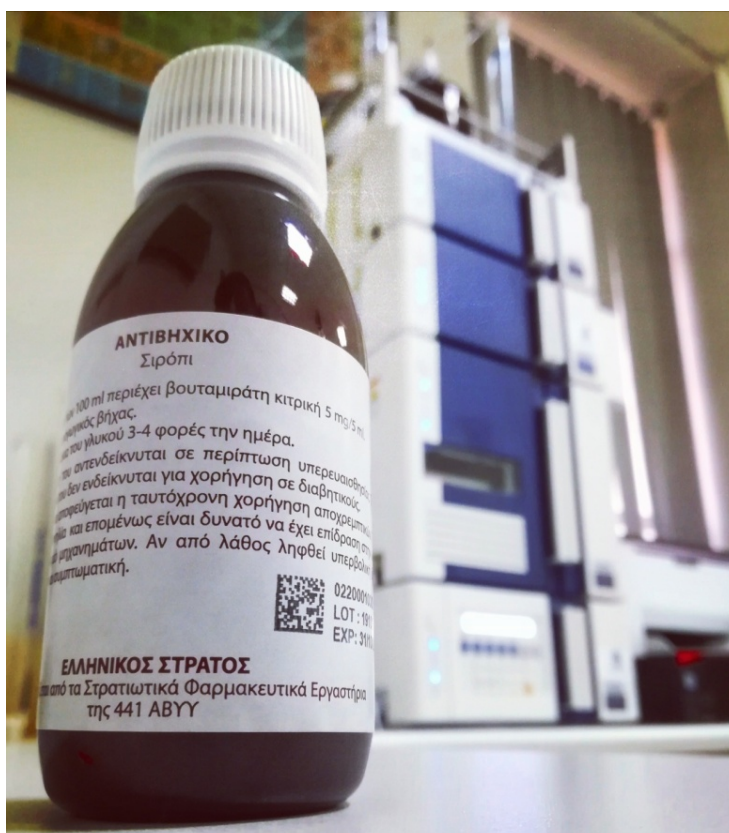




ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ



Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου HPLC
με χρήση ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA)
για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό
της Κιτρικής Βουταμιράτης και του Βενζοϊκού Οξέος
σε σιρόπι

ΝΕΟΦΩΤΙΣΤΟΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ-ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ, Χημικός

ΑΘΗΝΑ, Νοέμβριος 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιωάννης Ντότσικας, Αν. Καθηγητής (Επιβλέπων), Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ

Ιωάννης Λουκάς, Αν. Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ

Ειρήνη Παντερή, Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ

«Η έγκριση διατριβής ειδίκευσης από το Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα.»

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα Φαρμακευτικά Εργαστήρια του Ελληνικού Στρατού, τα οποία στεγάζονται στην 441 Αποθήκη Βάσης Υγειονομικού Υλικού (ΑΒΥΥ) στον Ταύρο Αττικής. Αποτελεί ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Φαρμακευτική Ανάλυση-Έλεγχος Ποιότητας» του τμήματος Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ. Ο σκοπός της εργασίας ήταν η ανάπτυξη και η επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της δραστικής ουσίας *Κιτρική Βουταμιράτη* και του συντηρητικού *Βενζοϊκό Οξύ* σε σκεύασμα σιρόπι, το οποίο παράγεται και διανέμεται στα φαρμακεία των στρατιωτικών δομών της χώρας από την 441 ΑΒΥΥ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Ιωάννη Ντότσικα για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω μια ερευνητική μελέτη μαζί του, για τη συνεχή καθοδήγησή του και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ' αρχής. Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κα Ειρήνη Παντερή και κ. Ιωάννη Λουκά, για το χρόνο που αφιέρωσαν και για τη συμβολή τους στην αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ τη διοίκηση της 441 ΑΒΥΥ, κ. Ευστράτιο Κιόρτση -διοικητή και κ. Χαράλαμπο Μπουτσικάρη -υποδιοικητή, οι οποίοι με δέχτηκαν με μεγάλη προθυμία και μου έδωσαν τη δυνατότητα να διεξάγω τη παραπάνω μελέτη στα Φαρμακευτικά Εργαστήρια του Ελληνικού Στρατού.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο στρατιωτικό Φαρμακοποιό κ. Κωνσταντίνο Γκουντάνα για τις υποδείξεις, τη παρακίνηση και τη καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας, καθώς και για την εκμάθηση πάρα πολλών αναλυτικών τεχνικών και χρήσιμων εργαστηριακών πρακτικών. Ακόμη ευχαριστώ από καρδιάς όλα τα στελέχη του εργαστηρίου, κ. Σταύρο Κωστούδη, κ. Ευάγγελο Μαυρίδη, κα Μαριάνθη Καραμάνη και κα Αικατερίνη Ζαρμπίνιου για το άριστο εργασιακό κλίμα, την άψογη συνεργασία μας και την άμεση βοήθεια που μου παρείχαν όποτε τη χρειάστηκα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Ευάγγελο Γκίκα -αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ και τον κ. Γρηγόρη Ζωΐδη -αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, για τις πολύτιμες συμβουλές τους σε οποιαδήποτε στιγμή τις είχα ανάγκη κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα.

Ευχαριστώ ειλικρινά το φίλο κ. Γεώργιο Δανέζη, μεταδιδακτορικό ερευνητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την ανιδιοτελή βοήθεια του και το αδιάλειπτο ενδιαφέρον του σχετικά με την επαγγελματική μου σταδιοδρομία.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την αμέριστη στήριξη, κατανόηση, ανοχή και πίστη σε μένα, καθώς και την πάσης φύσεως ενίσχυση προς επίτευξη των στόχων μου.

Μην θες να σταθείς
σε κόρφες
τη μοναξιά αν φοβάσαι
γιατί όλο πιο γρήγορα ανεβείς
τόσο πιο μόνος θα 'βεί
20/07/20 Γιώργος Γιατρός

Στη μάνα μου, Μαρία

Περίληψη

Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας μεθόδου RP-HPLC για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της δραστικής ουσίας «Κιτρική Βουταμιράτη» και του συντηρητικού «Βενζοϊκό Οξύ» σε σιρόπι. Η αναλυτική διαδικασία σχεδιάστηκε και εν συνεχεία επικυρώθηκε ώστε να αξιολογηθούν ορθολογικά, μέσω πειραματικής τεκμηρίωσης, οι δυνατότητές της και να δειχθεί ότι είναι κατάλληλη για το σκοπό για τον οποίο αυτή προορίζεται (fitness for purpose). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στα Φαρμακευτικά Εργαστήρια του Ελληνικού Στρατού, στον Ταύρο Αττικής.

Η βουταμιράτη είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο κατασταλτικό του ξηρού, μη παραγωγικού βήχα και συνήθως συναντάται στα διάφορα σκευάσματα με τη μορφή του κιτρικού άλατος (Butamirate Citrate, BC). Το βενζοϊκό οξύ και τα άλατά του αποτελούν βασικά συντηρητικά στη βιομηχανία φαρμάκων, εξασφαλίζοντας τη δομική ακεραιότητα μιας φαρμακοτεχνικής μορφής.

Η Φαρμακοποιία συχνά βασίζεται σε πρωτόκολλα άμεσης φασματοσκοπίας UV (direct UV spectroscopy), ωστόσο στη βιομηχανία ο προσδιορισμός των διαφόρων αναλυτών με φασματοφωτομετρία UV συνήθως διαδέχεται έναν «προκαταρκτικό διαχωρισμό» με HPLC. Κατά προσέγγιση, τα 3/4 των εφαρμογών της HPLC πραγματοποιούνται με στήλες πληρωτικών υλικών αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Ο βασικός γνώμονας για το σχεδιασμό της παρούσας μεθόδου ήταν η επίτευξη ενός βέλτιστου «συμβιβασμού» ανάμεσα στον επαρκή διαχωρισμό και στον όσο το δυνατόν πιο σύντομο χρόνο ανάλυσης (conflicting goals). Οι διάφορες προκαταρκτικές δοκιμές οδήγησαν στην επιλογή μιας στατικής φάσης νιτριλίου (-CN), και συγκεκριμένα κυανο-πρόπυλο σιλανίου (cyanopropylsilane). Οι στήλες αυτές θεωρούνται ως οι πιο πολικές εκ των στατικών φάσεων RP-HPLC και ως οι λιγότερο πολικές εκ των στατικών φάσεων NP-HPLC. Η κινητή φάση αποτελούνταν από ίση ποσότητα (1:1) MeOH και NaH₂PO₄*H₂O 50 mM, 1% Et₃N, pH=3±0,1. Η θερμοκρασία της στήλης ορίστηκε στους 36 °C, ενώ χρησιμοποιήθηκε ένας ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων (DAD) ρυθμισμένος στα 210 nm.

Παρατηρήθηκε ένας εγγενώς ικανοποιητικός διαχωρισμός, ωστόσο οι κορυφές ήταν αρκετά ασύμμετρες και έτσι ελήφθησαν μέτρα άρσης του φαινομένου αυτού. Παρόλα αυτά, η ασυμμετρία δεν ήταν σε καμία περίπτωση τόσο μεγάλη ώστε να οδηγήσει σε επικάλυψη των κορυφών ή να επηρεάσει την ακεραιότητα της ολοκλήρωσης. Επιδιώχθηκε η αποφυγή μιας εξαιρετικά καθυστερημένης έκλουσης της βουταμιράτης και μιας εξαιρετικά γρήγορης έκλουσης (μέτωπο του διαλύτη) του βενζοϊκού οξέος. Η μέθοδος βρέθηκε να πληροί τις προδιαγραφές της ειδικότητας, της γραμμικότητας, της ακρίβειας (ορθότητας), της πιστότητας και της σταθερότητας των προτύπων διαλυμάτων και των δειγμάτων. Ακόμη, η ανθεκτικότητά της αξιολογήθηκε και τεκμηριώθηκε μέσα από κατάλληλο πειραματικό σχεδιασμό.

Abstract

The present diploma thesis had as its aim the development of a RP-HPLC method for the simultaneous determination of the active pharmaceutical ingredient (API) "*Butamirate Citrate*" and of the preservative "*Benzoic Acid*" in syrup preparation. The analytical procedure was designed and subsequently validated so that its performance characteristics be rationally assessed, throughout an experimental documentation, and the method itself prove to be suitable for its intended purpose (fitness for purpose). The experimental part was conducted at the Greek Military Pharmaceutical Laboratories in Tauros, Athens.

Butamirate is a widely used suppressant for dry, non-productive cough which is most commonly prescribed in the form of its citrate salt (Butamirate Citrate, BC). Benzoic acid and its respective salt compounds constitute essential preservatives of the pharmaceutical industry, ensuring the structural stability of a formulation as a whole.

Even though Pharmacopoeial assays often rely quite heavily on direct UV spectroscopy, yet in industry this kind of detection usually succeeds a "preliminary separation" by HPLC. Approximately, 3/4 of all HPLC applications are carried out employing reversed phase packings (RP-HPLC). Regarding this study, the leading guideline for the method development stage was the achievement of an optimum "compromise" between the conflicting goals of adequate resolution vs as short as possible run time. Various preliminary tests eventually led to the selection of a cyanopropyl silica gel stationary phase (-CN column). Columns of this kind are considered to be as the most polar amongst reversed phased packings and as the least polar amongst normal phased packings. The mobile phase consisted of equal volumes (1:1) of MeOH and NaH₂PO₄*H₂O 50 mM, 1% Et₃N, pH=3±0,1. The column's temperature was set at 36 °C, while the detection of target analytes was achieved with a diode array detector (DAD) at 210 nm.

In spite of demonstrating a congenitally satisfactory separation, yet the analytical method produced quite asymmetrical peaks and that is why corrections were immediately made. All the same, the observed peak asymmetry was far from a magnitude which could be detrimental in terms of peak overlap or integration integrity. We aimed at avoiding a long delay elution of butamirate and a quite rapid elution of benzoic acid (close to the solvent front). The method was found to fulfill the required specifications with respect to specificity, linearity, accuracy (trueness), precision and stability of both standard solutions and of samples. What is more, an experimental design was set in order to provide documented assessment and evidence in relation to method ruggedness.

