



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ
ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
Γ' ΚΟΙΝΟΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΣΤΗΡΙΞΗΣ**



Συγχρηματοδότηση Ευρωπαϊκή
Επιτροπή, Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο, Δ/ση V
& Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής
Ανάπτυξης, Δ/ση XVI



**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

**ΣΠΥΡΟΠΟΥΛΟΣ Ν. ΣΤΑΥΡΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ ΕΚΠΑ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ
ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΟΛΙΚΗΣ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ ΣΕ
ΚΟΣΜΗΤΙΚΗ ΚΡΕΜΑ ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑ GC-FID**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2014

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ανάπτυξη, Βελτιστοποίηση και Επικύρωση Αναλυτικών Μεθόδων για τον Προσδιορισμό Ολικής Παραφίνης σε Κοσμητική Κρέμα με Σύστημα GC-FID

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ
Σπυρόπουλος Σταύρος

A.M.: 101309

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κουππάρης Μιχαήλ, Καθηγητής ΕΚΠΑ (Επιβλέπων)

Θωμαΐδης Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Οικονόμου Αναστάσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 27-02-2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΟΛΙΚΗΣ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ ΣΕ ΚΟΣΜΗΤΙΚΗ ΚΡΕΜΑ ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑ GC-FID

**Σπυρόπουλος Σταύρος
Χημικός**

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη, η βελτιστοποίηση και η επικύρωση μίας αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό της ολικής παραφίνης, υγρής και στερεής, σε κοσμητική κρέμα.

Χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριοχρωματογραφίας με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (GC-FID), τριχοειδή στήλη MEGA-5HT της εταιρίας MEGA, εσωτερικής διαμέτρου 0,25mm και μήκους 30m, με μέγιστη θερμοκρασίας αντοχής τους 350 °C, ενώ η κινητή φάση ήταν το αδρανές αέριο He. Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ήταν 3 mL/min, ο όγκος έγχυσης της ένεσης ήταν 0,5 µL και η θερμοκρασία του εισαγωγέα ήταν 320 °C.

Μετά από πολλές προσπάθειες δεν ήταν εφικτό να αναπτυχθεί μία αναλυτική μέθοδος για τον προσδιορισμό και της υγρής και της στερεής παραφίνης μαζί και έτσι αναπτύχθηκαν δύο ανεξάρτητες αναλυτικές μέθοδοι για κάθε ένα τύπο παραφίνης. Για την βελτιστοποίηση των συνθηκών και των δύο μεθόδων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διαδοχικής μεταβολής ενός παράγοντα. Εφαρμόστηκαν βαθμιδωτά θερμοκρασιακά προγράμματα και στις δύο μεθόδους λόγω του πλήθους και της πολυπλοκότητας των υπό προσδιορισμό ενώσεων, ενώ για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το άθροισμα των εμβαδών όλων των κορυφών για τη στερεή παραφίνη και το μέγιστο ύψος της καμπύλης για την υγρή παραφίνη.

Για την επικύρωση των δύο αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού της ολικής παραφίνης πραγματοποιήθηκαν πειράματα:

- Ειδικότητας μεθόδου, όπου οι κορυφές οι οποίες εμφανίζονταν στο placebo δεν παρεμπόδιζαν τις κορυφές των υπό προσδιορισμό ενώσεων στη μέθοδο για την στερεή παραφίνη, ενώ και το μέγιστο ύψος της καμπύλης δεν επηρεαζόταν για τη μέθοδο της υγρής παραφίνης.
- Γραμμικότητας μεθόδου, όπου ο συντελεστής συσχέτισης της καμπύλης βαθμονόμησης ήταν μεγαλύτερος από 0,99 και για τις δύο αναλυτικές μεθόδους.
- Πιστότητας μεθόδου, όπου η σχετική τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων για τις δύο αναλυτικές μεθόδους ήταν εντός του ανώτατου ορίου του 5,0 %.
- Ανθεκτικότητας μεθόδου, όπου μικρές μεταβολές σε πειραματικές συνθήκες όπως στο ρυθμό μεταβολής του θερμοκρασιακού προγράμματος, τη ταχύτητα ροής της κινητής φάσης και η αρχική θερμοκρασία στήλης δεν επηρεάζουν σημαντικά το αποτέλεσμα.
- Ορίου ανίχνευσης-ποσοτικοποίησης: όπου για την μέθοδο της στερεής παραφίνης βρέθηκαν 50 ppm και 150 ppm, αντίστοιχα, ενώ για τη μέθοδο της υγρής παραφίνης βρέθηκαν 83 ppm και 250 ppm αντίστοιχα.

Για το πρωτόκολλο ρουτίνας, για τη μέθοδο στερεής παραφίνης το δείγμα κατεργάζεται με έξάνιο και χρησιμοποιείται η μέθοδος ποσοτικοποίησης ενός προτύπου στη συγκέντρωση εργασίας του δείγματος. Για τη μέθοδο υγρής παραφίνης γίνεται κατεργασία του δείγματος με αλκοόλη και χρησιμοποιείται η μέθοδος ποσοτικοποίησης δύο προτύπων (καμπύλη αναφοράς ρουτίνας).

ABSTRACT

DEVELOPMENT, OPTIMIZATION AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS FOR THE DETERMINATION OF TOTAL PARAFFIN IN COSMETIC CREAM WITH GC-FID

**Spyropoulos Stavros
Chemist**

The purpose of this investigation is the development, the optimization and the validation of an analytical method for the determination of the total paraffin liquid and solid in cosmetic cream samples.

The system used was a gas chromatograph with a flame ionization detector (GC-FID) capillary column MEGA-5HT of MEGA Corporations with internal diameter 0.25 mm, length 30 m and maximum temperature in 350 °C, while the mobile phase was composed of gas Helium. The typical flow of the mobile phase was 3 mL/min, the injected volume was 0.5 μ L and the temperature of injector was 320° C.

Finally it was not possible to establish an analytical method for the determination of the liquid an solid paraffin at the same time. Therefore two independent analytical methods for each species were established. For the conditions optimization in both methods, the single factor, at a time, sequential optimization method was used. Scalar temperature programs in both methods were taken place, due to the large amount an the complexity of the compound about to be determined, while for the quantization of the results for the solid paraffin the sum of the area of all peaks was calculated and as for the liquid paraffin the maximum height of the curve was used.

For the validation of the two analytical methods took place the following experiments:

- Specificity of the method, in which the pics obtained from the placebo did not interfere with the pics of the compound about to be determined in the solid paraffin. While the maximum height of the signal had not been affected in the liquid paraffin.
- Linearity of the method, in which the correlation calibration coefficient was higher than 0.99 in both methods.
- Precision of the method in which the relative standard deviation of the results in both analytical methods was within the upper limit of 0.5%.
- Robustness of the method, in which small variation in experimental conditions such as variation rate of the temperature program, in typical flow of the liquid phase and the initial column temperature did not substantially affect the final result.
- Limit of detection- quantization, in which for the solid paraffin 50ppm and 150ppm were found respectively. While in the liquid paraffin 83ppm and 250ppm were obtained respectively.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1° ΠΑΡΑΦΙΝΕΣ.....	2
1.1 Εισαγωγή.....	2
1.2 Τα αλκάνια και οι ιδιότητες τους.....	2
1.2.1 Τύποι αλκανίων.....	2
1.2.2 Προέλευση	3
1.2.3 Φυσικές ιδιότητες.....	4
1.3 Είδη παραφινών	5
1.3.1 Στερεή παραφίνη.....	5
1.3.2 Υγρή παραφίνη.....	7
1.4 Παρασκευή και αξιοποίηση παραφινών.....	8
1.4.1 Ιστορική αναδρομή.....	8
1.4.2 Βιομηχανικές διεργασίες παραφινών.....	10
1.4.3 Εφαρμογές στη φαρμακευτική.....	12
1.5 Έλεγχοι παραφινών στην πρώτη ύλη.....	12
1.5.1 Έλεγχοι υγρής παραφίνης.....	13
1.5.2 Έλεγχοι στερεής παραφίνης.....	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2° ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ	
ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ.....	15
2.1 Εισαγωγή.....	15
2.2 Βελτιστοποίηση αναλυτικών μεθόδων.....	16
2.2.1 Μέθοδοι βελτιστοποίησης.....	16
2.3 Στοιχεία επικύρωσης.....	19
2.3.1 Εκλεκτικότητα.....	20
2.3.2 Ακρίβεια και ανάκτηση.....	21

2.3.3 Πιστότητα, επαναληψιμότητα και ενδιάμεση πιστότητα.....	22
2.3.4 Εύρος.....	22
2.3.5 Όριο ανίχνευσης (LOD).....	23
2.3.6 Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ).....	23
2.3.7 Γραμμικότητα	24
2.3.8 Ανθεκτικότητα.....	24
2.3.9 Αντοχή.....	25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3° ΠΕΡΙ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ.....26

3.1 Εισαγωγή.....	26
3.2 Οργανολογία.....	27
3.2.1 Σύριγγες.....	28
3.2.2 Συστήματα έγχυσης.....	28
3.2.3 Κλίβανος.....	32
3.2.4 Στήλες.....	32
3.2.5 Ανιχνευτές.....	36
3.3 Παράμετροι απόδοσης αεριοχρωματογραφίας.....	38
3.4 Παραγωγοποίηση στην αεριοχρωματογραφία.....	40
3.5 Ποσοτικοποίηση στην αεριοχρωματογραφία.....	41
3.5.1 Μέθοδος εσωτερικής κανονικοποίησης.....	41
3.5.2 Μέθοδος εσωτερικού προτύπου.....	42

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4° ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ..... 45

4.1 Σύστημα GC.....	45
4.2 Φίλτρα διήθησης.....	46
4.3 Αναλυτικός ζυγός.....	46
4.4 Διαλύτες – Αντιδραστήρια.....	47
4.5 Πρότυπες ουσίες.....	47
4.6 Έκδοχα.....	48

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5° ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ.....49

5.1 Εισαγωγή.....	49
5.2 Ανάπτυξη μεθόδου.....	49
5.3 Βελτιστοποίηση μεθόδου.....	51
5.3.1 Τεχνική βελτιστοποίησης.....	51
5.3.2 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα.....	51
5.3.3 Επιλογή διαλυτών.....	55
5.4 Συμπεράσματα.....	58

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6° ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

ΣΤΕΡΕΗΣ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ ΣΕ ΚΟΣΜΗΤΙΚΗ ΚΡΕΜΑ.....65

6.1 Χρωματογραφικές συνθήκες.....	65
6.2 Ειδικότητα Μεθόδου.....	66
6.3 Γραμμικότητα Μεθόδου.....	67
6.4 Πιστότητα Μεθόδου.....	69
6.4.1 Επαναληψιμότητα Συστήματος.....	69
6.4.2 Επαναληψιμότητα Μεθόδου.....	70
6.5 Ακρίβεια Μεθόδου.....	71
6.6 Ανθεκτικότητα Μεθόδου.....	72
6.6 Όριο Ανίχνευσης (LOD) – Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ).....	74
6.7 Πρωτόκολλο ανάλυσης ρουτίνας.....	75

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7° ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

ΥΓΡΗΣ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ ΣΕ ΚΟΣΜΗΤΙΚΗ ΚΡΕΜΑ.....76

7.1 Χρωματογραφικές συνθήκες.....	76
7.2 Ειδικότητα Μεθόδου.....	77
7.3 Γραμμικότητα Μεθόδου.....	78
7.4 Πιστότητα Μεθόδου.....	80
7.4.1 Επαναληψιμότητα Συστήματος.....	80
7.4.2 Επαναληψιμότητα Μεθόδου.....	81
7.5 Ακρίβεια Μεθόδου.....	82
7.6 Ανθεκτικότητα Μεθόδου.....	83
7.7 Όριο Ανίχνευσης (LOD) – Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ).....	84

7.8 Πρωτόκολλο ανάλυσης ρουτίνας.....	85
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	88
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	89

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1. Σημεία τήξης(κάτω γραμμή) και σημεία ζέσεως(πάνω γραμμή) των κανονικών αλκανίων μέχρι τα 14 άτομα άνθρακα σε °C	4
Σχήμα 2.1. Επιφάνεια απόκρισης συστήματος 2 παραμέτρων.....	17
Σχήμα 3.1. Σιλιανοποίηση των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης	34
Σχήμα 5.1. Αεροχρωματογραφική ανάλυση στερεής και υγρής παραφίνης....	49
Σχήμα 5.2. Αεροχρωματογράφημα μείγματος στερεής και υγρής παραφίνης.	50
Σχήμα 5.3. Αεροχρωματογράφημα παραφινών με το πρόγραμμα Β.....	52
Σχήμα 5.4. Αεροχρωματογράφημα παραφινών με το πρόγραμμα Γ.....	53
Σχήμα 5.5. Αεροχρωματογράφημα παραφινών με το πρόγραμμα Δ.....	53
Σχήμα 5.6. Αεροχρωματογράφημα παραφινών με το πρόγραμμα Ε.....	54
Σχήμα 5.7. Αεροχρωματογράφημα παραφινών με χρήση διαλύτη οξικό οξύ..	56
Σχήμα 5.8. Αεροχρωματογράφημα παραφινών με χρήση διαλύτη ακετόνη...	56
Σχήμα 5.9. Αεροχρωματογράφημα παραφινών με χρήση διαλύτη αιθανόλη..	57
Σχήμα 5.10. Αεροχρωματογράφημα παραφινών με χρήση διαλύτη μεθανόλη.	57
Σχήμα 5.11. Αεροχρωματογράφημα παραφινών με χρήση διαλύτη εξάνιο και το τελικό πρόγραμμα θερμοκρασιών.....	58
Σχήμα 5.12. Αεροχρωματογράφημα πρότυπης στερεής παραφίνης Lot Α.....	59
Σχήμα 5.13. Αεροχρωματογράφημα πρότυπης στερεής παραφίνης Lot Β.....	60
Σχήμα 5.14. Αεροχρωματογράφημα πρότυπης υγρής παραφίνης και ποσοτικοποίηση με βάση το άθροισμα των εμβαδών των κορυφών.....	61
Σχήμα 5.15. Αεροχρωματογράφημα πρότυπης υγρής παραφίνης και ποσοτικοποίηση με βάση το εμβαδόν της μεγάλης κορυφής (Α.Υ.Υ.).....	61
Σχήμα 5.16. Αεροχρωματογράφημα πρότυπης υγρής παραφίνης και ποσοτικοποίηση με βάση το μέγιστο ύψος.....	62
Σχήμα 5.17. Αεροχρωματογράφημα υγρής παραφίνης (500 ppm) και στερεής παραφίνης (8000 ppm) σε αιθανόλη που αποδεικνύει την παρεμπόδιση.....	63

Σχήμα 5.18. Αεροχρωματογράφημα υγρής παραφίνης σε αλκοόλη (0 – 2500 ppm).....	63
Σχήμα 6.1. Αεροχρωματογράφημα placebo και πρότυπου διαλύματος στερεής παραφίνης (1000 ppm) σε εξάνιο.....	66
Σχήμα 6.2. Διάγραμμα και εξίσωση καμπύλης αναφοράς μεθόδου προσδιορισμού στερεής παραφίνης.....	68
Σχήμα 6.3. Διάγραμμα και εξίσωση καμπύλης αναφοράς από πρότυπα διαλύματα στερεής παραφίνης προσαρμοσμένα στη μήτρα.....	69
Σχήμα 6.4. Αέριοχρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος στερεής παραφίνης συγκέντρωσης ίσης με το LOQ της μεθόδου.....	75
Σχήμα 7.1. Αέριοχρωματογράφημα λευκού, placebo και εμβολιασμένου διαλύματος 250 ppm υγρής παραφίνης.....	77
Σχήμα 7.2. Διάγραμμα και εξίσωση παλινδρόμησης καμπύλης αναφοράς υγρής παραφίνης από πρότυπα διαλύματα.....	79
Σχήμα 7.3. Διάγραμμα και εξίσωση παλινδρόμησης καμπύλης αναφοράς υγρής παραφίνης από εμβολιασμένα πρότυπα διαλύματα σε placebo.....	80

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 Η πιο κοινή μορφή της στερεής παραφίνης.....	6
Εικόνα 1.2 Υγρή παραφίνη.....	7
Εικόνα 3.1 Σύστημα αέριοχρωματογραφίας.....	27
Εικόνα 3.2 Έγχυση στην κεφαλή μίας πληρωμένης στήλης.....	29
Εικόνα 3.3 Ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας.....	36
Εικόνα 3.4 Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων.....	37
Εικόνα 3.5 Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας.....	37
Εικόνα 3.6 Ανιχνευτής αζώτου φωσφόρου.....	38
Εικόνα 3.7 Ανιχνευτής υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier.....	38

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 5.1. Πολικότητα αλκανίων – κυκλοαλκανίων.....	55
Πίνακας 5.2. Αντιστοιχία 20 των κορυφών από τα 2 lot της στερεής παραφίνης.....	60
Πίνακας 5.3. Αναλογικότητα τρόπων ποσοτικοποίησης για υγρή παραφίνη...	62
Πίνακας 6.1. Αποτελέσματα γραμμικότητας μεθόδου προσδιορισμού στερεής παραφίνης.....	67
Πίνακας 6.2. Αποτελέσματα επαναληψιμότητα συστήματος προσδιορισμού στερεής παραφίνης.....	70
Πίνακας 6.3. Αποτελέσματα επαναληψιμότητας μεθόδου προσδιορισμού στερεής παραφίνης σε πρότυπο διάλυμα και σε εμβολιασμένο διάλυμα placebo.....	70
Πίνακας 6.4. Αποτελέσματα ακρίβειας μεθόδου προσδιορισμού στερεής παραφίνης.....	72
Πίνακας 6.5. Αποτελέσματα ανθεκτικότητας προσδιορισμού στερεής παραφίνης.....	73
Πίνακας 6.6. Αποτελέσματα LOD – LOQ οργάνου και μεθόδου προσδιορισμού στερεής παραφίνης.....	74
Πίνακας 7.1 Αποτελέσματα γραμμικότητας μεθόδου προσδιορισμού υγρής παραφίνης.....	78
Πίνακας 7.2. Αποτελέσματα επαναληψιμότητα συστήματος προσδιορισμού υγρής παραφίνης.....	81
Πίνακας 7.3. Αποτελέσματα επαναληψιμότητας μεθόδου προσδιορισμού υγρής παραφίνης.....	82
Πίνακας 7.4. Αποτελέσματα ακρίβειας μεθόδου προσδιορισμού υγρής παραφίνης.....	83
Πίνακας 7.5 Αποτελέσματα ανθεκτικότητας μεθόδου προσδιορισμού υγρής παραφίνης.....	84
Πίνακας 7.6. Αποτελέσματα LOD – LOQ οργάνου και μεθόδου προσδιορισμού υγρής παραφίνης.....	85

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος “Χημική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας”. Η ανάθεση του θέματος έγινε από τον Καθηγητή κ. Κουμπάρη Μιχαήλ.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον κ. Κουμπάρη και το μεταδιδάκτορα, κ. Μέγκουλα Νικόλαο για τις σημαντικές συμβουλές και την πολύτιμη βοήθειά τους κατά την επίβλεψη αυτής της εργασίας

Επίσης, ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για την διόρθωση του κειμένου και τις χρήσιμες επισημάνσεις τους .

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη ηθική και υλική υποστήριξη που μου παρείχε.

Σπυρόπουλος Ν. Σταύρος
Αθήνα, Νοέμβριος 2013

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1°

ΠΑΡΑΦΙΝΕΣ

1.1 Εισαγωγή

Παλαιότερα, πριν την καθιέρωση της ονοματολογίας της Γενεύης, με τον όρο παραφίνες ονομάστηκαν τα αλκάνια και οι άλλοι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες. Αυτή η ονομασία δόθηκε από τις λατινικές λέξεις «ragum» και «affinas», οι οποίες σημαίνουν «ολίγον» και «συγγένεια» αντίστοιχα και αυτό λόγω της χαρακτηριστικής τους χημικής σταθερότητας και αδράνειας που παρουσιάζουν έναντι των περισσοτέρων αντιδραστηρίων.

Όλες οι ενώσεις οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των παραφινών ακολουθούν τον γενικό μοριακό τύπο των αλκανίων που είναι C_nH_{2n+2} .

1.2 Τα αλκάνια και οι ιδιότητες τους

1.2.1 Τύποι αλκανίων

Τα αλκάνια αποκαλούνται συχνά και κορεσμένοι υδρογονάνθρακες, γιατί περιέχουν μόνον άτομα άνθρακα και υδρογόνου και κορεσμένοι γιατί περιέχουν μόνο απλούς δεσμούς C-C και C-H και έτσι φέρουν το μέγιστο δυνατό αριθμό υδρογόνων ανά άνθρακα (C_nH_{2n+2}). Τα αλκάνια αναφέρονται επίσης περιστασιακά και ως αλειφατικές ενώσεις, ονομασία που προέρχεται από την αρχαιοελληνική λέξη *άλειφαρ*, η οποία σημαίνει λίπος.

Τα αλκάνια μπορούν να είναι ευθείας αλυσίδας ατόμων άνθρακα με βαθμό ακορεστότητας ίσο με 0 ή μπορούν να σχηματίζουν τα άτομα άνθρακά τους δακτύλιο, οπότε ονομάζονται κυκλοαλκάνια, τα οποία έχουν βαθμό ακορεστότητας ίσο με 1. Τα κυκλοαλκάνια έχουν γενικό μοριακό τύπο C_nH_{2n} και οι σκελετικές τους δομές παριστάνονται από πολύγωνα [1].

1.2.2 Προέλευση

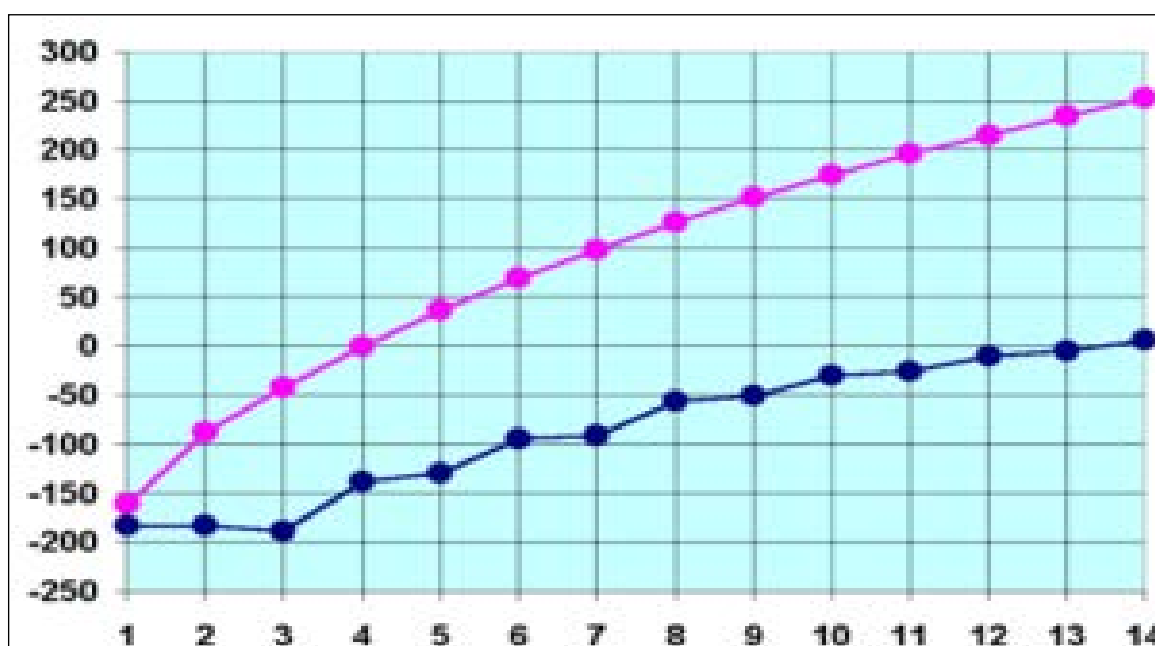
Τα αλκάνια απαντώνται, τόσο στη Γη, όσο και στο ηλιακό σύστημα, αλλά συνήθως μόνο τα περίπου εκατό πρώτα μέλη της ομόλογης σειράς και κυρίως σε ίχνη. Οι ελαφροί υδρογονάνθρακες, και κυρίως το μεθάνιο και το αιθάνιο, έχουν εντοπιστεί σε ουρές κομητών, αλλά και σε μετεωρίτες. Επίσης, αποτελούν ένα σημαντικό ποσοστό της ατμόσφαιρας των αέριων πλανητών Δία, Κρόνου, Ουρανού και Ποσειδώνα. Στον Τιτάνα, δορυφόρο του Κρόνου, πιστεύεται ότι κάποτε υπήρχαν μεγάλοι ωκεανοί μικρών ή και μακρύτερων αλκανίων, ενώ τώρα πιστεύεται ότι υπάρχουν μικρότερες θάλασσες υγρού αιθανίου.

Στη Γη οι κύριες πηγές των υδρογονανθράκων είναι τα ορυκτά καύσιμα (φυσικό αέριο, πετρέλαιο και γαιάνθρακες. Το φυσικό αέριο είναι κατά βάση μεθάνιο με μικρότερες ποσότητες άλλων αέριων αλκανίων (αιθάνιο, προπάνιο, βουτάνιο), καθώς και ποσότητες διυδρογόνου και ηλίου. Το πετρέλαιο είναι μείγμα αλκανίων και κυκλοαλκανίων με μικρότερες ποσότητες αρωματικών υδρογονανθράκων, αλλά και άλλων (κυρίως θειούχων) οργανικών ενώσεων (δηλαδή και άλλων κατηγοριών υδρογονανθράκων και μη υδρογονανθράκων). Η δημιουργία των ορυκτών αυτών σχετίζεται με τη δημιουργία ιζηματογενών πετρωμάτων και αποτελεί προϊόν αποδόμησης των ζωικών και φυτικών ιστών, οι οποίοι παγιδεύτηκαν μέσα στα πετρώματα στη διάρκεια της δημιουργίας τους. Η διεργασία αυτή έλαβε χώρα στη διάρκεια εκατομμυρίων ετών. Αρχικά μία ποσότητα του οργανικού υλικού υπό την επίδραση αερόβιων μικροοργανισμών μετατράπηκε σε αέριο, το οποίο και απελευθερώθηκε, ενώ απομακρύνθηκε το υδατοδιαλυτό μέρος του υλικού. Το υπόλειμμα δεν αποδομήθηκε λόγω έλλειψης οξυγόνου. Υπό την επίδραση αναερόβιων μικροοργανισμών τα μεγάλα οργανικά μόρια διασπάστηκαν δίδοντας συστατικά πλούσια σε άνθρακα και υδρογόνο. Η αυξημένη πίεση από το βάρος των υπερκειμένων στρωμάτων του πετρώματος και η υψηλή θερμοκρασία ολοκληρώνουν την μετατροπή της οργανικής ύλης σε πετρέλαιο. Τα αρχαιότερα κοιτάσματα χρονολογούνται στα 600 εκατομμύρια χρόνια και τα νεότερα σε 1 εκατομμύριο χρόνια.

1.2.3 Φυσικές ιδιότητες

Τα μέλη της ομόλογης σειράς των αλκανίων έχουν φυσικές ιδιότητες οι οποίες μεταβάλλονται εντός της σειράς με κανονικό τρόπο. Έτσι, υπό κανονικές συνθήκες, τα πρώτα μέλη της σειράς από 1 έως 4 άτομα άνθρακα είναι αέρια, τα μέσα μέλη άνω του βουτανίου είναι υγρά και τα ανώτερα αλκάνια, άνω του δεκαπεντανίου, είναι στερεά. Σε γενικές γραμμές για κάθε μεθυλενική ομάδα που προστίθεται, το σημείο ζέσεως αυξάνεται από 20 έως 30 °C, όπως φαίνεται και στο σχήμα 1.1. Από την άλλη, το σημείο τήξης των κανονικών αλκανίων, παρόλο που αυξάνεται επίσης με την αύξηση των ατόμων άνθρακα (με την εξαίρεση του προπανίου), αυξάνεται εμφανώς πιο αργά ιδιαίτερα στα ανώτερα αλκάνια. Επίσης, το σημείο τήξης των αλκανίων με περιττό αριθμό ατόμων άνθρακα αυξάνεται γρηγορότερα από το σημείο τήξης των αλκανίων με ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα.

Γενικά, τα γραμμικά αλκάνια έχουν υψηλότερο σημείο ζέσεως από τα αντίστοιχα διακλαδισμένα. Αυτό αποδίδεται στις δυνάμεις van der Waals που ασκούνται εντονότερα μεταξύ των μορίων γραμμικών αλκανίων από ό,τι μεταξύ των μορίων διακλαδισμένων αλκανίων. Στα διακλαδισμένα αλκάνια, τα οποία έχουν περισσότερο σφαιρικό σχήμα από τα γραμμικά και άρα μικρότερη εξωτερική επιφάνεια, η επαφή μεταξύ των μορίων είναι μικρότερη και επομένως μεταξύ των μορίων ασκούνται ασθενέστερες δυνάμεις van der Waals.



Σχήμα 1.1 Σημεία τήξης(κάτω γραμμή) και σημεία ζέσεως(πάνω γραμμή) των κανονικών αλκανίων μέχρι τα 14 άτομα άνθρακα σε °C.

Τα αλκάνια θεωρούνται άπολες ενώσεις και γι' αυτό δεν σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου και δεν διαλύονται σε πολικούς διαλύτες, όπως το νερό και τις αλκοόλες. Αντίθετα, διαλύονται εύκολα σε άπολους διαλύτες όπως το βενζόλιο και ο τετραχλωράνθρακας. Τέλος, διάφορα αλκάνια μπορούν να αναμιχθούν μεταξύ τους σε διάφορες αναλογίες.

Η πυκνότητα των αλκανίων αυξάνεται με την αύξηση του αριθμού των ατόμων άνθρακα αλλά παραμένει μικρότερη από αυτή του νερού. Έτσι, σε ένα μείγμα νερού-αλκανίων τα αλκάνια διατηρούνται πάντα στα ανώτερα στρώματα του μίγματος [2,3].

1.3 Είδη παραφινών

Όπως ειπώθηκε και προηγούμενα, ο όρος «παραφίνη» είναι αρκετά ταυτόσημος με τον όρο «αλκάνιο». Οι παραφίνες, λοιπόν, χωρίζονται σε δύο τύπους, κάθε ένας από τους οποίους περιλαμβάνει αρκετά μόρια αλκανίων. Ο πρώτος τύπος είναι η «στερεή παραφίνη» (paraffin wax) και ο δεύτερος η «υγρή παραφίνη» (mineral oil) και οι ενώσεις που περιλαμβάνονται σε αυτές έχουν γενικό μοριακό τύπο C_nH_{2n+2} .

1.3.1 Στερεή παραφίνη

Η στερεή παραφίνη ταυτοποιήθηκε από τον Carl Reichenbach το 1830 και αναφέρεται σε μείγμα αλκανίων με εύρος ατόμων C μεταξύ $20 \leq n \leq 40$. Βρίσκεται σε στερεή κατάσταση σε θερμοκρασία δωματίου και αρχίζει να μετατρέπεται στην υγρή φάση μετά τους 37 °C. Η στερεή παραφίνη βρίσκεται συνήθως ως ένα λευκό, άοσμο και άγευστο στερεό κέρινης υφής (Εικόνα 1.1). Το σημείο ζέσεως της κυμαίνεται μεταξύ 46 και 68 °C ανάλογα με την περιεκτικότητά της κάθε φορά στα

επί μέρους αλκάνια τα οποία την αποτελούν και η πυκνότητά της είναι περίπου $0,9 \text{ g/cm}^3$. Η στερεή παραφίνη είναι αδιάλυτη στο νερό, αλλά παρουσιάζει εξαιρετική διαλυτότητα στους περισσότερους συχνά χρησιμοποιούμενους οργανικούς διαλύτες. Επίσης, δεν αντιδρά με τα ευρέως χρησιμοποιούμενα χημικά αντιδραστήρια και είναι καλός αγωγός του ηλεκτρικού ρεύματος. Ακόμα, η στερεή παραφίνη είναι ένας αποτελεσματικός ρυθμιστής νετρονίων και χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ταυτοποίησης του νετρονίου από τον James Chadwick το 1932.

