.Taylor, J.Newburger, A.A.Tymiak, G.J.Grover, and M.L.Ogletree, *Anal.Biochem.*, 1992, 204, pp.72.
74. S.L.Abidi and T.L.Mounts, *J. Chromatogr.A*, 1997, 773, pp.93-101.
75. E.J.Murphy, T.A.Rosenberger and L.A.Horrocks, *J. Chromatogr.B*, 1996, 685, pp.9-14.
76. W.W.Christie, *Lipid Technology*, 1989, 1, pp.23-25.
77. R.A.Moreau, M.J.Powell and K.B.Hicks, *J.Agric.Food Chem.*, 1996, 44, pp.2149.
78. K.Warner and T.L.Mounts, *J.A.O.C.S.*, 1990, 67(11), pp.827-831.
79. G.A.Spanos and S.J.Schwartz, *LC-GC*, 1992, 10, pp.774.
80. C.E.Kibbey, *Mol.Diversity*, 1996, 1, pp.247.
81. A.Roda, C.Cerré, P.Simoni, C.Polimeni, C.Vaccari and A.Pistillo, *J.Lipid Resol.*, 1992, 33, pp.1393.
82. J.A.Peterson and D.S.Risley, *J.Liq.Chromatogr*, 1995, 18, pp.331.
83. N.Martin, *J.Liq.Chromatogr.*, 1995, 18(6), pp.1173-1194.
84. T.C.G.Kibbey, T.P.Yavaraski and K.F.Hayes, *J.Chromatogr.A*, 1996, 752, pp.155-165.
85. S.M.Poling and R.D.Plattner, *J.Agric.Food Chem.*, 1996, 44, pp.2792.

86. P.Carraud, D.Thiebaut, M.Caude, R.Rosset, M.Lafosse and M.Dreux, *J.Chromatogr.Sci*, 1987, 25, pp.395.
87. N.C.Megoulas and M.A.Koupparis, *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 2004, 36, pp.73-79.
88. N.C.Megoulas and M.A.Koupparis, *Anal.Chim.Acta*, 2005, 547, pp.64-72.
89. T.Greibrokk, B.E.Berg, S.Hoffmann, H.R.Norli and Q.Ying, *J.Chromatogr.A*, 1990, 505, pp.2830.
90. F.Guerrero and J.L.Rocca, *Chimica Oggi*, 1995, 13, pp.110.
91. V.L.Cebolla, L.Membrado, J.Vela and A.C.Ferrando, *J.Chromatogr.Sci*, 1997, 35, pp.19.
92. J.Thompson, B.Strode, L.T.Taylor, T.A.van Beck, *J.Chromatogr.A*, 1996, 738, pp.115.
93. M.Ganzera and H.Stuppner, *Current Pharm.Anal.*, 2005, 1(2), pp.135-144.
94. P.Bhandari, N.Kumar, B.Singh and V.K.Kaul, *J.Chromatogr.A*, 2008, 1994, pp.257-261.
95. A.J.Berry, E.D.Ramsey, M.Newby and D.E.Games, *J.Chromatogr.Sci.*, 1996, 34, pp.245.
96. Γ.Μανουσάκης, *Γενική και Ανόργανη Χημεία*, Β' Έκδοση, Εκδόσεις Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη 1994, pp.416, 433.
97. Π.Π.Καραγιαννίδης, *Ειδική Ανόργανη Χημεία-Τα χημικά στοιχεία και οι ενώσεις τους*, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη 1999.
98. A.Townshed, P.J.Worsfold, S.J.Haswell, R.M^cRae, H.W.Werner and I.O.Wilson, (ed), *Encyclopedia of Analytical Science*, 1st Ed., Academic Press, NY, 1995.
99. Ν.Δ.Κλούρας, *Η ταυτότητα των χημικών στοιχείων*, Εκδόσεις Τραυλός, 1^η έκδοση 2007.