Πίνακας περιεχομένων

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
Κεφάλαιο 1: Βήχας και αντιβηχικά φάρμακα	11
1.1 Κατηγορίες και αίτια πρόκλησης βήχα	11
1.2 Αντιμετώπιση βήχα	14
1.2.1 Στρατηγικές αντιμετώπισης.....	14
1.2.2 Κατηγορίες φαρμάκων	15
1.3 Βουταμιράτη.....	17
1.3.1 Δομή.....	17
1.3.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες	18
1.3.3 Φαρμακολογικές ιδιότητες - Φαρμακοδυναμική	20
1.3.4 Φαρμακολογικές ιδιότητες - Φαρμακοκινητική.....	20
1.3.5 Θεραπευτικές εφαρμογές	21
1.3.6 Δοσολογία και τοξικότητα (υπερδοσολογία)	21
1.3.7 Ανεπιθύμητες ενέργειες.....	22
1.3.8 Αλληλεπιδράσεις, Προφυλάξεις & Προειδοποιήσεις κατά τη χρήση....	22
1.4 Βενζοϊκό οξύ και αντιβηχικά φάρμακα.....	22
1.4.1 Δομή.....	23
1.4.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες	23
1.4.3 Χρήσεις.....	24
1.4.4 Περιορισμοί κατά τη χρήση, τοξικότητα, θεραπευτικές ιδιότητες & αποβολή βενζοϊκού οξέος.....	25
Κεφάλαιο 2: Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	27
2.1 Εφαρμογές της χρωματογραφίας HPLC ^{59,61,62}	27
2.2 Δυνατότητες και περιορισμοί της HPLC ^{61,62}	28
2.3 Εξαγωγή και επεξεργασία πληροφοριών από ένα χρωματογράφημα.....	29
2.3.1 Ποιοτική ανάλυση ^{59,60}	29
2.3.2 Ποσοτική ανάλυση ^{59,60}	30
2.4 Εισαγωγή στη χρωματογραφία προσρόφησης και κατανομής ^{59-63,68}	32
2.4.1 Χρωματογραφία προσρόφησης (Adsorption Chromatography).....	35
2.4.2 Χρωματογραφία κατανομής (Partition Chromatography)	36
2.5 Οργανολογία HPLC.....	48

2.5.1	Αναλυτική στήλη χρωματογραφίας και φούρνος θερμοστάτησης ^{59-63,68}	49
2.5.2	Σύστημα παροχής της κινητής φάσης ^{59,61-63}	62
2.5.3	Σύστημα εισαγωγής του δείγματος ^{59,61-63}	68
2.5.4	Σύστημα ανίχνευσης ^{59,61-63}	74
2.5.5	Ηλεκτρονικοί υπολογιστές-Λογισμικά ^{59,61-63}	79
Κεφάλαιο 3: Αρχές της Υγροχρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (RP-HPLC)		82
3.1	Αναλύτες που προσδιορίζονται με RP-HPLC ⁶⁸	82
3.2	Κατηγοριοποίηση διαλυτών, επιθυμητές ιδιότητες & συνήθειες διαλύτες στη RP-HPLC ^{62,68}	83
3.3	Ασυμμετρία κορυφών (Peak asymmetry) ^{61-63,68}	88
3.3.1	Αξιολόγηση της ασυμμετρίας	89
3.3.2	Αίτια πρόκλησης της ασυμμετρίας	92
3.3.3	Αντιμετώπιση της ασυμμετρίας στους διαχωρισμούς βασικών ενώσεων	93
3.4	Ρυθμιστικά διαλύματα στη RP-HPLC - κριτήρια επιλογής ^{63,68}	96
3.5	Ο ρόλος της θερμοκρασίας στη RP-HPLC ^{63,68}	100
3.6	Ο ρόλος του pH και της σταθεράς pK_a στη RP-HPLC ^{63,68}	102
3.6.1	Η σταθερά ιοντισμού pK_a	102
3.6.2	Η ρύθμιση του pH-αντιθετικές προσεγγίσεις	102
3.7	Ο σχεδιασμός ενός διαχωρισμού: αρχικές προσεγγίσεις και ανάπτυξη μεθόδου (method development) ^{61-63,68}	106
3.7.1	Βασικές πληροφορίες για τα συστατικά του δείγματος - pK_a και $\log P$	106
3.7.2	Ανάπτυξη της μεθόδου (method development)	108
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		116
Κεφάλαιο 4: Οργανολογία και αντιδραστήρια		117
4.1	Οργανολογία	117
4.2	Αντιδραστήρια - Διαλύτες - Πρότυπες ουσίες	120
Κεφάλαιο 5: Ανάπτυξη και επικύρωση αναλυτικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της δραστικής ουσίας «Κιτρική Βουταμιράτη» και του συντηρητικού «Βενζοϊκό Οξύ» σε σιρόπι		123
5.1	Παρόμοιες μελέτες	123

5.2	Ανάπτυξη μεθόδου (method development) - επιδιωκόμενοι στόχοι & κατευθυντήριες γραμμές	125
5.2.1	Στήλη	126
5.2.2	Διαλύτες	127
5.2.3	Ρυθμιστικό διάλυμα	128
5.2.4	pH	128
5.2.5	Θερμοκρασία	129
5.2.6	Απενεργοποιητές	129
5.2.7	Μήκος κύματος	130
5.2.8	Τελικές δοκιμές	131
5.3	Επικύρωση μεθόδου	134
5.3.1	Πειραματικό πρωτόκολλο μεθόδου και έλεγχος καταλληλότητας συστήματος (SST)	134
5.3.2	Σταθερότητα Διαλυμάτων	141
5.3.3	Ειδικότητα-εκλεκτικότητα ⁶⁵	151
5.3.4	Γραμμικότητα ⁶⁵	156
5.3.5	Ακρίβεια-Ορθότητα ⁶⁵	166
5.3.6	Πιστότητα ⁶⁵	175
5.3.7	Ανθεκτικότητα ^{65,80}	191
5.3.8	Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού σε σκεύασμα	210
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	213

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Βήχας και αντιβηχικά φάρμακα

Ο βήχας (αρχαία ελληνική: βήξι¹) είναι μια αντανακλαστική δράση του αναπνευστικού συστήματος (και όχι μία νόσος) η οποία αποτελεί απόρροια του ερεθισμού των αεραγωγών². Βέβαια, ο βήχας μπορεί να ξεκινήσει και εκούσια. Εκδηλώνεται με επαναλαμβανόμενη εισπνοή η οποία ακολουθείται από βίαιη και σπασμωδική (ενίοτε πολλαπλή) εκπνοή του αέρα από τους πνεύμονες και συνοδεύεται από έναν ιδιαίτερο και συχνά τραχύ ήχο.

Ως αμυντικό αντανακλαστικό ο βήχας παρουσιάζει μια προσαγωγό οδό και μια απαγωγό οδό. Το προσαγωγό σκέλος περιλαμβάνει υποδοχείς στην αισθητική κατανομή του τριδύμου νεύρου (γλωσσοφαρυγγικού, άνω λαρυγγικού, πνευμονογαστρικού). Το απαγωγό σκέλος περιλαμβάνει το παλίνδρομο λαρυγγικό νεύρο και τα νωτιαία νεύρα³ (Σχήμα 1).

Σε ό,τι αφορά τη νευροφυσιολογία⁴ του βήχα, τα τμήματα του εγκεφάλου που συνιστούν τα ανώτερα κέντρα ελέγχου τα οποία επεξεργάζονται όλες τις αισθητηριακές πληροφορίες (καθώς είναι αισθητήρια συστήματα), είναι εξαιρετικά πολύπλοκες δομές. Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται η ανατομία αυτών των νευρωνικών οδών. Η περαιτέρω εξέταση των μηχανισμών ρύθμισης του βήχα ξεφεύγει από το αντικείμενο μελέτης της εν λόγω διπλωματικής εργασίας.

Ο βήχας παρέχει έναν φυσικό προστατευτικό μηχανισμό: εξασφαλίζει τον καθαρισμό του τραχειοβρογχικού δένδρου από διάφορα εισπνεόμενα ξένα σώματα (π.χ. σκόνη, σωματίδια) ή/και από εκκρίσεις (συσσωρευμένη βλέννα η οποία αδρανοποιεί τα μικρόβια) μέσω της μηχανικής απομάκρυνσης από τους πνεύμονες ή το ανώτερο αναπνευστικό^{3,4} (Σχήμα 1). Καθόσον αντανακλαστικό και όχι νόσος, ο βήχας είναι απλά ένα σύμπτωμα το οποίο μπορεί να παραπέμπει σε διαφορετικές ασθένειες ανά περίπτωση² (βλ. 1.1). Καθίσταται λοιπόν αναγκαία η αξιολόγηση της βαρύτητάς του και η συν-θεώρηση της χρονιότητας του αλλά και λοιπών συνοδών συμπτωμάτων (διαφορική διάγνωση). Συνήθως επιδιώκεται η πλήρης διάγνωση της αιτίας του βήχα, εξετάζοντας ενδελεχώς και το ενδεχόμενο σπάνιων ασθενειών. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις αυτό δεν είναι εφικτό και τότε μιλάμε για ιδιοπαθή βήχα ή βήχα αγνώστου αιτιολογίας².

1.1 Κατηγορίες και αίτια πρόκλησης βήχα

Ο βήχας μπορεί να ξεκινήσει από μία πληθώρα ερεθιστικών αιτιών, είτε εξωγενών (καπνός, σκόνη, ατμοί, ξένα σώματα) είτε ενδογενών (εκκρίσεις στον ανώτερο αεραγωγό, γαστρικό περιεχόμενο). Αυτά τα ερεθίσματα είναι δυνατόν να επηρεάσουν τους υποδοχείς των ανώτερων αεραγωγών (ειδικά του φάρυγγα και του λάρυγγα) ή της κατώτερης αναπνευστικής οδού (Σχήμα 1), μετά από πρόσβαση στο τραχειοβρογχικό δένδρο από εισπνοή ή εισρόφηση³. Κάθε διαταραχή που οδηγεί σε φλεγμονή, βρογχόσπασμο, διήθηση ή συμπίεση των αεραγωγών μπορεί να προκαλέσει βήχα. Οι φλεγμονές συνήθως προκαλούνται από λοιμώξεις των αεραγωγών οι οποίες συνήθως είναι είτε ιογενείς είτε

βακτηριακές.

Η πιο συχνή ταξινόμηση του βήχα είναι η διάκριση του σε **παραγωγικό** και **μη παραγωγικό**. Παραγωγικός ονομάζεται ο βήχας ο οποίος μέσω εκκρίσεων φλεγμάτων, βλέννας, πύου ή ξένων σωμάτων βοηθά στον καθαρισμό των βρόγχων και των πνευμόνων. Οι πιθανές αιτίες πρόκλησης του εν λόγω είδους βήχα ποικίλουν, ενώ οι κυριότερες (συχνότερες) είναι^{2,3}:

- Οι ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού, όπως το κοινό κρυολόγημα ή η γρίπη. Πολλοί ιοί επωφελούνται από την πρόκληση βήχα στον ξενιστή διότι έτσι επιτυγχάνεται η εξάπλωσή τους σε νέους ξενιστές⁴. Στην ιογενή βρογχίτιδα η φλεγμονή των αεραγωγών πολλές φορές επιμένει πολύ μετά την εξάλειψη των τυπικών οξέων συμπτωμάτων και για το λόγο αυτό προκαλεί παρατεταμένο βήχα που ίσως διαρκέσει και για εβδομάδες³.
- Οι μικροβιακές λοιμώξεις, όπου ο βήχας μπορεί να παραπέμπει σε βρογχίτιδα, πνευμονία, φαρυγγίτιδα, λαρυγγίτιδα (αν και συνήθως είναι ιογενής και πιο σπάνια μικροβιακή), ιγμορίτιδα ή φυματίωση (σε συνδυασμό με πυρετό, πόνο στο θώρακα και πιθανή αιμόπτυση). Επίσης συγκεκριμένες κατηγορίες μικροβιακών λοιμώξεων όπως οι βακτηριακές λοιμώξεις (π.χ. κοκκύτης). Η λοίμωξη από κοκκύτη είναι μια πιθανή αιτία εμμένου βήχα στους ενήλικες³. Πολλά βακτήρια επωφελούνται από την πρόκληση βήχα στον ξενιστή διότι έτσι επιτυγχάνεται η εξάπλωσή τους σε νέους ξενιστές. Ο παραγωγικός βήχας σε καπνιστή σχετίζεται συχνά με χρόνια βρογχίτιδα αλλά και με ερεθισμό του φάρυγγα ή του οισοφάγου.
- Αλλεργικές παραγωγικές παθήσεις, όπως οξεία ή χρόνια οπισθορρινική καταρροή αλλεργικής αρχής (σπανιότερα λοιμώδους ή αγγειοκινητικής αρχής).
- Καρδιολογικά νοσήματα όπως καρδιακή η ανεπάρκεια και το οξύ πνευμονικό οίδημα, το οποίο αποτελεί την ακραία επείγουσα έκφρασή της.
- Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), όπου ο βήχας με μεγάλη παραγωγή φλεγμάτων είναι πιθανό να παραπέμπει σε επιδείνωση της αποφρακτικής νόσου των πνευμόνων ή/και σε επιπλοκή της.
- Η Κυστική Ίνωση (γενετική νόσος που προκαλεί αναπνευστικές λοιμώξεις και σταδιακό περιορισμό της αναπνευστικής ικανότητας, λόγω της εκτεταμένης καταστροφής του πνευμονικού ιστού, δηλαδή ίνωσης). Η βλέννα φράσσει τους αεραγωγούς και παγιδεύει διάφορα μικρόβια στους πνεύμονες. Στο πάγκρεας, η βλέννα εμποδίζει την έκλυση ενζύμων σημαντικών για τη διάσπαση των τροφών.