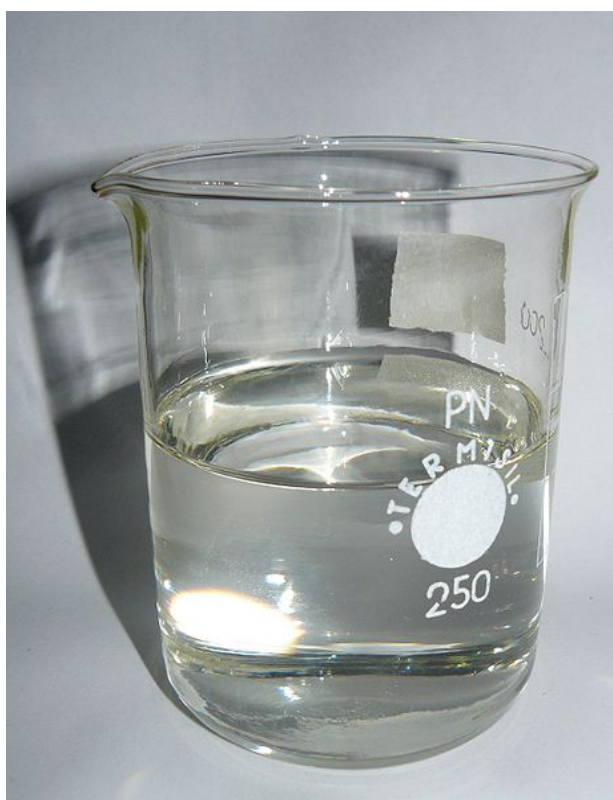


Εικόνα 1.1 Η πιο κοινή μορφή της στερεής παραφίνης.

Η στερεή παραφίνη είναι επίσης ένα εξαιρετικό υλικό για την αποθήκευση θερμότητας. Λόγω αυτής της ιδιότητάς της βρίσκεται ως συστατικό σε μονωτικά υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται σε κτήρια. Έτσι, κατά τη διάρκεια της ημέρας η στερεή παραφίνη λιώνει, καθώς δεσμεύει την θερμότητα και στη συνέχεια τη νύχτα στερεοποιείται πάλι, αποδεσμεύοντας αυτήν την θερμότητα. Επιπλέον, παράγωγα στερεής παραφίνης χρησιμοποιούνται ευρέως ως θερμοστατικά υλικά για βιομηχανικούς και οικιακούς σκοπούς. Σε διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές συχνά είναι χρήσιμο να μεταβάλλονται οι κρυσταλλικές ιδιότητες της καθαρής στερεής παραφίνης κάτι που επιτυγχάνεται με χρήση κάποιων πρόσθετων, όπως το πολυαιθυλένιο. Κάποιες άλλες γενικές χρήσεις της στερεής παραφίνης είναι οι εξής: χρησιμοποιείται ως συστατικό καλλυντικών, πρόσθετο τροφίμων, αποτελεί συστατικό ειδών ένδυσης και χρησιμοποιείται ευρέως ως λιπαντικό μέσο.

1.3.2 Υγρή παραφίνη

Η υγρή παραφίνη είναι ένα άχρωμο, άοσμο μίγμα αλκανίων με εύρος αριθμού ατόμων άνθρακα από 15 έως 40 (Εικόνα 1.2) . Η πυκνότητα της υγρής παραφίνης είναι περίπου $0,8 \text{ g/cm}^3$. Η υγρή παραφίνη αποτελείται από παραφινικά έλαια και ναφθεινικά έλαια. Τα μεν πρώτα περιέχουν αλκάνια ευθείας αλυσίδας, ενώ τα δεύτερα περιέχουν κυκλοαλκάνια. Στις διάφορες υγρές παραφίνες που κυκλοφορούν το ποσοστό των κυκλοαλκανίων κυμαίνεται μεταξύ 30-35% [3] .



Εικόνα 1.2 Υγρή παραφίνη.

Η υγρή παραφίνη χρησιμοποιείται ευρύτατα σε διάφορους τομείς. Υπάρχει η φαρμακευτική υγρή παραφίνη η οποία βοηθάει στη λειτουργία του παχέος εντέρου, καθώς δρα εναντίον της δυσκοιλιότητας. Επίσης, η υγρή παραφίνη χρησιμοποιείται για τη δημιουργία αλοιφής από στερεές ουσίες για τη λήψη του φάσματος στη φασματοσκοπία IR. Αυτό γίνεται διότι το φάσμα της στην υπέρυθρη περιοχή δεν είναι πολύπλοκο, οπότε και ελαχιστοποιούνται οι παρεμποδίσεις στο φάσμα του

δείγματος. Κάποιες άλλες γενικές χρήσεις της υγρής παραφίνης είναι οι εξής: χρησιμοποιείται ως συστατικό καλλυντικών, καύσιμο και περιέχεται σε πηγμένα και βαφές.

1.4 Παρασκευή και αξιοποίηση παραφινών

1.4.1 Ιστορική αναδρομή

Μέχρι τις αρχές του 20^{ου} αιώνα οι αλειφατικές ενώσεις δεν έπαιζαν σημαντικό ρόλο στη συνθετική οργανική χημική βιομηχανία. Μέχρι εκείνη την περίοδο γινόταν χρήση και επεξεργασία των συστατικών της ανθρακικής πίσσας, όπως η φαινόλη, η ναφθαλίνη και το τολουόλιο. Από αυτές τις ενώσεις παράχθηκε μεγάλη ποικιλία ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων.

Αμέσως μετά τον πρώτο παγκόσμιο πόλεμο, η ανάπτυξη της πετρελαϊκής βιομηχανίας ήταν ταχεία και ως εκ τούτου η μελέτη των αλειφατικών ενώσεων ήταν υψηλής σημασίας. Με τη δημιουργία των διυλιστηρίων, οι παραφίνες ήταν εφικτό να παραληφθούν ως κλάσμα του πετρελαίου. Σε χώρες με έλλειψη πετρελαίου θα έπρεπε να στραφούν σε κάποιο τρόπο παρασκευής των παραφινών ώστε να καλύψουν τις ανάγκες τους. Έτσι τεράστιας σημασίας θεωρείται η πορεία Fischer-Tropsch που επέτρεψε στη Γερμανία να αποκτήσει πρόσβαση σε συνθετικά υγρά καύσιμα το 1925. Η πορεία Fischer-Tropsch ήταν ο πρώτος τρόπος παγκοσμίως για την παρασκευή αλκανίων και περιλαμβάνει μία σειρά χημικών αντιδράσεων. Ο γενικός τύπος των πιο χρήσιμων αντιδράσεων αυτής της πορείας είναι ο παρακάτω:



Για δύο λόγους οι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες δεν χρησιμοποιήθηκαν εξ αρχής στην οργανική σύνθεση. Πρώτον, το πετρέλαιο είναι ένα εξαιρετικά πολύπλοκο μίγμα υδρογονανθράκων με έντονη ποικιλομορφία όσον αφορά τη

σύστασή του που εξαρτάται από την εκάστοτε πηγή προέλευσής του. Ακόμα και σήμερα οι υψηλότερου μοριακού βάρους ενώσεις του έχουν συγκριτικά ελάχιστα μελετηθεί. Επιπροσθέτως, οι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες αντιδρούν με τα συνήθη χημικά αντιδραστήρια σχετικά περιορισμένα σε σχέση με τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Έτσι, για μία μεγάλη περίοδο το πετρέλαιο δεν είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την συνθετική οργανική βιομηχανία.

Με την πάροδο του χρόνου οι χαμηλού μοριακού βάρους αέριες αλειφατικές ενώσεις ήταν οι πρώτες που απομονώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν. Αυτό συνέβη λόγω των μεγάλων διαφορών της εκάστοτε ένωσης στο σημείο βρασμού κάτι το οποίο επέτρεπε το διαχωρισμό μεταξύ τους με απόσταξη. Επιπλέον, από αυτή την ομάδα των αέριων αλειφατικών ενώσεων σε μεγαλύτερο βαθμό χρησιμοποιήθηκαν οι ολεφίνες (αλκένια), οι οποίες ήταν και δραστικότερες από τις παραφίνες. Οι χαμηλότερου μοριακού βάρους παραφινικοί υδρογονάνθρακες πρακτικά, όπως και πριν, δεν χρησιμοποιήθηκαν εκτός από τη χλωρίωση του μεθανίου και του πεντανίου. Μόνο μετά το 1930 έγιναν προσπάθειες ώστε να ξεκινήσει το μεθάνιο να χρησιμοποιείται ως αρχική ύλη στην οργανική σύνθεση. Προσπάθειες για χρήση υψηλότερου μοριακού βάρους παραφινών έγιναν μόνο πριν από λίγες δεκαετίες με εξαίρεση την παραγωγή λιπαρών οξέων από την οξειδωση των παραφινών, για τα οποία ήταν επιθυμητό να αντικατασταθεί η παρασκευή τους από τα ζωικά λίπη, ώστε αυτά τα τελευταία να χρησιμοποιούνταν αποκλειστικά για τη διατροφή.

Εξάλλου, οι υψηλού μοριακού βάρους υδρογονάνθρακες δεν μπορούν να παραληφθούν από το πετρέλαιο στην καθαρότητα που απαιτείται για χημική χρήση. Ακόμα και η απομόνωση ενός κλάσματος από το πετρέλαιο περιλαμβάνει ενώσεις εύρους έως 20 ατόμων άνθρακα με διάφορα είδη ισομέρειας και γενικά με διαφορετικά χαρακτηριστικά, γεγονός που καθιστά αυτό το κλάσμα μη αποτελεσματικό για χημικές διεργασίες. Τέτοια μίγματα βέβαια μπορούν να διαχωριστούν στα πλούσια σε παραφινικές ενώσεις και στα πλούσια σε αρωματικές ενώσεις με χρήση κατάλληλων εκλεκτικών αντιδραστηρίων. Με την ίδια φιλοσοφία παρασκευάζονται και οι παραφίνες που χρησιμοποιούνται σήμερα σε διάφορους επιστημονικούς και βιομηχανικούς τομείς, όπως και η υγρή και στερεή παραφίνη που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης στην παρούσα διατριβή ειδίκευσης [3,4] .

1.4.2 Βιομηχανικές διεργασίες παραφινών

Σήμερα υπάρχουν πέντε είδη διεργασιών που λαμβάνουν χώρα με τους παραφινικούς υδρογονάνθρακες σε βιομηχανική κλίμακα. Αυτές είναι οι εξής:

1. Οξείδωση
2. Χλωρίωση
3. Νίτρωση
4. Θειοχλωρίωση
5. Θειοοξείδωση

Στην οξείδωση των παραφινών χρησιμοποιείται κυρίως η στερεή παραφίνη, η οποία περιέχει υδρογονάνθρακες μεταξύ 20-25 ατόμων άνθρακα με σκοπό την παρασκευή λιπαρών οξέων. Κατά τη διάρκεια της οξείδωσης των παραφινών τα λιπαρά οξέα που παρασκευάζονται είναι διαφόρων μοριακών βαρών, καθώς σπάνε οι ανθρακικές αλυσίδες. Αυτό το μίγμα των λιπαρών οξέων που προκύπτει διαχωρίζεται με απόσταξη σε τρία μεγάλα κλάσματα:

1. Τα ελαφρά λιπαρά οξέα με 5-11 άτομα άνθρακα,
2. Τα σαπωνοειδή λιπαρά οξέα με 12-18 άτομα άνθρακα, και
3. Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα με περισσότερα από 18 άτομα άνθρακα.

Τα σαπωνοειδή λιπαρά οξέα μπορούν σε όλες τις περιπτώσεις να αντικαταστήσουν επιτυχώς τα υψηλής κορεστότητας λιπαρά οξέα των ζωικών και φυτικών λιπών. Όσον αφορά τα ελαφρά λιπαρά οξέα στις αρχές εκφράστηκαν

αμφιβολίες για το αν άξιζε το κόστος της οξειδωσης των παραφινών ώστε να παρασκευαστούν. Αργότερα όμως αξιοποιήθηκαν και αυτά επιτυχώς, καθώς αυτά τα ελαφρά λιπαρά οξέα, με καταλυτική υδρογόνωση μπορούσαν να μετασχηματιστούν στις κύριες αλκοόλες οι οποίες αποτελούν πολύ σημαντικά πρόσθετα στους πλαστικοποιητές.

Η χλωρίωση αποτελεί την παλαιότερη πορεία μετασχηματισμού των παραφινών. Αυτή η πορεία λαμβάνει χώρα πολύ ομαλά και αφήνει τον ανθρακικό σκελετό ανέπαφο. Σε σύγκριση με τις παραφίνες τα αλκυλοχλωρίδια χαρακτηρίζονται από αυξημένη δραστηριότητα και αυτός ήταν και ουσιαστικά ο λόγος ύπαρξης αυτής της πορείας, δηλαδή να καταστεί δυνατό οι σχετικά αδρανείς παραφίνες να μετατραπούν σε δραστικές ενώσεις.

Η νίτρωση των παραφινών και αυτή με τη σειρά της έχει καταστεί μία ομαλή πορεία σε βιομηχανικό επίπεδο σε όλο το εύρος των μοριακών βαρών των παραφινών. Οι νιτρο-παραφίνες, οι οποίες είναι τουλάχιστον όσο δραστικές είναι αρωματικές νιτρο-ενώσεις αν και με διαφορετικό τρόπο, προσφέρουν μεγάλη ποικιλία δυνατοτήτων για σημαντικές βιομηχανικές συνθέσεις στις αλειφατικές σειρές.

Στη θειοχλωρίωση λαμβάνει χώρα συνδυασμένη δράση διοξειδίου του θείου και χλωρίου στους παραφινικούς υδρογονάνθρακες κάτω από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Η θειοχλωρίωση είναι μία τυπική αλυσιδωτή αντίδραση και μαζί με την οξειδωση αποτελούν δύο πορείες οι οποίες δεν θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν με αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Αυτές οι δύο αντιδράσεις είναι τυπικό παράδειγμα του γεγονότος ότι οι παραφίνες κάτω από κάποιες ιδιαίτερες συνθήκες μπορούν να είναι πιο δραστικές από τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες.

Στη θειοξειδωση αντιδρούν διοξείδιο του θείου και οξυγόνο με παραφινικούς υδρογονάνθρακες κάτω από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας ή με την παρουσία υπεροξειδίων, ώστε να σχηματιστούν αλειφατικά οξέα. Δεν μπορεί να γίνει χρήση απευθείας θειικού οξέος σε παραφίνες, όπως συμβαίνει με τις αρωματικές ενώσεις. Με την θειοξειδωση μπορεί να υπερκεραστεί αυτό το μειονέκτημα.

Πρακτικά, όλες οι πορείες που αναφέρθηκαν προηγουμένως για τη χρήση των παραφινικών υδρογονανθράκων είναι αλυσιδωτές αντιδράσεις και υπόκεινται στους ίδιους κανόνες που αφορούν την ισομέρεια στις οργανικές ενώσεις. Ο κλάδος των παραφινών συνεχώς βρίσκεται υπό μελέτη και πιθανότατα θα προκύψουν και άλλα χρήσιμα ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα τα οποία θα παρασκευαστούν από αυτή τη μεγάλη οικογένεια οργανικών ενώσεων. Προς αυτή την κατεύθυνση κινούνται και οι πετρελαϊκές βιομηχανίες οι οποίες επιδιώκουν την παρασκευή συνθετικών παραφινών υψηλής καθαρότητας από το πετρέλαιο και τα άλλα ορυκτά καύσιμα [5].

1.4.3 Εφαρμογές στη φαρμακευτική

Η υγρή παραφίνη έχει ευρεία χρήση στο πεδίο της φαρμακευτικής. Λόγω του ότι διέρχεται από τον οργανισμό δίχως να απορροφάται έχει ισχυρή καθαριστική δράση και για αυτό χρησιμοποιείται ως δραστική ουσία σε φαρμακευτικά σκευάσματα που δρουν εναντίον της δυσκοιλιότητας. Ακόμη, περιέχεται σε αλοιφές που δρουν εναντίον των ερεθισμών του δέρματος και σε ορισμένους τύπους οφθαλμικών σταγόνων.

Επίσης, αρκετές εφαρμογές της υπάρχουν στο τομέα των καλλυντικών. Χρησιμοποιείται ως έκδοχο σε κρέμες σώματος και σε έλαια, λόγω της λιπαρότητας που προσφέρει στα ξηρά δέρματα.

1.5 Έλεγχοι παραφινών στην πρώτη ύλη

Σε όλες τις Φαρμακοποιίες περιγράφονται έλεγχοι που αφορούν την πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται για την παρασκευή φαρμακευτικών σκευασμάτων. Οι έλεγχοι αυτοί πρέπει να γίνονται τόσο από τους παρασκευαστές, με έκδοση πιστοποιητικού ανάλυσης, όσο και από τους χρήστες (φαρμακευτικές βιομηχανίες) για την επιβεβαίωση των προδιαγραφών ποιότητας.

Όσον αφορά τις παραφίνες, στις διάφορες Φαρμακοποιίες υπάρχουν έλεγχοι και για την υγρή και για την στερεή παραφίνη. Αυτοί οι έλεγχοι συνοψίζονται παρακάτω και έχουν ως βάση τις μονογραφίες της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας.

1.5.1 Έλεγχοι υγρής παραφίνης

Για την υγρή παραφίνη, η οποία αποτελεί μείγμα υγρών κορεσμένων υδρογονανθράκων προερχόμενων από το πετρέλαιο, κατά πρώτον εξετάζονται τα βασικά χαρακτηριστικά της. Όσον αφορά την εμφάνισή της πρέπει να είναι άχρωμη, διαφανής και να έχει ελαιώδη υγρή υφή, ενώ θα πρέπει επίσης να είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό και λίγο διαλυτή στην αιθανόλη.

Η ταυτοποίηση της υγρής παραφίνης μπορεί να γίνει με φασματοφωτομετρία υπερύθρου, με οπτικό έλεγχο έπειτα από τη χρήση διαλύματος καυστικού νατρίου και φαινολοφθαλείνης ως δείκτη και με μέτρηση του ιξώδους.

Τέλος, στη μονογραφία της υγρής παραφίνης παρέχονται λεπτομερείς οδηγίες για τις δοκιμές καθαρότητας που μπορούν να γίνουν σε αυτή την πρώτη ύλη, οι οποίες είναι η εύρεση της οξύτητας, η μέτρηση της πυκνότητας και του ιξώδους και η ανίχνευση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και ενώσεων της στερεής παραφίνης.

1.5.1 Έλεγχοι υγρής παραφίνης

Η στερεή παραφίνη με τη σειρά της αποτελεί ένα μείγμα στερεών κορεσμένων υδρογονανθράκων γενικά προερχόμενων από το πετρέλαιο. Εμφανίζεται ως μία λευκή ή σχεδόν λευκή μάζα και είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό και στην αιθανόλη, ενώ είναι διαλυτή στο διχλωρομεθάνιο.

Όσον αφορά την ταυτοποίησή μπορεί να γίνει με φασματοφωτομετρία υπερύθρου, εξετάζοντας το σημείο τήξεως, το οποίο πρέπει να είναι μεταξύ 50°C και 61°C ή προσδιορίζοντας την οξύτητα (I_{ω}).

Οι επιπλέον δοκιμές καθαρότητας που περιγράφονται στη μονογραφία της στερεής παραφίνης είναι η εύρεση της ανθεκτικότητας και της οξύτητας, ο προσδιορισμός της θειικής τέφρας και η ανίχνευση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων [6].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2°

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

2.1 Εισαγωγή

Για την αξιολόγηση μίας μεθόδου, όσον αφορά την καταλληλότητά της για τον σκοπό για τον οποίο έχει αναπτυχθεί, λαμβάνονται υπόψη κάποια χαρακτηριστικά ποιότητας (quality characteristics), τα οποία θεωρούνται εκείνες οι παράμετροι, ιδιότητες, κριτήρια ή συμπεριφορές που εμφανίζει μία αναλυτική μέθοδος κατά την εφαρμογή της στην ανάλυση ενός δείγματος. Τα χαρακτηριστικά ποιότητας, κατά κανόνα ποσοτικοποιούν την καταλληλότητα της μεθόδου έτσι, ώστε να επιτρέπουν:

- Τη βελτιστοποίηση κατά το στάδιο της ανάπτυξης ή μετά την επιλογή,
- Τη σύγκριση μεταξύ μεθόδων πριν την επιλογή για την επίλυση ενός αναλυτικού προβλήματος,
- Την αποδοχή της μεθόδου από μία επιστημονική ένωση ή φορέα ως μέθοδο επιλογής/ρουτίνας,
- Την επικύρωση που απαιτείται από κανονιστικές αρχές.

Τα χαρακτηριστικά ποιότητας της μεθόδου, κατά κανόνα αφορούν στην πλήρη εφαρμογή όλων των σταδίων της μεθόδου σε ένα δείγμα, ενώ μερικά χαρακτηριστικά μπορούν να αναφέρονται σε επιμέρους στάδια [7].

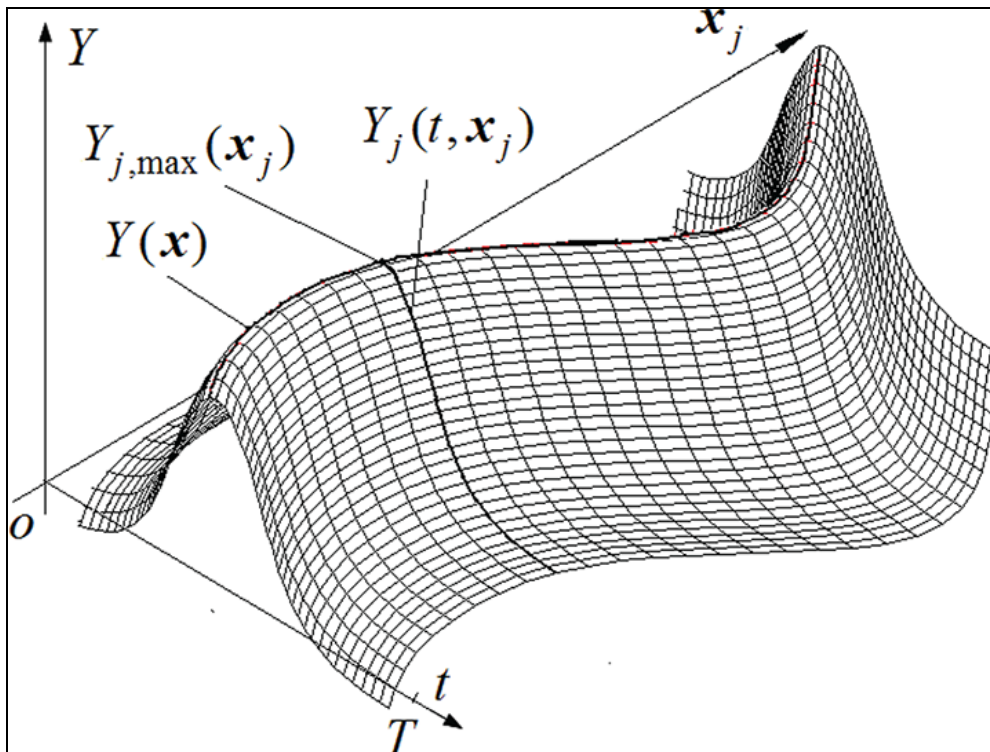
2.2 Βελτιστοποίηση αναλυτικών μεθόδων

Για μία αναλυτική μέθοδο ως βελτιστοποίηση (optimization) ορίζεται η εύρεση των τιμών των πειραματικών παραμέτρων της που δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα για αυτή. Η βελτιστοποίηση απαιτείται κατά την ανάπτυξη μίας νέας αναλυτικής μεθόδου ή την προσαρμογή μίας ήδη υπάρχουσας σε άλλους τύπους δειγμάτων. Μία αναλυτική μέθοδος επηρεάζεται από πολλές αριθμήσιμες παραμέτρους.

2.2.1 Μέθοδοι βελτιστοποίησης

Οι μέθοδοι βελτιστοποίησης παρέχουν τη δυνατότητα να εντοπισθούν οι τιμές των παραμέτρων που παρέχουν τη βέλτιστη απόκριση. Ως βέλτιστη θεωρείται μία ακρότατη, μέγιστη ή ελάχιστη τιμή, ανάλογα με ποιο μέγεθος εκπροσωπεί την απόκριση. Κάποιες τυπικές αποκρίσεις προς βελτιστοποίηση είναι η τιμή του μετρούμενου αναλυτικού σήματος, το εύρος της γραμμικής περιοχής της καμπύλης αναφοράς, η διαχωριστική ικανότητα δύο χρωματογραφικών κορυφών (RS), η σχετική τυπική απόκλιση των μετρήσεων (RSD), το όριο ποσοτικοποίησης και ο χρόνος και το κόστος της αναλυτικής μεθόδου. Συχνά ως απόκριση θεωρείται ένας γραμμικός συνδυασμός πολλών από τα προηγούμενα μεγέθη τα οποία έχουν μορφή αθροίσματος γινομένων με συντελεστές βαρύτητας ανάλογα με τη σημασία τους και για την εξομάλυνση των μεγεθών τους.

Γενικά, στις διάφορες τεχνικές βελτιστοποίησης αναλυτικών μεθόδων υπεισέρχεται συνάρτηση της μορφής $A = f(x, y, \dots, n)$, η οποία είναι άγνωστη και γίνεται προσπάθεια να εκτιμηθούν οι τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών (x, y, \dots, n) που τη μεγιστοποιούν. Για παράδειγμα σε ένα σύστημα 2 παραμέτρων, όπως είναι φερειπείν το pH και η θερμοκρασία έχουμε τη συνάρτηση $A = f(\text{pH}, T)$. Οι δύο παράμετροι παρίστανται σε δύο άξονες ενός επιπέδου του τρισδιάστατου χώρου όπου η βέλτιστη απόκριση A_{opt} βρίσκεται στην κορυφή της επιφάνειας απόκρισης. Στο σχήμα 2.1 φαίνεται επιφάνεια απόκρισης που αφορά σύστημα 2 παραμέτρων.



Σχήμα 2.1 Επιφάνεια απόκρισης συστήματος 2 παραμέτρων.

Στόχος, λοιπόν, των διάφορων τεχνικών βελτιστοποίησης αποτελεί η εύρεση ενός τρόπου αναρρίχησης στην επιφάνεια απόκρισης από το συντομότερο δυνατό δρόμο. Αυτός ο τρόπος αναρρίχησης στην επιφάνεια απόκρισης πρέπει να πληροί δύο σημαντικά κριτήρια:

1. Να είναι αποτελεσματικός, δηλαδή να απαιτεί όσο το δυνατόν μικρότερο αριθμό δοκιμών.
2. Να είναι αξιόπιστος, ώστε να εντοπίζεται παγκόσμιο μέγιστο ή ελάχιστο της επιφάνειας απόκρισης και να μην υπάρχει παγίδευση σε ένα πιθανό τοπικό μέγιστο ή ελάχιστο.

Υπάρχουν 3 κατηγορίες τεχνικών βελτιστοποίησης, οι οποίες και θα αναλυθούν παρακάτω, η αναζήτηση του βέλτιστου σχηματομορφής, η διαδοχική μεταβολή ενός παράγοντα και η διαδοχική πολυπαραμετρική μέθοδος Simplex.

Αναζήτηση βέλτιστου σημείου σχηματομορφής

Σε αυτή την τεχνική βελτιστοποίησης γίνεται προσπάθεια συστηματικής χαρτογράφησης των αποκρίσεων. Για την απλή περίπτωση των 2 παραμέτρων απαιτούνται k^2 πειράματα, όπου k είναι ο αριθμός των τιμών που δοκιμάζονται για κάθε παράμετρο, ενώ για n παραμέτρους θα απαιτούνταν k^n πειράματα. Το κυριότερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι ακόμα και για το απλό σύστημα των δύο παραμέτρων θα απαιτούνταν μεγάλος αριθμός πειραμάτων. Ακόμα, σε συστήματα όπου μελετούνται περισσότερες από δύο παράμετροι, συχνά παρουσιάζονται απότομες μεταβολές στην απόκριση και είναι πιθανό να μην εντοπιστεί το βέλτιστο σημείο.

Για να μειωθεί ο αριθμός των πειραμάτων χρησιμοποιείται ο παραγοντικός σχεδιασμός και ο σχετιζόμενος με αυτόν κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός. Η αρχή τους στηρίζεται στη μείωση των αρχικών κρίσιμων παραμέτρων σε δύο. Έτσι για τον παραγοντικό σχεδιασμό απαιτούνται 2^n πειράματα και για τον κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό $(1/2)2^n$ πειράματα. Προϋπόθεση για να χρησιμοποιηθεί αυτή η μεθοδολογία είναι κάποια γνώση του τρόπου επίδρασης των παραμέτρων στο εξεταζόμενο σύστημα.

Διαδοχική μεταβολή ενός παράγοντα (μονοπαραμετρική)

Στη διαδοχική μεταβολή ενός παράγοντα όλες οι n παράμετροι εκτός από μία διατηρούνται σταθερές και από k πειράματα προσδιορίζεται η βέλτιστη τιμή αυτής της παραμέτρου. Στη συνέχεια μεταβάλλεται η επόμενη παράμετρος κατά αντίστοιχο τρόπο χρησιμοποιώντας τη βέλτιστη τιμή των προηγούμενων. Το μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι δεν λαμβάνονται υπόψη οι τυχόν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραμέτρων, δηλαδή είναι δυνατό η βέλτιστη τιμή της μίας παραμέτρου να αλλάζει τη βέλτιστη τιμή κάποιας άλλης. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι πολύ δύσκολο να εντοπισθεί η πραγματικά βέλτιστη ομάδα τιμών των πειραματικών παραμέτρων.

Μέθοδος Simplex

Η μέθοδος Simplex είναι η καλύτερη τεχνική βελτιστοποίησης η οποία περιορίζει τα μειονεκτήματα των άλλων δύο μεθόδων. Τα πλεονεκτήματά της είναι:

- η δυνατότητα ταυτόχρονης μεταβολής των τιμών όλων των παραμέτρων αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της μεθόδου,
- η ταχεία αναρρίχηση στο μέγιστο της επιφάνειας απόκρισης ακολουθώντας ένα απλό αλγόριθμο και η εύκολη κωδικοποίησή του σε γλώσσα προγραμματισμού,
- η δυνατότητα αξιόπιστης και αποτελεσματικής βελτιστοποίησης παραμέτρων που αλληλεπιδρούν και
- η πρόβλεψη για κάποιο μηχανισμό ανάδρασης για αποφυγή εξακολουθητικά λανθασμένων κινήσεων.