100. M.Chalmers, *New Scientist*, 2008, 199(2663), pp.28-31.
101. O.Zerbinati, F.Balduzzi and V.Dell'Oro, *J.Chromatogr.A*, 2000, 881, pp.645-650.
102. R.P.Quirk, *Macromolecules*, 1986, 19, pp.1291.
103. F.G.A.Stone, R.West, *Advances in Organometallic Chemistry*, Academic Press, 1980, pp.55.
104. Martindale, *The Complete Drug Reference*, 34th ed., Pharmaceutical Press, pp. 301-305.
105. The United States Pharmacopoeia, 29th ed., United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville, MD, USA
106. P.B.Mitchell, D.Hadzi-Pavlovic, *Bulletin of the World Health Organization*, 2000, 78(4), pp.515-517.
107. Δ.Μπόσκου, *Χημεία Τροφίμων*, Εκδόσεις Γαρταγάνης, Έκδ. Δ', Θεσσαλονίκη 2007.
108. Ι.Γ.Γεωργάτσος, *Εισαγωγή στη Βιοχημεία*, Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, Έκδ.3^η, Θεσσαλονίκη 1993.
109. L.Stryer, *Βιοχημεία*, 2^η Έκδοση, Παν.Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1995.
110. B.L.Railsback, *Some Fundamentals of Mineralogy & Geochemistry*; www.gly.uga.edu/ (τελευταία επίσκεψη 08/06/2009).

111. P.O.Wester, *Am.J.Clin.Nutr.*, 1987, 45(5), pp.1305-1312.
112. A.V.Flores, C.A.Pérez and M.A.Z.Arruda, *Talanta*, 2004, 62, pp.619-626.
113. H.Matusiewicz, *Anal.Chim.Acta*, 1982, 136, pp.215-223.
114. J.K.Grime and T.J.Vickers, *Anal.Chem.*, 1975, 47(3), pp.432-435.
115. E.Bourret, I.Moynier and L.Bardet, *Anal.Chim.Acta*, 1985, 172, pp.157-166.
116. H.Hamzaoui, A.M'nif and R.Rokbani, *Talanta*, 2006, 70, pp.847-851.
117. H.Vanhoe and C.Vandecasteele, *Anal.Chim.Acta*, 1991, 244, pp.259-267.
118. Y.Nishio and S.Nakai, *Anal.Chim.Acta*, 2002, 456(2), pp.271-281.
119. G.Galbács, Z.Galbács, O.Axner and Z.Geretovszky, *Spectrochim.Acta B*, 2005, 60, pp.299-306.
120. U.Olsher, *J.Am.Chem.Soc*, 1982, 104, pp.4006-4007.
121. K.Suzuki, H.Yamada, K.Sato, K.Watanabe, H.Hisamoto, Y.Tobe, K.Kobori, *Anal.Chem.*, 1993, 65, pp.3404-3410.
122. M.F.S.Teixeira, E.T.G.Cavalheiro, M.F.Bergamini, F.C.Moraes and N.Bocchi, *Electroanalysis*, 2004, 16(8), pp.633-639.