Εάν στη διαδρομή της αναπνευστικής οδού τυχαίνει να μην υπάρχουν εκκρίματα (αναπνευστικές εκκρίσεις) τότε ο βήχας ονομάζεται μη παραγωγικός (ξηρός). Αναπτύσσεται συνήθως μετά από έντονη ή μακροπρόθεσμη έκθεση σε λοιμώδεις ή ερεθιστικούς παράγοντες. Οι συχνότερες αιτίες πρόκλησης του εν λόγω είδους βήχα είναι^{2,3}:

- Οι ιογενείς ασθένειες, όπως το κοινό κρυολόγημα ή η γρίπη όπου ο ξηρός βήχας (μεταλοιμώδης) μπορεί να διαρκέσει έως και μήνες. Προκαλείται από ερεθισμένο βλεννογόνο.
- Διάφορες αλλεργίες του ανώτερου αναπνευστικού όπως η αλλεργική ρινίτιδα η οποία συνήθως συνδυάζεται με συχνό φτέρνισμα.
- Το άσθμα, και γενικότερα αλλεργίες του κατώτερου αναπνευστικού, όπου ο (χρόνιος συνήθως) ξηρός βήχας συχνά συνοδεύεται με σφίξιμο στο στήθος και δύσπνοια. Συνήθως, η κλινική εικόνα εύκολα υποδεικνύει το πότε ο βήχας οφείλεται σε κρίση άσθματος, ωστόσο μερικοί ασθενείς παρουσιάζονται με βήχα χωρίς να έχουν τα υπόλοιπα τυπικά συμπτώματα (συριγμός, δύσπνοια) και έτσι η διάγνωση γίνεται πιο δύσκολη³.
- Η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση (ΓΟΠ), η οποία συμβαίνει όταν το γεύμα επιστρέφει από το στομάχι στον οισοφάγο (οφείλεται σε ανεπάρκεια του κάτω οισοφαγικού σφιγκτήρα) προκαλώντας καυσαλγίες σε συνδυασμό με βήχα.
- Η παρατεταμένη έκθεση σε αναθυμιάσεις, καυσαέρια και σωματίδια λόγω περιβαλλοντικής μόλυνσης, σκόνη, καπνό του τσιγάρου και διάφορες άλλες ερεθιστικές χημικές ουσίες (κυρίως πτητικές). Πολλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την ισχυρά δοσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ βήχα και έκθεσης σε συνθήκες περιβαλλοντικής μόλυνσης ή/και σε καπνό τσιγάρου ή κάπνισμα⁵.
- Η απόφραξη των αεραγωγών από εισπνεόμενο αντικείμενο ή εισχώρηση φαγητού στην τραχεία αντί για τον οισοφάγο.
- Η ύπαρξη εξωγενών μαζών όπως μεσοθωρακικών όγκων ή λεμφαδένων οι οποίοι προκαλούν συμπίεση του βρογχικού δένδρου και των αεραγωγών (εξωβρογχική πίεση). Γενικά, μια νεοπλασματική διήθηση (βρογχογενές καρκίνωμα, καρκινοειδής όγκος) στο τοίχωμα του αεραγωγού σχετίζεται συχνά με βήχα³.
- Ο καρκίνος του πνεύμονα, όπου παρατηρείται συνήθως σε συνδυασμό με πόνο στο θώρακα, δυσκολίες στην αναπνοή και ενίοτε αιμόπτυση.

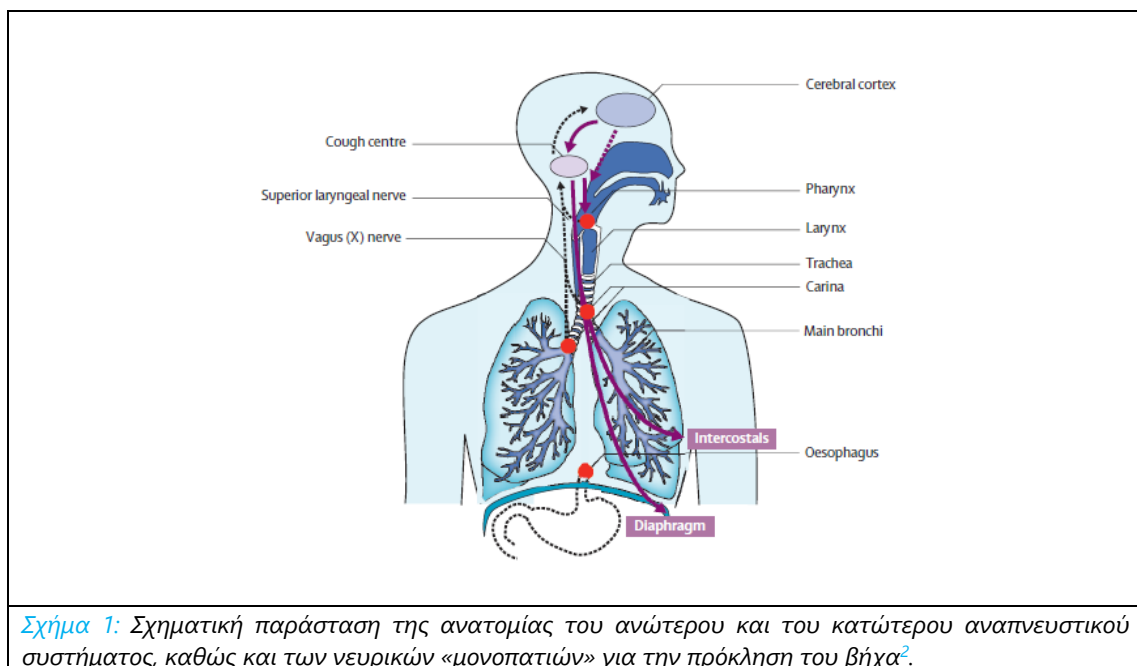
Τέλος, ο **κεντρικός βήχας** αποτελεί μια σπάνια μορφή βήχα με χαρακτήρα είτε παραγωγικό είτε ξηρό και μπορεί να οφείλεται σε⁶:

- Αίτια εντός του κεντρικού νευρικού συστήματος (*εγκέφαλος, νωτιαίος μυελός*) όπως ένας όγκος.
- Διάφορα φάρμακα, δηλαδή να αποτελεί σημαντική ανεπιθύμητη ενέργεια (παρενέργεια). Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα φάρμακα που ανήκουν στην κατηγορία AMEA (Αναστολείς του Μετατρεπτικού Ενζύμου Αγγειοτενσίνης, Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors, *ACE inhibitors*) και χορηγούνται σε περιπτώσεις υψηλής αρτηριακής πίεσης. Το ποσοστό πρόκλησης επίμονου βήχα από αντιυπερτασικά φάρμακα ενδέχεται να φτάσει έως και το 10%. Παραδείγματα^{7,8} τέτοιων φαρμάκων αποτελούν η λισινοπρίλη

(Zestoretic, Prinivil, Zestril), η καπτοπρίλη (Capoten), η εναλαπρίλη (Renitec), η ραμιπρίλη (Triatec) και η κιναπρίλη (Accupron).

Μια άλλη σημαντική κατηγοριοποίηση του βήχα είναι η διάκριση ανάλογα με τη **διάρκεια** του. Ο βήχας δύναται να χαρακτηριστεί ως³:

- Οξύς, όταν έχει διάρκεια < 3 εβδομάδων
Συνήθως οφείλεται σε λοιμώξεις της ανώτερης αναπνευστικής οδού (ειδικά το κοινό κρυολόγημα) αλλά και πιο σοβαρά αίτια όπως πνευμονία, πνευμονική εμβολή, δύναται να παρουσιαστούν με τη μορφή αυτή.
- Υποξύς, όταν έχει διάρκεια 3-8 εβδομάδων
Συχνά είναι μεταλοιμώδης και οφείλεται σε παραμονή της φλεγμονώδους αντίδρασης των αεραγωγών.
- Χρόνιος, όταν έχει διάρκεια > 8 εβδομάδων
Σε καπνιστές σηματοδοτεί αυξημένη πιθανότητα χρόνιας αποφρακτικής πνευμονικής νόσου ή βρογχογενούς καρκίνου. Σε μη καπνιστές η συχνότερη αιτία είναι το άσθμα και η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση.



Σχήμα 1: Σχηματική παράσταση της ανατομίας του ανώτερου και του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, καθώς και των νευρικών «μονοπατιών» για την πρόκληση του βήχα².

1.2 Αντιμετώπιση βήχα

1.2.1 Στρατηγικές αντιμετώπισης

Σε πολλές περιπτώσεις ο βήχας οδηγεί στην αντανακλαστική απομάκρυνση σωματιδίων και μικροβίων από τον οργανισμό, συνήθως μέσω της παροχέτευσης υλικού, και γι' αυτό το λόγο δεν επιδιώκεται η καταστολή του. Η κατακράτηση των

πτύλων στο τραχειοβρογχικό δένδρο ίσως διαταράξει την κατανομή του κυψελιδικού αερισμού και την ικανότητα των πνευμόνων να αντισταθούν στις λοιμώξεις³.

Ωστόσο, όταν ο βήχας χαρακτηρίζεται από μεγάλη ένταση και αυξημένη συχνότητα ο ασθενής ταλαιπωρείται από διαταραχή της φυσιολογικής ζωής και άλλα παρελκόμενα, όπως για παράδειγμα^{2,3} θωρακική και κοιλιακή δυσφορία, ερεθισμό του οισοφάγου, πόνο στο λαιμό, στα πλευρά και στο στήθος, διάθεση για εμετό, μυϊκό πόνο, ακράτεια ούρων, εξάντληση, κατάθλιψη και πιο σπάνια ακόμα και συγκοπή (ως συνέπεια της μεγάλης ενδοθωρακικής και κυψελιδικής πίεσης και της ελάττωσης της φλεβικής επαναφοράς και της καρδιακής παροχής³). Ο έντονος και ενοχλητικός βήχας είναι ένα από τα συχνότερα συμπτώματα για το οποίο οι ασθενείς ζητούν ιατρική βοήθεια³.

Ο τρόπος αντιμετώπισης δεν είναι πάντοτε ο ίδιος. Μπορεί είτε να στοχεύει στην αντιμετώπιση του αιτίου που τον προκαλεί και όχι στο σύμπτωμα που είναι ο βήχας είτε να στοχεύει στην ανακούφιση από το βήχα αυτόν καθ' εαυτόν (συμπτωματική αντιμετώπιση). Η οριστική θεραπεία του βήχα εξαρτάται από την εξακρίβωση της υποκείμενης αιτίας και στη συνέχεια την έναρξη της κατάλληλης ειδικής αγωγής³. Η εξάλειψη των διαφόρων παραγόντων (βλ. 1.1) εξωγενών ή ενδογενών (π.χ. διακοπή του καπνίσματος, διακοπή της έκθεσης σε ερεθιστικές χημικές ουσίες, διακοπή λήψης των αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης ή οπισθορινική καταρροή, ΓΟΠ αντίστοιχα) είναι αποτελεσματική όταν κάποιος από αυτούς τους παράγοντες έχει αναγνωρισθεί με βεβαιότητα. Άλλες σημαντικές θεραπευτικές παρεμβάσεις είναι για παράδειγμα η θεραπεία των ειδικών λοιμώξεων της αναπνευστικής οδού. Στους ασθενείς με χρόνια βήχα αγνώστου αιτιολογίας υιοθετείται συχνά μια κατά περίπτωση εμπειρική προσέγγιση με βάση τη θεραπευτική αγωγή για άλλες ασθένειες, όπως βρογχίτιδα γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση ή άσθμα³.

Η συμπτωματική (μη ειδική θεραπεία) ακολουθείται όταν η υφιστάμενη αιτία του βήχα δεν είναι γνωστή ή η ειδική θεραπεία δεν είναι δυνατή και ταυτόχρονα ο βήχας προκαλεί δυσφορία ή διαταραχή ύπνου και δεν είναι λειτουργικός³. Η ταξινόμηση των ειδών του βήχα όπως αυτή παρουσιάστηκε στην ενότητα 1.1, έχει βαρύνουσα σημασία για την εκλογή της σωστής στρατηγικής για την αντιμετώπισή του.

1.2.2 Κατηγορίες φαρμάκων

Σε έναν μεγάλο αριθμό ασθενών η εγγενής αιτία της αυξημένης συχνότητας και έντασης του βήχα παραμένει ανεξήγητη, ενώ οι διάφορες θεραπείες έναντι των δυνητικά επιβαρυντικών παραγόντων συχνά δεν ευδοκιμούν. Σε πολλές περιπτώσεις είναι απαραίτητη η υιοθέτηση μιας αντιβηχικής φαρμακοθεραπείας⁵. Οι πιο γνωστές χορηγούμενες φαρμακευτικές ουσίες για την αντιμετώπιση του βήχα δρουν είτε στο κέντρο του εγκεφάλου που είναι υπεύθυνο για τον βήχα είτε περιφερικά στους πνεύμονες είτε λειτουργούν διευκολύνοντας την ρευστοποίηση

των βρογχικών εκκρίσεων.