Η μέθοδος Simplex αναπτύχθηκε ταχέως τις τελευταίες δεκαετίες στο χώρο της αναλυτικής χημείας (χημειομετρίας) με μεγάλο αριθμό άρθρων σε επιστημονικά περιοδικά να αφορούν αυτή τη μέθοδο. Με τον καιρό έχουν εξελιχθεί διάφορες τροποποιήσεις αυτής της μεθόδου ώστε ανάλογα με την εφαρμογή να επιτυγχάνεται η βέλτιστη απόδοσή της. Υπάρχει πληθώρα λογισμικών προγραμμάτων τα οποία χρησιμοποιούν ανάλογους αλγόριθμους ώστε να εξάγουν τη βέλτιστη απόκριση για διάφορες παραμέτρους, όπως για παράδειγμα είναι τα προγράμματα DryLab και ChemSword που χρησιμοποιούνται για την εύρεση της βέλτιστης σύστασης των διαλυτών της κινητής φάσης των χρωματογραφικών μεθόδων [8,9].

2.3 Στοιχεία επικύρωσης

Στο πλαίσιο λειτουργίας ενός εργαστηρίου σύμφωνα με τα πρότυπα διαπίστευσης (ISO, GMP), η επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου θα πρέπει να παρέχει τη σαφή απόδειξη ότι η μέθοδος ανταποκρίνεται στο σκοπό για τον οποίο προορίζεται. Η επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου είναι μία από τις πιο βασικές απαιτήσεις κατά τη διαδικασία διαπίστευσης ενός εργαστηρίου. Μεγάλη σημασία πρέπει να δοθεί στο γεγονός ότι όλα τα βήματα που περιλαμβάνονται στη μέθοδο θα πρέπει να επικυρωθούν για το αν είναι εφαρμόσιμα.

Οι αναλυτικές μέθοδοι, για τις απαιτήσεις της επικύρωσης, ταξινομούνται σε τέσσερις ξεχωριστές κατηγορίες:

1. Έλεγχοι ταυτοποίησης
2. Ποσοτικοί προσδιορισμοί για την περιεκτικότητα προσμίξεων
3. Έλεγχοι ορίων για προσμίξεις
4. Ποσοτικοί προσδιορισμοί δραστικών ουσιών

Η έκταση της επικύρωσης εξαρτάται από τον τύπο της μεθόδου. Συχνά απαιτείται επανεπικύρωση μίας μεθόδου όταν λαμβάνουν χώρα σημαντικές αλλαγές, όπως για παράδειγμα σε όργανα, στη σύνθεση ενός προϊόντος, στην ίδια την μέθοδο ή σε κάποιον κρίσιμο προμηθευτή. Η έκταση της επανεπικύρωσης εξαρτάται από τη φύση της αλλαγής. Η αιτία και η έκταση της επανεπικύρωσης πρέπει να τεκμηριώνονται στο πρωτόκολλο επικύρωσης.

Η πειραματική εργασία σχεδιάζεται έτσι, ώστε τα κατάλληλα χαρακτηριστικά ελέγχου επικύρωσης να εξετάζονται συγχρόνως, παρέχοντας ορθολογική και συνολική γνώση των δυνατοτήτων της αναλυτικής μεθόδου.

Στη συνέχεια, θα αναφερθούν τα κυριότερα χαρακτηριστικά ποιότητας μίας χρωματογραφικής μεθόδου, αεριοχρωματογραφικής ή υγροχρωματογραφικής [10].

2.3.1 Εκλεκτικότητα

Η εκλεκτικότητα αφορά στην αξιολόγηση της ικανότητας της μεθόδου να διακρίνει την προσδιοριζόμενη ουσία από προσμίξεις, μεταβολίτες, προϊόντα διάσπασης και συστατικά του μητρικού υλικού.

Μέτρο της εκλεκτικότητας μίας μεθόδου είναι η διαχωριστική ικανότητα δύο κορυφών, που έχουν χρόνους κατακράτησης t_1 και t_2 και εύρη κορυφών w_1 και w_2 , αντίστοιχα, και δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$R_s = \frac{\text{Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.}}{w_1 + w_2} \quad (2.1)$$

Αν $R_s > 1,5$, έχουμε τον πλήρη διαχωρισμό δύο κορυφών ίδιου μεγέθους. Αν $R_s = 1.0$ οι κορυφές αλληλεπικαλύπτονται σε ποσοστό 2% και ο διαχωρισμός θεωρείται επαρκής για αναλυτικούς σκοπούς.

Κάποιοι από τους τρόπους με τους οποίους μπορεί να ελεγχθεί η εκλεκτικότητα της μεθόδου παρουσιάζονται παρακάτω:

A) συγκρίνοντας το χρωματογράφημα της υπό εξέταση ουσίας με αυτό μίας ουσίας αναφοράς,

B) συγκρίνοντας τα φάσματα UV/Vis των κορυφών, εάν υπάρχει διαθέσιμος ανιχνευτής PDA (σειράς φωτοδιόδων) ή φασματοόμετρο μαζών,

Γ) ελέγχοντας δείγματα “placebo”, δηλαδή λευκά δείγματα που έχουν όλα τα συστατικά εκτός από την ουσία η οποία μελετάται και

Δ) ελέγχοντας την καθαρότητα των κορυφών παρουσία δευτερευουσών ουσιών οι οποίες παράγονται μετά από υποβολή του δείγματος σε έντονες συνθήκες, όπως ακτινοβόληση με UV ακτινοβολία, θερμική κατεργασία, οξειδωση και κατεργασία με οξύ ή βάση (συνθήκες “stress”).

2.3.2 Ακρίβεια και ανάκτηση

Η ακρίβεια προσδιορίζεται αναλύοντας μία σειρά δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων και συγκρίνοντας τις αληθινές συγκεντρώσεις με αυτές που προκύπτουν πειραματικά. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται προκύπτουν με προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας της υπό εξέταση ουσίας σε λευκά διαλύματα. Στον προσδιορισμό της ακρίβειας σημαντικό ρόλο παίζει η προετοιμασία και η σύσταση των δειγμάτων. Για το λόγο αυτό τα διαλύματα πρέπει να παρασκευάζονται με τρόπο ανάλογο του τρόπου παρασκευής του πραγματικού

σκευάσματος. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων κυμαίνονται σε περιοχή γύρω από τις αναμενόμενες τιμές. Για τον προσδιορισμό της ακρίβειας απαιτούνται τουλάχιστον 9 προσδιορισμοί σε τουλάχιστον 3 συγκεντρώσεις, δηλαδή 3 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση.

Η ακρίβεια εκφράζεται ως το % ποσοστό της ανάκτησης ή ως το σφάλμα της πειραματικής τιμής, αναφέροντας και τα όρια εμπιστοσύνης. Η διαφορά του μέσου όρου πειραματικών τιμών (χ) από την πραγματική τιμή (μ) παρέχει το συστηματικό σφάλμα της μεθόδου και εκφράζει την ορθότητά της.

2.3.3 Πιστότητα, επαναληψιμότητα και ενδιάμεση πιστότητα

Πιστότητα

Εκφράζει τη συμφωνία των αποτελεσμάτων όταν η μέθοδος εφαρμόζεται σε υποδείγματα του ίδιου δείγματος. Διακρίνεται σε επαναληψιμότητα όταν οι συνθήκες είναι ακριβώς ίδιες και σε ενδιάμεση πιστότητα όταν οι συνθήκες είναι διαφορετικές.

Επαναληψιμότητα

Ο έλεγχος πραγματοποιείται από τον ίδιο αναλυτή στο ίδιο όργανο και βασίζεται στον προσδιορισμό μίας ουσίας σε 2 ή 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις τουλάχιστον 5 φορές σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Ενδιάμεση πιστότητα ή ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

Ο έλεγχος πραγματοποιείται από διαφορετικούς αναλυτές ή και διαφορετικά όργανα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Η ενδιάμεση πιστότητα εκφράζει την αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων στο ίδιο εργαστήριο αλλά σε διαφορετικές συνθήκες.

2.3.4 Εύρος

Εύρος μίας αναλυτικής μεθόδου ορίζεται η περιοχή ανάμεσα στο ανώτερο και στο κατώτερο όριο που καθορίζουν η ακρίβεια και η γραμμικότητα. Το ελάχιστο εύρος σε κάθε περίπτωση είναι μεταξύ 80% και 120% της αναμενόμενης τιμής για ποσοτικούς προσδιορισμούς δραστικών ουσιών, μεταξύ 50% και 120% ή από το όριο ποσοτικοποίησης για προσδιορισμούς προσμίξεων, μεταξύ 70% και 130% για ομοιομορφία περιεχομένου και $\pm 20\%$ του ορίου που αναφέρεται για τον έλεγχο διαλυτοποίησης.

2.3.5 Όριο ανίχνευσης (LOD)

Το όριο ανίχνευσης είναι η ελάχιστη συγκέντρωση μίας ουσίας σε ένα συγκεκριμένο δείγμα η οποία μπορεί να ανιχνευτεί αξιόπιστα αλλά όχι να προσδιοριστεί ποσοτικά. Το όριο ανίχνευσης δεν πρέπει να συγχέεται με την ευαισθησία της μεθόδου η οποία είναι η ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει μικρές διαφορές συγκεντρώσεων και εκφράζεται από την κλίση της καμπύλης αναφοράς.

Στη χρωματογραφία το όριο ανίχνευσης είναι η ποσότητα δείγματος η οποία όταν ενίεται στο χρωματογράφο δίνει μία κορυφή το ύψος της οποίας είναι τουλάχιστον 3,3 φορές μεγαλύτερο το ύψος του θορύβου ($S/N=3,3$). Επίσης, το όριο ανίχνευσης μίας μεθόδου μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας την κλίση (b) της καμπύλης αναφοράς και την τυπική απόκλιση (SD) των αποκρίσεων του διαλύματος που βρίσκεται στο χαμηλότερο επίπεδο συγκεντρώσεων σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$LOD = 3,3 \frac{SD}{b} \quad (2.2)$$

2.3.6 Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το όριο ποσοτικοποίησης είναι η ελάχιστη συγκέντρωση μίας ουσίας σε ένα συγκεκριμένο δείγμα η οποία μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με αποδεκτή ακρίβεια.

Στη χρωματογραφία το όριο ποσοτικοποίησης είναι η ποσότητα δείγματος η οποία όταν ενίεται στο χρωματογράφο δίνει μία κορυφή το ύψος της οποίας είναι τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερο το ύψος του θορύβου ($S/N=10$). Επίσης, το όριο ανίχνευσης μίας μεθόδου μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας την κλίση (b) της καμπύλης αναφοράς και τη τυπική απόκλιση (SD) των αποκρίσεων του διαλύματος που βρίσκεται στο χαμηλότερο επίπεδο συγκεντρώσεων σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$LOD = 10 \frac{SD}{b} \quad (2.3)$$

2.3.7 Γραμμικότητα

Η μελέτη της γραμμικότητας μπορεί να γίνει ή με αραιώσεις ενός πυκνού προτύπου διαλύματος ή με προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων της υπό εξέταση ουσίας σε λευκά διαλύματα. Τα διαλύματα είναι τουλάχιστον 5 διαφορετικών συγκεντρώσεων στην περιοχή 80 – 120% ή και σε ευρύτερη και αναλύονται 3-6 φορές το καθένα.

Η απόκριση θα πρέπει να είναι ανάλογη των συγκεντρώσεων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε γραφική παράσταση $Response = f(Amount)$ και βρίσκεται η εξίσωση της ευθείας. Η τεταγμένη επί την αρχή δεν πρέπει να διαφέρει σημαντικά από το μηδέν. Σε αντίθετη περίπτωση θα πρέπει να αποδεικνύεται ότι αυτό δεν επηρεάζει την ακρίβεια. Η γραμμικότητα εκφράζεται από τον συντελεστή συσχέτισης, ο οποίος πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 0,99.

2.3.8 Ανθεκτικότητα

Η ανθεκτικότητα εξετάζει την επίδραση σκοπούμενων μικρών μεταβολών των πειραματικών παραμέτρων στο αναλυτικό αποτέλεσμα. Παράμετροι που εξετάζονται

είναι το pH, η σύσταση και η ροή της κινητής φάσης, η θερμοκρασία της στήλης, ο όγκος της ένεσης, το μήκος κύματος και άλλα. Εάν κάποια αλλαγή προκαλεί κρίσιμη αλλαγή στο αναλυτικό αποτέλεσμα θα πρέπει να αναφέρεται και να καθορίζονται τα όρια ανοχής.

Τα αποτελέσματα της ανθεκτικότητας καθορίζουν κάποιες φορές εάν η μέθοδος χρειάζεται να επαναξιολογηθεί. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ανθεκτικότητας γίνεται με παραγοντικό σχεδιασμό.

2.3.9 Αντοχή

Η αντοχή εξετάζει την αναπαραγωγικότητα αποτελεσμάτων αναλύσεων που πραγματοποιούνται από διαφορετικούς αναλυτές σε διαφορετικά εργαστήρια. Για τον έλεγχο της αντοχής αναλύονται τρία διαφορετικά δείγματα από δύο διαφορετικούς αναλυτές σε δύο διαφορετικά εργαστήρια. Η αντοχή είναι έννοια συνώνυμη με τη διεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα [11].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3°

ΠΕΡΙ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

3.1 Εισαγωγή

Η αεριοχρωματογραφία (Gas Chromatography) στηρίζεται στην ροή μίας κινητής φάσης, υπό πίεση, εντός θερμαινόμενου σωλήνα, είτε επικαλυμμένου με μία υγρή στατική φάση ή πληρωμένου με υγρή στατική φάση επιστρωμένη επί στερεού υποστρώματος. Το δείγμα φορτώνεται στην κεφαλή της στήλης διαμέσου θερμαινόμενης πύλης εισαγωγής δείγματος, όπου και εξατμίζεται. Ακολούθως συμπυκνώνεται στην κεφαλή της στήλης, η οποία βρίσκεται σε χαμηλότερη θερμοκρασία. Η θερμοκρασία του κλιβάνου ακολούθως, είτε διατηρείται σταθερή ή προγραμματίζεται να αυξάνει βαθμιαία. Εντός της στήλης, ο διαχωρισμός ενός μείγματος συμβαίνει με βάση τα σχετικά χρονικά διαστήματα παραμονής των συστατικών του στη στατική φάση. Η παρακολούθηση του εκλούσματος της στήλης πραγματοποιείται με ποικιλία ανιχνευτών.

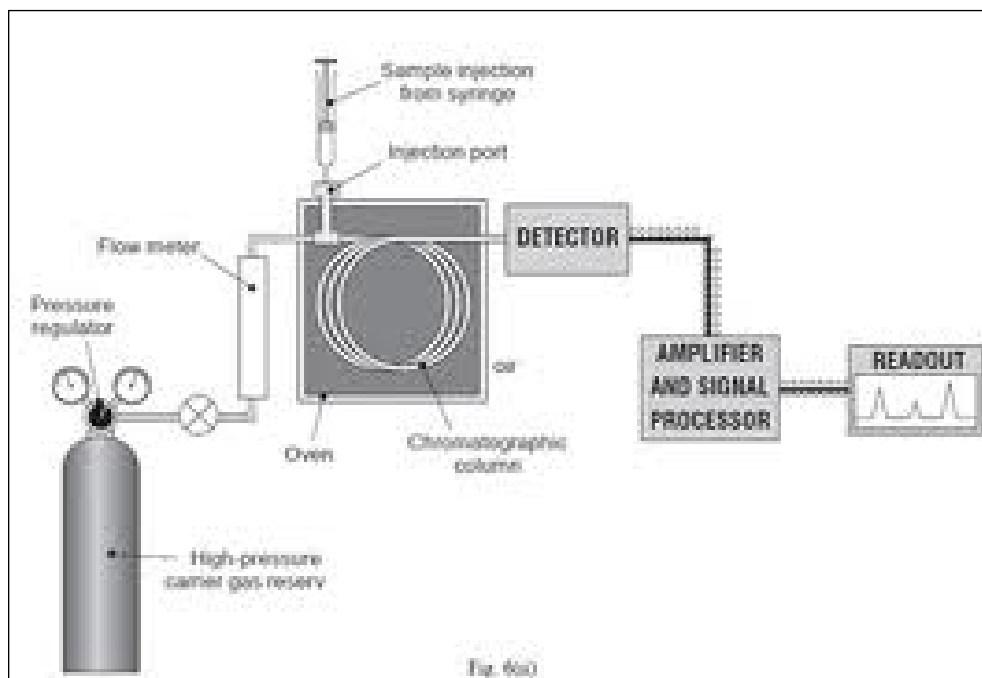
Η χρήση της αεριοχρωματογραφίας, ως ποσοτικής τεχνικής στη φαρμακευτική ανάλυση έχει φθίνουσα εφαρμογή μετά την έλευση της HPLC (υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης) και την συνεχιζόμενη εξέλιξη αυτής της τεχνικής. Ωστόσο, η αεριοχρωματογραφία χρησιμοποιείται ευρέως στην περιβαλλοντική επιστήμη, τη ζυθοποιία, τη βιομηχανία τροφίμων, στην ανάλυση αρωμάτων και μυρωδικών, τη βιομηχανία πετροχημικών, τις μικροβιολογικές αναλύσεις και στην κλινική βιοχημεία. Στη φαρμακευτική ανάλυση χρησιμοποιείται στον έλεγχο της σύστασης αιθέριων ελαίων, στον έλεγχο υπολειμμάτων διαλυτών (headspace chromatography) και στον έλεγχο ουσιών που δεν ανιχνεύονται με τους ανιχνευτές της HPLC [12].

3.2 Οργανολογία

Οι γενικές αρχές και οι λειτουργίες ενός συστήματος αεριοχρωματογραφίας παρουσιάζονται παρακάτω:

1. Η εισαγωγή του δείγματος μπορεί να γίνει με το χέρι ή χρησιμοποιώντας ένα αυτόματο δειγματολήπτη πολλαπλών θέσεων μέσω ενός επανασφραγίσιμου ελαστικού διαφράγματος.
2. Το διάλυμα του δείγματος εξατμίζεται στη θερμαινόμενη περιοχή εισαγωγής και συμπυκνώνεται στην κεφαλή της στήλης.
3. Η στήλη μπορεί να είναι, είτε τριχοειδής, είτε πληρωμένη στήλη. Η κινητή φάση που χρησιμοποιείται για την μεταφορά του δείγματος διαμέσου της στήλης είναι ένα αέριο, συνήθως άζωτο ή ήλιο, ανάλογα με τον χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή.
4. Η στήλη είναι τοποθετημένη σε κλίβανο που μπορεί να ρυθμιστεί σε κάθε θερμοκρασία μεταξύ περιβάλλοντος και περίπου 400°C.
5. Στο τέλος βρίσκεται ένας ανιχνευτής, ο οποίος παρέχει την αναλυτική πληροφορία μέσω του σήματός του. Ο πλέον χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής στην αεριοχρωματογραφία είναι ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας (FID).

Μία γενική σχηματική αναπαράσταση ενός συστήματος αεριοχρωματογραφίας φαίνεται στην εικόνα 3.1.



3.2.1 Σύριγγες

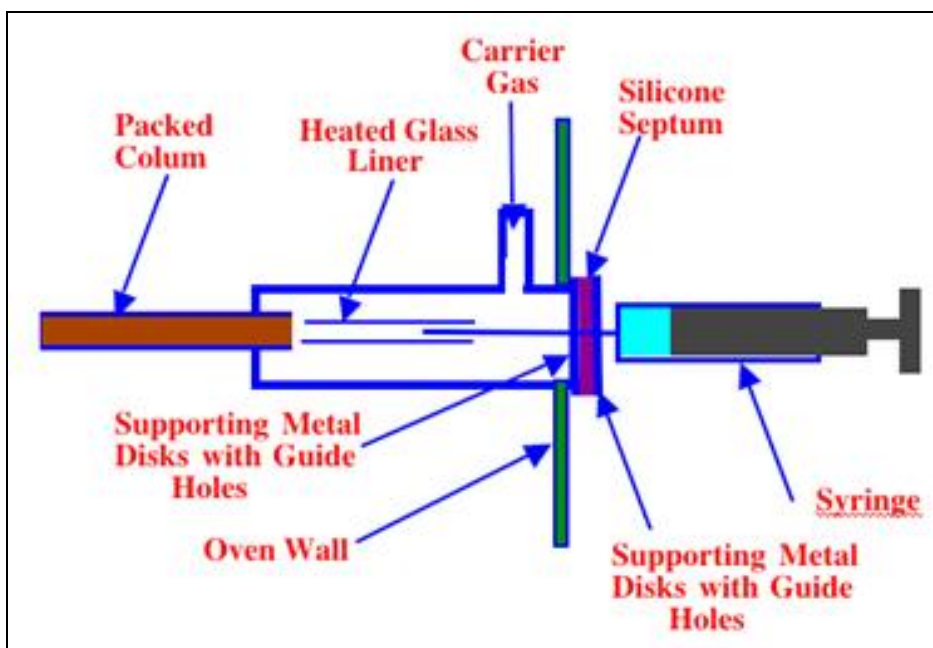
Οι εισαγόμενοι όγκοι στην αεριοχρωματογραφία είναι συνήθως στην περιοχή 0,5- 2 μl και οι συνήθεις όγκοι συρίγγων είναι 5 και 10 μl. Μία συνιστώμενη τεχνική για εισαγωγή σε μία τριχοειδή στήλη GC είναι να πληρωθεί η σύριγγα με περίπου 0,5 μl διαλύτη και να τραβηχτεί ο διαλύτης ελαφρά μέσα στον κύλινδρο πριν από την πλήρωση με δείγμα. Το δείγμα επίσης αναρροφάται μέσα στον κύλινδρο, ώστε να αφήσει ένα κενό με αέρα κάτω από αυτό. Η βελόνα της σύριγγας μπορεί ακολούθως να εισαχθεί στον εισαγωγέα όπου και αφήνεται για 1-2 δευτερόλεπτα να ζεσταθεί πριν πιεστεί το έμβολο. Ακολούθως η σύριγγα απομακρύνεται αμέσως από το στόμιο έγχυσης [12].

3.2.2 Συστήματα έγχυσης

Υπάρχουν τέσσερα διαδεδομένα συστήματα έγχυσης του δείγματος στην αεριοχρωματογραφία τα οποία και θα περιγραφούν εκτενώς παρακάτω:

Έγχυση σε πληρωμένη στήλη

Η εισαγωγή γενικά διεξάγεται διαμέσου ενός επανασφραγίσιμου ελαστικού διαφράγματος (septum). Η είσοδος του εισαγωγέα διατηρείται στους 150-200°C, ανάλογα με την πτητικότητα του δείγματος, και η άμεση έγχυση 0,1- 10 μl του δείγματος γίνεται στην κεφαλή της στήλης. Η ποσότητα δείγματος που εισάγεται σε μία πληρωμένη στήλη είναι περίπου 1-2 μg ανά συστατικό. Η εισαγωγή σε πληρωμένη στήλη εμφανίζει λιγότερο πρόβλημα από την εισαγωγή δείγματος σε τριχοειδή στήλη, επειδή όλο το δείγμα εισάγεται στην πληρωμένη στήλη. Έτσι, αν και οι πληρωμένες στήλες δεν οδηγούν σε χρωματογραφία υψηλής διαχωριστικότητας, αυτό είναι το πλεονέκτημά τους. Στην εικόνα 3.2 φαίνεται ο τρόπος έγχυσης σε μία πληρωμένη στήλη [12,13].



Εικόνα 3.2 Έγχυση στην κεφαλή μίας πληρωμένης στήλης.

Έγχυση διαμοιρασμού/άνευ διαμοιρασμού

Αυτός ο τύπος εισαγωγέα χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τριχοειδή στήλη GC. Οι τριχοειδείς στήλες έχουν συνήθως εσωτερικές διαμέτρους μεταξύ 0,2 και 0,5 mm και μήκη μεταξύ 12 και 50 m. Η εισαγωγή λαμβάνει χώρα σε θερμαινόμενο ευθυγραμμιστή (liner) από γυαλί ή χαλαζία παρά απευθείας επί της στήλης.

Στο τύπο διαμοιρασμού, το δείγμα διαμοιράζεται σε δύο άνισα τμήματα, από τα οποία το μικρότερο εισάγεται στη στήλη. Οι λόγοι διαμοιρασμού κυμαίνονται μεταξύ 10:1 και 100:1, με το μεγαλύτερο τμήμα να αποβάλλεται μέσω της υψηλής ροής του διαμοιραστή. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται με πυκνά δείγματα. Στον τύπο άνευ διαμοιρασμού, όλο το δείγμα εισάγεται επί της στήλης και η βαλβίδα καθαρισμού του εισαγωγέα παραμένει κλειστή για 0,5-1 min μετά την έγχυση. Η δυσκολία που προκύπτει στην εισαγωγή με και άνευ διαμοιρασμού επί τριχοειδούς στήλης σχετίζεται με την επίτευξη καλής επαναληψιμότητας εισαγωγής. Απαιτείται προσοχή σε συγκεκριμένα σημεία:

1. Επειδή η εισαγωγή γίνεται σε υψηλές θερμοκρασίες σε μία είσοδο, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η έλλειψη επαναληψιμότητας που προκύπτει από τη διάσπαση κάποιων από τα συστατικά σε ένα μείγμα, πριν φτάσουν στη στήλη. Έτσι, είναι σημαντικό να διασφαλιστεί ότι το δείγμα έχει ελάχιστη

- επαφή με μεταλλικές επιφάνειες κατά τη διαδικασία εισαγωγής, καθώς αυτές μπορεί να καταλύσουν μία διάσπαση.
2. Αν χρησιμοποιείται εισαγωγή με διαμοιρασμό, πρέπει να ληφθεί φροντίδα ότι δεν υπάρχει διάκριση μεταξύ περισσότερο και λιγότερο πτητικών συστατικών σε ένα μείγμα, σχετικά με το τμήμα που χάνεται διαμέσου του εξαερισμού του διαμοιρασμού.
 3. Αν πραγματοποιηθεί έγχυση άνευ διαμοιρασμού, οι όγκοι πρέπει να διατηρηθούν κάτω από 2 μl στην περίπτωση που το δείγμα επανακάμπτει, εξαιτίας της ταχείας διαστολής του διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένο, είτε προς τις γραμμές παροχής του αερίου ή προς τις γραμμές καθαρισμού. Κάθε μl διαλύτη διαστέλλεται έντονα κατά την εξάτμισή του, όπως για παράδειγμα η μεθανόλη 0,66 mL/μl σε ατμοσφαιρική πίεση.
 4. Ακόμη και αν χρησιμοποιηθεί εσωτερικό πρότυπο για αντιστάθμιση των απωλειών, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η τυχαία διάκριση λόγω διαφορών, είτε στην πτητικότητα, είτε στη διάσπαση, σε σχέση με το δείγμα.
 5. Στο τύπο εισαγωγής άνευ διαμοιρασμού, το δείγμα πρέπει να παγιδευτεί αποδοτικά στην κεφαλή της στήλης. Για να συμβεί αυτό, πρέπει να είναι αρκούντως μη πτητικό, δηλαδή να έχει σημείο ζέσεως $>50^{\circ}\text{C}$ υψηλότερο από την αρχική θερμοκρασία της στήλης. Εάν το δείγμα είναι σχετικά πτητικό, πρέπει να εγχυθεί εντός της GC σε διαλύτη χαμηλής πτητικότητας, που θα συμπυκνωθεί στην κεφαλή της στήλης, παγιδεύοντας αποτελεσματικά το δείγμα.
 6. Η μεταφορά δείγματος μπορεί να είναι αργή, για αυτό είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη όταν καθορίζονται οι χρόνοι για τη βαλβίδα καθαρισμού. Για παράδειγμα για μία τυπική ροή ηλίου 1 mL/min διαμέσου μίας τριχοειδούς στήλης, απαιτείται περίπου 0,5 min για να μεταφερθεί εισαγόμενος όγκος 2 μL οξικού αιθυλεστέρα στη στήλη.
 7. Η πιστότητα των εκχύσεων βελτιώνεται σημαντικά με τη χρήση ενός αυτόματου δειγματολήπτη που θα πραγματοποιεί τις εκχύσεις, καθώς μπορεί να επιτύχει πολύ καλύτερη πιστότητα στη μέτρηση όγκων περίπου 1 μL, σε σχέση με τον ανθρώπινο χειρισμό [12,13].

Ψυχρή επί της στήλης έγχυση

Απευθείας έγχυση επί της στήλης σε τριχοειδή στήλη μπορεί να εκτελεστεί με έναν τρόπο ανάλογο της εισαγωγής σε πληρωμένη στήλη. Αυτή η τεχνική απαιτεί μία σύριγγα με μία πολύ λεπτή βελόνα τηγμένης πυριτίας. Η τεχνική αυτή έχει τα εξής πλεονεκτήματα:

- α) μειωμένη διάκριση μεταξύ των συστατικών των μειγμάτων,
- β) μη διάσπαση του δείγματος στο θερμό εισαγωγέα και
- γ) μη επανάκαμψη του δείγματος και επομένως ποσοτική μεταφορά του δείγματος.

Έχει επίσης, τα ακόλουθα μειονεκτήματα:

- α) τα δείγματα πρέπει να είναι καθαρά, διαφορετικά τα υπολείμματα θα εναποτεθούν επί της στήλης,
- β) ο εισαγωγέας είναι μηχανικά πολυπλοκότερος και απαιτεί περισσότερη συντήρηση από ένα σύστημα εισαγωγής με διάφραγμα και
- γ) η βελόνα της σύριγγας μπορεί να προξενήσει βλάβη στην κεφαλή της στήλης [12].

Θερμοπρογραμματιζόμενος εξατμιστήρας (PTV)

Ο προγραμματιζόμενος εισαγωγέας (PTV) είναι μία πρόσφατη καινοτομία. Αυτός ο τύπος εισαγωγέα σχεδιάστηκε για να επιτρέπει την εισαγωγή μεγάλων όγκων δείγματος επί τριχοειδών στηλών GC. Τυπικά εισάγονται 5-50 μL δείγματος, με τον εισαγωγέα να διατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία, π.χ. στους 30°C . Ο διαλύτης κατόπιν απομακρύνεται μέσω μίας βαλβίδας καθαρισμού με υψηλή ροή (π.χ. 100 mL/min για 1 min). Τα λιγότερο πτητικά συστατικά του δείγματος διατηρούνται στην πύλη εισαγωγής, ακολούθως η βαλβίδα καθαρισμού κλείνει και η θερμοκρασία του εισαγωγέα μεταβάλλεται ταχέως (π.χ. στους 300°C με 700°C/min). Αυτό είναι δυνατόν επειδή ο ευθυγραμμιστής είναι στενής διαμέτρου (1 mm) συγκρινόμενος με εκείνους σε άλλους τύπους εισαγωγέων και είναι φτιαγμένος από πυριτιοχάλυβα, ο οποίος παρέχει μία αδρανή επιφάνεια, αλλά άγει την θερμοκρασία πολύ ταχύτερα από το γυαλί. Το σημείο ζέσεως του συστατικού με το χαμηλότερο σημείο ζέσεως στο μείγμα πρέπει να είναι τουλάχιστον 100°C υψηλότερο από αυτό του διαλύτη για αυτόν τον εισαγωγέα, ώστε να λειτουργεί σωστά.

Αυτός ο εισαγωγέας παρέχει μία δυνατότητα για χρήση σε συνδυασμό με ταχεία αεριοχρωματογραφία. Η ταχεία GC χρησιμοποιεί την υψηλή απόδοση της τριχοειδούς GC χρησιμοποιώντας πολύ κοντές στήλες, ώστε οι διαχωρισμοί πολύπλοκων μειγμάτων να μπορούν να επιτευχθούν σε λιγότερο από 1 λεπτό [12].