123. M.F.S.Teixeira, F.C.Moraes, O.Fatibello-Filho and N.Bocchi, *Anal.Chim.Acta*, 2001, 443, pp. 249-255.
124. V.K.Gupta, S.Chandra, S.Agarwal and H.Lang, *Sensors and Actuators B*, 2005, 107, pp.762-767.
125. D.A.Lee, *J.Chromatogr.*, 1967, 26, pp.342-345.
126. U.Nickus and H.Thies, *J.Chromatogr.A*, 2001, 920, pp.201-204.
127. D.H.Thomas, M.Rey, P.E.Jackson, *J.Chromatogr.A*, 2002, 956, pp.181-186.
128. R.Kadnar, *J.Chromatogr.A*, 1998, 804, pp.217-221.
129. W.Zeng, Y.Chen, H.Cui, F.Wu, Y.Zhu, J.S.Fritz, *J.Chromatogr.A*, 2006, 1118, pp.68-72.
130. European Pharmacopoeia, 6th ed., Council of Europe, Strasbourg, France
131. H.Small, T.S.Stevens and W.C.Bauman, *Anal.Chem.*, 1975, 47(11), pp.1801-1809.
132. R.Kadnar, *J.Chromatogr.A*, 1998, 804, pp.217-221.
133. K.Ohta, H.Morikawa and K.Tanaka, *J.Chromatogr.A*, 1999, 850, pp.229-238.
134. K.Ohta, H.Morikawa, K.Tanaka and P.R.Haddad, *J.Chromatogr.A*, 1998, 804, pp.171-177.
135. W.Bashir and B.Paull, *J.Chromatogr.A*, 2001, 907, pp.191-200.
136. W.Hu and H.Haraguchi, *Anal.Chim.Acta*, 1994, 29(2), pp.231-236.
137. Safni, T.Takeuchi and T.Miwa, *J.Chromatogr.B*, 2001, 735, pp.409-412.
138. B.W.Pack and D.S.Risley, *J.Chromatogr.A*, 2005, 1073, pp.269-275.
139. W.Zeng, Y.Chen, H.Cui, F.Wu, Y.Zhu and J.S.Fritz, *J.Chromatogr.A*, 2006, 1118, pp.68-72.
140. D.H.Thomas, M.Rey and P.E.Jackson, *J.Chromatogr.A*, 2002, 956, pp.181-186.
141. J.H.Kim and J.H.Lee, *J.Chromatogr.A*, 1997, 782, pp.140-146.
142. N.Gros and B.Gorenc, *J.Chromatogr.A*, 1995, 697, pp.31-43.

143. M.El Haddad, F.Mouchère, C.Elfakir and M.Dreux, *J.Sep.Sci.*, 2001, 24, pp.669-673.
144. F.Mouchère, M.El Haddad, C.Elfakir and M.Dreux, *J.Chromatogr.A*, 2001, 914, pp.167-173.
145. S.Svensson, A.C.Isacson, G.Ljungkvist, K.Torén and A.C.Olin, *J.Chromatogr.B*, 2005, 814(1), pp.173-177.
146. L.M.Thienpont, J.E.Van Nuwenborg, H.Reinauer and I.D.Stöck, *Clin.Biochem.*, 1996, 29(6), pp.501-508.
147. H.Matusiewicz, *Anal.Chim.Acta*, 1988, 207, pp.349-354.
148. P.Pohl and B.Prusisz, *Talanta*, 2007, 71, pp.715-721.
149. K.Jankowski, *Talanta*, 2001, 54(5), pp.855-862.
150. A.De Jesus, M.M.Silva and M.G.R.Vale, *Talanta*, 2008, 74(15), pp.1378-1384.
151. T.Hirokawa, H.Okamoto, Y.Gosyo, T.Tsuda and A.R.Timerbaev, *Anal.Chim.Acta*, 2007, 581, pp.83-88.
152. N.Shakulashvili, T.Faller and H.Engelhardt, *J.Chromatogr.A*, 2000, 895, pp.205-212.
153. Θ.Π.Χατζηιωάννου, *Χημική Ισορροπία & Ανόργανη Ποιοτική Ημιμικροανάλυση*, Αθήνα 2003, pp.344.
154. C.Exley, L.M.Charles, L.Barr, C.Martin, A.Polwart and P.D.Darbre, *J.Inorg. Biochem.*, 2007, 101(9), pp.1344-1346.
155. www.alzheimers.org.uk/factsheet/406 (τελευταία επίσκεψη 15/05/2009).
156. J.F.Ma, P.R.Ryan and E.Delhaize, *Trends in Plant Science*, 2001, 6(6), pp.273-278.
157. N.Petrovsky and J.C.Aguilar, *Immunol.Cell Biol.*, 2004, 82(5), pp.488-496.
158. M.Buratti, C.Valla, O.Pellegrino, F.M.Rubino and A.Colombi, *Anal.Biochem.*, 2006, 353(1), pp.63-68.
159. Y.Suzuki, S.Imai and T.Kamiki, *Analyst*, 1989, 114, pp.839-842.
160. C-II.Park and K.W.Cha, *Talanta*, 2000, 51(4), pp.769-774.
161. K.Kashimura, Y.Mizushima, E.Hoshino and S.Matsubara, *J.Chromatogr.B*, 2003, 791(1-2), pp.13-19.
162. H.Z.Lian, Y.F.Kang, A.Yasin, S.P.Bi, D.L.Shao, Y.J.Chen, L.M.Dai and L.C.Tian, *J.Chromatogr.A*, 2003, 993(1-2), pp.179-185.