Γενικότερα, για την αντιμετώπιση του βήχα χρησιμοποιείται πληθώρα φαρμάκων τα οποία ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με τη δομή τους και κατ' επέκταση το μηχανισμό δράσης τους (Πίνακας 1). Η ταξινόμηση των φαρμάκων αυτών είναι η εξής⁵⁻⁸:

- **Ναρκωτικά φάρμακα:** Δρουν στο αντανακλαστικό κέντρο του βήχα στον εγκέφαλο και το καταστέλλουν. Ένας ερεθιστικός μη παραγωγικός βήχας μπορεί να κατασταλεί από διάφορους τέτοιους αντιβηχικούς παράγοντες. Η κωδεΐνη (codeine, *Sival-B*) είναι πιθανόν το πιο γνωστό και ευρέως χρησιμοποιούμενο οπιούχο αναλγητικό (15 mg, 4 φορές/ημέρα³).
- **Μη ναρκωτικά αντιβηχικά:** Τα περισσότερα από αυτά έχουν κεντρική δράση, δηλαδή δρουν στο κέντρο του βήχα στον εγκέφαλο χωρίς να είναι ναρκωτικά. Η δεξτρομεθορφάνη (dextromethorphan, *Varosyrup*) έχει βρεθεί να είναι αποτελεσματική στο βήχα που σχετίζεται με λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού⁵ (15 mg, 4 φορές/ημέρα³). Ωστόσο η επίδραση της στη συχνότητα του βήχα είναι μικρή και με μη επιβεβαιωμένη κλινική συνάφεια⁹. Ένα άλλο γνωστό μη ναρκωτικό αντιβηχικό είναι η κιτρική βουταμιράτη (Butamirate Citrate, *Sinecod*, *Codimin*, *Physiocod*, *Safarol*)⁷, η οποία αποτελεί και αντικείμενο μελέτης αυτής της διπλωματικής εργασίας.
- **Αποχρεμπτικά-Ρευστοποιητικά των εκκρίσεων:** Χορηγούνται ευρέως στην περίπτωση του παραγωγικού βήχα ως βλεννολυτικοί παράγοντες για τη μείωση του ιξώδους των βλεννωδών εκκρίσεων. Τα πιο γνωστά είναι η βρωμεξίνη (bromhexine, *Bisolvon*), η αμβροξόλη (ambroxol hydrochloride, *Mucosolvan*, *Tosse*), η καρβοκυστεΐνη (carbocysteine, *Mucothiol*) και η ακετυλοκυστεΐνη (acetylcysteine, *Mucomyst*, *Trebon-N*)^{7,8}.
- **Αντιϊσταμινικά αντιβηχικά:** Καταστέλλουν την παραγωγή της βλέννας αλλά και το αντανακλαστικό του βήχα. Παράδειγμα τέτοιων φαρμάκων είναι η κετοτιφαΐνη (ketotifen, *Zaditen*), ένα μη βρογχοδιασταλτικό αντιασθματικό φάρμακο και η μοντελουκάστη (montelukast, *Singulair*), ένας ανταγωνιστής των υποδοχέων των λευκοτριενίων.
- **Βρογχοδιασταλτικά φάρμακα:** Συνήθως πρόκειται για ουσίες που επιφέρουν εκλεκτική διέγερση των β-2 υποδοχέων (αδρενεργικοί υποδοχείς) όπως η κλενβουτερόλη (clenbuterol, *Spiropent*) το οποίο χορηγείται για αντιμετώπιση του άσθματος και άλλων περιπτώσεων με αναστρέψιμη απόφραξη των αεροφόρων οδών. Επιπρόσθετα παραδείγματα φαρμάκων αυτής της οικογένειας αποτελούν η σαλμετερόλη (salmeterol, *Serevent*).
- **Αντιβιοτικά:** Είναι χημειοθεραπευτικά φάρμακα τα οποία στοχεύουν στη θεραπεία (ή πρόληψη) βακτηριακών λοιμώξεων μέσω μείωσης της μικροβιακής φλεγμονής του λαϊμού ή των πνευμόνων. Έχουν αποτέλεσμα ενάντια σε

επιπλέον κατηγορίες μικροοργανισμών, όπως οι μύκητες αλλά όχι απέναντι στους ιούς⁷.

- **Κορτικοστεροειδή:** Είναι χημικές ενώσεις που εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών διεργασιών, όπως στη ρύθμιση φλεγμονών, στην απόκριση στο στρες και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Χορηγούνται είτε υπό μορφή δισκίων είτε σε εισπνεόμενη μορφή (π.χ. βεκλομεθαζόνη (beclomethasone, *Becotide*, *Becloneb* αντίστοιχα)⁷. Δύναται επίσης να χορηγηθούν ως ένα μείγμα με διάφορα βρογχοδιασταλτικά (π.χ. βεκλομεθαζόνη/Φορμοτερόλη, *Inuvair*⁸).

Πίνακας 1: Σύνοψη αντιβηχικών φαρμάκων (δραστικές ουσίες) διαφορετικών χημικών κατηγοριών^{3,7,8}

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ (Δραστικές ουσίες)
Ναρκωτικά φάρμακα	κωδεΐνη
Μη ναρκωτικά φάρμακα	κιτρική βουταμιράτη, δεξτρομεθορφάνη
Αποχρεμπτικά-Ρευστοποιητικά των εκκρίσεων (βλεννολυτικά)	βρωμεξίνη, αμβροξόλη, ακετυλοκυστεΐνη
Αντιϊσταμινικά αντιβηχικά	κετοτιφαΐνη, μοντελουκάστη
Βρογχοδιασταλτικά φάρμακα	κλενβουτερόλη, σαλμετερόλη, σαλβουταμόλη
Αντιβιοτικά	σουλφοναμίδες, κυκλικές λιποπεπτίδες, γλυκυκυκλίνες, οξαζολιδινόνες
Κορτικοστεροειδή	βεκλομεθαζόνη, φορμοτερόλη

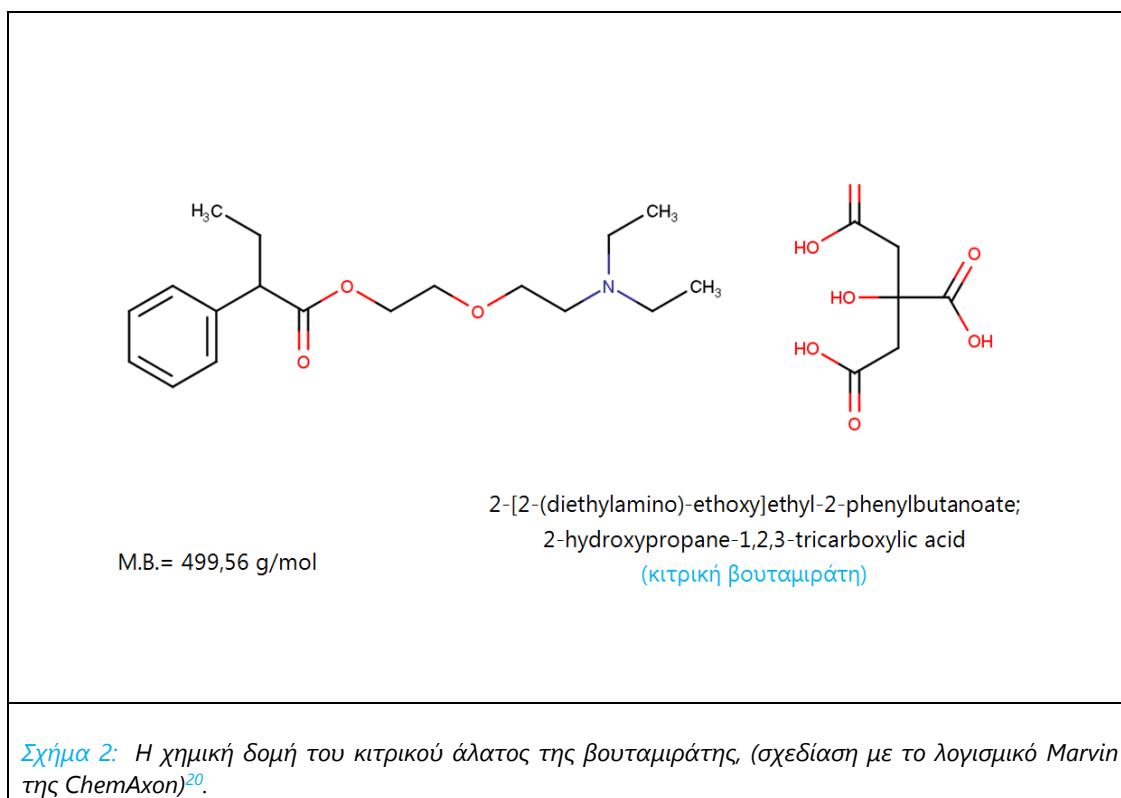
1.3 Βουταμιράτη

Η βουταμιράτη ή κατά IUPAC 2-[2-(διαιθυλαμινο)-αιθοξυ]αιθυλο-2-φαινυλοβουτανοϊκό οξύ, με επίσημη αγγλική ονομασία 2-[2-(diethylamino)-ethoxy]ethyl-2-phenylbutanoate¹⁰, χρησιμοποιείται στα διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα με τη μορφή του **κιτρικού άλατος** και είναι εμπορικά γνωστή με την ονομασία **κιτρική βουταμιράτη (Butamirate Citrate, BC)**¹¹. Πρόκειται για ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο **κατασταλτικό** του ξηρού, **μη παραγωγικού** βήχα το οποίο φέρεται να έχει κεντρική δράση^{12,13}. Χρησιμοποιείται για πολλά χρόνια και είναι πλήρως αποτελεσματικό (βάσει της μείωσης τόσο της έντασης όσο και της συχνότητας του βήχα¹⁴) και ασφαλές φάρμακο¹⁵ (βλ. παράγραφο 1.3.7). Η κιτρική βουταμιράτη χορηγείται συνήθως **στη φαρμακοτεχνική μορφή του σιροπιού**^{16,17} ενώ άλλες εμπορικά διατιθέμενες μορφές είναι το πόσιμο διάλυμα (σταγόνες) και τα δισκία ελεγχόμενης αποδέσμευσης¹¹.

1.3.1 Δομή

Η βουταμιράτη ανήκει στη κατηγορία των 2-[2-(διαιθυλαμινο)-αιθοξυ]αιθυλο εστέρων και η χημική της δομή προσομοιάζει αρκετά τη δομή των ενώσεων οξελαδίνη και πεντοξυβερίνη (Σχήμα 2). Στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία η βουταμιράτη αναφέρεται σαν μια χαρακτηρισμένη πρόσμιξη της οξελαδίνης¹⁸. Αν και πρόκειται για μια δραστική ουσία η οποία είναι ευρέως γνωστή στη διεθνή αγορά, εντούτοις αυτή **δεν** περιγράφεται από κάποια **μονογραφία** επίσημου

φαρμάκου (1^{ης} ύλης) ή ακόμη ενός σκευάσματος εντός κάποιας φαρμακοποιίας. Η μοναδική μονογραφία η οποία αναφέρεται στη βουταμιράτη ως 1^η ύλη ανήκει στην Τσέχικη Φαρμακοποιία.¹⁹



1.3.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Με τη μορφή του κιτρικού άλατος ($C_{18}H_{29}NO_3, C_6H_6O_7$ ή αλλιώς $C_{24}H_{37}NO_{10}$), η βουταμιράτη είναι λευκή ή υπόλευκη έως υποκίτρινη κοκκιώδης κρυσταλλική κόνις, ελαφρά κηρώδης, με πολύ ασθενή οσμή αμίνης και με μια αναλογία συνεκτικών συσσωματωμάτων¹⁹. Η διαλυτότητα της στο νερό είναι μέτρια ενώ είναι εύκολα διαλυτή στην αιθανόλη και πολύ διαλυτή στο χλωροφόρμιο, την ακετόνη και τον αιθέρα (π.χ. διμεθυλαιθέρα²¹). Ακόμη είναι ελαφρώς διαλυτή στο υδροξείδιο του νατρίου²¹. Έχει μοριακό βάρος 499,56 g/mol και το σημείο τήξης της κυμαίνεται από 74 έως 78 °C. Το pH του διαλύματος κιτρικής βουταμιράτης σε νερό¹⁹ κυμαίνεται από 3,5 έως 4 (20-25°C). Ο συντελεστής μερισμού του μορίου (log P) είναι **3,43** και η σταθερά pK_a της αμινομάδας του είναι **9,41** (Πίνακας 2). Το **φάσμα απορρόφησης** της ένωσης στο UV οφείλεται στον αρωματικό δακτύλιο και ακόμη, πιθανόν στα ασύζευκτα ζεύγη e^- από τα ετεροάτομα O και N (βλ. παράγραφο 5.2.7). Η δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες του μορίου μελετώνται προσεχτικά και λαμβάνονται υπόψη κατά το στάδιο της

ανάπτυξης (και εν συνεχεία επικύρωσης) μιας μεθόδου ειδικής για τον ποσοτικό προσδιορισμό του (βλ. ενότητα 5.2).

Πίνακας 2: Σύνοψη των βασικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων της (κιτρικής) βουταμιράτης και του κιτρικού οξέος^{22,23}.

Ιδιότητα	Τιμή
<i>Βουταμιράτη</i>	
Μοριακό Βάρος	307,4 g/mol
Ακριβής Μάζα	307,214744 g/mol
Μονοϊσοτοπική Μάζα	307,214744 g/mol
Θέσεις σύναψης δεσμών υδρογόνου (δότης)	0
Θέσεις σύναψης δεσμών υδρογόνου (δέκτης)	4
Τοπολογική πολική επιφάνεια	38,77 Å ²
Διαλυτότητα στο νερό	0,107 mg/mL
log P	3,43
log S	-3,5
pKa (ισχυρότερη βασική)	9,41
Φορτίο	1
Διαθλαστικότητα	89,87 m ³ /mol
Πολωσιμότητα	36,58 Å ³
<i>Κιτρική Βουταμιράτη</i>	
Μοριακό Βάρος	499,6 g/mol
Ακριβής Μάζα	499,241746 g/mol
Μονοϊσοτοπική Μάζα	499,241746 g/mol
Θέσεις σύναψης δεσμών υδρογόνου (δότης)	4
Θέσεις σύναψης δεσμών υδρογόνου (δέκτης)	11
Τοπολογική πολική επιφάνεια	171 Å ²
<i>Κιτρικό οξύ</i>	
Μοριακό Βάρος	192,12 g/mol
Ακριβής Μάζα	192,027003 g/mol
Μονοϊσοτοπική Μάζα	192,027003 g/mol
Θέσεις σύναψης δεσμών υδρογόνου (δότης)	4
Θέσεις σύναψης δεσμών υδρογόνου (δέκτης)	7
Τοπολογική πολική επιφάνεια	132,13 Å ²
Διαλυτότητα στο νερό	106,0 mg/mL
log P	-1,3
log S	-0,26
pKa (ισχυρότερη όξινη)	3,05
pKa (ισχυρότερη βασική)	-4,2
Φορτίο	-3
Διαθλαστικότητα	35,62 m ³ /mol
Πολωσιμότητα	15,54 Å ³

1.3.3 Φαρμακολογικές ιδιότητες - Φαρμακοδυναμική

Η κιτρική βουταμιράτη καταστέλλει το βήχα χωρίς να είναι ούτε χημικά ούτε φαρμακολογικά συγγενής των αλκαλοειδών του οπίου¹¹. Πιστεύεται ότι έχει κεντρική δράση μειώνοντας τη δραστηριότητα στο **κέντρο του βήχα στον εγκέφαλο** (μέσω των υποδοχέων του εγκεφάλου), και συγκεκριμένα δρώντας επί του προμήκη μυελού (medulla oblongata), χωρίς να καταστέλλει την αναπνοή^{14,24}. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός¹¹.