3.2.3 Κλίβανος

Οι κλίβανοι περιλαμβάνουν έναν ανεμιστήρα, ο οποίος εξασφαλίζει ομοιόμορφη κατανομή της θερμότητας σε όλο τον κλίβανο. Μπορεί να προγραμματιστούν να παρέχουν μία σταθερή θερμοκρασία (ισοθερμικές συνθήκες) ή μία βαθμιαία αύξηση στη θερμοκρασία ή συνδυασμό. Οι ρυθμοί προγραμματισμού του κλιβάνου μπορούν να εκτείνονται από 1 °C/min έως και 40 °C/min. Πολύπλοκα προγράμματα θερμοκρασιών μπορούν να παραχθούν χρησιμοποιώντας μία σειρά μεταβολών θερμοκρασιών, διάσπαρτων ανάμεσα σε ισοθερμικές συνθήκες, για παράδειγμα 50 °C (2 min)/5 °C/min έως 100 °C(5 min)/10 °C/min έως 200 °C(5 min). Τα πλεονεκτήματα προγραμμάτων θερμοκρασίας είναι ότι ουσίες με πολύ διαφορετικές πτητικότητες μπορούν να διαχωριστούν σε ένα λογικό χρόνο και επίσης ότι η εισαγωγή του δείγματος μπορεί να γίνει σε χαμηλή θερμοκρασία, όπου θα παγιδευτεί στην κεφαλή της στήλης και ακολούθως η θερμοκρασία μπορεί να αυξηθεί μέχρι να εκλουστεί [12].

3.2.4 Στήλες

Οι στήλες στην αεριοχρωματογραφία χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις πληρωμένες (packed) στήλες και τις τριχοειδείς (capillary) στήλες, κάθε μία από τις οποίες θα περιγραφεί παρακάτω. Τα χαρακτηριστικά με βάση τα οποία γίνεται αξιολόγηση μίας στήλης για τη χρήση της στην αεριοχρωματογραφία είναι τα εξής:

- η διαχωριστική ικανότητά της, που είναι μέτρο του διαχωρισμού που μπορεί να επιτευχθεί,
- η διαφυγή υποβάθρου (bleed), που είναι μέτρο της σταθερότητάς της,
- η μέγιστη θερμοκρασία λειτουργίας, που είναι το μέτρο της σταθερότητας και του χρόνου ζωής της,

- η αδράνεια, που είναι μέτρο της επίδρασης στην ανάκτηση ενώσεων,
- η πολικότητα της στατικής φάσης, η οποία επιλέγεται με βάση τις εκάστοτε προσδιοριζόμενες ενώσεις και
- τα διάφορα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στήλης, όπως το μήκος, η εσωτερική διάμετρος και το πάχος στιβάδας της στατικής φάσης.

Όσον αφορά τις στατικές φάσεις με τις οποίες πληρώνονται οι στήλες που χρησιμοποιούνται στην αεριοχρωματογραφία χωρίζονται σε δύο ειδών με βάση το υλικό πλήρωσης.

Η πρώτη κατηγορία αφορά τις στήλες που έχουν πολυσιλοξάνιο ως στατική φάση. Το πολυσιλοξάνιο αποτελεί την πλέον συνηθισμένη στατική φάση καθώς είναι σταθερή, ανθεκτική και πολλαπλών χρήσεων. Το πολυσιλοξάνιο χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενα μονομερή. Κάθε άτομο συνδέεται με δύο δραστικές ομάδες, οι οποίες μπορεί να είναι μεθυλο-, κυανοπροπυλο-, τριφθοροπροπυλο- και φαινυλο-ομάδες. Η παρουσία φαινυλο-ομάδας στη στατική φάση πολυσιλοξανίου την καθιστά πιο σταθερή με αποτέλεσμα αυτή να διασπάται σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

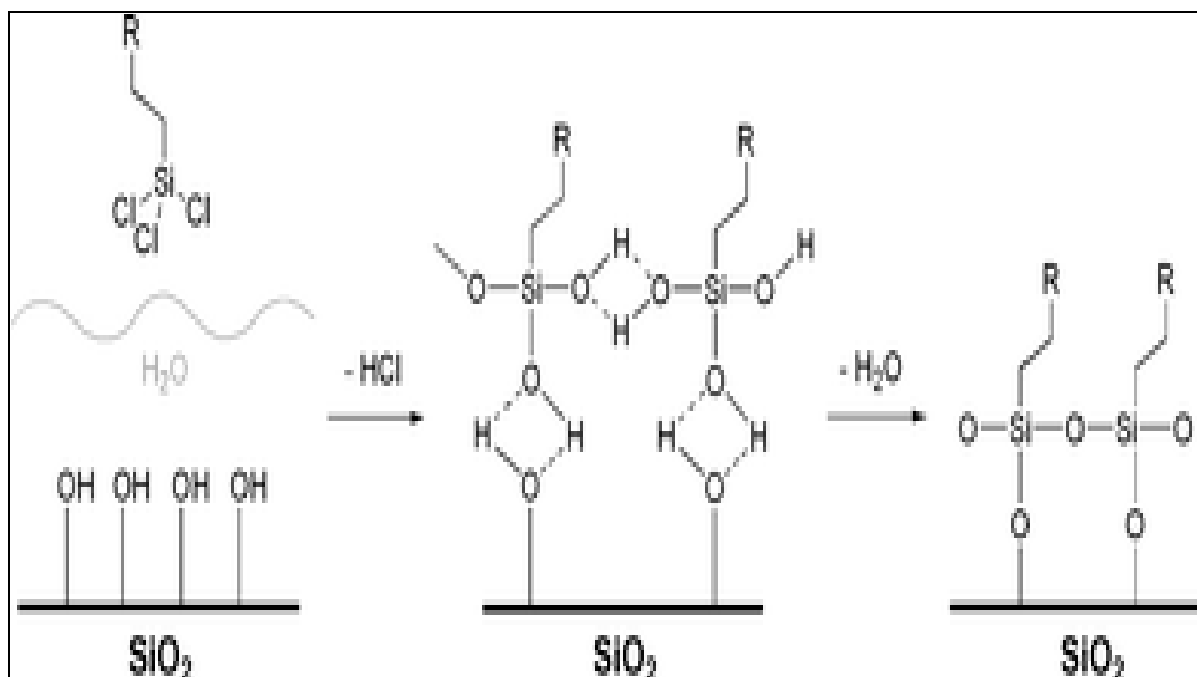
Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι στήλες που έχουν πολυαιθυλενογλυκόλη ως στατική φάση. Είναι και αυτή ευρέως χρησιμοποιούμενη στατική φάση, αν και λιγότερο ανθεκτική και με χαμηλότερο θερμοκρασιακό όριο από το πολυσιλοξάνιο, αλλά η διαχωριστική της ικανότητα την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη. Πρέπει να είναι υγρή υπό τις συνήθεις θερμοκρασίες οι οποίες χρησιμοποιούνται στην αεριοχρωματογραφία. Επιπλέον, έχει καλύτερη αναπαραγωγικότητα και αδράνεια από τις στατικές φάσεις πολυσιλοξανίου.

Γενικά, μία καλή στατική φάση πρέπει να χαρακτηρίζεται από μικρή πτητικότητα, να έχει υψηλό σημείο ζέσεως και να είναι χημικά αδρανής.

Πληρωμένες στήλες

Αυτού του είδους οι στήλες είναι συνήθως κατασκευασμένες από ύαλο που έχει σιλανοποιηθεί για να απομακρυνθούν οι πολικές ομάδες σιλανόλης (Si-OH) από την επιφάνειά του, καθώς αυτές μπορούν να οδηγήσουν σε εμφάνιση χρωματογραφικής ουράς σε κορυφές πολικών αναλυτών. Αυτές οι στήλες έχουν εσωτερικές διαμέτρους 2-5 mm. Οι στήλες πληρώνονται με σωματίδια στερεού

υποστρώματος που έχουν επικαλυφθεί με υγρή στατική φάση. Το πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα είναι η γη διατόμων, κυρίως από πυριτικό ασβέστιο. Αυτό το υλικό συνήθως πλένεται με οξύ για την απομάκρυνση ορυκτών προσμίξεων και κατόπιν σιλανοποιείται όπως φαίνεται στο σχήμα 3.1 για την απομάκρυνση των πολικών ομάδων Si-OH από την επιφάνεια του υποστρώματος, που μπορεί να οδηγήσει σε χρωματογραφική ουρά στην κορυφή του εκάστοτε αναλύτη.



Σχήμα 3.1 Σιλανοποίηση των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης.

Το υπόστρωμα μπορεί ακολούθως να επικαλυφθεί μηχανικά με μία ποικιλία υγρών στατικών φάσεων. Η πλέον χρησιμοποιούμενη κινητή φάση σε πληρωμένες στήλες GC είναι το άζωτο με ροή περίπου 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Οι πληρωμένες στήλες GC παρέχουν ένα σχετικά χαμηλού βαθμού διαχωρισμό, συγκρινόμενες με την τριχοειδή GC, τυπικά 4000-6000 θεωρητικές πλάκες για μία στήλη 2 m, σύγκριση με τις >100000 θεωρητικές πλάκες για μία τριχοειδή στήλη 25 m. Το άνω όριο θερμοκρασίας των πληρωμένων στηλών είναι περίπου 280 $^{\circ}\text{C}$, πέραν αυτής της θερμοκρασίας η υγρή στατική φάση εξατμίζεται με ρυθμό που δημιουργεί μεγάλο σήμα υποβάθρου. Ωστόσο, για πολλές δοκιμασίες ρουτίνας ελέγχου ποιότητας είναι αρκετά κατάλληλη.

Τριχοειδής στήλες

Οι τριχοειδείς στήλες είναι κατασκευασμένες από τηγμένη πυριτία, συνήθως επικαλυμμένη στο εξωτερικό με πολυαμίδιο για να δίνει στη στήλη κάποιο βαθμό ευκαμψίας. Επικάλυψη του εξωτερικού έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για εργασία σε υψηλές θερμοκρασίες (>400 °C). Η εσωτερική διάμετρος των στηλών κυμαίνεται μεταξύ 0,15 και 0,5 mm. Το τοίχωμα της στήλης καλύπτεται με μία υγρή στατική, η οποία μπορεί να έχει ένα πάχος μεταξύ 0,1 και 5 μm. Ο πλέον κοινός τύπος επικάλυψης βασίζεται σε οργανοπυριτικά πολυμερή, τα οποία είναι χημικά συνδεδεμένα στις ομάδες σιλανόλης του τοιχώματος της στήλης και οι αλυσίδες των πολυμερών αυτών είναι περαιτέρω σταυροδεσμευμένες.

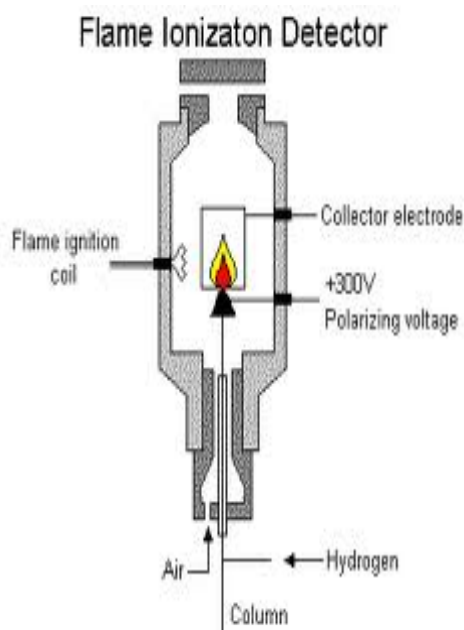
Αυτά τα είδη φάσεων έχουν αντικαταστήσει σε μεγάλο βαθμό τις στήλες ανοιχτού σωλήνα με επικάλυψη τοιχωμάτων (WCOT) και τις στήλες ανοιχτού σωλήνα με επικάλυψη υποστρώματος (SCOT) για τις περισσότερες εφαρμογές ρουτίνας. Οι στήλες SCOT απαντώνται μερικές φορές σε αναλύσεις που απαιτούν πολύ υψηλές θερμοκρασίες. Οι συνδεδεμένες με το τοίχωμα φάσεις είναι σταθερές τουλάχιστον έως τους 325 °C και μερικά είδη επικάλυψης αντέχουν και θερμοκρασίες 370 °C. Τα πολυμερή μη βασισμένα στη σιλικόνη, όπως η πολυαιθυλενογλυκόλη (carbowax), δεν μπορούν να συνδεθούν στο τοίχωμα της στήλης με τον ίδιο τρόπο και οι στήλες με αυτές τις επικαλύψεις είναι λιγότερο σταθερές στη θερμοκρασία. Για παράδειγμα, το όριο θερμοκρασίας για μία τριχοειδή στήλη πολυαιθυλενογλυκόλης είναι περίπου 240 °C.

Το πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενο φέρον αέριο στην τριχοειδή GC είναι το ήλιο και οι ροές που χρησιμοποιούνται είναι μεταξύ 0,5 και 2 mL/min. Επειδή η ταχύτητα ροής στο τέλος της τριχοειδούς στήλης είναι χαμηλή σε σχέση με τον εσωτερικό χώρο μερικών ανιχνευτών, πρέπει να προστεθεί συμπληρωματικό αέριο στην ροή του αερίου μετά τη στήλη, ώστε να παρασύρεται το δείγμα μέσα στον εσωτερικό όγκο του ανιχνευτή με μία λογική ταχύτητα. Συνήθως, περίπου 100 ng ανά συστατικό φορτώνεται σε μία τριχοειδή στήλη [12,14].

3.2.5 Ανιχνευτές

Υπάρχουν πολλοί διαθέσιμοι ανιχνευτές GC, αν και ο ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας παραμένει ο πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενος και εφαρμόσιμος στον έλεγχο ποιότητας των φαρμακευτικών προϊόντων. Ωστόσο, νεώτεροι ανιχνευτές, όπως ο ανιχνευτής εκπομπής πλάσματος για ανάλυση ιχνών προσμίξεων ή ο ανιχνευτής GC-FTIR για το χαρακτηρισμό δομής των συστατικών σε μείγματα, καθίστανται ολοένα και πιο σημαντικοί. Η εκλεκτικότητα σε ένα ανιχνευτή είναι πολύ σημαντικό ζητούμενο για ευαίσθητες βιοαναλυτικές μεθόδους, όπου ιχνοποσότητες ενώσεων αναλύονται παρουσία παρεμποδιστών, οι οποίοι είναι παρόντες στη μήτρα του δείγματος. Οι ιδιότητες μερικών από τους συχνότερα χρησιμοποιούμενους ανιχνευτές παρουσιάζονται παρακάτω [12].

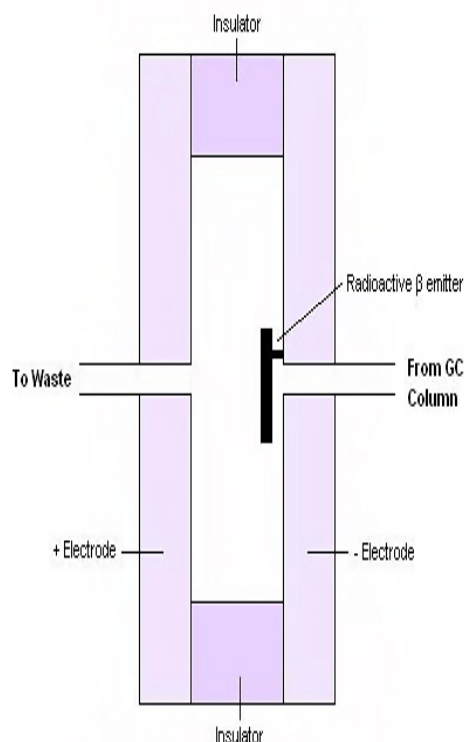
Ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας (FID)



Εικόνα 3.3 Ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας (FID).

Στον ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας οι ενώσεις καίγονται στη φλόγα παράγοντας ιόντα και έτσι μία αύξηση του ρεύματος μεταξύ του πίδακα και του συλλέκτη. Ανιχνεύει ενώσεις που περιέχουν άνθρακα και υδρογόνο. Είναι μη ευαίσθητος ανιχνευτής σε άτομα άνθρακα συνδεδεμένα με οξυγόνο, άζωτο ή χλώριο. Σε συνδυασμό με τριχοειδή GC μπορεί να ανιχνεύσει έως και 100 pg- 10 ng.

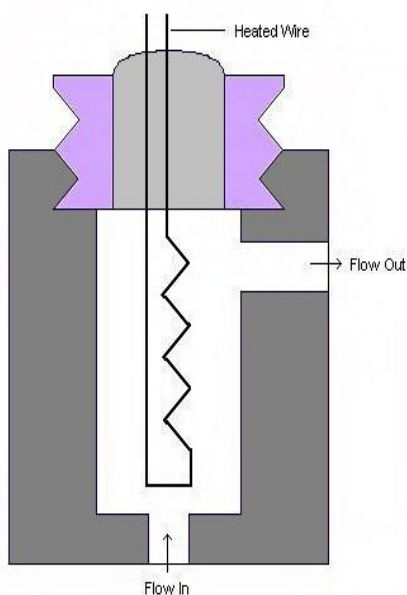
Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD)



Εικόνα 3.4 Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD).

Σε αυτόν τον ανιχνευτή ηλεκτρονιόφιλες ενώσεις εισέρχονται στον ανιχνευτή και συλλαμβάνουν τα ηλεκτρόνια που παράγονται από τη ραδιενεργή πηγή και έτσι μειώνουν το ρεύμα στο συλλέκτη. Πολυαλογονωμένες ενώσεις μπορούν να ανιχνευτούν στα επίπεδα των 50 pg. Έχει μεγάλο εσωτερικό όγκο και επομένως μπορεί να χαθεί κάποιος χρωματογραφικός διαχωρισμός. Χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάλυση φαρμάκων σε σωματικά υγρά. Έχει ευρεία εφαρμογή στην περιβαλλοντική παρακολούθηση, για παράδειγμα προσδιορισμό χλωροφθορανθράκων στην ατμόσφαιρα.

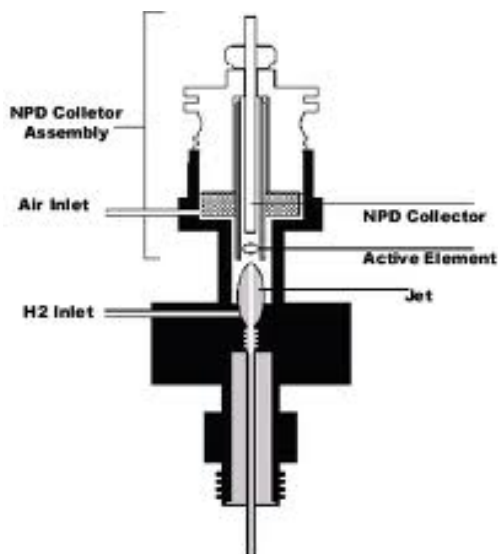
Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD)



Εικόνα 3.5 Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD).

Αυτός ο ανιχνευτής αποκρίνεται στο φαινόμενο ψύξης από αναλύτη διερχόμενο πάνω από θερμαινόμενο νήμα. Είναι σχετικά μη ευαίσθητος σε οργανικές ενώσεις σε σχέση με τον FID. Είναι γενικός ανιχνευτής, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό υδρατμών. Είναι επίσης μη καταστρεπτικός, έτσι οι αναλύτες μπορούν να συλλεχθούν μετά την ανίχνευση, εάν απαιτείται αυτό. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της χρήσης του αποτελεί ο προσδιορισμός ύδατος σε πεπτιδία.

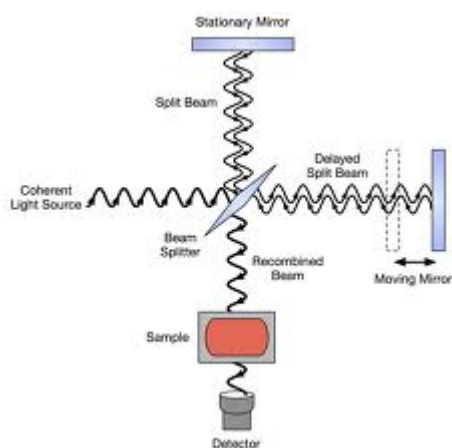
Ανιχνευτής αζώτου φωσφόρου (NPD)



Ενώσεις που περιέχουν άζωτο και φώσφορο αντιδρούν με αλκαλιμέταλλο (Rb ή Cs) παρουσία H₂ στον ανιχνευτή για να παράγουν είδη, όπως CN⁻, διάφορα ανιόντα φωσφόρου ή ηλεκτρόνια, εκ των οποίων όλα παράγουν αύξηση στο ρεύμα που δημιουργεί το σήμα. Ανιχνεύει ενώσεις που περιέχουν φώσφορο σε επίπεδο pg και αζωτούχες ενώσεις σε επίπεδο ng. Έχει υψηλή εκλεκτικότητα για ενώσεις που περιέχουν άζωτο και φώσφορο.

Εικόνα 3.6 Ανιχνευτής αζώτου φωσφόρου (NPD).

Ανιχνευτής υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier



Αυτός ο ανιχνευτής είναι ουσιαστικά ένα όργανο FT-IR συνδεδεμένο με GC, επιτρέποντας έτσι τη λήψη φασμάτων IR ενώσεων που εκλύονται από στήλη GC. Πλέον χρήσιμος για τη διερεύνηση δομής παρά για ποσοτικές μελέτες. Ο ανιχνευτής είναι ευαίσθητος σε επίπεδα 10 ng. Χρησιμοποιείται ως εργαλείο για ταυτοποίηση ενώσεων.

Εικόνα 3.7 Ανιχνευτής υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier.

3.3 Παράμετροι απόδοσης αεριοχρωματογραφίας

Η απόδοση των διαχωρισμών στην αεριοχρωματογραφία επηρεάζεται σημαντικά από την ρύθμιση των επιμέρους παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία και το μήκος της στήλης, το πάχος του υμενίου φόρτωσης στατικής φάσης, η εσωτερική

διάμετρο της στήλης και ο τύπος και η ροή του φέροντος αερίου. Κατά την ανάπτυξη μίας νέας αναλυτικής μεθόδου χρειάζεται προσεκτική μελέτη όλων των παραμέτρων και προσαρμογή τους στη συγκεκριμένη ανάλυση ώστε με την κατάλληλη ρύθμισή τους να επιτευχθεί η βέλτιστη απόδοση.

Θερμοκρασία στήλης

Καθώς η θερμοκρασία της στήλης αυξάνεται, ο βαθμός διαχωρισμού μεταξύ δύο συστατικών μειώνεται, επειδή ο βαθμός αλληλεπίδρασης με τη στατική φάση μειώνεται. Αυτό συμβαίνει επειδή η τάση ατμών των αναλυτών αυξάνει. Χαμηλότερες θερμοκρασίες παρέχουν καλύτερο διαχωρισμό.

Μήκος στήλης

Η διαχωριστική ικανότητα μίας στήλης μεταβάλλεται με την τετραγωνική ρίζα του μήκους της. Έτσι, αν απαιτείται διπλασιασμός στη διαχωριστικότητα θα πρέπει να τετραπλασιασθεί το μήκος της στήλης και αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα τον τετραπλασιασμό του χρόνου ανάλυσης. Η αυξημένη διαχωριστικότητα που παρέχεται από το μήκος, μπορεί συχνά να αντικατασταθεί με μείωση της θερμοκρασίας, εξασφαλίζοντας ότι λαμβάνει χώρα ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τη στατική φάση, ειδικά αν η στατική φάση έχει χαρακτηριστικά που της επιτρέπουν να επιλέγει τον έναν αναλύτη περισσότερο από τον άλλο.

Πάχος υμενίου φόρτωσης στατικής φάσης

Όσο μεγαλύτερος είναι ο όγκος της στατικής φάσης, τόσο περισσότερο η διαλυμένη ουσία θα κατανέμεται εντός αυτής. Αν το πάχος του υμενίου ή η φόρτωση της στατικής φάσης διπλασιαστεί, τότε η συγκράτηση ενός αναλύτη διπλασιάζεται. Έτσι, παχύτερα υμένια χρησιμοποιούνται για πολύ πτητικά συστατικά, για να αυξηθεί ο χρόνος ανάσχεσής τους και ο διαχωρισμός μεταξύ των αναλυτών, χωρίς να αυξηθεί το μήκος της στήλης.

Εσωτερική διάμετρος στήλης

Όσο μικρότερη είναι η εσωτερική διάμετρος μίας τριχοειδούς στήλης, τόσο περισσότερο αποδοτική είναι η στήλη για δεδομένο πάχος υμενίου της στατικής φάσης στο τοίχωμα της στήλης. Αυτό συμβαίνει επειδή τα χαρακτηριστικά μεταφοράς μάζας της στήλης βελτιώνονται, με τον αναλύτη να μπορεί να διαχέεται εντός και εκτός της κινητής φάσης πιο συχνά, εξαιτίας της μικρότερης απόστασης για εγκάρσια διάχυση.

Τύπος και ροή φέροντος αερίου

Σύμφωνα με την εξίσωση Van Deemter, το υδρογόνο και το ήλιο δίνουν υψηλότερες αποδόσεις σε υψηλές ροές, σε σύγκριση με το άζωτο. Για πρακτικούς χρόνους ανάλυσης οι τυπικές ροές για το υδρογόνο ή το ήλιο κυμαίνονται από 30 έως 50 cm/s, ενώ το άζωτο έχει βέλτιστη ροή στα 10 έως 20 cm/s. Η ροή του αερίου ελαττώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και αυτό μπορεί να έχει μία επίδραση στην απόδοση της στήλης. Τα σύγχρονα όργανα έχουν προγράμματα ροής έτσι, ώστε η ροή να ρυθμίζεται να διατηρείται σταθερή, καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται [12].

3.4 Παραγωγοποίηση στην αεριοχρωματογραφία

Η παραγωγοποίηση αποτελεί πολύ συχνά ένα απαραίτητο στάδιο που απαιτείται ώστε να πραγματοποιηθεί μία ανάλυση με αεριοχρωματογραφία. Γενικά, η παραγωγοποίηση είναι αναγκαία όταν μία ένωση είναι υψηλής πολικότητας, ώστε να μπορεί να επιτευχθεί μία καλή μορφή χρωματογραφικής κορυφής. Ακόμα, πολλές φορές χρειάζεται το στάδιο παραγωγοποίησης για να καταστεί η προσδιοριζόμενη ουσία αρκούτσως πτητική ώστε να πραγματοποιηθεί ικανοποιητική χρωματογραφική ανάλυση.

Η πιο δημοφιλής τάξη αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης είναι οι παράγοντες σιλανοποίησης. Αυτά τα αντιδραστήρια εισάγουν υπολείμματα στο

δείγμα, αν και αυτό δεν είναι μεγάλο πρόβλημα εφόσον ο αναλύτης είναι σχετικά μη πτητικός [12].

3.5 Ποσοτικοποίηση στην αεριοχρωματογραφία

Στην ποσοτική αεριοχρωματογραφική ανάλυση που χρησιμοποιούνται τριχοειδείς στήλες, η εισαγωγή καθορισμένων όγκων δείγματος δεν μπορεί να επιτευχθεί εύκολα με την απαιτούμενη πιστότητα εφαρμόζοντας την κλασική μέθοδο της εισαγωγής με μικροσύριγγα. Έτσι δεν υφίσταται καλή αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων, λόγω των μικρών όγκων δείγματος που μπορούν να εισαχθούν στις τριχοειδείς στήλες και λόγω του ότι αυτοί οι μικροί όγκοι είναι απαραίτητοι για να παραχθούν αναλυτικά σήματα τα οποία να προσαρμόζονται στη γραμμική δυναμική περιοχή του συστήματος ανίχνευσης. Για να γίνει όμως άμεση ποσοτικοποίηση του αναλυτικού σήματος με απευθείας βαθμονόμηση του συστήματος είναι απαραίτητο να υπάρχει καλή επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων.

Τα περισσότερα υγρά δείγματα που εισάγονται με μικροσύριγγες έχουν όγκους μεταξύ 1 και 10 μL . Όποιος τρόπος εισαγωγής δείγματος και να χρησιμοποιηθεί η πραγματική σύνθεση του δείγματος συχνά παραποιείται με αποτέλεσμα λανθασμένα ποσοτικά δεδομένα ανάλυσης. Αυτό συμβαίνει όταν στο δείγμα υπάρχουν ενώσεις με μεγάλο εύρος πτητικοτήτων και όταν, επίσης, σημαντικός αριθμός αυτών των ενώσεων παθαίνει θερμική αποσύνδεση. Οι ενώσεις που δεν μπορούν να καταστούν πτητικές στον εισαγωγέα ή μέσα στη στήλη δεν εμφανίζουν ασφαλώς σήμα στον ανιχνευτή. Τέτοια σφάλματα μπορούν να διορθωθούν ώστε να καταστεί αξιόπιστη η ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο της εσωτερικής κανονικοποίησης ή με τη μέθοδο χρήσης εσωτερικού προτύπου [15].

3.5.1 Μέθοδος εσωτερικής κανονικοποίησης

Η διαδικασία της ποσοτικοποίησης με τη μέθοδο της εσωτερικής κανονικοποίησης συχνά χρησιμοποιείται ως αναλυτική πρακτική, αλλά μόνο σε ημιποσοτικές αναλύσεις. Αυτή η μέθοδος δεν απαιτεί γνώση της ακριβούς ποσότητας δείγματος που εισέρχεται στο σύστημα ώστε να γίνει ποσοτικοποίηση.

Στη μέθοδο της εσωτερικής κανονικοποίησης το σύνολο των ποσοτήτων της κάθε ένωσης του δείγματος προσδιορίζεται σε σχέση με το εμβαδόν όλων χρωματογραφικών κορυφών. Από τις αναλογίες των εμβαδών του κάθε συστατικού με το συνολικό εμβαδόν όλων των συστατικών του δείγματος βρίσκεται η επί τοις εκατό σύσταση του δείγματος. Οι αναλογίες των εμβαδών των κορυφών μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωρίς τη χρήση συντελεστών διόρθωσης εάν η απόκριση από τα συστατικά του μείγματος μπορεί να θεωρηθεί παρόμοια, όπως για παράδειγμα μπορεί να γίνει με μείγμα συστατικών τα οποία είναι μέλη της ίδιας χημικής ομάδας. Σε διαφορετική περίπτωση πρέπει να είναι γνωστή η τιμή του συντελεστή διόρθωσης για κάθε συστατικό.

Όπως γίνεται φανερό η μέθοδος της εσωτερικής κανονικοποίησης απαιτεί τη μέτρηση των εμβαδών των κορυφών όλων των συστατικών στο χρωματογράφημα. Αυτή η μέθοδος είναι πολύ χρήσιμη για τον προσδιορισμό των σχετικών συγκεντρώσεων μίας ποικιλίας συστατικών από το χρωματογράφημα, αν και οι απόλυτα ακριβείς συγκεντρώσεις των συστατικών του δείγματος παραμένει άγνωστη.

3.5.2 Μέθοδος εσωτερικού προτύπου

Αυτή η μέθοδος είναι η πιο χρήσιμη στην ποσοτική αεριοχρωματογραφική ανάλυση διότι παρέχει δεδομένα υψηλής πιστότητας και ακρίβειας για τα συστατικά ακόμα και πολύπλοκων δειγμάτων. Η αξιολόγηση όλων των κορυφών σε ένα χρωματογράφημα δεν είναι απαραίτητη και γίνεται προσδιορισμός των συγκεντρώσεων ενός ή μερικών συστατικών του δείγματος.