163. J.Wu, C.Y.Zhou, H.Chi, M.K.Wong, H.K.Lee, H.Y.Ong and C.N.Ong, *J.Chromatogr.B*, 1995, 663, pp.247.
164. A.Godal, W.Langseth, T.Sivertsen and W.Lund, *Sci.Tot.Environm.*, 1995, 168(3), pp.249-254.
165. J.B.Vincent, *J.Nutrition*, 2000, 130, pp.715-718.
166. R.A.Anderson, *Nutr.Res.Reviews*, 2003, 16, pp.267-275.
167. Z.Krejpcio, *Polish J. of Environ. Studies*, 2001, 10(6), pp.399-404.
168. Royal Society of Chemistry, www.rsc.uk.org/ (τελευταία επίσκεψη 22/07/2009).
169. WHO:International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs, Vol. 49 <http://monographs.iarc.fr> (τελευταία επίσκεψη 22/06/2009).
170. X.F.Wang, M.L.Xing, Y.Shen, X.Zhu and L.H.Xu, *Toxicology*, 2006, 228, pp.16-23.

171. M.J.Molyneux and M.J.Davies, *Carcinogenesis*, 1995, 16, pp.875-882.
172. W.Qi, R.J.Reiter, D.X.Tan, J.J.Garcia, L.C.Manchester, M.Karbownik and J.R.Calvo, *Environ.Health Perspect.*, 2000, 108(5), pp.399-402.
173. K.Salnikow and A.Zhitkovich, *Chem. Res. Toxicol.*, 2008, 21, pp.28-44.
174. M.Reynolds, L.Stoddard, I.Bespalov and A.Zhitkovich, *Nucleic Acids Res*, 2006, 14:17169990.
175. <http://eur-lex.europa.eu> (τελευταία επίσκεψη 15/05/2009).
176. Guidelines for Drinking-Water Quality, Geneva 2008, vol.1 <http://www.who.int/topics> (τελευταία επίσκεψη 15/05/2009).
177. R.Rubio, G.Sahuquillo, G.Rauret, L.Garcia Beltran and P.Quevauviller, *Anal.Chim. Acta*, 1993, 283, pp.207.
178. D.Y.Sarica, A.R.Türker and E.Erol, *J.Sep.Sci.*, 2006, 29, pp.1600-1606.
179. A.S.Stasinakis, N.S.Thomaidis and T.D.Lekkas, *Anal.Chim.Acta*, 2003, 478, pp.119-127.
180. C.Camara, R.Cornelis and P.Quevauviller, *Trends Anal.Chem.*, 2000, 19, pp.189-194.
181. M.Bittner and J.A.C.Broekaert, *Anal.Chim.Acta*, 1998, 364, pp.31-40.
182. F.A.Byrde, L.K.Olson, N.P.Vela and J.A.Caruso, *J.Chromatogr.A*, 1995, 712, pp.311.
183. H.Hagendorfer and W.Goessler, *Talanta*, 2008, 76, pp.656-661.
184. M.Pantsar-Kallio and P.K.G.Manninen, *Anal.Chim.Acta*, 1996, 318, pp.335.
185. Z.L.Chen, M.Megharaj and R.Naidu, *Talanta*, 2007, 72, pp.394-400.
186. Y.Inoue, T.Sakai and H.Kumagai, *J.Chromatogr.A*, 1995, 706, pp.127-136.
187. H.Gürleyük and D.Wallschläger, *J.Anal.At.Spectrom.*, 2001, 16, pp.926-930.
188. E.Pobozy, E.Wojasinska and M.Trojanowicz, *J.Chromatogr.*, 1996, 736, pp.141.
189. A.P.Vonderheide, J.Meija, K.Tepperman, A.Puga, A.R.Pinhas, J.C.States and J.A.Caruso, *J.Chromatogr.A*, 2004, 1024, pp.129-137.