Παρουσιάζει μη ειδικό αντιχολινεργικό και σπασμολυτικό αποτέλεσμα¹¹ (μειώνει την αντίσταση στους αεραγωγούς αναστέλλοντας τον βρογχόσπασμο και έχοντας αντιφλεγμονώδη δράση²⁴), το οποίο διευκολύνει την αναπνευστική λειτουργία. Είναι ένα μη ναρκωτικό αντιβηχικό το οποίο δεν προκαλεί εξάρτηση ή έξη. Έχει **ευρύ θεραπευτικό φάσμα** (βλ. 1.3.5) και είναι καλά ανεκτό ακόμη και σε υψηλές δόσεις για ανακούφιση από το βήχα σε ενήλικες και παιδιά (βλ. 1.3.6).

Σε γενικές γραμμές, ο **άξονας δράσης** της κιτρικής βουταμιράτης είναι τριπλός²¹: Κατασταλτική δράση επί του αντανακλαστικού βήχα τρεις φορές περισσότερο από εκείνη της φωσφορικής κωδεΐνης, βλεννολυτική δράση καθώς μειώνει το ιξώδες της βλέννης διεγείροντας τις εκκρίσεις και τέλος βρογχοσπασμολυτική δράση επτά φορές περισσότερο από εκείνη της παπαβερίνης.

1.3.4 Φαρμακολογικές ιδιότητες - Φαρμακοκινητική

Απορρόφηση²⁵

Όταν χορηγείται από του στόματος, η βουταμιράτη απορροφάται γρήγορα και ολοκληρωτικά. Υδρολύεται κυρίως σε φαινυλο-2-βουτυρικό οξύ (phenyl-2-butyric acid) και σε διαιθυλαμινο-αιθοξυ-αιθανόλη (diethylaminoethoxyethanol). Η επίδραση της τροφής δεν έχει ερευνηθεί. Η έκθεση σε φαινυλο-2-βουτυρικό και διαιθυλαμινο-αιθοξυ-αιθανόλη είναι πλήρως ανάλογη με το εύρος της δόσης, κυμαινόμενης σε ένα εύρος 22,5 mg-90 mg (παρατηρείται μια γραμμική σχέση μεταξύ βιοδιαθεσιμότητας και δόσης).

Χορηγηθείσα υπό μορφή σιροπιού, η βουταμιράτη ανιχνεύεται στο πλάσμα του αίματος 5 με 10 min μετά τη χορήγηση των εξής τεσσάρων δόσεων: 22,5 mg, 45 mg, 67,5 mg και 90 mg. Η C_{max} της δραστικής στο πλάσμα επιτυγχάνεται μετά από 1 h και για τις τέσσερις δόσεις, με τη μέση τιμή να είναι 16,058 µg/mL για τη δόση των 90 mg.

Κατανομή²⁵

Η βουταμιράτη έχει υψηλό όγκο κατανομής, ο οποίος έχει τιμή μεταξύ 81 και 112 L (ανάλογα με το σωματικό βάρος σε kg). Ακόμη παρουσιάζει υψηλό βαθμό

πρωτεϊνικής σύνδεσης (~98%). Δεν είναι γνωστό εάν η βουταμιράτη διέρχεται τον πλακούντα ή αν εκκρίνεται στο μητρικό γάλα.

Μεταβολισμός²⁵

Σχετικά με το βιο-μετασχηματισμό του μορίου, η υδρόλυσή του γίνεται με ταχύ ρυθμό και ολοκληρωτικά. Παράγονται κυρίως δύο μεταβολίτες που έχουν αντιβηχικό αποτέλεσμα.

Απέκκριση²⁵

Η αποβολή των μεταβολιτών γίνεται κυρίως μέσω των νεφρών (90 %). Η βουταμιράτη είναι ανιχνεύσιμη στα ούρα μέχρι και για 48 h, ενώ η ποσότητα της βουταμιράτης που απεκκρίνεται στα ούρα κατά την 96ωρη περίοδο δειγματοληψίας αντιπροσωπεύει περίπου το 0,02 % της δόσης των 22,5 mg. Ένα μεγαλύτερο ποσοστό της δόσης της βουταμιράτης απεκκρίνεται στα ούρα ως διαιθυλαμινο-αιθοξυ-αιθανόλη ή ως μη συζευγμένο φαινυλο-2-βουτυρικό.

Ο μέσος μετρούμενος χρόνος ημίσειας ζωής ($t^{1/2}_{\text{μέσο}}$) της βουταμιράτης είναι 1,48-1,93 h. Τέλος, σχετικά με ειδικές ομάδες ασθενών, δεν είναι γνωστό εάν οι διάφορες διαταραχές της ηπατικής ή της νεφρικής λειτουργίας επηρεάζουν τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους της βουταμιράτης.

1.3.5 Θεραπευτικές εφαρμογές

Η βουταμιράτη χορηγείται στη θεραπεία του χρόνιου ή/και του παροδικού ερεθιστικού βήχα προκαλούμενου από διάφορες εποχιακές διαταραχές του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος²⁶. Ακόμη, χορηγείται σε περιπτώσεις οξείων λοιμώξεων του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος όπως τραχειίτιδα, λαρυγγίτιδα, βρογχίτιδα (εμπύρετη, σπαστική, ασθματική)²⁷ αλλά και φυματίωσης ή σιλίκωσης²¹.

1.3.6 Δοσολογία και τοξικότητα (υπερδοσολογία)

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η κιτρική βουταμιράτη δύναται να χορηγηθεί είτε με τη μορφή σιροπιού (πιο συχνά^{16,17}) είτε με τη μορφή δισκίων ή πόσιμου διαλύματος. Στον ελληνικό χώρο η ποσοτική σύνθεση των προϊόντων έχει ως εξής: 3,9 mg/5 mL σιροπιού ή 7,5 mg/5 mL σιροπιού, 4,6 mg/mL για το πόσιμο διάλυμα (σταγόνες), 30 mg/tab για τα δισκία ελεγχόμενης αποδέσμευσης¹¹. Η μέγιστη δόση για τους ενήλικες είναι 37,5 mg για το σιρόπι (22,5 mg για τους εφήβους) και 60 mg για το δισκίο (2 δισκία) μιλώντας πάντα για διάστημα μίας ημέρας και μετά από υποδιαιρέσεις σε δόσεις. Στα παιδιά, και ανάλογα την ακριβή ηλικία, το επιτρεπόμενο όριο μειώνεται κατά 20-30 %¹¹.

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η συνήθης ημερήσια δόση για ενήλικες κυμαίνεται περί τα 30 mg (διαμεμένη σε 3-4 δόσεις) ενώ σε κάποιες χώρες το επιτρεπόμενο όριο ανέρχεται στα 90 mg (σε διαμεμένες δόσεις)²⁸. Σε περίπτωση υπερδοσολογίας, είναι πιθανόν να προκληθεί υπνηλία, διάρροια, απώλεια της ισορροπίας, υπόταση,

ναυτία (σπάνια) και εμετός (σπάνια)¹¹. Για την άμεση αντιμετώπιση συνίσταται χορήγηση ενεργού άνθρακα ή αλατούχου καθαρτικού και υποστήριξη της καρδιακής και αναπνευστικής λειτουργίας²⁹.

1.3.7 *Ανεπιθύμητες ενέργειες*

Πρόκειται για ένα σχετικά ασφαλές φάρμακο με μικρή έως σπάνια συχνότητα εμφάνισης παρενεργειών²⁶, σε ποσοστό 0,5-1 % των ασθενών²⁴, όπως δερματικές και υποδόριες διαταραχές, π.χ. κνίδωση: σπάνια (>1/10.000, <1/1.000) ή γαστροεντερικές διαταραχές, π.χ. ναυτία, ζάλη, διάρροια: σπάνια (>1/10.000, <1/1.000) και διαταραχές του νευρικού συστήματος, π.χ. υπνηλία: σπάνια (>1/10.000, <1/1.000)¹¹. Φυσικά, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η κατά περίπτωση υπερευαισθησία ενός ατόμου στην βουταμιράτη ή σε κάποιο από τα έκδοχα του κάθε σκευάσματος (π.χ.³⁰ Κιτρικό οξύ, Σακχαρίνη, διάλυμα Σορβιτόλης 70 %, Γλυκερίνη, Βενζοϊκό νάτριο, διάλυμα Βανιλίνης σε αιθανόλη 94 %).

1.3.8 *Αλληλεπιδράσεις, Προφυλάξεις & Προειδοποιήσεις κατά τη χρήση*

Δεν έχουν αναφερθεί πιθανές αλληλεπιδράσεις της βουταμιράτης με άλλα φάρμακα και ουσίες^{11,21}. Ωστόσο, σε ό,τι αφορά τις προφυλάξεις κατά τη χρήση, πρέπει να αποφεύγεται η ταυτόχρονη χορήγηση βουταμιράτης και αποχρεμπτικών. Η βουταμιράτη αναστέλλει τον αντανακλαστικό βήχα και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε κατακράτηση της βλέννας στο αναπνευστικό σύστημα, η οποία μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο βρογχόσπασμου και μόλυνσης των αεραγωγών¹¹.

Σχετικά με την κύηση, μελέτες αναπαραγωγής σε πειραματόζωα δεν έδειξαν κίνδυνο για το έμβρυο. Ωστόσο, καθώς δεν υπάρχουν επαρκείς μελέτες σε εγκύους, η χρήση της βουταμιράτης πρέπει να αποφεύγεται κατά το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης. Τέλος, δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με το εάν η βουταμιράτη περνά στο μητρικό γάλα (βλ.1.3.4).

1.4 Βενζοϊκό οξύ και αντιβηχικά φάρμακα

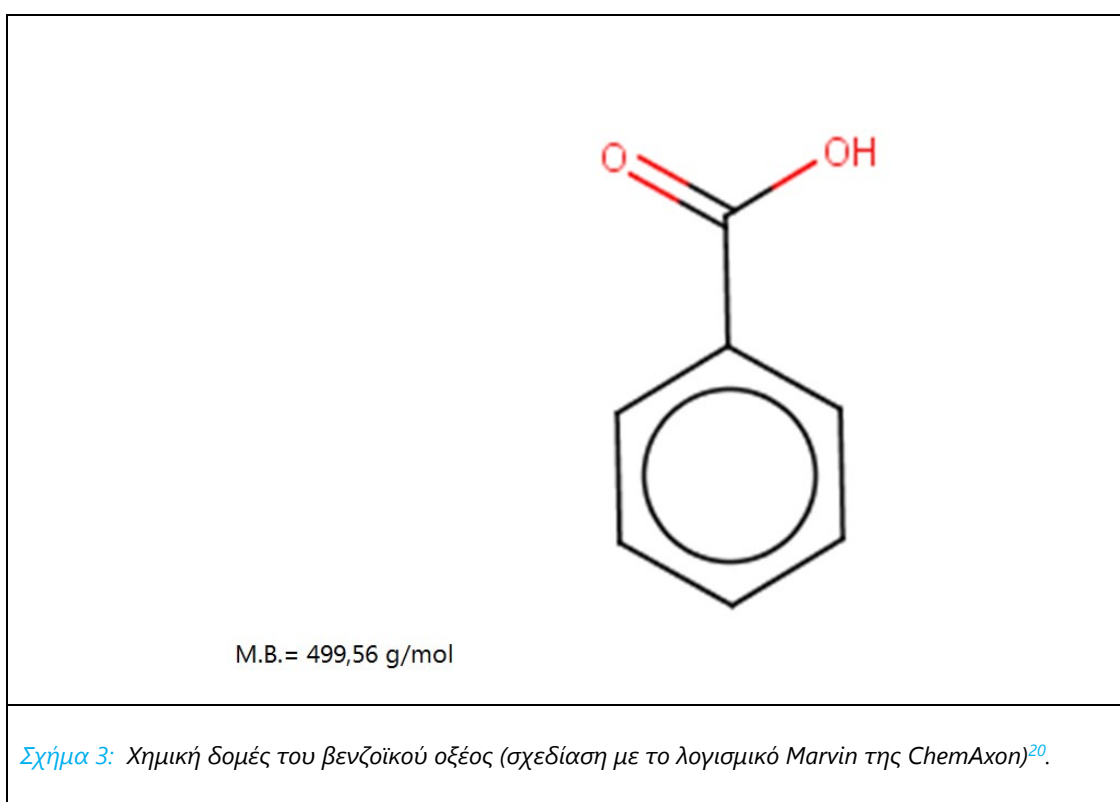
Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, κιτρική βουταμιράτη χορηγείται συνήθως στη φαρμακοτεχνική μορφή του σιροπιού^{16,17}, το οποίο περιέχει βενζοϊκό οξύ ως συντηρητικό έναντι της μικροβιακής ανάπτυξης¹⁷. Τόσο το βενζοϊκό οξύ όσο και άλλα παρόμοια συντηρητικά χρησιμοποιούνται πολύ συχνά στις υγρές φαρμακοτεχνικές μορφές³¹.

Πρόκειται για μία ένωση που προκύπτει με φυσικό τρόπο σε πολλά φυτά και χρησιμεύει ως ένα ενδιάμεσο στη βιοσύνθεση πολλών πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών³². Περιγράφηκε για πρώτη φορά τον 16^ο αιώνα³³. Ακόμη, μπορεί να βρεθεί (με τη μορφή του οξέος ή σαν βενζοϊκός εστέρας) σε πολλά φυσικά προϊόντα όπως λαχανικά³⁴, φρούτα³⁵ (π.χ. μούρα, δαμάσκηνα) και τρόφιμα ζωικής προέλευσης³⁶ (π.χ. γαλακτομικά). Τέλος, το βενζοϊκό οξύ προκύπτει στα ζώα ως το τελικό προϊόν του μεταβολισμού της φαυνολαανίνης³³.