Η εκτέλεση της μεθόδου γίνεται με το τρόπο που παρουσιάζεται παρακάτω. Ένα εσωτερικό πρότυπο προστίθεται στο διάλυμα του αγνώστου δείγματος με μία ακριβώς γνωστή συγκέντρωση, η οποία προσδιορίζεται με ζύγιση. Σε ένα δεύτερο διάλυμα περιέχονται ποσότητες του προτύπου και του εσωτερικού προτύπου γνωστών συγκεντρώσεων και αυτές προσδιορίζονται με ζύγιση. Από αυτό το δεύτερο διάλυμα υπολογίζεται ο συντελεστής απόκρισης. Έτσι, επιστρέφοντας στο άγνωστο δείγμα μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση του αναλύτη. Το εσωτερικό πρότυπο επιλέγεται σύμφωνα με τα κριτήρια που παρατίθενται ακολούθως:

- Ο συντελεστής απόκρισης του εσωτερικού προτύπου πρέπει να είναι γνωστός.
- Η κορυφή του εσωτερικού προτύπου πρέπει να εντοπίζεται σε περιοχή του χρωματογραφήματος όπου δεν παρεμποδίζεται από τις κορυφές των άλλων συστατικών.
- Το προσδιοριζόμενο συστατικό και το εσωτερικό πρότυπο πρέπει να έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες, για παράδειγμα δεν θα πρέπει να διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά την πτητικότητα ή την πολικότητα [15].

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4°

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Σε αυτό το κεφάλαιο θα παρατίθενται τα όργανα και τα αντιδραστήρια, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

4.1 Σύστημα GC

Χρησιμοποιήθηκε σύστημα της εταιρίας Shimadzu τύπου GC 2010 με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (FID) και τα παρακάτω παρελκόμενα.

Φιάλες αερίων

Ως αέριο καύσης για τη φλόγα χρησιμοποιήθηκε μίγμα H₂ και O₂ –N₂ και ως φέρον αέριο (κινητή φάση) χρησιμοποιήθηκε το αδρανές αέριο He.

Αυτόματος δειγματολήπτης

Χρησιμοποιήθηκε αυτόματος δειγματολήπτης 6 θέσεων της εταιρίας Shimadzu, το μοντέλο AOC-20i.

Στήλη

Χρησιμοποιήθηκε η τριχοειδής στήλη MEGA-5HT της εταιρίας MEGA, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 mm και μήκους 30 m, με μέγιστη θερμοκρασίας αντοχής

τους 350 °C. Η στατική φάση είναι πολυσιλοξάνιο, μία μη πολική στατική φάση, η οποία είναι και η πλέον διαδεδομένη για τις στήλες της GC.

Ηλεκτρονικός υπολογιστής

Η επεξεργασία και η καταγραφή των πειραματικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος συνδεόταν με το υπόλοιπο σύστημα. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το GC Solution της εταιρίας Shimadzu.

Για κάθε χρωματογράφημα είναι δυνατό να παρέχονται στο χρήστη πληροφορίες σχετικά με το χρόνο ανάσχεσης, το εμβαδόν και το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής, τη διαχωριστική ικανότητα και κάποιες άλλες πληροφορίες. Το σύστημα έχει επίσης τη δυνατότητα ολοκλήρωσης των χρωματογραφικών κορυφών αυτόματα, ανάλογα με τις εντολές που έχει λάβει από τον αναλυτή.

4.2 Φίλτρα διήθησης

Για την διήθηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα διήθησης Chromafil RC-45 με μέγεθος πόρων 0,45 μm από αναγεννημένη κυτταρίνη.

4.3 Αναλυτικός ζυγός

Για τις ζυγίσεις χρησιμοποιήθηκε ο ζυγός τύπου AUW 320 της εταιρίας Shimadzu με ακρίβεια ανάγνωσης 4 δεκαδικών ψηφίων και εύρος ζυγίσεων 10 mg έως 500 g.

4.4 Διαλύτες – Αντιδραστήρια

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι παρακάτω:

- Εξάνιο (C_6H_{14}) καθαρότητας HPLC της εταιρίας SIGMA-ALDRICH
- Αιθανόλη (C_2H_5OH) καθαρότητας 99% της εταιρίας Fisher Chemical
- Μεθανόλη (CH_3OH) καθαρότητας HPLC της εταιρίας Fisher Chemical
- Ακετόνη ($(CH_3)_2CO$) της εταιρίας Fisher Chemical
- Διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2) της εταιρίας LAB-SCAN
- Οξικό οξύ (CH_3COOH) της εταιρίας SIGMA-ALDRICH
- Οξικός αιθυλεστέρας ($CH_3COOC_2H_5$) της εταιρίας Fisher Chemical

4.5 Πρότυπες ουσίες

Ως πρότυπα για τη στερεή παραφίνη χρησιμοποιήθηκαν το VASELINE CODEX P23 με LOT No 10A2104 και το SYNTADEX SA με LOT No 09E13V02 αμφότερα της εταιρίας AIGLON SAS. Αυτή η πρότυπη ουσία, η οποία είναι μείγμα στερεών υδρογονανθράκων, έχει παρασκευαστεί έτσι ώστε να πληροί τις απαιτήσεις καθαρότητας της φαρμακοποιίας και η περιεκτικότητά του είναι 100% σε αλκάνια ευθείας αλυσίδας. Είναι λευκού χρώματος και άοσμο.

Για την υγρή παραφίνη χρησιμοποιήθηκε το Primol 352 με LOT SU9210 της εταιρίας ExxonMobil. Αυτή η πρότυπη ουσία είναι ένα καθαρό μείγμα υγρών υδρογονανθράκων και είναι άοσμο και άχρωμο. Έχει παρασκευαστεί και αυτό έτσι, ώστε να πληροί τις απαιτήσεις καθαρότητας της φαρμακοποιίας και η τυπική περιεκτικότητά του είναι 66% σε αλκάνια ευθείας αλυσίδας και 34% σε κυκλοαλκάνια [16].

4.6 Έκδοχα

Για την παρασκευή των placebo, δηλαδή των δειγμάτων που περιέχουν όλες τις ουσίες εκτός από την δραστική, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω έκδοχα: glycerol, silicone oil, glycerol monostearate, stearic acid, polydimethylcyclosiloxane, macrogol 600, triethanolamine, water, parahydroxy benzoate propyl

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

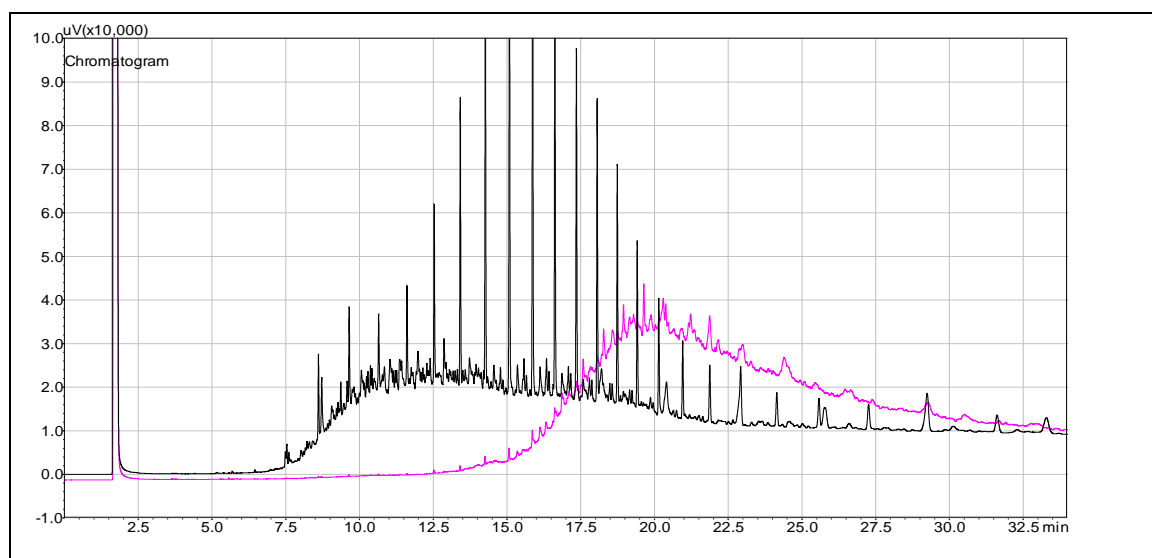
5.1 Εισαγωγή

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη, η βελτιστοποίηση και η επικύρωση μίας μεθόδου για τον προσδιορισμό της στερεής (solid) και της υγρής (liquid) παραφίνης σε κρέμα και τον όσο δυνατό καλύτερο διαχωρισμό αυτών.

5.2 Ανάπτυξη μεθόδου

Εξ'αρχής μελετώντας τις εργασίες που διεθνώς έχουν γίνει για τον προσδιορισμό των παραφινών βγήκε το συμπέρασμα ότι θα έπρεπε να χρησιμοποιηθεί θερμοπρογραμματιζόμενη έκλουση και όχι κάποιο ισόθερμο πρόγραμμα, λόγω του πλήθους των ενώσεων και της πολυπλοκότητας των δειγμάτων. Σε αυτό έπαιξε ρόλο και το γεγονός ότι ο ανιχνευτής FID δεν παρουσιάζει εκλεκτικότητα μεταξύ αλκανίων, κυκλοαλκανίων και των ισομερών τους [17-21].

Σε ένα πρώτο στάδιο μελετήθηκε η συμπεριφορά των προτύπων της στερεής και της υγρής παραφίνης σε ένα τυπικό θερμοκρασιακό πρόγραμμα (A) με διαλύτη εξάνιο (σχήμα 5.1).



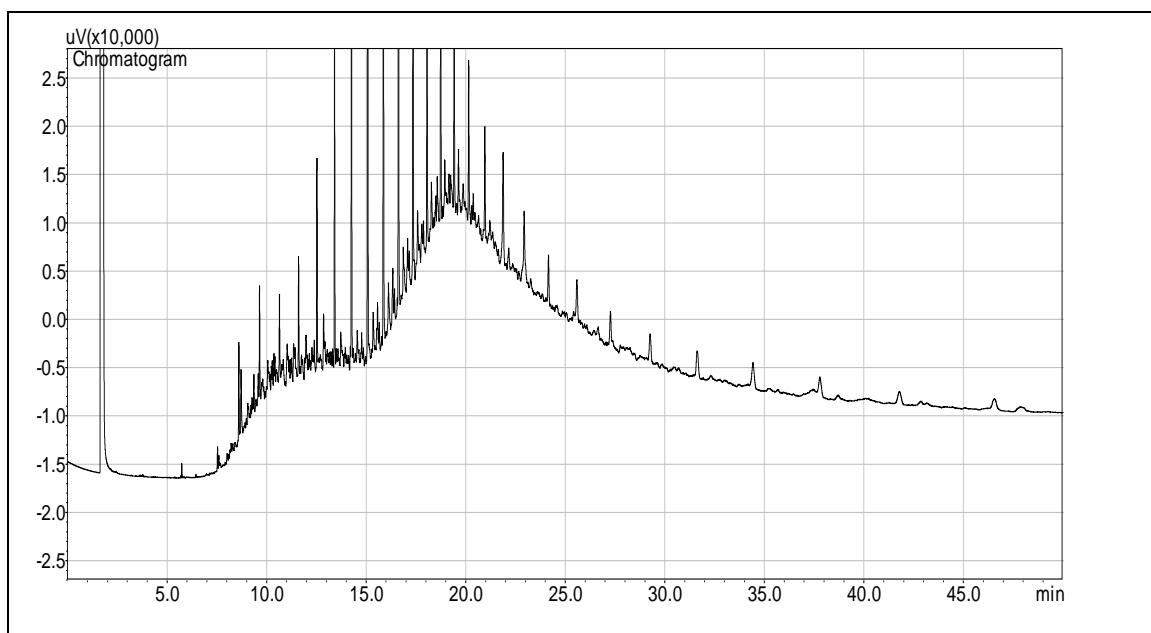
Σχήμα 5.1. Αεροχρωματογραφική ανάλυση στερεής και υγρής παραφίνης.

Solid 5000 ppm —
Liquid 5000 ppm —

διαλύτης
εξάνιο

Θερμοκρασιακό πρόγραμμα A
150 °C (2 min) → 10 °C/min → 320 °C (26 min)

Όπως φαίνεται από το σχήμα 5.1 το θερμοκρασιακό πρόγραμμα θα είναι ένας από τους παράγοντες προς βελτιστοποίηση αν και ο πλήρης διαχωρισμός της στερεής και της υγρής παραφίνης θα ήταν αδύνατος. Εκτός από το πλήθος των ενώσεων, ένας επιπλέον ανασταλτικός παράγοντας για την κοινή ανάλυση της στερεής και της υγρής παραφίνης στο ίδιο δείγμα είναι η διαφορετική διαλυτότητα που παρουσιάζουν στους διάφορους διαλύτες με αποτέλεσμα να μην μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάποιος κοινός διαλύτης και για τα δύο είδη παραφίνης. Προς επιβεβαίωση των παραπάνω παρατείνεται και ένα χρωματογράφημα της ολικής παραφίνης σε εξάνιο (σχήμα 5.2).



Σχήμα 5.2. Αεροχρωματογράφημα μείγματος στερεής και υγρής παραφίνης.
διαλύτης: εξάνιο, θερμοκρασιακό πρόγραμμα A: 150 °C (2 min) → 10 °C/min → 320 °C (26 min)

Τελικά, βγήκε το συμπέρασμα ότι θα ήταν προτιμότερο να αναπτυχθούν δύο μέθοδοι, μία για τον προσδιορισμό της στερεής παραφίνης και μία για τον προσδιορισμό της υγρής παραφίνης εισάγοντας επιπλέον έναν παράγοντα εκλεκτικότητας. Αυτός ο παράγοντας εκλεκτικότητας είναι ο διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί, για την παραλαβή των ουσιών ώστε για κάθε είδος παραφίνης να βρεθεί ο καταλληλότερος διαλύτης με βάση την πολικότητά του και με συνέπεια και τη συγγένειά του ως προς την εκάστοτε παραφίνη.

5.3 Βελτιστοποίηση μεθόδου

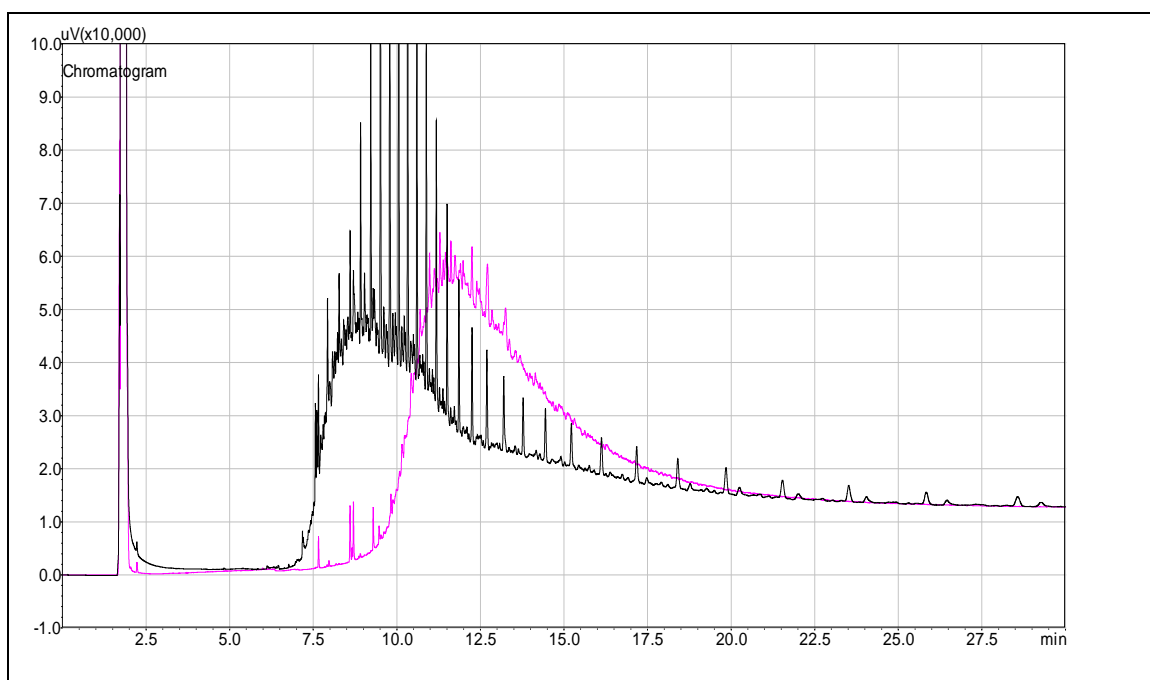
Η βελτιστοποίηση επικεντρώθηκε στην εύρεση του ιδανικότερου θερμοκρασιακού προγράμματος με στόχο τον καλύτερο δυνατό διαχωρισμό των δύο ειδών της παραφίνης και στη συνέχεια στην επιλογή των καλύτερων διαλυτών, ώστε να προκύψουν οι δύο ανεξάρτητες μέθοδοι. Τελικά, αφού προέκυψαν οι δύο μέθοδοι έγινε προσπάθεια να βρεθεί η βέλτιστη περιοχή συγκεντρώσεων ώστε να υπάρχει η ελάχιστη παρεμπόδιση του ενός είδους παραφίνης στο άλλο.

5.3.1 Τεχνική βελτιστοποίησης

Για την εύρεση των βέλτιστων παραγόντων, που στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι το θερμοκρασιακό πρόγραμμα και ο διαλύτης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διαδοχικής μεταβολής ενός παράγοντα (εδάφιο 2.2.1). Το ένα μειονέκτημα αυτής της τεχνικής, το οποίο είναι ο μεγάλος αριθμός πειραμάτων, όντως προέκυψε κατά την πορεία της βελτιστοποίησης. Όσον αφορά το δεύτερο μειονέκτημα, το οποίο είναι οι τυχόν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραμέτρων, στην παρούσα εργασία δεν υφίσταται, καθώς οι εξεταζόμενες παράμετροι, δηλαδή το θερμοκρασιακό πρόγραμμα και οι διαλύτες, είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους. Έτσι η εύρεση της κορυφής της επιφάνειας απόκρισης, η οποία ήταν ο καλύτερος διαχωρισμός στερεής και υγρής παραφίνης, ήταν μία σχετικά εύκολη διαδικασία.

5.3.2 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα

Αρχικά, διατηρώντας ως διαλύτη εργασίας και για τα δύο είδη παραφίνης το εξάνιο έγινε πλήθος δοκιμών ώστε να βρεθεί το βέλτιστο θερμοκρασιακό πρόγραμμα. Παρακάτω παρατίθενται τα χρωματογραφήματα από τα τέσσερα είδη θερμοκρασιακών προγραμμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, καθένα από τα οποία είχε στοχευμένες αλλαγές στις μεταβλητές που επηρεάζουν την ποιότητα των διαχωρισμών. Σε όλες τις περιπτώσεις η συγκέντρωση και των δύο ειδών παραφίνης ήταν 5000 ppm.

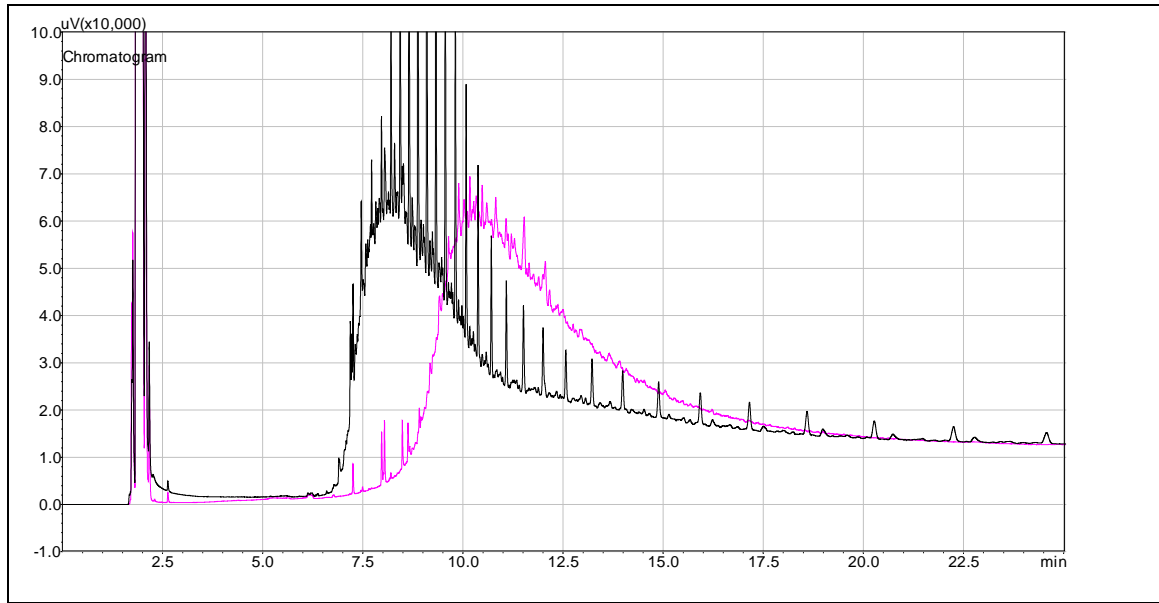


Σχήμα 5.3. Αεροχρωματογράφημα παραφινών με το πρόγραμμα Β.

Solid 5000 ppm —————
 Liquid 5000 ppm —————
 Διαλύτης
 εξάνιο
 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα Β
 100°C (2min)→30°C/min→320°C (20min)

Στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα Β (σχήμα 5.3) δοκιμάστηκε ένας σχετικά μεγάλο ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας της τάξεως των 30 °C/min. Όπως φαίνεται ο διαχωρισμός της στερεής και της υγρής παραφίνης δεν είναι ικανοποιητικός.

Στη συνέχεια δοκιμάστηκε το θερμοκρασιακό πρόγραμμα Γ με ακόμη μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας (40 °C/min), όπου και πάλι δεν ήταν ικανό να δώσει καλό διαχωρισμό μεταξύ των δύο τύπων της παραφίνης (σχήμα 5.4). Το συμπέρασμα που βγήκε ήταν ότι ίσως θα βοηθούσε αν δοκιμαζόταν και ένα θερμοκρασιακό πρόγραμμα το οποίο για κάποιο διάστημα θα είχε μία σταθερή ενδιάμεση θερμοκρασία μεταξύ της αρχικής και της τελικής, δηλαδή με ένα θερμοκρασιακό «πλατό».



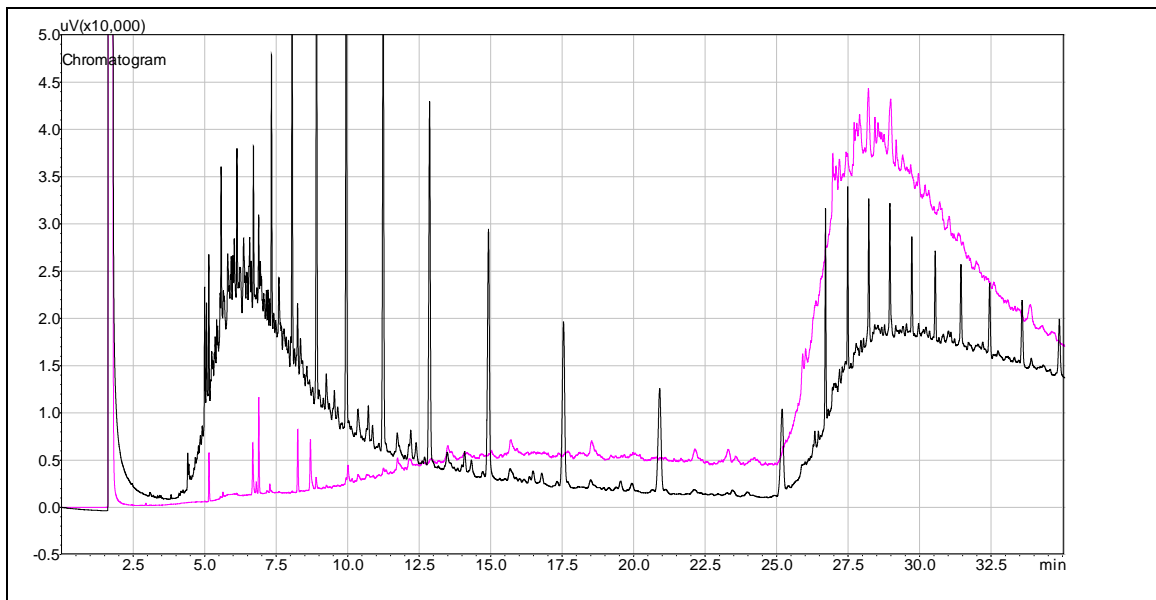
Σχήμα 5.4. Αεροχρωματογράφημα παραφινών με το πρόγραμμα Γ.

Solid 5000 ppm —
Liquid 5000 ppm —

διαλύτης
εξάνιο

Θερμοκρασιακό πρόγραμμα Γ
150°C (2min)→40°C/min→320°C (21,5min)

Εν συνεχεία δοκιμάστηκε το θερμοκρασιακό πρόγραμμα Δ το οποίο περιείχε ένα «πλατό» θερμοκρασίας στους 260°C με δύο διαφορετικούς ρυθμούς αύξησης της θερμοκρασίας, ο πρώτος 20°C/min και ο δεύτερος 40°C/min (σχήμα 5.5).



Σχήμα 5.5. Αεροχρωματογράφημα παραφινών με το πρόγραμμα Δ

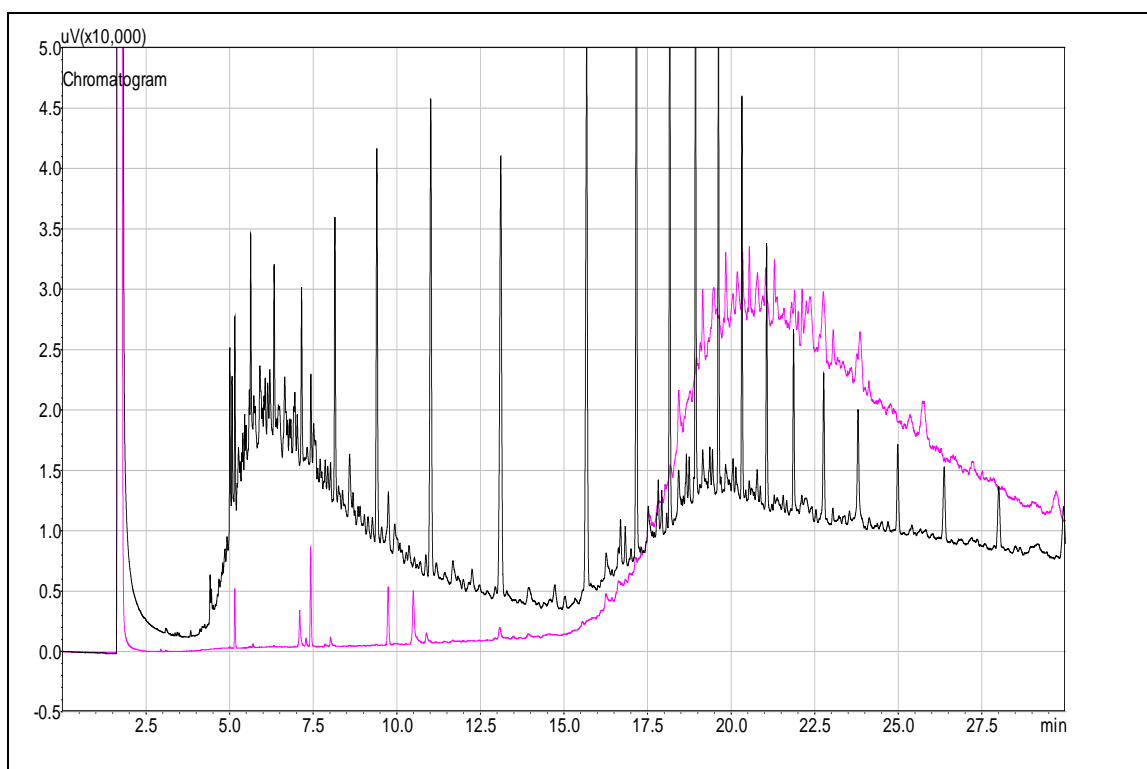
Solid 5000 ppm —
Liquid 5000 ppm —

διαλύτης
εξάνιο

Θερμοκρασιακό πρόγραμμα Δ
180°C (2min)→20°C/min→260°C (19min) → 40°C/min→340°C (13min)

Σε αυτό φάνηκε μία σαφής βελτίωση του διαχωρισμού ενός μεγάλου μέρους των κορυφών της στερεής παραφίνης.

Ακόμα μεγαλύτερη βελτίωση του διαχωρισμού των κορυφών των δύο ειδών παραφίνης παρουσιάστηκε στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα E, το οποίο και αυτό είχε «πλατό» θερμοκρασίας στους 240 °C, πέριξ του οποίου υπήρχε ο ίδιος ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας της τάξεως των 20 °C/min (σχήμα 5.6).



Σχήμα 5.6. Αεροχρωματογράφημα παραφινών με το πρόγραμμα E.
Solid 5000 ppm — διαλύτης
Liquid 5000 ppm — εξάνιο
θερμοκρασιακό πρόγραμμα E
180°C (2min)→20°C/min→240°C (10min) → 20°C/min→340°C (11min)

Τελικά, βγήκε το συμπέρασμα ότι το τελικό θερμοκρασιακό πρόγραμμα που θα χρησιμοποιηθεί θα ήταν το E αυξημένο κατά 10 min και συνολικής διάρκειας 40 min ώστε να περιλαμβάνει όλες τις πιθανές κορυφές και επιπλέον για να σταθεροποιηθεί η γραμμή βάσης.

5.3.3 Επιλογή διαλυτών

Αρχικά, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα κυκλοαλκάνια, από τα οποία σε μεγάλο βαθμό αποτελείται η υγρή παραφίνη, είναι μη πολικές ενώσεις, όπως και τα άλλα αλκάνια με τη διαφορά ότι μόρια με τον ίδιο συντακτικό τύπο έχουν ελάχιστα μεγαλύτερο βαθμό πολικότητας όταν πρόκειται για κυκλοαλκάνια. Ενδεικτικά παρατίθεται ο παρακάτω πίνακας όπου φαίνονται αυτές οι μικρές διαφορές (πίνακας 5.1).