190. J.Threeprom, R.Meelapsom, W.Som-aum and J-M.Lin., *Talanta*, 2007, 71, pp.103-108.
191. A.M.Bond and G.G.Wallace, *Anal.Chim.Acta*, 1984, 164, pp.233.
192. A.M.Bond and G.G.Wallace, *Anal.Chem.*, 1982, 54, pp.1706.
193. J.Posta, A.Gaspar, R.Toth and L.Ombodi, *Microchem.J.*, 1996, 54, pp.195.
194. <http://www.zincworld.org/recycling.html> International Zinc Association (τελευταία επίσκεψη 07/07/2009).
195. M.R.Broadley, P.J.White, J.P.Hammond, I.Zelko and A.Lux, *New Phytologist*, 2007, 173, pp.677.
196. N.N.Greenwood and A.Earnshaw, *Chemistry of the Elements*, 2nd Ed., Butterworth-Heinemann, Oxford, 1997, pp.1225.
197. F.A.Cotton, G.Wilkinson, C.A.Murillo and M.Bochmann, *Advanced Inorganic Chemistry*, 6th Ed., John Wiley & Sons, Inc., NY, 1999, pp.627.
198. X.Chang, A.M.Jorgensen, P.Bardrum and J.J.Led, *Biochemistry*, 1997, 36, pp.9409-9422.
199. K.M.Hambidge and N.F.Krebs, *J.Nutr.*, 2007, 137, pp.1101; <http://jn.nutrition.org/>

200. A.S.Prasad, *British Medical Journal*, 2003, 326, pp.409.
201. World Health Organization «Implementing the new Recommendations on the Clinical Management of Diarrhoea: Guidelines for Policy Makers and Program Managers 2006» <http://www.who.int/> (τελευταία επίσκεψη 05/08/2009).
202. L.Rink and P.Gabriel, *Proc. Nutr. Soc.*, 2000, 59(4), pp.541-52.
203. D.G.Barceloux and D.Barceloux, *Clin Toxicol.* 1999, 37, pp.279.
204. D.R.Bennett, C.J.Baird, K-M.Chan, P.F.Crookes, C.G.Bremner, M.M.Gottlieb and W.Y.Naritoku, *Am.J.Forensic Med.Pathol.*, 1997, 18, pp.148.
205. O-W.Lau and O-M.Cheng, *Anal.Chim.Acta*, 1998, 376(2), pp.197-207.
206. L.L.Lewin, P.Sanz Pedrero and M.R.Vilariño, *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 1986, 4(1), pp.23-29.
207. I.López-García, P.Viñas, C.Blanco and M.Hernández-Córdoba, *Talanta*, 1999, 49(3), pp.597-602.
208. H.S.Ferreira, W.N.L.Dos Santos, R.P.Fiuza, J.A.Nóbrega and S.L.C.Ferreira, *Microchem.J.*, 2007, 87, pp.128-131.
209. M.Burguera-Pascu, A.Rodríguez-Archilla, J.L.Burguera, M.Burguera, C.Rondón and P.Carrero, *Anal.Chim.Acta*, 2007, 600(1-2), pp.214-220.
210. O.C.Manouri, N.D.Papadimas, S.E.Salta, G.C.Ragos, M.A.Demertzis and P.B.Issopoulos, *Il Farmaco*, 1998, 53, pp.563-569.