Μεταβολίζεται σε βενζούλο συνένζυμο A (*benzoyl-CoA*), ένα ενδιάμεσο προϊόν, από τη λιγάση του βουτυρικού συνενζύμου A (*butyrate-CoA ligase*) και στη συνέχεια μεταβολίζεται σε ιππουρικό οξύ από την N-ακέτυλοτρανσφεράση της γλυκίνης (*glycine N-acyltransferase*)³⁷.

1.4.1 Δομή

Το βενζοϊκό οξύ¹⁰ είναι αρωματική οργανική ένωση και ανήκει στην οικογένεια των αρωματικών καρβοξυλικών οξέων. Πρόκειται για το απλούστερο οξύ της κατηγορίας αυτής. Καθόσον έχει όξινο χαρακτήρα σχηματίζει άλατα (Σχήμα 3), ενώ η παρουσία της ομάδας του καρβοξυλίου (-COOH) απενεργοποιεί σημαντικά τον βενζολικό δακτύλιο³⁸.



1.4.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Το χημικά καθαρό βενζοϊκό οξύ (C_6H_5-COOH), υπό κανονικές συνθήκες περιβάλλοντος (25 °C, 1 atm) είναι λευκή κρυσταλλική σκόνη ή έχει τη μορφή άχρωμων κρυστάλλων και είναι άοσμο ή διακρίνεται από μια σχετικά ασθενή αλλά αρκετά χαρακτηριστική οσμή³⁹ (προσομοιάζει την οσμή της βενζαλδεΐδης⁴⁰). Είναι ελάχιστα διαλυτό στο νερό, αρκετά διαλυτό σε βραστό νερό, σε αλκοόλη και λιπαρά έλαια³⁹ αλλά και γενικότερα στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες³³. Πειραματικά η διαλυτότητα του μορίου στο νερό βρίσκεται ίση με $3,5 \times 10^3$ mg/L (25° C)⁴¹, ενώ 1 g βενζοϊκού οξέος διαλύεται σε 2,3 mL/1,5 mL ψυχρής/θερμής

αλκοόλης, 4,5 mL χλωροφορμίου, 3 mL αιθέρα (ελάχιστα σε πετρελαϊκό αιθέρα), 3 mL ακετόνη, 10 mL βενζόλιο, 30 mL τετραχλωράνθρακα⁴². Έχει μοριακό βάρος 122,12 g/mol και το σημείο τήξης είναι της καθαρής ουσίας είναι 122,4 °C. Το pH του κορεσμένου διαλύματος βενζοϊκού οξέος σε καθαρό νερό είναι 2,8 (25 °C)⁴². Ο συντελεστής μερισμού του μορίου (log P) είναι **1,63** (θεωρητική τιμή· 1,87 η πειραματική τιμή) και η σταθερά pK_a της καρβοξυλομάδας του μορίου είναι **4,08** (θεωρητική τιμή· 4,19 η πειραματική τιμή) (Πίνακας 3). Είναι ένα σχετικά ασθενές οξύ. Το **φάσμα απορρόφησης** της ένωσης στο UV οφείλεται στον αρωματικό δακτύλιο και επιπλέον, πιθανόν στο ασύζευκτο ζεύγος e⁻ από το ετεροάτομο του οξυγόνου (βλ. παράγραφο 5.2.7).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και για τη βουταμιράτη, έτσι και εδώ, η δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες του μορίου μελετώνται προσεχτικά και λαμβάνονται υπόψη κατά το στάδιο της ανάπτυξης (και πριν την επικύρωση) μεθόδου ειδικής για τον ποσοτικό προσδιορισμό του (βλ. ενότητα 5.2).

Πίνακας 3: Σύνοψη των βασικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων του βενζοϊκού οξέος^{43,44}

Ιδιότητα (property name)	Τιμή (property value)
Βενζοϊκό Οξύ	
Μοριακό Βάρος	122,12 g/mol
Ακριβής Μάζα	122,036779 g/mol
Μονοϊσοτοπική Μάζα	122,036779 g/mol
Θέσεις σύναψης δεσμών υδρογόνου (δότης)	1
Θέσεις σύναψης δεσμών υδρογόνου (δέκτης)	2
Τοπολογική πολική επιφάνεια	37,3 Å ²
Διαλυτότητα στο νερό	7,08 mg/mL
log P	1,63
log S	-1,2
pK _a (ισχυρότερη όξινη)	4,08
Φορτίο	-1
Διαθλαστικότητα	33,31 m ³ /mol
Πολωσιμότητα	11,97 Å ³

1.4.3 Χρήσεις

Το βενζοϊκό οξύ είναι **μυκητοστατική ένωση**. Είναι ένα σύνηθες συστατικό διαφόρων αλοιφών για τη θεραπεία μυκητιασικών δερματικών παθήσεων³⁹. Ακόμη, από πολύ νωρίς, ελάχιστα μετά την ανακάλυψη του, οι αντισηπτικές του ιδιότητες ήταν γνωστές και χρησιμοποιούνταν σαν συντηρητικό⁴⁵. Σήμερα, το βενζοϊκό οξύ και τα άλατα του (π.χ. βενζοϊκό νάτριο) αποτελούν ευρέως γνωστά και **εγκεκριμένα από το νόμο συντηρητικά** χρησιμοποιούμενα κατά κόρον στη βιομηχανία τροφίμων^{33,39}, αλλά και καλλυντικών³³, βαφών, πλαστικών και εντομοαπωθητικών. Ακόμη, το εν λόγω οξύ αποτελεί ένα σημαντικό ενδιάμεσο στη βιομηχανική σύνθεση πολλών άλλων οργανικών ενώσεων τα οποία χρησιμεύουν

ως χημικά πρόσθετα στους παραπάνω τομείς³⁹. Το πιο γνωστό άλας του βενζοϊκού οξέος είναι το βενζοϊκό νάτριο (συντηρητικό τροφίμων) ενώ διάφορα άλλα παράγωγα είναι το βενζοϊκό βενζύλιο (benzyl benzoate) (μυκητοκτόνος εστέρας) και το υπεροξειδίο του βενζοϋλίου (βενζοϊκό υπεροξειδίο, benzoyl peroxide) (λευκαντικό αλεύρι & εκκινητής χημικών αντιδράσεων για την παρασκευή ορισμένων πλαστικών)³³. Ακόμη, χρησιμοποιείται ως σμηγματοστατικό αναστέλλοντας την υπέρμετρη παραγωγή σμήγματος που σχετίζεται με την ακμή⁴⁶.

Στα τρόφιμα, τα συντηρητικά προστίθενται για να σταματήσουν ή να καθυστερήσουν την **απώλεια θρεπτικών συστατικών** εξαιτίας μικροβιολογικών, ενζυμικών ή χημικών αλλαγών των τροφών κατά τη διάρκεια του επιτρεπόμενου διαστήματος ανάλωσής τους⁴⁷. Επιπλέον, προλαμβάνουν τους διάφορους κινδύνους για τους καταναλωτές (καθώς και οικονομικές απώλειες) τους οποίους θα μπορούσε να επιφέρει η αλλοίωση των τροφίμων από την παρουσία μικροβιακών τοξινών ή παθογόνων μικροοργανισμών⁴⁷. Παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δραστηριότητα αναστέλλοντας τη δράση κάποιων ενζύμων του κύκλου Krebs (π.χ. αφυδρογονάση α-κετογλουταρικού οξέος, αφυδρογονάση ηλεκτρικού οξέος)³³.

Ωστόσο, πολλά από τα πρόσθετα τροφίμων είναι χρήσιμα και άκρως απαραίτητα συστατικά στα περισσότερα **φαρμακοτεχνικά σκευάσματα**, και **ιδιαίτερα στα σιρόπια**. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η ακεραιότητα των προϊόντων ή/και βελτιώνεται η γεύση, το χρώμα και η εμφάνιση, όπου αυτό είναι απαραίτητο⁴⁸. Ειδικά στα **σιρόπια**, η παρουσία συντηρητικού είναι απαραίτητη διότι τα **έκδοχα** και μερικές φορές ακόμα και το **δραστικό συστατικό** καταστρέφονται από διάφορους μικροοργανισμούς και εν τέλει **αλλοιώνεται** η φαρμακοτεχνική μορφή στο σύνολό της⁴⁹. Όπως και στον κλάδο των τροφίμων, έτσι και στις φαρμακευτικές παρασκευές, το βενζοϊκό οξύ και τα άλατα του (αναγνωριστικό της ταυτότητάς τους είναι το γράμμα E) είναι τα πιο γνωστά συντηρητικά³³. Το βενζοϊκό οξύ είναι γνωστό ως E210, το βενζοϊκό νάτριο ως E211, το βενζοϊκό κάλιο ως E212 και το βενζοϊκό ασβέστιο ως E213⁴⁷. Ακόμη, τα συνθετικά συντηρητικά συνιστούν την πιο μεγάλη και πιο συχνά χρησιμοποιούμενη κατηγορία συντηρητικών στα φαρμακευτικά προϊόντα⁴⁹. Οι **εστέρες** του π-υδροξυ βενζοϊκού οξέος με διάφορες αλκοόλες είναι γνωστοί ως υδροξυ βενζοϊκά ή parabens⁵⁰. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι το μεθυλ-4-υδροξυ βενζοϊκό οξύ (methylparaben, MP) ή το προπυλ-4-υδροξυ βενζοϊκό οξύ (propylparaben, PP). Χρησιμοποιούνται τόσο ανεξάρτητα όσο και συνδυασμένα, σαν αντιμικροβιακά συντηρητικά⁴⁹.

1.4.4 Περιορισμοί κατά τη χρήση, τοξικότητα, θεραπευτικές ιδιότητες & αποβολή βενζοϊκού οξέος

Η επιτρεπόμενη ποσότητα το βενζοϊκού οξέος και των διαφόρων χημικών προσθέτων ρυθμίζεται αυστηρά από τις αρμόδιες υγειονομικές αρχές, λόγω των

δυναμικών βλαβερών επιπτώσεων των ουσιών αυτών στον πληθυσμό⁴⁸. Οι επιπτώσεις αυτές μπορεί να κυμαίνονται από αλλεργίες (ρινίτιδα, εξανθήματα, δερματίτιδα⁵¹) έως και οιστρογονική δραστηριότητα⁵². Για παράδειγμα, η έκθεση σε parabens (βλ.1.4.3) μπορεί να προκαλέσει διατάραξη της ομαλής λειτουργίας του ενδοκρινικού συστήματος ενώ το βενζοϊκό νάτριο μπορεί να προκαλέσει αλλεργικές αντιδράσεις σε ευαίσθητα άτομα καθώς και υπερκινητικότητα, ειδικά όταν χρησιμοποιείται σε τρόφιμα⁵³⁻⁵⁵. Επιπλέον, πολλές χρωστικές στα τρόφιμα ή τα φαρμακευτικά προϊόντα καθίστανται τοξικές μετά από παρατεταμένη χρήση, προκαλώντας με τη σειρά τους και αυτές προβλήματα υγείας⁵⁶.

Το βενζοϊκό οξύ είναι ελαφρώς ερεθιστικό για το δέρμα, τα μάτια και τους βλεννογόνους⁵⁷ ενώ σε ό,τι αφορά τα τρόφιμα, μπορεί να προκαλέσει έντονα στυφή γεύση όταν βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις³³. Το βενζοϊκό νάτριο είναι ελάχιστα ερεθιστικό για τα μάτια και καθόλου ερεθιστικό για το δέρμα³³.

Το βενζοϊκό οξύ χρησιμοποιείται με τη μορφή του μετά νατρίου άλατος για τη θεραπεία διαταραχών του κύκλου ουρίας λόγω της ικανότητάς του να δεσμεύει αμινοξέα. Αυτό οδηγεί στην απέκκριση αυτών των αμινοξέων και σε μείωση των επιπέδων αμμωνίας⁵⁸. Επιπλέον, πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι το βενζοϊκό νάτριο είναι πιθανόν να είναι ωφέλιμο ως συμπληρωματική θεραπεία (1 g/ημέρα) στη σχιζοφρένεια. Το βενζοϊκό οξύ τείνει ως επί το πλείστον να σχηματίζει ιππουρικό οξύ που απεκκρίνεται δια μέσου των νεφρών, αφού πρώτα έχει συνδεθεί με τη γλυκίνη στο ήπαρ. Ενεργοποιείται σε βενζόυλο συνένζυμο Α (*benzoyl-CoA*) το οποίο αντιδρά με γλυκίνη προς σχηματισμό ιππουρικού οξέος⁵⁸.

Όλα όσα αναφέρθηκαν πιο πάνω καταδεικνύουν την ανάγκη για ύπαρξη κατάλληλων μεθόδων που επιτρέπουν τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων χημικών προσθέτων, συχνά σε πολύ μικρές ποσότητες (ίχνη), αλλά των και δραστικών συστατικών, με ικανοποιητική ακρίβεια. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η **ποιότητα** και η **ασφάλεια** των παραγόμενων προϊόντων ενώ ταυτόχρονα επιτυγχάνεται η εναρμόνιση με τις κατευθυντήριες οδηγίες της νομοθεσίας και των ρυθμιστικών οργανισμών (regulatory agencies).