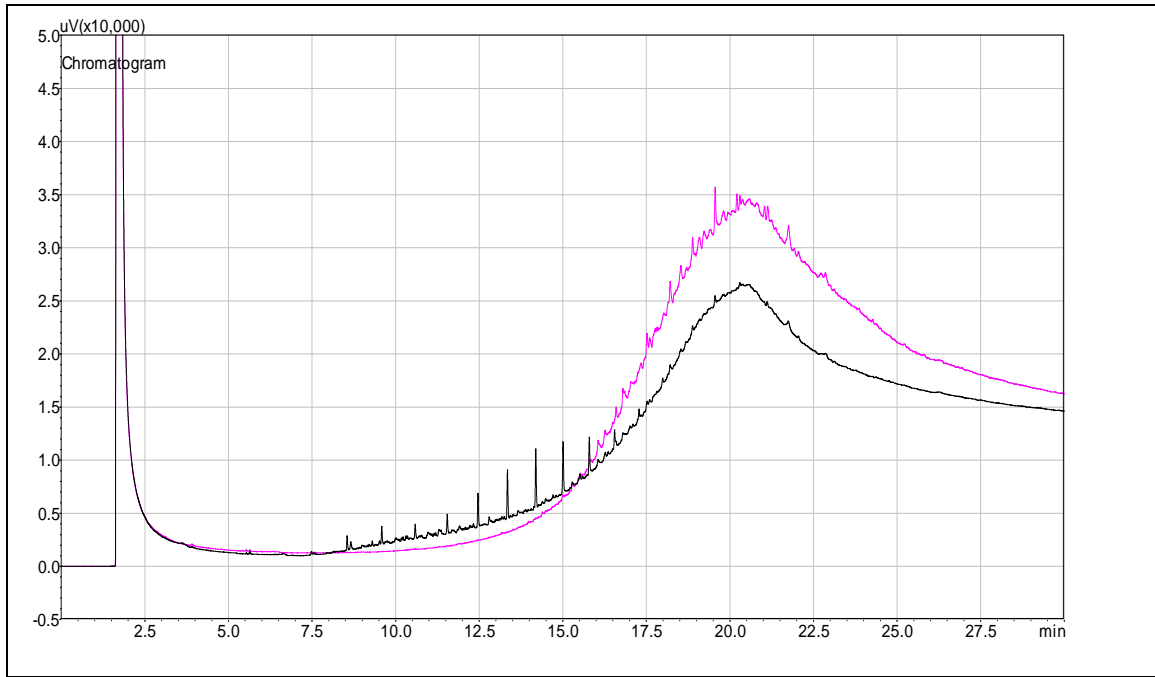
Πίνακας 5.1. Πολικότητα αλκανίων – κυκλοαλκανίων.

Αλκάνιο	Δείκτης Πολικότητας (P')
πεντάνιο	0,0
κυκλοπεντάνιο	0,1
εξάνιο	0,1
κυκλοεξάνιο	0,2

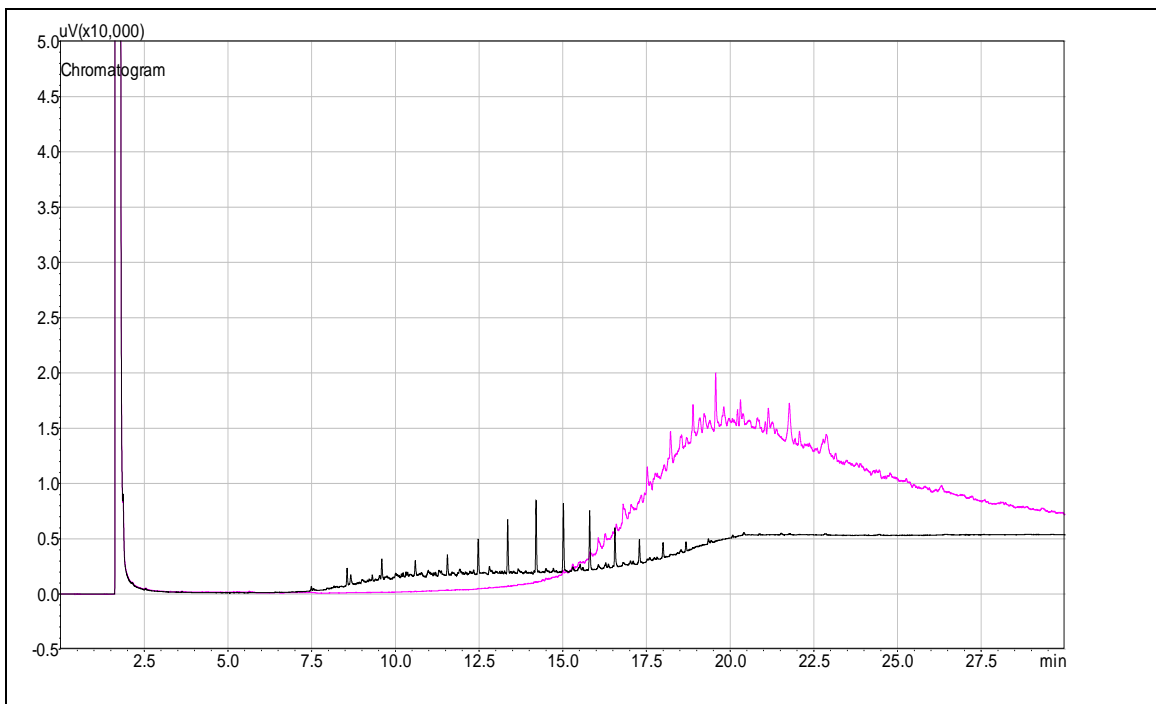
Όπως φάνηκε από την πορεία βελτιστοποίησης του θερμοκρασιακού προγράμματος το εξάνιο αποτελούσε έναν εξαιρετικό διαλύτη για την στερεή παραφίνη. Οπότε η προσπάθεια επικεντρώθηκε στο να βρεθεί ένας διαλύτης στον οποίο η στερεή παραφίνη θα είχε μειωμένη απόκριση σε αντίθεση με την υγρή παραφίνη, της οποίας η απόκριση θα ήταν επιθυμητό να είναι όσο το δυνατόν καλύτερη.

Για την επιλογή του διαλύτη χρησιμοποιήθηκε το θερμοκρασιακό πρόγραμμα A και όχι το τελικό θερμοκρασιακό πρόγραμμα. Αυτό έγινε για λόγους οικονομίας χρόνου καθώς το θερμοκρασιακό πρόγραμμα A διαρκεί 10 min λιγότερο.

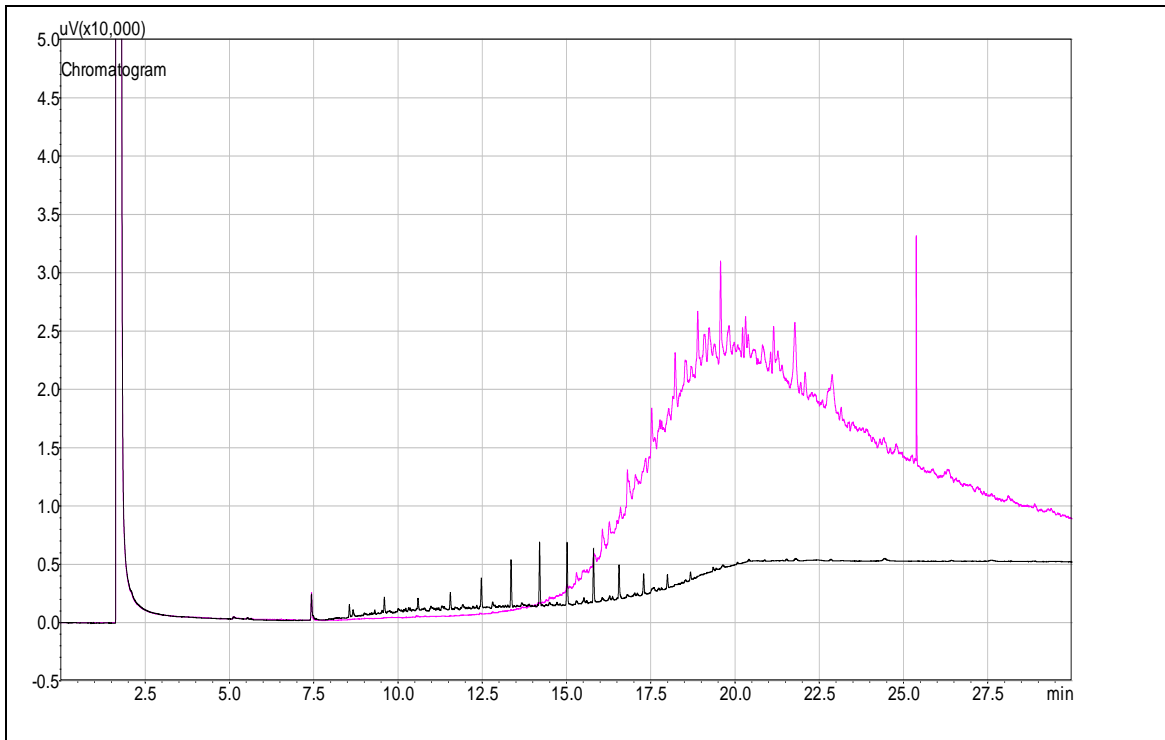
Παρακάτω φαίνονται τα χρωματογραφήματα της στερεής και της υγρής παραφίνης συγκέντρωσης 3000 ppm με οξικό οξύ, ακετόνη, αιθανόλη και μεθανόλη αντίστοιχα κατά σειρά αυξανόμενης πολικότητας (σχήματα 5.7-5.10).



Σχήμα 5.7. Αεροχρωματογράφημα παραφινών με χρήση διαλύτη οξικό οξύ.
 Solid 3000 ppm —————
 Liquid 3000 ppm —————
 θερμοκρασιακό πρόγραμμα A
 150°C (2min)→10°C/min→320°C (11min)



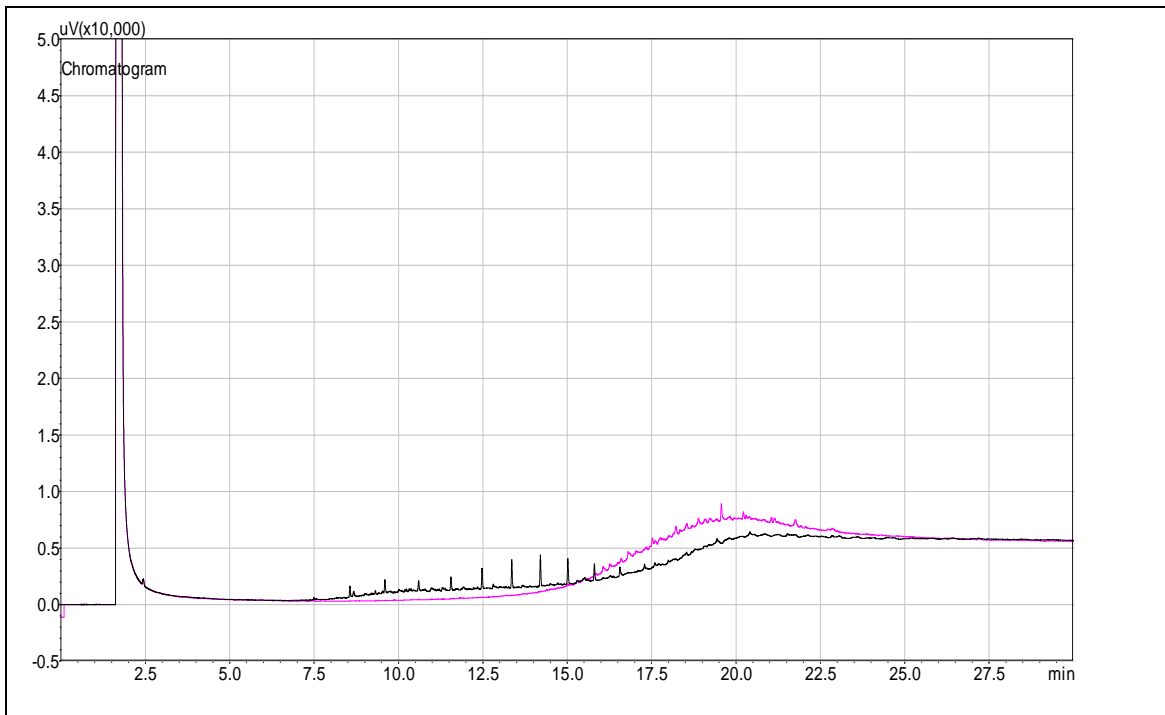
Σχήμα 5.8. Αεροχρωματογράφημα παραφινών με χρήση διαλύτη ακετόνη.
 Solid 3000 ppm —————
 Liquid 3000 ppm —————
 θερμοκρασιακό πρόγραμμα A
 150°C (2min)→10°C/min→320°C (11min)



Σχήμα 5.9. Αεροχρωματογράφημα παραφινών με χρήση διαλύτη αιθανόλη.

Solid 3000 ppm —
Liquid 3000 ppm —

Θερμοκρασιακό πρόγραμμα A
150°C (2min)→10°C/min→320°C (11min)



Σχήμα 5.10. Αεροχρωματογράφημα παραφινών με χρήση διαλύτη μεθανόλη.

Solid 3000 ppm —
Liquid 3000 ppm —

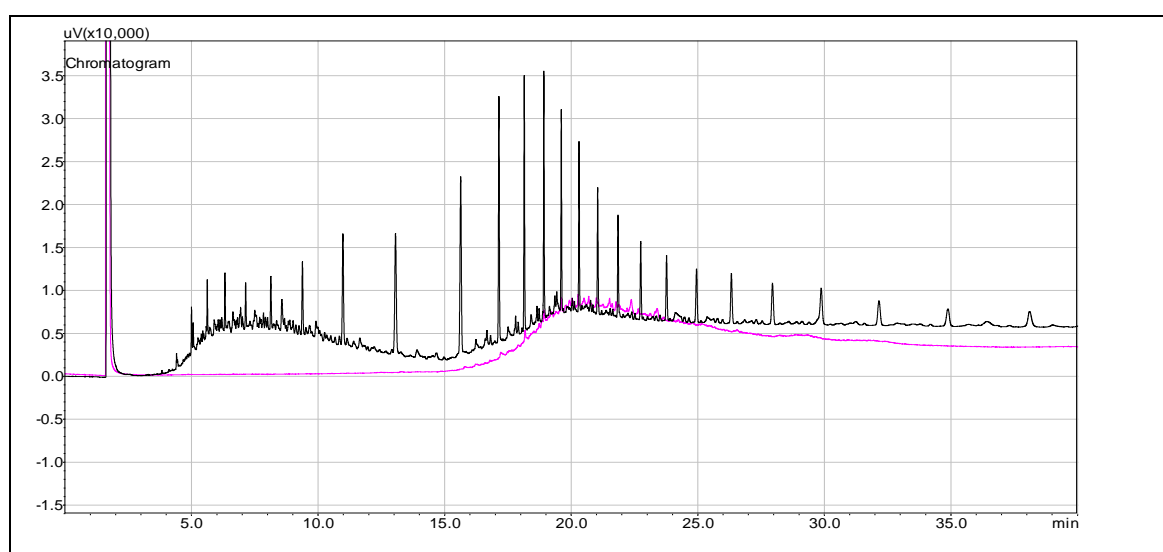
Θερμοκρασιακό πρόγραμμα A
150°C (2min)→10°C/min→320°C (11min)

Αναλύοντας τα παραπάνω χρωματογραφήματα γίνεται φανερό ότι σε έναν ισχυρά πολικό διαλύτη, όπως η μεθανόλη το αναλυτικό σήμα είναι μειωμένο και για τα δύο είδη παραφίνης. Από τους υπόλοιπους διαλύτες οι οποίοι είναι μέτριας πολικότητας την καλύτερη συμπεριφορά ως προς τα κριτήρια που είχαν τεθεί, δηλαδή υψηλό σήμα της υγρής παραφίνης και χαμηλό σήμα της στερεής παραφίνης, είχε η αιθανόλη, η οποία και θα χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης στην μέθοδο για τον προσδιορισμό της υγρής παραφίνης.

5.4 Συμπεράσματα

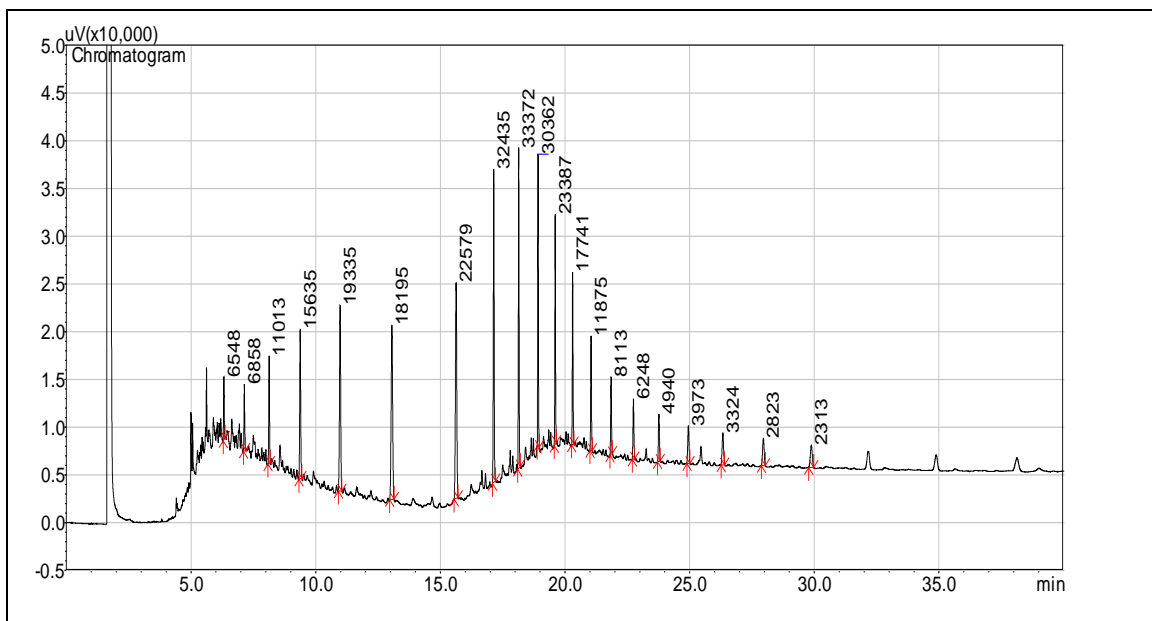
Έχοντας καταλήξει στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα και στους διαλύτες που θα χρησιμοποιηθούν απέμεινε ένα τελικό βήμα της πορείας ανάπτυξης και βελτιστοποίησης των δύο μεθόδων το οποίο ήταν να βρεθεί μία γενική εικόνα της περιοχής των συγκεντρώσεων στις οποίες θα γινόταν η επικύρωση.

Για τη μέθοδο που αφορούσε τη στερεή παραφίνη ήταν εύκολο να καθοριστεί αυτή η περιοχή των συγκεντρώσεων, καθώς στο εξάνιο οι κορυφές αυτής είναι εξαιρετικής ποιότητας. Στο παρακάτω χρωματογράφημα φαίνεται ότι σε συγκεντρώσεις περίξ των 1000 ppm για τα δύο είδη παραφίνης θα μπορούσε να επικυρωθεί η πρώτη μέθοδος για τον προσδιορισμό της στερεής παραφίνης, καθώς το σφάλμα από το εμβαδόν των κορυφών της υγρής παραφίνης θα ήταν μικρό (σχήμα 5.11)

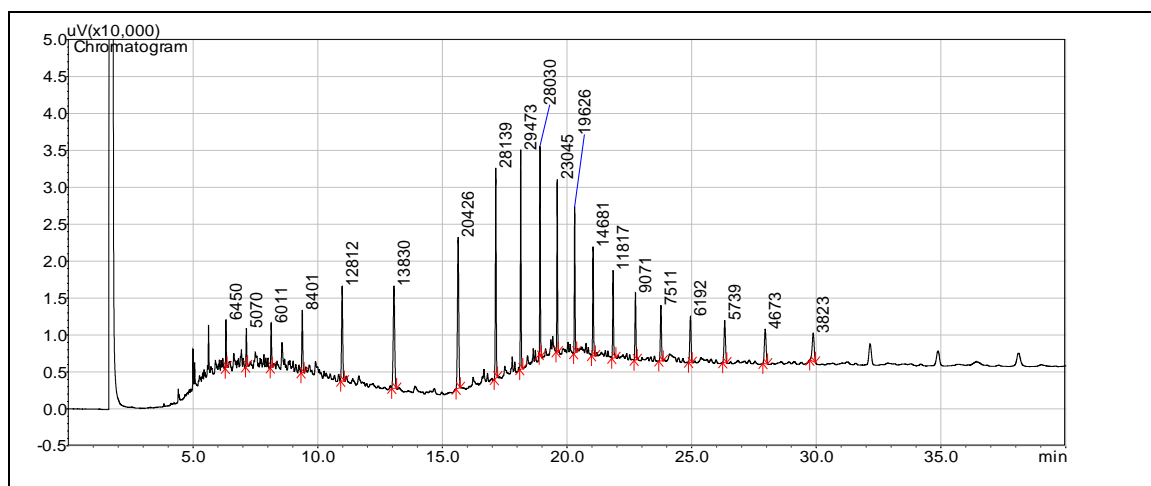


Σχήμα 5.11. Αεροχρωματογράφημα παραφινών με χρήση διαλύτη εξάνιο και το τελικό πρόγραμμα θερμοκρασιών.
 Solid 2000 ppm ———— διαλύτης
 Liquid 2000 ppm ———— εξάνιο
 θερμοκρασιακό πρόγραμμα
 180°C (2min) → 20°C/min → 240°C (10min) → 20°C/min → 340°C (21min)

Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων θα λαμβάνεται ως απόκριση το άθροισμα των εμβαδών των κορυφών που οφείλονται στην στερεή παραφίνη. Ακολουθήθηκε αυτός ο τρόπος ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων, καθώς φάνηκε ότι σε όμοιας συγκέντρωσης πρότυπα διαλύματα προερχόμενα από τα 2 lot της πρότυπης στερεής παραφίνης οι περισσότερες κορυφές που οφείλονταν στο ίδιο αλκάνιο είχαν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ τους, ενώ αντιθέτως όταν αθροίζονταν το εμβαδόν όλων των κορυφών όλων των αλκανίων υπήρχε αξιοσημείωτη ομοιότητα των αποτελεσμάτων στα 2 lot. Στα σχήματα 5.12 και 5.13 φαίνονται τα χρωματογραφήματα πρότυπων διαλυμάτων στερεής παραφίνης συγκέντρωσης 1000 ppm από το lot A και lot B αντίστοιχα, ενώ στον πίνακα 5.2 φαίνεται η αντιστοιχία μεταξύ ομοίων κορυφών και του συνολικού αθροίσματος των εμβαδών αυτών. Για τις 20 κορυφές η αντιστοιχία χρόνων ανάλυσης ήταν άριστη, ενώ η αντιστοιχία εμβαδών κυμαίνονταν από 55.7 – 186.1%, αλλά στο άθροισμα εμβαδών η αντιστοιχία ήταν 106,1%.



Σχήμα 5.12. Αεροχρωματογράφημα πρότυπης στερεής παραφίνης Lot A
 Solid 1000 ppm ———— διαλύτης θερμοκρασιακό πρόγραμμα (τελικό)
 εξάνιο 180°C (2min)→20°C/min→240°C (10min) → 20°C/min→340°C (21min)



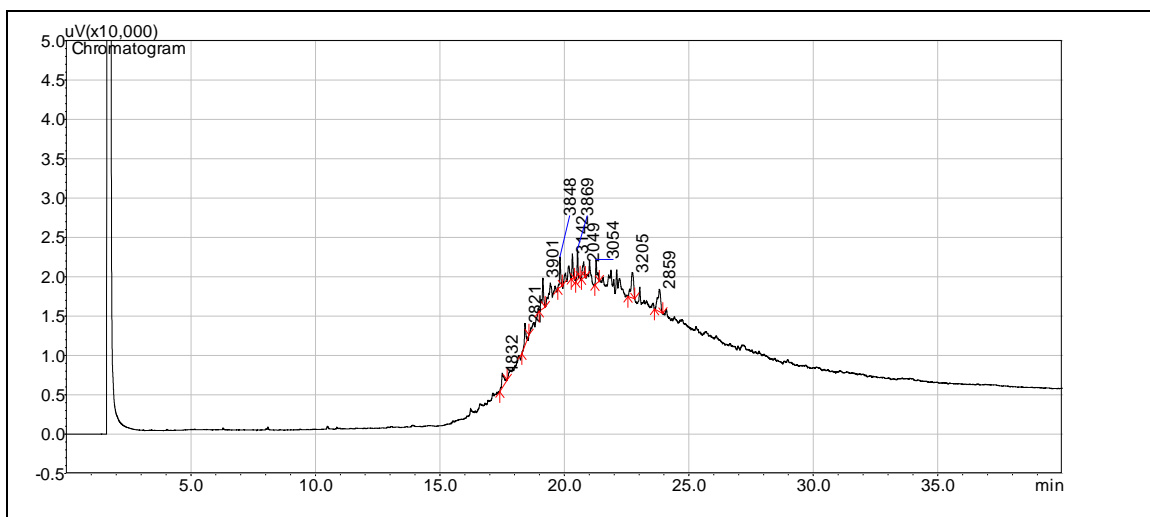
Σχήμα 5.13. Αεροχρωματογράφημα πρότυπης στερεής παραφίνης Lot B.

Solid 1000 ppm ———— διαλύτης θερμοκρασιακό πρόγραμμα (τελικό)
εξάνιο 180°C (2min)→20°C/min→240°C (10min) → 20°C/min→340°C (21min)

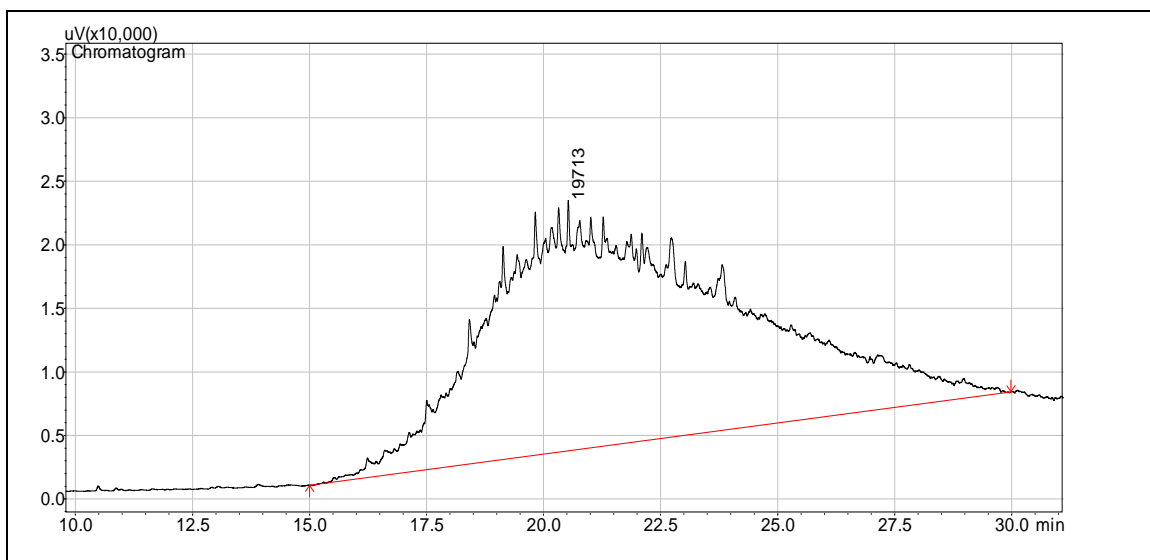
Πίνακας 5.2. Αντιστοιχία 20 των κορυφών από τα 2 lot της στερεής παραφίνης.

Lot A			Lot B		Λόγος(A _A /A _B),%
A/A	t _R (min)	A	t _R (min)	A	
1	6,32	6548	6,32	6450	101,5
2	7,14	6858	7,14	5070	135,3
3	8,13	11013	8,12	6011	183,2
4	9,38	15635	9,38	8401	186,1
5	10,98	19335	10,97	12812	150,9
6	13,06	18195	13,06	13830	131,6
7	15,63	22579	15,61	20426	110,5
8	17,14	32435	17,14	28139	115,3
9	18,14	33372	18,13	29473	113,2
10	18,92	30362	18,92	28030	108,3
11	19,61	23387	19,60	23045	101,5
12	20,31	17741	20,29	19626	90,4
13	21,04	11875	21,04	14681	80,9
14	21,85	8113	21,84	11817	68,7
15	22,74	6248	22,72	9071	68,9
16	23,77	4940	23,78	7511	65,8
17	24,95	3973	24,95	6192	64,2
18	26,33	3324	26,33	5739	57,9
19	27,96	2823	27,95	4673	60,4
20	29,88	2313	29,87	3823	55,7
ΑΘΡΟΙΣΜΑ		281069	-	264820	106,1

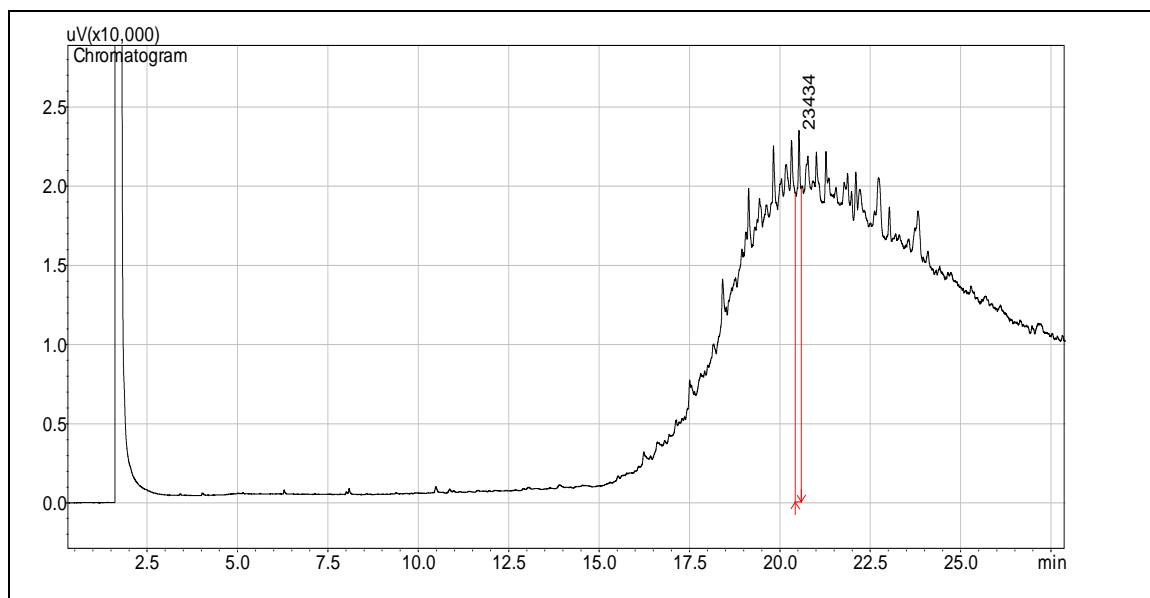
Όσον αφορά τον προσδιορισμό της υγρής παραφίνης βγήκε το συμπέρασμα ότι θα ήταν προτιμότερο να γίνει η ποσοτικοποίηση βάσει του ύψους της απόκρισης αυτής. Αυτό έγινε γιατί οι κορυφές της υγρής παραφίνης είναι κακής ποιότητας εξαιτίας των πολλών ισομερών λόγω αλκανίων και κυκλοαλκανίων, τα οποία δεν μπορούν να διακριθούν ικανοποιητικά στον ανιχνευτή FID [16]. Ενδεικτικά δίνονται κάποια χρωματογραφήματα με τους πιθανούς τρόπους ποσοτικοποίησης, οι οποίοι είναι α) με βάση το εμβαδόν των κορυφών, β) με βάση το εμβαδόν της μεγάλης κορυφής (Area Under Curve) και γ) με βάση το μέγιστο ύψος, αντίστοιχα (σχήματα 5.14-5.16).