211. H.Vanhoe, C.Vandecasteele, J.Versieck and R.Dams, *Anal.Chem.*, 1989, 61(17), pp.1851-1857.
212. O.Mestek, J.Komínková, R.Koplík and M.Suchánek, *Talanta*, 2001, 54(5), pp.927-934.
213. A.A.Menegário, A.P.Packer and M.F.Giné, *Analyst*, 2001, 126, pp.1363-1366.
214. M.Watanabe, M.Asatsuma, A.Ikui, M.Ikeda, Y.Yamada, S.Nomura and A.Igarashi, *Chem.Senses*, 2005, 30(2), pp.121-125.
215. A.S.Amin and Y.M.Issa, *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 2003, 31(3), pp.491-497.
216. S.Rastegarzadeh and V.Rezaei, *Sensors & Actuators B*, 2008, 129(1), pp.327-331.
217. P.C.A.Jerónimo, A.N.Araújo, M.Conceição and B.S.M.Montenegro, *Sensors & Actuators B*, 2004, 103, pp.169-177.
218. E.Santoyo, S.Santoyo-Gutiérrez and S.P.Verma, *J.Chromatogr.A*, 2000, 884, pp.229-241.
219. K.Ohta and K.Tanaka, *J.Chromatogr.A*, 1998, 804, pp.87-93.
220. P.Bruno, M.Caselli, G.De Gennaro, P.Ielpo and A.Traini, *J.Chromatogr.A*, 2000, 888, pp.145-150.
221. W.Zeng, Y.Chen, H.Cui, F.Wu, Y.Zhu and J.S.Fritz, *J.Chromatogr.A*, 2006, 1118, pp.68-72.
222. X.Diing, S.Mou, K.Liu, A.Siriraks and J.M.Riviello, *Anal.Chim.Acta.*, 2000, 407, pp.319-326.
223. H.Lu, S.Mou and J.M.Riviello, *J.Chromatogr.A*, 1999, 857, pp.343-349.
224. C.N.Ong, H.Y.Ong and L.H.Chua, *Anal.Biochem.*, 1988, 173(1), pp.64-69.

225. P.Gunkel, B.Fabre, G.Prado and J.Y.Baliteau, *Analysis*, 1999, 27, pp.823-828.
226. F.Y.Iskander, D.E.Klein and T.L.Bauer, *J.Rad.Nucl.Chem.*, 1986, 97, pp.353-357.
227. S.Mukhtar, S.J.Haswell, A.T.Ellis and D.T.Hawke, *Analyst*, 1991, 116, pp.333.
228. www.dionex.com (τελευταία επίσκεψη 12/07/2009).
229. SEDEX Model 75, Evaporative Light Scattering Detector, Operator's Mannual,2001.
230. Γ.Μανουσάκης, *Γενική και Ανόργανη Χημεία*, Β' Έκδοση, Εκδόσεις Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη 1994, pp.418 (πίνακας 35.2), pp.433 (πίνακας 36.1).
231. www.stress.gr/disorders (τελευταία επίσκεψη 14/12/2006).
232. C.H.Stober, Analytical profiles of drug substances, Vol.15, Edition Academic Press, 1986, pp.367-391.
233. The Physics Factbook – Density of blood; www.wikipedia.com (τελευταία επίσκεψη 01/08/2009).
234. Oxford English Dictionary; www.oed.com (τελευταία επίσκεψη 05/11/2009)
235. The Merck Index, 11th Ed., pp.352.
236. W.D.Kaehny, *New Engl.J.Med.*, 1997, 296, pp.1389.
237. www.chem.uoa.gr/ : Η χημική ένωση του μήνα: Ινσουλίνη (τελευταία επίσκεψη 09/09/2009).
238. www.wikipedia.com : Insulin (τελευταία επίσκεψη 05/09/2009).
239. N.Gustin, American Association for the Advancement of Science, 2005; http://www.eurekalert.org/pub_releases/ (τελευταία επίσκεψη 09/09/2009).
240. E.Steen, B.M.Terry, E.J.Rivera, J.L.Cannon, T.R.Neely, R.Tavares, X.J.Xu, J.R.Wands and S.M.De la Monte, *J. Alzheimers Dis.*, 2005, 7(1), pp.63–80.
241. Εθνικό Συνταγολόγιο, Κεφάλαιο 6^ο, Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων
242. Θεωρία: ΕΑ, κεφ.11 – Άσκηση: ΕΑΠΑΧ, εδάφιο 27.3
243. www.thermo.com/ (τελευταία επίσκεψη 12/12/2009)