Κεφάλαιο 2: Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η τεχνική της HPLC είναι ίσως η **συχνότερα χρησιμοποιούμενη** αναλυτική τεχνική, και επιτυγχάνει το διαχωρισμό ενός μίγματος αναλυτών που περιέχονται σε ένα δείγμα με βάση τη διαφορά κατανομής των ενώσεων σε δύο μη μειγνυόμενες μεταξύ τους φάσεις. Παρέχονται ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για τον κάθε αναλύτη ξεχωριστά, καθώς αυτός χαρακτηρίζεται από το δικό του χρόνο συγκράτησης και ακολούθως τη δική του χρωματογραφική κορυφή (βλ. παραγράφους 2.3.1 & 2.3.2).

Χάρη στην επίτευξη σταθερών ροών οι αναλύσεις επιταχύνονται σημαντικά, κάτι το οποίο είναι ένας εκ των βασικών στόχων. Αυτό επιτρέπει τη χρήση στηλών πληρωμένων με υλικά κατασκευασμένα από σωματίδια μικρού μεγέθους (μικρότερης διαμέτρου, d_p). Με αυτό τον τρόπο αυξάνεται σημαντικά το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης το οποίο είναι διαθέσιμο για αλληλεπίδραση με τα παρασυρόμενα από τη ρέουσα κινητή φάση μόρια των αναλυτών. Έτσι, ο διαχωρισμός βελτιώνεται (επίσης βασικός στόχος) και ταυτόχρονα μειώνεται το μέγεθος της στήλης (L = το μήκος μιας στήλης) που απαιτείται για μια ανάλυση (βλ. παράγραφο 2.5.1).

Καθώς οι περιορισμοί της HPLC είναι ελάχιστοι (βλ. ενότητα 2.2), π.χ. η επαρκής διαλυτοποίηση των αναλυόμενων ουσιών στην κινητή φάση, το εύρος των εφαρμογών της είναι σαφώς μεγαλύτερο συγκριτικά με την αεριοχρωματογραφία. Στην LC, οι αλληλεπιδράσεις αφορούν το «τρίπτυχο» στατική φάση-κινητή φάση-αναλύτης. Λόγω του τρίπτυχου αυτού, στην LC έχουν αναπτυχθεί περισσότερα είδη στατικών φάσεων και έτσι μελετώνται αναλύτες πάρα πολλών διαφορετικών κατηγοριών. Ακόμη, οι διάφοροι διαλύτες που χρησιμοποιούνται ως κινητές φάσεις στην LC (βλ. ενότητα 3.2) είναι μακράν περισσότεροι από τα αέρια που χρησιμοποιούνται ως κινητές φάσεις στην GC (μάλιστα συχνά χρησιμοποιούνται και μίγματα διαλυτών). Αυτό είναι λογικό, καθώς η κινητή φάση καθορίζει σημαντικά το βαθμό του διαχωρισμού.

2.1 Εφαρμογές της χρωματογραφίας HPLC^{59,61,62}

Η HPLC είναι η πιο διαδεδομένη αναλυτική τεχνική διαχωρισμού, με ετήσιες πωλήσεις οργάνων οι οποίες φθάνουν τα δισεκατομμύρια δολάρια. Η ευρεία αυτή αποδοχή οφείλεται στην ευαισθησία της, στην εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς και στην καταλληλότητα της για ενώσεις μη πτητικές ή/και θερμοευαίσθητες. Το πιο σημαντικό όμως είναι η εφαρμοσιμότητά της σε διάφορα επιστημονικά πεδία τα οποία ανήκουν σε ένα ευρύτερο πλαίσιο, όπως αυτό της βιομηχανίας ή του δημόσιου τομέα μιας χώρας. Ειδικότερα, κρίνουμε σκόπιμο να τονίσουμε ότι η HPLC είναι η τεχνική που χρησιμοποιείται περισσότερο από όλες τις **ενόργανες τεχνικές** στον τομέα της **φαρμακευτικής ανάλυσης** (προσδιορισμός των φαρμάκων στα σκευάσματά τους).

Εν συντομία, αναφέρουμε τα εξής: Ο συνδυασμός της HPLC με ανίχνευση

UV/Vis παρέχει μια ακριβή, επαναλήψιμη και ανθεκτική **μέθοδο επιλογής** για την ποσοτική ανάλυση των φαρμακευτικών προϊόντων, αποτελώντας την **καθιερωμένη μέθοδο** (standard method) της βιομηχανίας για το σκοπό αυτό. Ακόμη, η HPLC βρίσκει εφαρμογή στη παρακολούθηση της σταθερότητας είτε καθαρών φαρμακευτικών ουσιών (pure drug substances) είτε φαρμάκων στα σκευάσματά τους (drugs in formulations) με ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση των διαφόρων προϊόντων αποικοδόμησης. Υπάρχουν επίσης αρκετές HPLC εφαρμογές για τον υπολογισμό χαμηλών συγκεντρώσεων των χορηγούμενων φαρμάκων ή/και των μεταβολιτών τους σε βιολογικά δείγματα. Τέλος, η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό διαφόρων σημαντικών μεγεθών που χαρακτηρίζουν τις φαρμακευτικές ενώσεις (π.χ. συντελεστές μερισμού, $\log P$, σταθερές διάστασης, pK_a κλπ) καθώς και σε μελέτες εκτίμησης της πρωτεϊνικής σύνδεσης φαρμάκων.

2.2 Δυνατότητες και περιορισμοί της HPLC^{61,62}

Το πιο βασικό χαρακτηριστικό σχετικά με τη λειτουργία ενός συστήματος HPLC είναι πως εξ' αρχής, η εισαγωγή του αναλυόμενου δείγματος γίνεται με τρόπο απόλυτα ελεγχόμενο, και επομένως επαναλήψιμο. Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια έχει καθιερωθεί η ένεση δειγμάτων μέσω αυτόματων δειγματοληπτών (autosamplers for automated & unattended analysis), κάτι που σχεδόν εξαλείφει κάθε πιθανότητα «ανώμαλης» εισαγωγής του δείγματος στη κορυφή της στήλης (βλ. παράγραφο 2.5.5).

Γενικότερα, τα τελευταία χρόνια, η HPLC είναι η χρωματογραφική τεχνική με τη πλέον έντονη και απρόσκοπτη εξέλιξη σε ό,τι αφορά την οργανολογία. Κατασκευάζονται συνεχώς αποδοτικότερες **στήλες** (στατικές φάσεις), βελτιωμένοι **ανιχνευτές** στην έξοδο της στήλης και ακόμα πιο ισχυρά **λογισμικά ελέγχου** (software packages) για τον προγραμματισμό της χρωματογραφικής διαδικασίας αλλά και την επεξεργασία των χρωματογραφικών δεδομένων (βλ. ενότητα 2.5). Όλο και περισσότερα χημικά ήδη αναλυτών μπορούν πλέον να ποσοτικοποιηθούν με HPLC. Επίσης, η πιθανότητα αποικοδόμησης ενός δείγματος είναι πολύ μικρή. Στην υδροχρωματογραφία, η μεταβολή της θερμοκρασίας για τη βελτίωση ενός διαχωρισμού παρουσιάζει μικρή έως μέτρια συχνότητα. Όταν δε αυτό κριθεί απαραίτητο, η θερμοκρασία δεν υπερβαίνει τους 60-70°C. Η επίδραση της θερμοκρασίας στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς σχολιάζεται στην ενότητα 3.5.

Σχετικά με τους **περιορισμούς** κατά την εφαρμογή μιας μεθόδου HPLC, αυτό που πρέπει να τονιστεί είναι η σημαντικότητα του εύρους των δυνατοτήτων ενός ανιχνευτή. Υπάρχει ιδιαίτερη ανάγκη για ακόμη πιο εξελιγμένους (και φυσικά αξιόπιστους) ανιχνευτές οι οποίοι θα μπορούν να ανιχνεύουν ενώσεις που δε διαθέτουν κάποιο χρωμοφόρο. Φυσικά, εξ ίσου σημαντική είναι η πολυπλοκότητα και το κόστος ενός ανιχνευτή, ώστε αυτός να μπορεί στη πράξη να χρησιμοποιηθεί από ένα εργαστήριο.

Επιπλέον, μια συχνή πρακτική δυσκολία της τεχνικής HPLC είναι ότι τα φάρμακα (δραστικές ουσίες, APIs) πρέπει συνήθως να **εκχυλιστούν** από τα σκευάσματά τους πριν αναλυθούν. Σε πολλές περιπτώσεις αυτό δεν είναι καθόλου εύκολο (π.χ. σιρόπια, κρέμες).

Τέλος, ένας ομολογουμένως επιλήψιμος περιορισμός της HPLC είναι το **κόστος** των αναλώσιμων αντιδραστηρίων και διαλυτών. Είναι γεγονός ότι χρησιμοποιούνται σημαντικές ποσότητες οργανικών διαλυτών υψηλού κόστους που οδηγούν στη συγκέντρωση συχνά μεγάλων ποσοτήτων τοξικών αποβλήτων (π.χ. THF, ACN). Η διαδικασία της κατάλληλης επεξεργασίας τέτοιων αποβλήτων με σκοπό την ασφαλή συλλογή και απόρριψη τους είναι επίσης δαπανηρή. Πλέον, στην επιστημονική κοινότητα, γίνεται έντονη προσπάθεια ανάπτυξης «πράσινων» μεθόδων HPLC. Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στη χρήση μη (ή όσο το δυνατόν λιγότερο) τοξικών διαλυτών (green chemistry).

2.3 Εξαγωγή και επεξεργασία πληροφοριών από ένα χρωματογράφημα

Αναμφίβολα, η χρωματογραφία οφείλει τον κατακόρυφο ρυθμό ανάπτυξής της σε χαρακτηριστικά όπως η ταχύτητα, η απλότητα, το σχετικά χαμηλό κόστος και η ευρεία, χωρίς ιδιαίτερους περιορισμούς, εφαρμοσιμότητά της. Παρ' όλα αυτά, η τεχνική αυτή δε θα ήταν δυνατό να έχει τόσες πολλές εφαρμογές εάν δεν παρείχε τη δυνατότητα του άμεσου ποιοτικού χαρακτηρισμού (ταυτοποίηση) και, ακόμη περισσότερο, του ποσοτικού προσδιορισμού των διαχωριζόμενων ουσιών.

2.3.1 Ποιοτική ανάλυση^{59,60}

Ο ποιοτικός προσδιορισμός έχει ως σκοπό να διερευνήσει και να πιστοποιήσει την ταυτότητα μιας ουσίας η οποία διαχωρίζεται με HPLC από τα υπόλοιπα συστατικά ενός δείγματος. Από ένα χρωματογράφημα μπορεί να ληφθεί μόνο ένα είδος ποιοτικής πληροφορίας για κάθε ουσία σε ένα δείγμα: ο χρόνος κατακράτησης (ή χρόνος ανάσχεσης ή χρόνος συγκράτησης, retention time, t_R). Συνεπώς, η πληροφόρηση που μπορεί να ληφθεί από τη χρωματογραφία είναι πολύ περιορισμένη σε σχέση με την αντίστοιχη πληροφόρηση από ένα φάσμα IR, NMR ή ένα φάσμα μαζών.

Από τα παραπάνω δεν πρέπει να θεωρηθεί ότι η χρωματογραφία δεν βρίσκει σημαντικές εφαρμογές στη ποιοτική ανάλυση. Αντιθέτως, χρησιμοποιείται ευρύτατα ως αναλυτικό εργαλείο για τη διαπίστωση της παρουσίας ή της απουσίας συστατικών σε μίγματα τα οποία ταυτοχρόνως περιέχουν ένα σχετικά περιορισμένο αριθμό άλλων ουσιών (προσμίξεων, προϊόντων διάσπασης) γνωστής (ως επί το πλείστον) ταυτότητας. Για παράδειγμα, 30 ή και περισσότερα αμινοξέα ενός υδρολύματος μιας πρωτεΐνης, μπορούν να ανιχνευθούν με σχετικά μεγάλο βαθμό βεβαιότητας από ένα χρωματογράφημα. Όμως, η επιβεβαίωση της ταυτότητας των ουσιών αυτών απαιτεί φασματοσκοπική ή χημική εξέταση

(ταυτοποίηση) των απομονωμένων συστατικών.

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι αν και τα χρωματογραφήματα δεν οδηγούν άμεσα σε μια θετική ταυτοποίηση των ουσιών σε ένα δείγμα, εν τούτοις αποτελούν ένδειξη της απουσίας ορισμένων ενώσεων. Έτσι, εάν ένα δείγμα δεν παρέχει μια κορυφή στον ίδιο χρόνο t_R ενός προτύπου διαλύματος, μετρημένου κάτω από τις ίδιες συνθήκες, τότε μπορεί να θεωρηθεί βέβαιη η απουσία της συγκεκριμένης ένωσης στο άγνωστο διάλυμα (ή ότι αυτή είναι παρούσα σε επίπεδα συγκέντρωσης κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου). Τέλος, υπάρχουν και περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει καμία πρότερη γνώση (ή εκτίμηση) της ταυτότητας των συστατικών ενός αγνώστου δείγματος. Και εδώ, η στρατηγική της αναλυτικής πορείας είναι περίπου η ίδια: Επιδιώκεται ο αποτελεσματικός χρωματογραφικός διαχωρισμός των επί μέρους συστατικών, τον οποίο διαδέχεται η φασματοσκοπική ταυτοποίηση.

2.3.2 Ποσοτική ανάλυση^{59,60}

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των χρωματογραφικά διαχωριζόμενων ουσιών βασίζεται στην εξέταση ορισμένων ποσοτικών χαρακτηριστικών τα οποία ισχύουν σε κάθε τύπο χρωματογραφίας. Η ποσοτική χρωματογραφία στήλης βασίζεται στη σύγκριση του ύψους (height) ή κάποιες φορές της επιφάνειας (area) της κορυφής του αναλύτη με τις αντίστοιχες κορυφές ενός ή περισσότερων προτύπων. Με κατάλληλο έλεγχο των πειραματικών συνθηκών, οι παράμετροι αυτές μεταβάλλονται γραμμικά με τη συγκέντρωση.