Σχήμα 5.14. Αεροχρωματογράφημα πρότυπης υγρής παραφίνης και ποσοτικοποίηση με βάση το άθροισμα των εμβαδών των κορυφών
 Liquid 3000 ppm ——— διαλύτης αιθανόλη θερμοκρασιακό πρόγραμμα (τελικό) 180°C (2min)→20°C/min→240°C (10min) → 20°C/min→340°C (21min)



Σχήμα 5.15. Αεροχρωματογράφημα πρότυπης υγρής παραφίνης και ποσοτικοποίηση με βάση το εμβαδόν της μεγάλης κορυφής (A.U.C.)
 Liquid 3000 ppm ——— διαλύτης αιθανόλη θερμοκρασιακό πρόγραμμα (τελικό) 180°C (2min)→20°C/min→240°C (10min) → 20°C/min→340°C (21min)



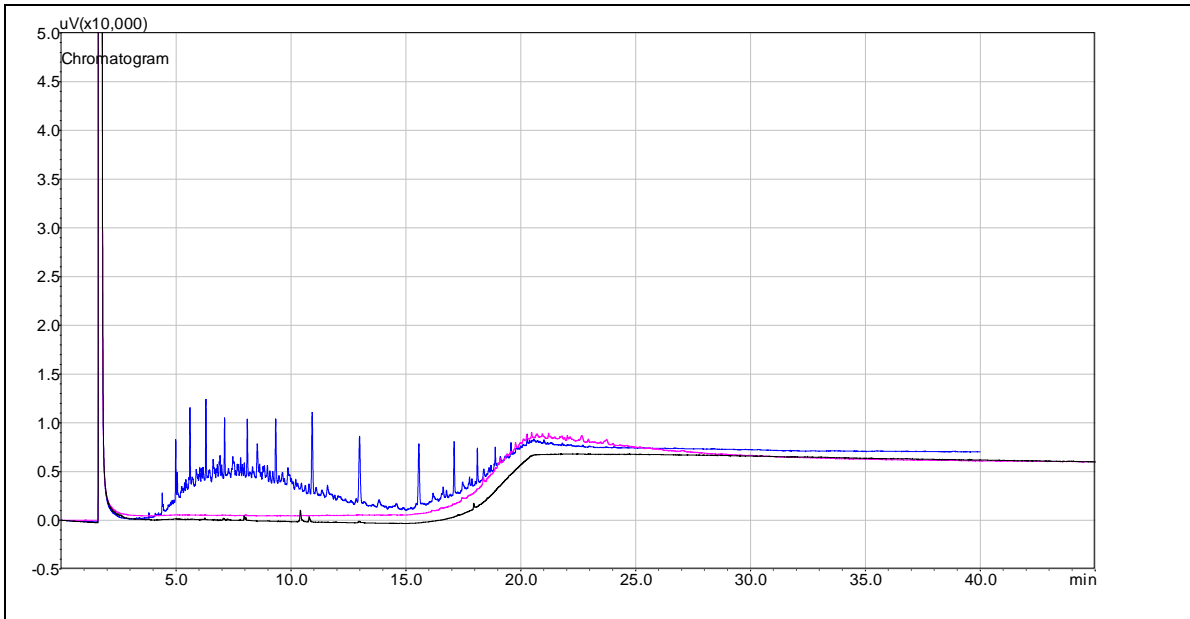
Σχήμα 5.16. Αεροχρωματογράφημα πρότυπης υγρής παραφίνης και ποσοτικοποίηση με βάση το μέγιστο ύψος
 Liquid 3000 ppm ———— διαλύτης θερμοκρασιακό πρόγραμμα (τελικό)
 αιθανόλη 180°C (2min)→20°C/min→240°C (10min) → 20°C/min→340°C (21min)

Στον πίνακα 5.3 φαίνεται ότι την καλύτερη αναλογικότητα παρουσιάζει η ποσοτικοποίηση με βάση το ύψος της απόκρισης οπότε και αυτός ο τρόπος θα εφαρμοσθεί για την υγρή παραφίνη.

Πίνακας 5.3. Αναλογικότητα τρόπων ποσοτικοποίησης για υγρή παραφίνη

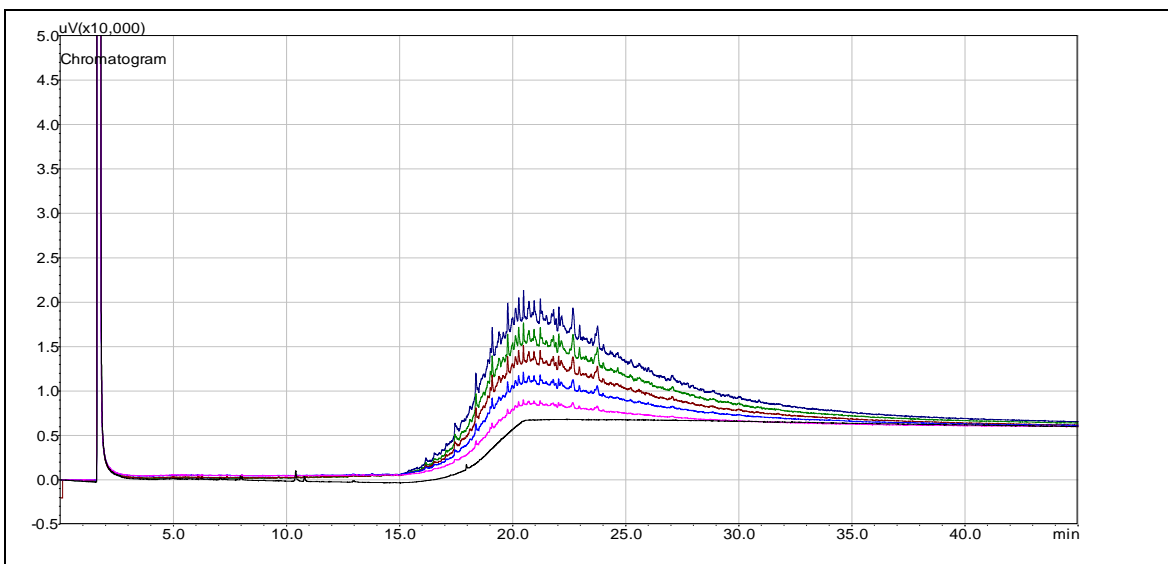
A/A	C (ppm)	Ύψος Απόκρισης (Σχήμα 5.16)	Εμβαδόν Καμπύλης (Σχήμα 5.15)	Άθροισμα Εμβαδών Κορυφών (Σχήμα 5.14)
1	3000	23434	6772926	142046
2	1500	12192	4235667	87111
Λόγος	2	1,92	1,60	1,63

Όσον αφορά την παρεμπόδιση της μεθόδου για την υγρή παραφίνη, ενδεικτικό είναι το επόμενο χρωματογράφημα στο οποίο η στερεή παραφίνη ακόμα και σε υψηλή συγκέντρωση της τάξεως των 8000 ppm παρεμποδίζει ελάχιστα το μέγιστο ύψος των κορυφών της υγρής παραφίνης των 500 ppm σε αιθανόλη (σχήμα 5.17).



Σχήμα 5.17. Αεροχρωματογράφημα υγρής παραφίνης (500 ppm) και στερεής παραφίνης (8000 ppm) σε αιθανόλη που αποδεικνύει την παρεμπόδιση
 blank ———— διαλύτης αιθανόλη θερμοκρασιακό πρόγραμμα (τελικό) 180°C (2min)→20°C/min→240°C (10min) → 20°C/min→340°C (21min)

Τέλος, μία πρώτη εικόνα για την γραμμικότητα που θα μπορούσε να έχει η ποσοτικοποίηση βάσει του ύψους μπορεί να παρθεί από το επόμενο χρωματογράφημα στο οποίο φαίνεται η απόκριση των κορυφών της υγρής παραφίνης διαφόρων συγκεντρώσεων σε αιθανόλη (σχήμα 5.18).



Σχήμα 5.18. Αεροχρωματογράφημα υγρής παραφίνης σε αιθανόλη (0 – 2500 ppm)
 blank ———— διαλύτης αιθανόλη θερμοκρασιακό πρόγραμμα (τελικό) 180°C (2min)→20°C/min→240°C (10min) → 20°C/min→340°C (21min)

Είναι εμφανής η γραμμικότητα μεταξύ των μέγιστων υψών των επιμέρους συγκεντρώσεων της υγρής παραφίνης, κάτι που θα φανεί καλύτερα κατά την επικύρωση της μεθόδου της υγρής παραφίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6°

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

ΣΤΕΡΕΗΣ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ ΣΕ ΚΡΕΜΑ

6.1 Χρωματογραφικές συνθήκες

Η πορεία βελτιστοποίησης μας οδήγησε στις τελικές χρωματογραφικές συνθήκες της μεθόδου για τον προσδιορισμό της στερεής παραφίνης. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά αυτές οι χρωματογραφικές συνθήκες.

Στήλη: τριχοειδής στήλη MEGA-5HT, $d = 0,25 \text{ mm}$, $l = 30 \text{ m}$, $T_{\max} = 350 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Κινητή φάση: He (αέριαχρωματογραφία)

Διαλύτης: εξάνιο

Ταχύτητα ροής ηλίου: 3 mL/min

Γραμμική ταχύτητα: 30 cm/min

Όγκος έγχυσης: $0,5 \text{ } \mu\text{L}$

Θερμοκρασία εισαγωγέα: $320 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Αναλογία διαμοιρασμού: 1/10

Θερμοκρασιακό πρόγραμμα στήλης:

Hold time (min)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Rate ($^{\circ}\text{C/min}$)
0-2	180	-
2-10	240	20
10-21	340	20

Ανιχνευτής: FID

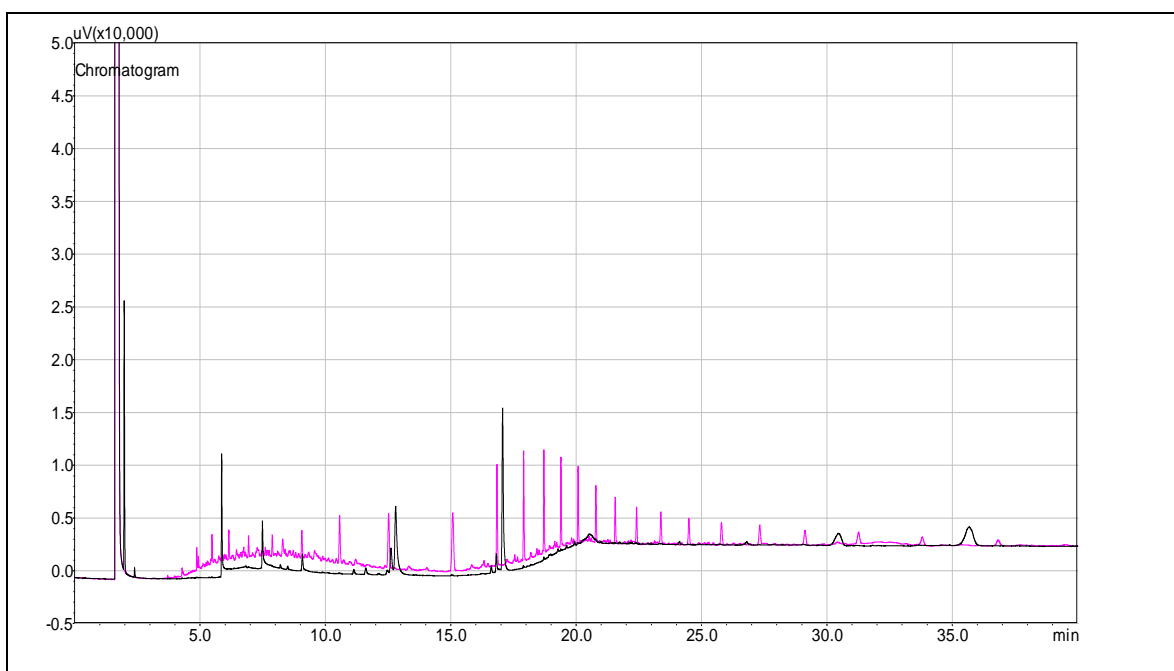
Θερμοκρασία ανιχνευτή: $350 \text{ }^{\circ}\text{C}$

6.2 Ειδικότητα Μεθόδου

Κριτήριο αποδοχής

Να μην υπάρχει παρεμπόδιση στον χρόνο ανάλυσης των κορυφών της στερεής παραφίνης από τα έκδοχα.

Η ειδικότητα της μεθόδου μελετήθηκε με διάλυμα του placebo, στο οποίο τα έκδοχα βρίσκονται σε συγκεντρώσεις οι οποίες καθορίζονται από τη συγκέντρωση εργασίας της στερεής παραφίνης (working concentration). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στο διάλυμα placebo πρέπει να περιέχεται και η υγρή παραφίνη, εφόσον αυτή θα προσδιοριστεί με άλλη μέθοδο της οποίας η επικύρωση παρουσιάζεται στο επόμενο κεφάλαιο. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα του διαλύματος placebo και διαλύματος στερεής παραφίνης στη συγκέντρωση εργασίας των 1000 ppm (σχήμα 6.1).



Σχήμα 6.1. Αεροχρωματογράφημα placebo και πρότυπου διαλύματος στερεής παραφίνης (1000 ppm) σε εξάνιο

Από το σχήμα 6.1 φαίνεται ότι η απόκριση της στερεής παραφίνης επηρεάζεται ελάχιστα από τα έκδοχα και μάλιστα οι πιο μεγάλες κορυφές της στερεής παραφίνης οι οποίες εμφανίζονται στο διάστημα 15-20 min δεν

επηρεάζονται καθόλου. Όποτε θεωρήθηκε ότι ικανοποιείται το κριτήριο αποδοχής για την ειδικότητα της μεθόδου.

6.3 Γραμμικότητα Μεθόδου

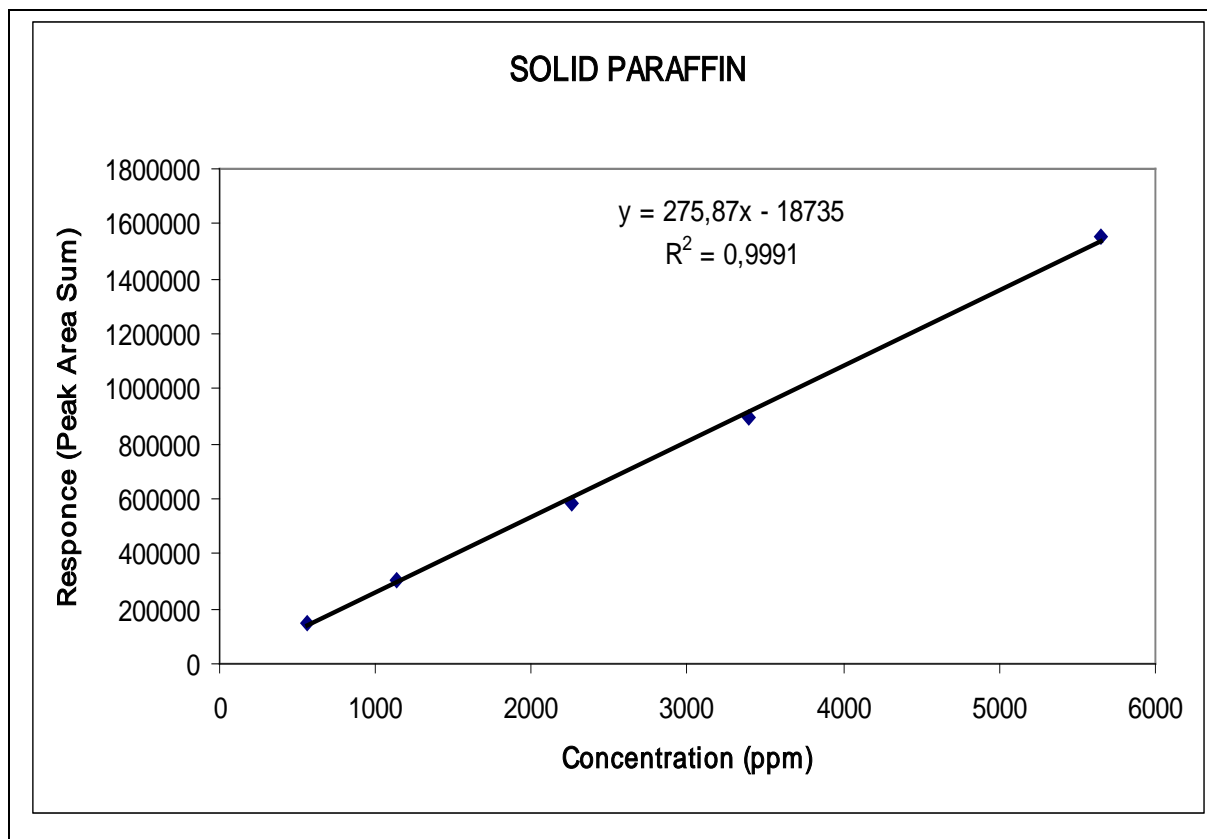
<i>Κριτήριο αποδοχής</i>
Ο συντελεστής συσχέτισης (r) της καμπύλης βαθμονόμησης να μην είναι μικρότερος από 0,99

Παρασκευάστηκαν 5 πρότυπα διαλύματα στερεής παραφίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις περιμετρικά της συγκέντρωσης εργασίας και αναλύθηκαν 3 φορές το καθένα. Πρέπει να σημειωθεί ότι η γραμμικότητα μελετήθηκε στο 50% - 500% της συγκέντρωσης εργασίας των 1000 ppm το οποίο εύρος είναι μεγαλύτερο από το ελάχιστο αποδεκτό και τυπικά εφαρμοζόμενο 80%-120%. Για κάθε ανάλυση μετρείται το εμβαδόν στις 20 κορυφές των οποίων οι χρόνοι ανάλυσης περιγράφονται στον πίνακα 5.2. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.1.

Πίνακας 6.1 Αποτελέσματα γραμμικότητας μεθόδου προσδιορισμού στερεής παραφίνης

Πρότυπα διαλύματα	Θεωρητική συγκέντρωση (ppm)	Μέση τιμή Σ εμβαδών κορυφών (\pm SD) (N=3)	Πειραματική συγκέντρωση από εξίσωση παλινδρόμησης (ppm) (\pm SD)
A	565	15,00 (\pm 0,32)*10 ⁴	612 (\pm 53)
B	1131	30,16 (\pm 0,46)*10 ⁴	1162 (\pm 38)
C	2262	58,70 (\pm 1,1)*10 ⁴	2197 (\pm 85)
D	3387	89,73 (\pm 1,9)*10 ⁴	3322 (\pm 89)
E	5654	155,6 (\pm 2,5)*10 ⁴	5712 (\pm 103)

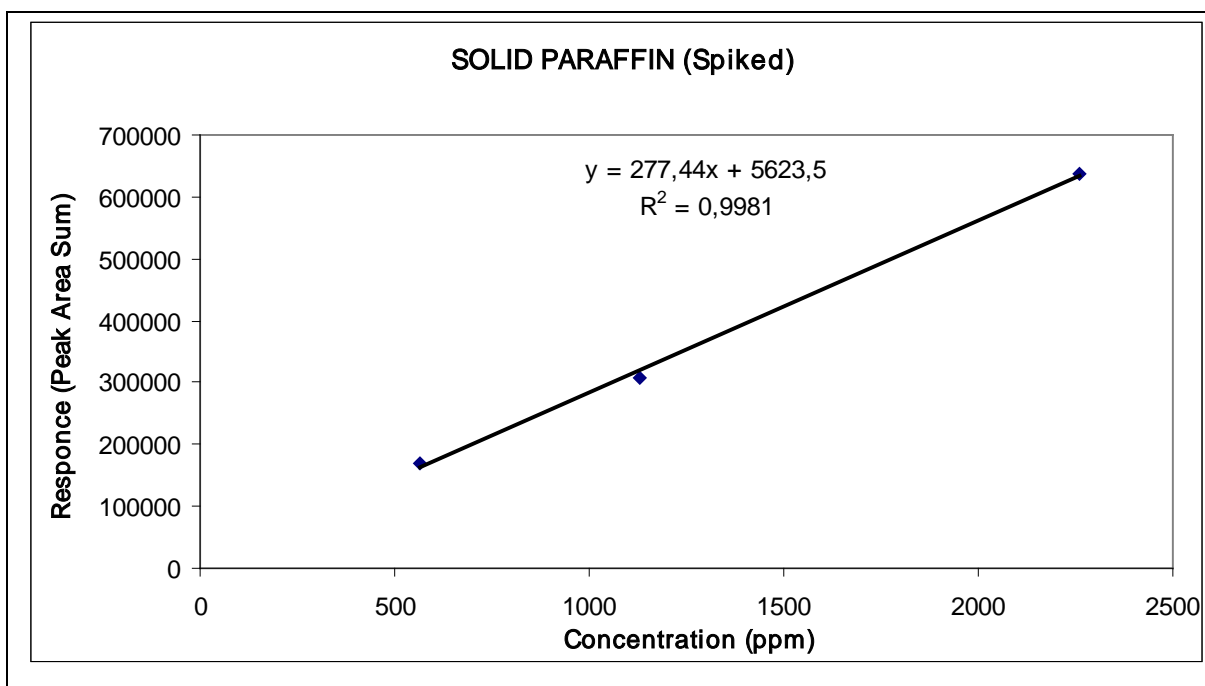
Στο σχήμα 6.2 παρατίθεται το διάγραμμα και η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς και ο συντελεστής r^2 .



Σχήμα 6.2. Διάγραμμα και εξίσωση καμπύλης αναφοράς μεθόδου προσδιορισμού στερεής παραφίνης

Οπότε και για τη γραμμικότητα της μεθόδου το κριτήριο αποδοχής ικανοποιείται καθώς, ο συντελεστής συσχέτισης (r) δεν είναι μικρότερος από 0.99. Η καμπύλη αναφοράς δεν διέρχεται από το μηδέν.

Επίσης, για να μελετηθεί τυχόν επίδραση της μήτρας του δείγματος παρασκευάστηκαν και διαλύματα στερεής παραφίνης προσαρμοσμένα στη μήτρα (στο διάλυμα placebo) σε διάφορα επίπεδα συγκεντρώσεων και κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς ώστε να φανεί αν υπάρχει κάποια σημαντική αλλαγή στην κλίση της. Στο σχήμα 6.3 φαίνεται η καμπύλη αναφοράς σε δείγματα προσαρμοσμένα στη μήτρα.



Σχήμα 6.3. Διάγραμμα και εξίσωση καμπύλης αναφοράς από πρότυπα διαλύματα στερεής παραφίνης προσαρμοσμένα στη μήτρα

Τεκμηριώνεται ότι δεν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των τιμών των κλίσεων των δύο καμπυλών με το κριτήριο t-test για στάθμη εμπιστοσύνης 95%.

6.4 Πιστότητα Μεθόδου

6.4.1 Επαναληψιμότητα Συστήματος

Κριτήριο αποδοχής

Το %RSD του αθροίσματος των εμβαδών των κορυφών να είναι μικρότερο ή ίσο του 5,0

Έγιναν 3 αναλύσεις σε πρότυπο διάλυμα στερεής παραφίνης στη συγκέντρωση εργασίας (950 ppm) και υπολογίστηκε η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) η οποία βρέθηκε 0,6, οπότε ικανοποιείτε το κριτήριο για την πιστότητα του συστήματος (πίνακας 6.2).

Πίνακας 6.2. Αποτελέσματα επαναληψιμότητα συστήματος προσδιορισμού στερεής παραφίνης

Αριθμός Έγχυσης	Άθροισμα εμβαδών κορυφών (Standard 950ppm)
1	234641
2	233987
3	236859
Μέσος όρος	235162
SD	1506
%RSD	0,6

6.4.2 Επαναληψιμότητα Μεθόδου

Κριτήρια αποδοχής

Οι ανακτήσεις να είναι μεταξύ 95-105% και το %RSD μεταξύ των ανακτήσεων να είναι μικρότερο ή ίσο του 5%.

Παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα στερεής παραφίνης στην συγκέντρωση εργασίας (950 ppm) και έγιναν 6 αναλύσεις. Επίσης, παρασκευάστηκε διάλυμα ίδιας συγκέντρωσης σε placebo και έγιναν και σε αυτό 6 αναλύσεις. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 6.3, από όπου προκύπτει ότι τα κριτήρια αποδοχής ικανοποιούνται όσον αφορά την επαναληψιμότητα της μεθόδου. Η ανάκτηση για κάθε εμβολιασμένο δείγμα υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το άθροισμα των εμβαδών του προτύπου.

Πίνακας 6.3. Αποτελέσματα επαναληψιμότητας μεθόδου προσδιορισμού στερεής παραφίνης σε πρότυπο διάλυμα και σε εμβολιασμένο διάλυμα placebo.

Άθροισμα εμβαδών κορυφών (πρότυπο 950ppm)	Άθροισμα εμβαδών κορυφών (εμβολιασμένο placebo 950ppm)	Ανάκτηση, %
238021	240393	102,2
244686	239112	101,7
249316	239269	101,8
219839	230895	98,2
228853	237760	101,1
230071	235256	100,0
Μέσος όρος	235131	Μέσος όρος 100,8
%RSD	4,6	%RSD 1,5

6.5 Ακρίβεια Μεθόδου

<i>Κριτήρια αποδοχής</i>
Οι ανακτήσεις να είναι μεταξύ 95-105% και το %RSD μεταξύ των ανακτήσεων να είναι μικρότερο ή ίσο του 5%.

Παρασκευάστηκαν 3 εμβολιασμένα διαλύματα σε placebo σε συγκεντρώσεις στερεής παραφίνης των 500, 1000 και 5000 ppm, τα οποία καλύπτουν όλο το εύρος της γραμμικής περιοχής της μεθόδου και έγιναν 3 αναλύσεις στο καθένα. Κατόπιν, παρασκευάστηκαν 3 πρότυπα στερεής παραφίνης με ανάλογες συγκεντρώσεις στα οποία έγιναν επίσης 3 αναλύσεις. Στον πίνακα 6.4 φαίνονται τα αποτελέσματα και προκύπτει ότι ικανοποιούνται τα κριτήρια όσον αφορά την ακρίβεια της μεθόδου. Ο υπολογισμός της ανάκτησης έγινε χρησιμοποιώντας τη σχέση:

$$\% \text{ Ανάκτηση} = \frac{\sum A_i(x) * C_s}{\text{Mean} \sum A_i(s) * C_x} \quad (\text{Σχέση 6.1})$$

Όπου $\sum A_i(x)$ το άθροισμα εμβαδών του αγνώστου, $\text{Mean} \sum A_i(s)$ το άθροισμα εμβαδών των 3 προτύπων, C_s η συγκέντρωση του προτύπου και C_x η θεωρητική συγκέντρωση του εμβολιασμένου δείγματος.

Πίνακας 6.4. Αποτελέσματα ακρίβειας μεθόδου προσδιορισμού στερεής παραφίνης.

Άθροισμα εμβαδών κορυφών (πρότυπο 584 ppm)		Άθροισμα εμβαδών κορυφών (εμβολιασμένο 553 ppm)	Ανάκτηση, %
132931		121796	94,8
135649		123096	95,8
138351		128386	100,0
Μέσος όρος	135644	-	RSD = 2,8%
Άθροισμα εμβαδών κορυφών (πρότυπο 1177 ppm)		Άθροισμα εμβαδών κορυφών (εμβολιασμένο 948 ppm)	Ανάκτηση, %
324915		249588	93,8
331802		268918	101,1
332785		268086	100,8
Μέσος όρος	329834	-	RSD = 4,2%
Άθροισμα εμβαδών κορυφών (πρότυπο 5012 ppm)		Άθροισμα εμβαδών κορυφών (εμβολιασμένο 5223 ppm)	Ανάκτηση, %
1164374		1156871	96,6
1187289		1203443	100,5
1102687		1151812	96,2
Μέσος όρος	1151450	-	RSD = 2,4%

6.6 Ανθεκτικότητα Μεθόδου

Κριτήρια αποδοχής

Οι ανακτήσεις να είναι μεταξύ 95-105% και το %RSD προτύπων και spiked είναι μικρότερο ή ίσο του 5%.

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι να δειχθεί ότι η μέθοδος διατηρεί την αξιοπιστία της όταν υπόκειται σε μικρές αλλαγές των συνθηκών της. Η αξιολόγηση έγινε με 3 διαφορετικές μικρές αλλαγές στη μέθοδο και για κάθε μία αναλύθηκαν από 3 φορές ένα πρότυπο και ένα εμβολιασμένο στερεής παραφίνης, τα οποία βρίσκονται στη συγκέντρωση εργασίας.

Στην πρώτη περίπτωση (πείραμα γ2) έγινε αλλαγή στην γραμμική ταχύτητα αερίου από 30 cm/min σε 28 cm/min, στην δεύτερη περίπτωση (πείραμα γ3) έγινε

αλλαγή στο ρυθμό μεταβολής της θερμοκρασίας στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα από 20°C/min σε 19 °C/min και στην τελευταία περίπτωση (πείραμα γ4) έγινε αλλαγή στη αρχική θερμοκρασία από 180 °C σε 175 °C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.5 και φαίνεται ότι τα κριτήρια όσον αφορά την ανθεκτικότητα ικανοποιούνται.

Πίνακας 6.5. Αποτελέσματα ανθεκτικότητας προσδιορισμού στερεής παραφίνης

ΠΕΙΡΑΜΑ Υ2				
Άθροισμα εμβαδών κορυφών (πρότυπο 810 ppm)		Άθροισμα εμβαδών κορυφών (εμβολιασμένο 909 ppm)		Ανάκτηση, %
146169		163168		101,8
143746		160751		100,3
138548		157791		98,4
Μέσος όρος	142821	Μέσος όρος	160570	-
RSD = 2,7%		RSD = 1,7%		-
ΠΕΙΡΑΜΑ Υ3				
Άθροισμα εμβαδών κορυφών (πρότυπο 976 ppm)		Άθροισμα εμβαδών κορυφών (εμβολιασμένο 1053 ppm)		Ανάκτηση, %
167686		179924		99,4
166929		177174		97,9
168239		180622		99,8
Μέσος όρος	167618	Μέσος όρος	179240	-
RSD = 0,4%		RSD = 1,0%		-
ΠΕΙΡΑΜΑ Υ4				
Άθροισμα εμβαδών κορυφών (πρότυπο 1042 ppm)		Άθροισμα εμβαδών κορυφών (εμβολιασμένο 1098 ppm)		Ανάκτηση, %
170012		174793		99,2
163873		175289		99,4
169762		173087		98,2
Μέσος όρος	167882	Μέσος όρος	174390	-
RSD = 2,1%		RSD = 0,7%		-

6.6 Όριο Ανίχνευσης (LOD) – Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου υπολογίστηκε από τις παρακάτω σχέσεις στις οποίες χρησιμοποιείται η κλίση της καμπύλης αναφοράς των προτύπων και η τυπική απόκλιση του αραιότερου εμβολιασμένου διαλύματος, του οποίου η συγκέντρωση ήταν 500 ppm, δηλαδή στο χαμηλότερο επίπεδο της γραμμικότητας :

$$LOD = 3,3 \frac{SD}{b}$$

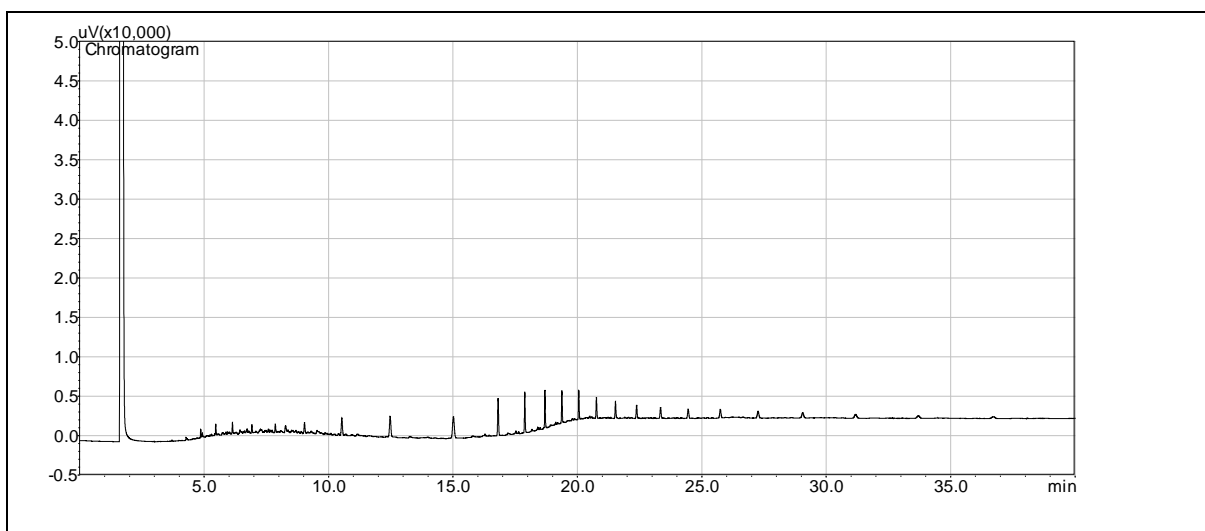
$$LOQ = 10 \frac{SD}{b}$$

Επίσης, από τις ίδιες σχέσεις υπολογίστηκε και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του οργάνου χρησιμοποιώντας το μικρότερης συγκέντρωσης πρότυπο διάλυμα των 500 ppm. Στον πίνακα 6.8 φαίνονται τα παραπάνω όρια, τα οποία αφορούν την μέθοδο και το όργανο αντίστοιχα.

Πίνακας 6.6. Αποτελέσματα LOD – LOQ οργάνου και μεθόδου προσδιορισμού στερεής παραφίνης.

Κλίση (b) καμπύλης αναφοράς (Σχήμα 6.2)	SD_{εμβολιασμένου}	SD_{προτύπου}
275.87	4115	3237
-	LOD _{μεθόδου} = 50ppm	LOD _{οργάνου} = 40ppm
-	LOQ _{μεθόδου} = 150ppm	LOQ _{οργάνου} = 120ppm

Παρακάτω παρατίθενται το χρωματογράφημα που πάρθηκε από πρότυπο διάλυμα σε συγκέντρωση ίση με το LOQ της μεθόδου και όπως φαίνεται αρκετές κορυφές της στερεής παραφίνης δεν εμφανίζουν ικανοποιητικές αποκρίσεις όπως αναμενόταν (σχήμα 6.4)



Σχήμα 6.4. Αέριοχρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος στερεής παραφίνης συγκέντρωσης ίσης με το LOQ της μεθόδου

6.7 Πρωτόκολλο ανάλυσης ρουτίνας

Για την παρασκευή του πρότυπου διαλύματος ζυγίζονται 25,0 mg στερεής παραφίνης (CRS), διαλύονται σε 10 mL εξάνιο μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL και γίνεται αραίωση μέχρι τη χαραγή αυτής, ώστε να βρίσκεται στη συγκέντρωση εργασίας των 1000 ppm.

Για την παρασκευή του δείγματος ζυγίζονται 312,5 mg κρέμας, ονομαστικής περιεκτικότητας σε στερεή παραφίνη 8%, διαλύονται σε 10 mL εξάνιο μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL και γίνεται αραίωση μέχρι τη χαραγή αυτής.

Στη συνέχεια, εγχύεται 1 mL από το πρότυπο διάλυμα σε φιαλίδιο και 1 mL από το διάλυμα του δείγματος σε άλλο φιαλίδιο και τοποθετούνται στον αυτόματο δειγματολήπτη ώστε να λάβει χώρα η αεροχρωματογραφική ανάλυση, αφού πρώτα διηθηθούν από φίλτρα διήθησης με μέγεθος πόρων 0,45 μm από αναγεννημένη κυτταρίνη.

Η μεθοδολογία της ποσοτικοποίησης που χρησιμοποιείται είναι αυτή του ενός προτύπου στη συγκέντρωση εργασίας του δείγματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7°

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΓΡΗΣ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ ΣΕ ΚΡΕΜΑ

7.1 Χρωματογραφικές συνθήκες

Οι τελικές χρωματογραφικές συνθήκες της μεθόδου για τον προσδιορισμό της υγρής παραφίνης. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά αυτές οι χρωματογραφικές συνθήκες.

Στήλη: τριχοειδής στήλη MEGA-5HT, $d= 0.25 \text{ mm}$, $l= 30 \text{ m}$, $T_{\max}= 350 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Κινητή φάση: He (αέριαχρωματογραφία)

Διαλύτης: αιθανόλη

Ταχύτητα ροής: 3 mL/min

Γραμμική ταχύτητα: 30 cm/min

Όγκος έγχυσης: $0.5 \text{ }\mu\text{L}$

Θερμοκρασία εισαγωγέα: $320 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Αναλογία διαμοιρασμού: 1/10

Θερμοκρασιακό πρόγραμμα στήλης:

Hold time (min)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Rate ($^{\circ}\text{C/min}$)
0-2	180	-
2-10	240	20
10-21	340	20

Ανιχνευτής: FID

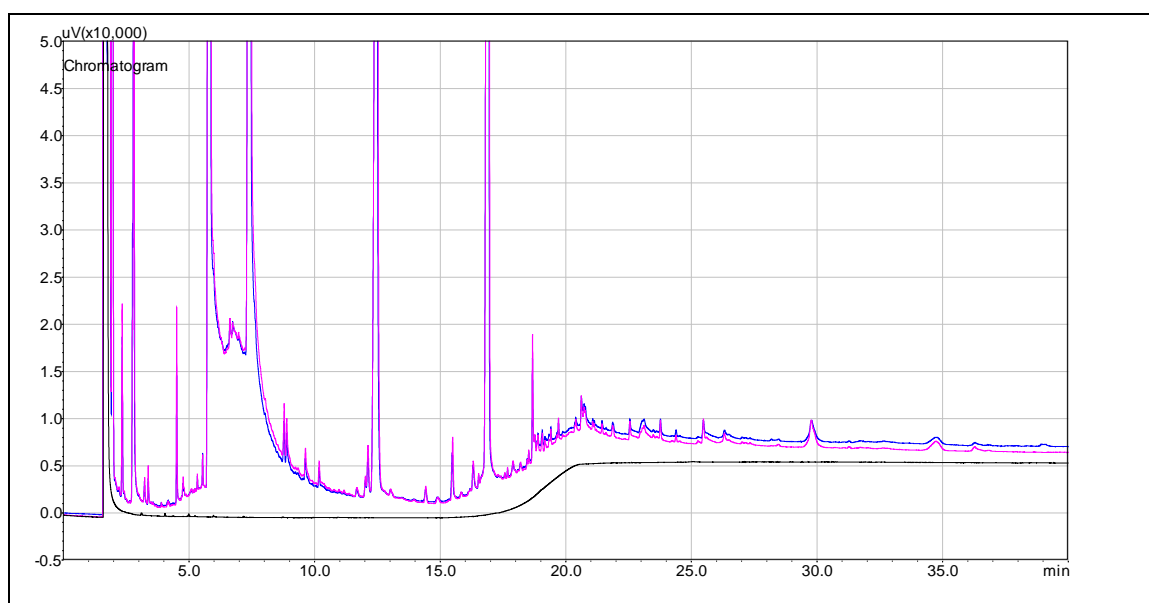
Θερμοκρασία ανιχνευτή: $350 \text{ }^{\circ}\text{C}$

7.2 Ειδικότητα Μεθόδου

Κριτήριο αποδοχής

Να μην υπάρχει παρεμπόδιση στο ύψος της καμπύλης της υγρής παραφίνης για το διάστημα χρόνου 19.5 min-20.5 min από τα έκδοχα.

Η ειδικότητα της μεθόδου μελετήθηκε με διάλυμα placebo, στο οποίο τα έκδοχα βρίσκονται σε συγκεντρώσεις οι οποίες καθορίζονται από τη συγκέντρωση εργασίας της υγρής παραφίνης (working concentration) του προς ανάλυση δείγματος. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στο διάλυμα placebo πρέπει να περιέχεται και η στερεή παραφίνη, εφόσον αυτή θα προσδιοριστεί με άλλη μέθοδο της οποίας η επικύρωση παρουσιάστηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα του διαλύματος placebo, του λευκού δείγματος και του εμβολιασμένου διαλύματος υγρής παραφίνης σε συγκέντρωση 250 ppm, η οποία όμως είναι αρκετά μικρότερη του διαλύματος εργασίας των 1000 ppm (σχήμα 7.1).



Σχήμα 7.1. Αέριοχρωματογράφημα λευκού, placebo και εμβολιασμένου διαλύματος 250 ppm υγρής παραφίνης.
blank — placebo — spiked 250 ppm —

Από το σχήμα 7.1 φαίνεται ότι τα ύψη των κορυφών του εμβολιασμένου δείγματος της υγρής παραφίνης στο χρονικό διάστημα ενδιαφέροντος, έστω και σε αυτή τη μικρή συγκέντρωση, είναι ευδιάκριτα και μεγαλύτερα από τα ύψη του placebo. Οπότε θεωρήθηκε ότι ικανοποιείται το κριτήριο αποδοχής για την ειδικότητα της μεθόδου.

7.3 Γραμμικότητα Μεθόδου

<i>Κριτήριο αποδοχής</i>
Ο συντελεστής συσχέτισης (r) της καμπύλης βαθμονόμησης να μην είναι μικρότερος από 0,99

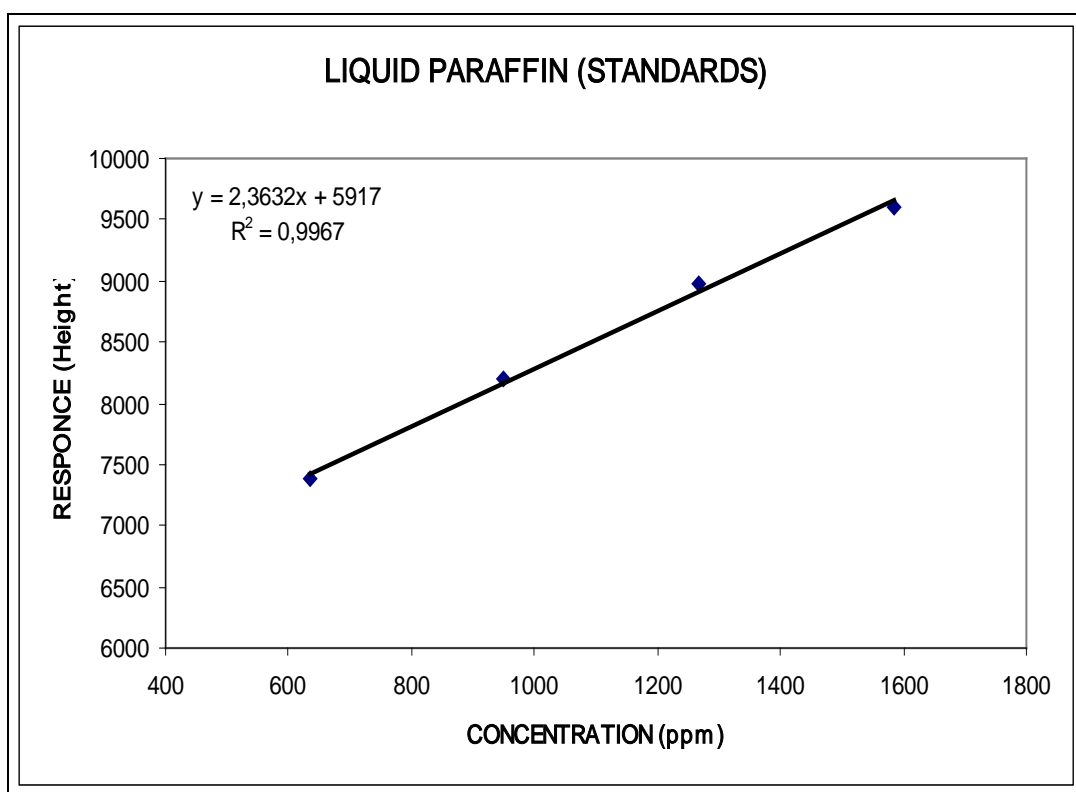
Παρασκευάστηκαν 4 εμβολιασμένα διαλύματα υγρής παραφίνης σε placebo σε διαφορετικές συγκεντρώσεις περιμετρικά της συγκέντρωσης εργασίας και αναλύθηκαν 3 φορές το καθένα. Πρέπει να σημειωθεί ότι η γραμμικότητα μελετήθηκε στην περιοχή 60% - 140% της συγκέντρωσης εργασίας των 1000 ppm, το οποίο εύρος είναι μεγαλύτερο από το ελάχιστο αποδεκτό και τυπικά χρησιμοποιούμενο 80% -120% (πίνακας 7.1).

Πίνακας 7.1 Αποτελέσματα γραμμικότητας μεθόδου προσδιορισμού υγρής παραφίνης

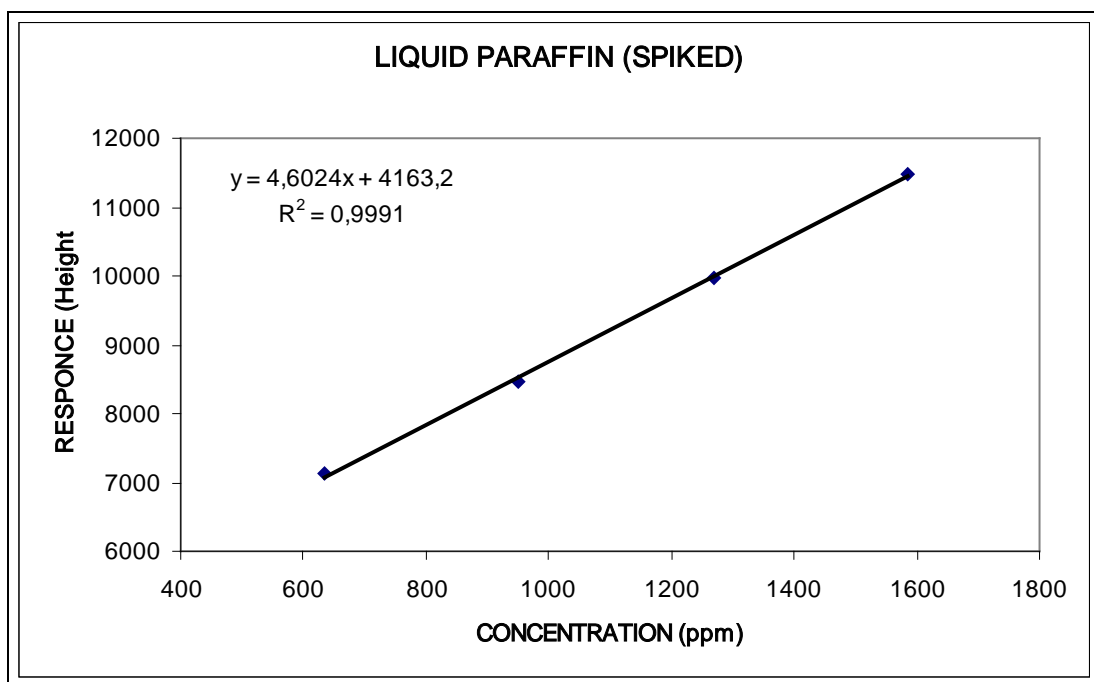
Πρότυπα διαλύματα	Θεωρητική συγκέντρωση (ppm)	Μέση τιμή Σ Ύψους καμπύλης (\pm SD) (N=3)	Πειραματική συγκέντρωση από εξίσωση παλινδρόμησης (ppm) (\pm SD)
A	634	7,13 (\pm 0,12)*10 ³	646 (\pm 26)
B	951	8,47 (\pm 0,13)*10 ³	935 (\pm 30)
C	1268	9,98 (\pm 0,18)*10 ³	1265 (\pm 33)
D	1585	11,49 (\pm 0,44)*10 ³	1592 (\pm 68)

Το διάγραμμα και εξίσωση της καμπύλης αναφοράς παρουσιάζεται στο σχήμα 7.2. Το κριτήριο αποδοχής ικανοποιείτε, καθώς ο συντελεστής συσχέτισης (r) είναι μεγαλύτερος από 0.99.

Πρέπει να αναφερθεί ότι σε αντίθεση με τον προσδιορισμό της στερεής παραφίνης, εδώ για την μελέτη των στοιχείων επικύρωσης θα χρησιμοποιηθούν εμβολιασμένα και όχι καθαρά πρότυπα διαλύματα καθώς η κλίση (ευαισθησία) είναι σημαντικά διαφορετική μεταξύ των καμπυλών αναφοράς που πάρθηκαν από πρότυπα και εμβολιασμένα διαλύματα, όπως φαίνεται και στα σχήματα 7.2 και 7.3. Με αυτό τον τρόπο θα εξουδετερωθεί η επίδραση της μήτρας του δείγματος η οποία είναι ισχυρή στον προσδιορισμό της υγρής παραφίνης. Σε αμφότερες τις περιπτώσεις οι καμπύλες αναφοράς δεν διέρχονται από το μηδέν λόγω της μέτρησης υψών κορυφών σε καμπύλες, οπότε δεν υφίσταται μηδενική γραμμή βάσης.



Σχήμα 7.2. Διάγραμμα και εξίσωση παλινδρόμησης καμπύλης αναφοράς υγρής παραφίνης από πρότυπα διαλύματα.



Σχήμα 7.3. Διάγραμμα και εξίσωση παλινδρόμησης καμπύλης αναφοράς υγρής παραφίνης από εμβολιασμένα πρότυπα διαλύματα σε placebo.

7.4 Πιστότητα Μεθόδου

7.4.1 Επαναληψιμότητα Συστήματος

Κριτήριο αποδοχής

Το %RSD των υψών στην καμπύλη να είναι μικρότερο ή ίσο του 5,0
--

Έγιναν 3 εγχύσεις σε εμβολιασμένο πρότυπο διάλυμα υγρής παραφίνης στη συγκέντρωση εργασίας (1000 ppm), προσδιορίστηκε το άθροισμα των υψών των κορυφών ΣΥί και υπολογίστηκε η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) η οποία ήταν 2,7, οπότε ικανοποιείται το κριτήριο για την επαναληψιμότητα του συστήματος (πίνακας 7.2).

Πίνακας 7.2. Αποτελέσματα επαναληψιμότητα συστήματος προσδιορισμού υγρής παραφίνης.

Αριθμός Έγχυσης	Ύψη καμπύλης (pA)
1	8347
2	8406
3	7993
Μέσος όρος	8192
SD	223
RSD	2,7%

7.4.2 Επαναληψιμότητα Μεθόδου

Κριτήρια αποδοχής

Οι ανακτήσεις να είναι μεταξύ 95-105% και το %RSD μεταξύ των ανακτήσεων να είναι μικρότερο ή ίσο του 5%.

Για την μελέτη της επαναληψιμότητας παρασκευάστηκαν 2 εμβολιασμένα πρότυπα διαλύματα με συγκεντρώσεις στα άκρα της γραμμικής περιοχής, δηλαδή 600 ppm και 1400 ppm αντιστοίχως, τα οποία αναλύθηκαν 6 φορές το καθένα. Από τους μέσους όρους των υψών υπολογίστηκε εξίσωση ευθείας καμπύλης αναφοράς ίση με $y = 0,9049x + 6173$.

Στη συνέχεια παρασκευάστηκε εμβολιασμένο διάλυμα 1000 ppm και αναλύθηκε 6 φορές. Από την εξίσωση καμπύλης αναφοράς ρουτίνας των 2 προτύπων υπολογίστηκε η πειραματική συγκέντρωση και η επί τοις εκατό (%) ανάκτηση (Πίνακας 7.3)

Πίνακας 7.3. Αποτελέσματα επαναληψιμότητας μεθόδου προσδιορισμού υγρής παραφίνης.

Ευρεθείσα συγκέντρωση (ppm)	Ύψος καμπύλης ΣΥί (pA)	Ανάκτηση, %
1048	7122	104,8
1034	7109	103,4
1035	7110	103,5
991	7069	99,0
995	7073	99,5
997	7075	99,7
	RSD = 0,8%	RSD = 2,2%
-	ΜΕΣΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗ	101,0%

7.5 Ακρίβεια Μεθόδου

Κριτήρια αποδοχής

Οι ανακτήσεις να είναι μεταξύ 95-105% και το %RSD μεταξύ των ανακτήσεων να είναι μικρότερο ή ίσο του 5%.

Για την μελέτη της ακρίβειας, όπως έγινε και για την επαναληψιμότητα, χρησιμοποιήθηκαν 2 εμβολιασμένα πρότυπα διαλύματα σε placebo με συγκεντρώσεις στα άκρα της γραμμικής περιοχής, δηλαδή 600 ppm και 1400 ppm αντιστοίχως. Μετά από 6 αναλύσεις στο καθένα κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς ρουτίνας 2 προτύπων και υπολογίσθηκε εξίσωση ευθείας ίση με $\psi = 8,6618\chi + 3844$.

Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν 3 εμβολιασμένα διαλύματα σε placebo σε συγκεντρώσεις υγρής παραφίνης των 690 ppm, των 1030 ppm και των 1390 ppm, τα οποία καλύπτουν όλο το εύρος της γραμμικής περιοχής της μεθόδου και έγιναν 3 αναλύσεις στο καθένα. Κατόπιν, με χρήση της προηγούμενης καμπύλης αναφοράς βρέθηκαν πειραματικές συγκεντρώσεις και υπολογίσθηκαν οι ανακτήσεις και το RSD αυτών. Στον πίνακα 7.3 φαίνονται τα αποτελέσματα και προκύπτει ότι ικανοποιούνται τα κριτήρια όσον αφορά την ακρίβεια της μεθόδου.

Πίνακας 7.4. Αποτελέσματα ακρίβειας μεθόδου προσδιορισμού υγρής παραφίνης.

Ευρεθείσα συγκέντρωση (ppm)	Ύψος καμπύλης ΣΥί (pA)	Ανάκτηση, %
724	10118	104,9
719	10070	104,2
733	10198	106,2
-	RSD = 0,6%	RSD = 1,0 %
Ευρεθείσα συγκέντρωση (ppm)	Ύψος καμπύλης ΣΥί (pA)	Ανάκτηση, %
1004	12543	97,5
1048	12919	101,7
1060	13023	102,9
-	RSD = 2,0%	RSD = 2,8 %
Ευρεθείσα συγκέντρωση (ppm)	Ύψος καμπύλης ΣΥί (pA)	Ανάκτηση, %
1344	15490	96,7
1331	15370	95,8
1328	15346	95,5
-	RSD = 0.5%	RSD = 0.7%

7.6 Ανθεκτικότητα Μεθόδου

Κριτήρια αποδοχής

Οι ανακτήσεις να είναι μεταξύ 95-105% και το %RSD των ανακτήσεων να είναι μικρότερο ή ίσο του 5%.

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι να δειχθεί ότι η μέθοδος διατηρεί την αξιοπιστία της όταν υπόκειται σε μικρές αλλαγές των συνθηκών της. Η αξιολόγηση έγινε με 3 διαφορετικές μικρές αλλαγές στη μέθοδο. Για κάθε μικρή αλλαγή στη μέθοδο πάρθηκε και από μία καινούργια καμπύλη βαθμονόμησης ρουτίνας 2 σημείων ώστε να μπορούν να βρεθούν οι ανακτήσεις από τα εμβολιασμένα δείγματα. Κάθε εμβολιασμένο δείγμα αναλύθηκε 3 φορές για κάθε μια από τα 3 πειράματα.

Στο πρώτο πείραμα (πείραμα γ2) έγινε αλλαγή στην γραμμική ταχύτητα αερίου από 30 cm/min σε 28 cm/min, στο δεύτερο πείραμα (πείραμα γ3) έγινε αλλαγή στο ρυθμό μεταβολής της θερμοκρασίας στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα από 20 °C/min σε 19 °C/min και στο τελευταίο πείραμα (πείραμα γ4) έγινε αλλαγή στη αρχική θερμοκρασία από 180 °C

σε 175 °C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7.4 και φαίνεται ότι τα κριτήρια για την ανθεκτικότητα ικανοποιούνται.

Από καμπύλη αναφοράς ρουτίνας 2 προτύπων υπολογίσθηκε εξίσωση ευθείας για το πείραμα Y2 ίση με $\psi = 6,1071\chi + 6130$, για το πείραμα Y3 ίση με $\psi = 5,9897\chi + 7167,4$ και για το πείραμα Y3 ίση με $\psi = 6,3245\chi + 7046,7$.

Πίνακας 7.5 Αποτελέσματα ανθεκτικότητας μεθόδου προσδιορισμού υγρής παραφίνης.

ΠΕΙΡΑΜΑ Y2		
Ευρεθείσα συγκέντρωση (ppm)	Ύψος καμπύλης ΣΥi (pA)	Ανάκτηση, %
907	11671	101,9
868	11433	97,6
920	11750	103,4
		RSD = 3,0%
ΠΕΙΡΑΜΑ Y3		
Ευρεθείσα συγκέντρωση (ppm)	Ύψος καμπύλης ΣΥi (pA)	Ανάκτηση, %
880	12439	95,7
936	12776	101,7
918	12665	99,8
		RSD = 3,1%
ΠΕΙΡΑΜΑ Y4		
Ευρεθείσα συγκέντρωση (ppm)	Ύψος καμπύλης ΣΥi (pA)	Ανάκτηση, %
841	12365	95,6
867	12532	98,5
896	12711	101,8
		RSD = 3,1%
	ΜΕΣΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗ	101.7%

7.7 Όριο Ανίχνευσης (LOD) – Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου υπολογίστηκε από τις παρακάτω σχέσεις στις οποίες χρησιμοποιείται η κλίση της καμπύλης αναφοράς των προτύπων και η τυπική απόκλιση του αραιότερου εμβολιασμένου

διαλύματος, του οποίου ή συγκέντρωση ήταν 500 ppm δηλαδή στο χαμηλότερο επίπεδο της γραμμικότητας :

$$LOD = 3,3 \frac{SD}{b}$$

$$LOQ = 10 \frac{SD}{b}$$

Επίσης, από τις ίδιες σχέσεις υπολογίστηκε και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του οργάνου χρησιμοποιώντας το μικρότερης συγκέντρωσης πρότυπο διάλυμα των 600 ppm. Στον πίνακα 7.5 φαίνονται τα παραπάνω όρια, τα οποία αφορούν τη μέθοδο και το όργανο αντίστοιχα.

Πίνακας 7.6. Αποτελέσματα LOD – LOQ οργάνου και μεθόδου προσδιορισμού υγρής παραφίνης.

Κλίση (b) καμπύλης αναφοράς από εμβολιασμένα διαλύματα (Σχήμα 7.3)	SD_{εμβολιασμένου}	SD_{πρότυπου}
4,6024	115	55
Κλίση (b) καμπύλης αναφοράς από πρότυπα διαλύματα (Σχήμα 7.2)	LOD _{μεθόδου} = 83 ppm	LOD _{οργάνου} = 77 ppm
2,3632	LOQ _{μεθόδου} = 250ppm	LOQ _{οργάνου} = 233 ppm

7.8 Πρωτόκολλο ανάλυσης ρουτίνας

Για την παρασκευή του πρότυπου διαλύματος ζυγίζονται 25,0 mg υγρής παραφίνης (CRS), διαλύονται σε 10 mL αιθανόλης μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL και γίνεται αραίωση μέχρι τη χαραγή αυτής, ώστε να βρίσκεται στη συγκέντρωση εργασίας των 1000 ppm.

Για την παρασκευή του δείγματος ζυγίζονται 1250,0 mg κρέμας, ονομαστικής περιεκτικότητας σε στερεή παραφίνη 2%, διαλύονται σε 10 mL αιθανόλη μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL και γίνεται αραίωση μέχρι τη χαραγή αυτής.

Στη συνέχεια, εγχύεται 1 mL από το πρότυπο διάλυμα σε φιαλίδιο και 1 mL από το διάλυμα του δείγματος σε άλλο φιαλίδιο και τοποθετούνται στον αυτόματο δειγματολήπτη ώστε να λάβει χώρα η αεροχρωματογραφική ανάλυση, αφού πρώτα διηθηθούν από φίλτρα διήθησης με μέγεθος πόρων 0,45 μm από αναγεννημένη κυτταρίνη.

Η μεθοδολογία της ποσοτικοποίησης που χρησιμοποιείται είναι αυτή των δύο προτύπων (καμπύλη αναφοράς ρουτίνας).

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantitation
GC	Gas chromatography
FID	Flame ionization detector

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mc Murry J., «Οργανική Χημεία», Τόμος 1, 4^η Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Αθήνα 2004
2. Torresola J., «Solidification properties of certain waxes and paraffins», B.S.M.E Massachusetts Institute of Technology, 1996
3. Mozes G., Freund M., Csikos R., Kesztyeli, «Paraffins Products: Properties, Technologies and Applications», 1st Edition, 1983
4. Eldridge B., Olefin/Paraffin separation technology: A review, Ind. Eng. Chem. Res. 1993, 32, 2208-2212
5. Asinger F., «Paraffins: Chemistry and Technology», 1st Edition, 1967
6. European Pharmacopeia, Edition 2007, Paraffin light liquid and Paraffin white soft monographs
7. Κουππάρης Μ., «Επικύρωση/Επαλήθευση Αναλυτικών Μεθόδων», Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Χημική Ανάλυση-Έλεγχος Ποιότητας»
8. Κουππάρης Μ., «Βελτιστοποίηση Αναλυτικών Μεθόδων», Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Χημική Ανάλυση-Έλεγχος Ποιότητας»
9. Morgan S., Deming S., Simplex optimization of analytical chemical methods, Anal. Chem., 1974, 46, 1170-1181
10. Validation of Analytical Procedures: Text and Methology, <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methology.html> (τελευταία επίσκεψη 28/9/2013)
11. Κουππάρης Μ., «Σημειώσεις Χημειομετρίας», Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Χημική Ανάλυση-Έλεγχος Ποιότητας», Αθήνα 2008
12. Watson D., «Φαρμακευτική Ανάλυση», Επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Κουππάρης Μ., 2^η Έκδοση, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, 2011
13. Μπακέας Ε., «Σημειώσεις Αεριοχρωματογραφίας», Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Χημική Ανάλυση-Έλεγχος Ποιότητας», Αθήνα 2008
14. Scoog, Holler, Nieman, «Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης», 5^η Έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα 2005

15. Schomburg G., «Gas Chromatography», 1st Edition, 1990
16. Primol 352, Medicinal grade White Oil (ExxonMobile),
http://www.exxonmobil.com/Denmark-English/Specialties/PDS/GLXXENSPCEM_Primol_352.aspx (τελευταία επίσκεψη 30/7/2013)
17. Mortimer J., Luke L., The determination of normal paraffins in petroleum products, Anal. Chim. Acta, 38,1967, 119-126
18. Fazeelat T., Saleem A., GC-FID Analysis of wax paraffins from Khaskheli Crude Oil, Chem. Soc. Pak., 29,2007, 492-499
19. Soulages N., Brieva A., Gas chromatographic determination of the paraffin and naphthene content in saturated hydrocarbon distillates with porous layer open tubular columns of molecular sieve 13X, Journal of Chromatogr.. 101,1974, 365-371
20. Tong H., Karasek W., Flame ionization detector response factors for compound classes in quantitative analysis of complex organic mixtures, Anal. Chem. 56,1984, 2124-2128
21. Yuan B., Wang Y., Fu J., Zhang Q., Jiang G., An analytical method for chlorinated paraffins and their determination in soil samples, Chin. Sc. Bul., 55,2010, 2396-2402