2.3.2.1 Αναλύσεις που βασίζονται στο ύψος των κορυφών⁵⁹

Το ύψος μιας χρωματογραφικής κορυφής υπολογίζεται με χάραξη μιας ευθείας (και από τις δύο πλευρές της κορυφής) που συνδέει τις γραμμές βάσης, και στη συνέχεια μέτρηση της κατακόρυφης απόστασης αυτής της γραμμής από το υψηλότερο σημείο της κορυφής. Αν και η μέτρηση αυτή μπορεί να γίνει με σχετικά ικανοποιητικό βαθμό επαναληψιμότητας, θα πρέπει να σημειωθεί ότι το ύψος της κορυφής είναι αντιστρόφως ανάλογο του εύρους της. Επομένως, τα λαμβανόμενα αποτελέσματα θα είναι ορθά μόνο εάν οι συνθήκες μέτρησης δεν προκαλούν μεταβολή στο πλάτος των κορυφών κατά το χρονικό διάστημα μετρήσεων αγνώστων και προτύπων. Είναι σημαντικό να ελέγχονται στενά διάφορες πειραματικές παράμετροι όπως η θερμοκρασία της στήλης, η ταχύτητα ροής του διαλύτη και η ταχύτητα έγχυσης του δείγματος. Η τελευταία παράμετρος είναι ιδιαίτερα κρίσιμη για τις πρώτες κορυφές ενός χρωματογραφήματος. Επιπλέον, θα πρέπει να αποφευχθεί και η υπερφόρτωση της στήλης (βλ. παράγραφο 2.5.3).

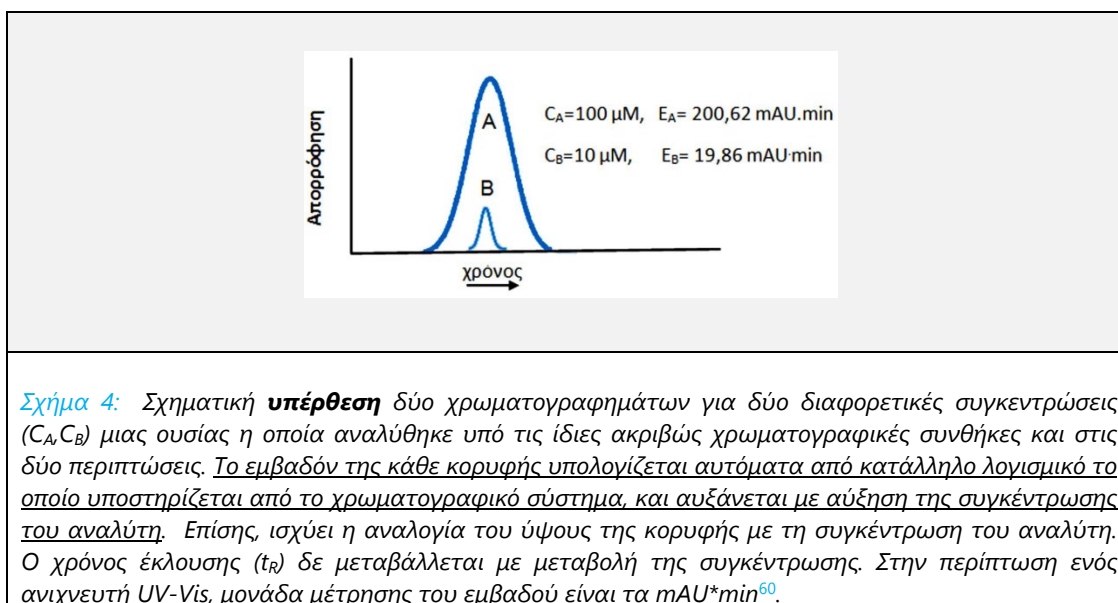
2.3.2.2 Αναλύσεις που βασίζονται στην επιφάνεια των κορυφών⁵⁹

Οι επιφάνειες (εμβαδά) των χρωματογραφικών κορυφών είναι ανεξάρτητες από διευρύνσεις οφειλόμενες στις κρίσιμες πειραματικές παραμέτρους που είδαμε στο εδάφιο 2.3.2.1. Ως εκ τούτου, μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελούν προτιμότερη

αναλυτική παράμετρο σε σχέση με τα ύψη των κορυφών. Φυσικά, πρέπει να αναφερθεί ότι τα ύψη των κορυφών μετρούνται ευκολότερα, και στην περίπτωση πολύ στενών κορυφών μετρούνται με μεγαλύτερη ακρίβεια σε σχέση με τις επιφάνειες. Σε ό,τι αφορά τον ακριβή υπολογισμό της επιφάνειας μιας κορυφής (ολοκλήρωση), αυτός πραγματοποιείται χάρη σε ψηφιακούς ηλεκτρονικούς ολοκληρωτές με τους οποίους είναι εφοδιασμένα τα σύγχρονα όργανα χρωματογραφίας. Ιστορικά, οι πρώτες ολοκληρώσεις γίνονταν με το χέρι, ακολουθώντας συγκεκριμένες μεθόδους (βλ. εδάφιο 2.5.5.2)⁵⁷.

Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση C της αναλυόμενης ουσίας τόσο μεγαλύτερο θα είναι το εμβαδό της προκύπτουσας κορυφής, καθώς περισσότερα μόρια της ουσίας θα ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή (Σχήμα 4). Μάλιστα, η σχέση αυτή είναι ανάλογη. Επομένως, η ποσοτικοποίηση γίνεται βάσει του εμβαδού της επιφάνειας της κορυφής το οποίο μεγαλώνει καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του διαλύματος της ενιέμενης ουσίας, μετά τη κατασκευή της κατάλληλης καμπύλης αναφοράς (βλ. εδάφιο 2.3.2.3). Ωστόσο, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για αποφυγή της ενδεχόμενης υπερφόρτωσης της στήλης (column overload) με μεγάλο όγκο ενιέμενου δείγματος (βλ παράγραφο 2.5.3)

Σημείωση: Αν μια κορυφή είναι ασύμμετρη (βλ. ενότητα 0), υποχρεωτικά βασιζόμαστε στο εμβαδόν της και όχι στο ύψος της. Αν είναι συμμετρική, δηλαδή $0,8 \leq A_s \leq 1,5$, τότε μπορεί να μετρηθεί το ύψος της.



2.3.2.3 Οι κυριότερες μέθοδοι βαθμονόμησης⁵⁹

Όπως γνωρίζουμε, οι μετρήσεις σε μια οποιαδήποτε χρωματογραφική τεχνική ανάλυσης είναι σχετικές και απαιτούν τη βαθμονόμηση των

χρωματογράφων με πρότυπα διαλύματα παραπλήσιας σύστασης με τα δείγματα (η σύνθεσή τους πρέπει να προσεγγίζει όσο γίνεται περισσότερο τη σύνθεση των αγνώστων). Η χρήση μιας σειράς τέτοιων προτύπων (με διαφορετικές και γνωστές συγκεντρώσεις για το κάθε ένα) είναι η πιο άμεση και απλή μέθοδος για την ποσοτική χρωματογραφική ανάλυση, και ονομάζεται **μέθοδος των εξωτερικών προτύπων**. Συλλέγονται τα χρωματογραφήματα των προτύπων, υπολογίζονται οι επιφάνειες (ή τα ύψη) των κορυφών και κατασκευάζεται διάγραμμα των τιμών αυτών ως προς τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις C. Το διάγραμμα θα πρέπει να οδηγεί σε μια ευθεία γραμμή, η οποία πρέπει να αποδειχθεί στατιστικά (με τη βοήθεια ενός κατάλληλου υπολογιστικού φύλλου) ότι διέρχεται από την αρχή των αξόνων (σημείο 0,0). Η καταρτιζόμενη αυτή καμπύλη ονομάζεται *καμπύλη βαθμονόμησης*. Έπειτα, οι αναλύσεις των αγνώστων που ακολουθούν βασίζονται στο διάγραμμα αυτό.

Μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται εξ ίσου συχνά στις ποσοτικές αναλύσεις είναι η **μέθοδος του εσωτερικού προτύπου**. Χάρη σ' αυτή λαμβάνεται η μέγιστη επαναληψιμότητα, διότι αποφεύγονται οι αβεβαιότητες οι οποίες εισάγονται κατά την έγχυση του δείγματος. Σε αυτή τη μέθοδο, προστίθεται σε κάθε πρότυπο διάλυμα και σε κάθε δείγμα μια προσεκτικά μετρημένη ποσότητα συγκεκριμένης ουσίας, η οποία αποτελεί το *εσωτερικό πρότυπο*. Ο λόγος της επιφάνειας (ή του ύψους) της κορυφής ενός αναλύτη προς την αντίστοιχη του εσωτερικού προτύπου αποτελεί την αναλυτική παράμετρο. Για να είναι επιτυχής η μέθοδος πρέπει η κορυφή του εσωτερικού προτύπου να διαχωρίζεται επαρκώς από τις κορυφές των άλλων συστατικών του δείγματος ($R_s > 1,5$), αλλά συγχρόνως δε θα πρέπει να απέχει σημαντικά από τη κορυφή του αναλύτη που μας ενδιαφέρει. Με την επιλογή του κατάλληλου εσωτερικού προτύπου μπορούν να επιτευχθούν σχετικές επαναληψιμότητες καλύτερες από 1%.

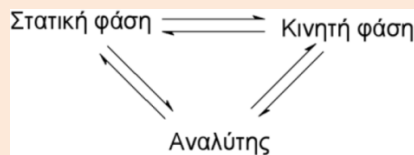
Τέλος, ένας άλλος τρόπος για να αποφευχθούν οι αβεβαιότητες που σχετίζονται με τη έγχυση του δείγματος είναι η **μέθοδος κανονικοποίησης της επιφάνειας**. Στη περίπτωση αυτή απαιτείται πλήρης έκλυση όλων των συστατικών του δείγματος. Αρχικά υπολογίζονται οι επιφάνειες όλων των κορυφών και στη συνέχεια διορθώνονται για τυχόν διαφορές ως προς την απόκριση του ανιχνευτή. Η συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας βρίσκεται από το λόγο της επιφάνειας της κορυφής της προς τη συνολική επιφάνεια των κορυφών (αναλυτική παράμετρος). Ωστόσο, συχνά δεν είναι τόσο πρακτικό, άρα και εφικτό, να ρυθμίζονται οι συνθήκες έτσι ώστε να εκλύονται όλα τα συστατικά του δείγματος μέσα σε ένα λογικό χρονικό διάστημα. Ως εκ τούτου, η μέθοδος κανονικοποίησης της επιφάνειας έχει περιορισμένες εφαρμογές.

2.4 Εισαγωγή στη χρωματογραφία προσρόφησης και κατανομής^{59-63,68}

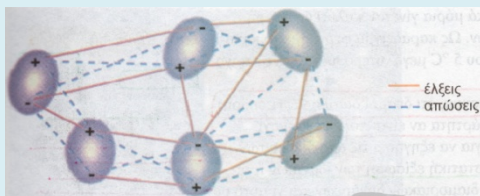
Στο πλαίσιο του «χρωματογραφικού μηχανισμού» στον οποίο βασίστηκε το πειραματικό σκέλος της παρούσα διπλωματικής εργασίας, θα ασχοληθούμε εκτενέστερα με τους μηχανισμούς προσρόφησης και κατανομής. Φυσικά, πρέπει να

τονιστεί ότι στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς συχνά υπάρχει σημαντική «**αλληλοεπικάλυψη**» των μηχανισμών που διέπουν μια ανάλυση. Ωστόσο, κάθε είδος μηχανισμού έχει διαφορετικό **ποσοστό συνεισφοράς** στο διαχωρισμό, ανάλογα με τη μέθοδο που έχουμε αναπτύξει (είδος στατικής φάσης, σύσταση κινητής φάσης, προσθήκη ειδικών αντιδραστηρίων στη κινητή φάση, προκατεργασία δείγματος).

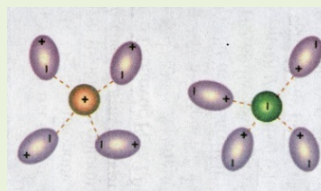
Στην LC, οι διάφορες αλληλεπιδράσεις αφορούν το «**τρίπτυχο**» στατική φάση-κινητή φάση-αναλύτης (Σχήμα 5 επάνω) και εκδηλώνονται μέσα από διάφορα είδη διαμοριακών δεσμών (Σχήμα 5 κάτω). Άλλωστε, αυτό το «**σύστημα αλληλεπίδρασης**» είναι ο λόγος που έχουν αναπτυχθεί πολλά είδη στατικών φάσεων και έτσι μελετώνται αναλύτες πάρα πολλών διαφορετικών κατηγοριών. Ως εκ τούτου, το συνολικό φαινόμενο είναι εξαιρετικά **πολύπλοκο** και επομένως δε πρέπει να εξετάζεται με τρόπο απόλυτο και μονοδιάστατο. Προκειμένου να αποφευχθεί η σύγχυση που μπορεί να προκαλέσουν τα διάφορα «αντιφατικά συμπεράσματα», θα πρέπει να αναλογιζόμαστε το **βαθμό συμμετοχής** κάθε ξεχωριστής διεργασίας στο διαχωρισμό.



Διαμοριακές δυνάμεις μεταξύ πολικών μορίων



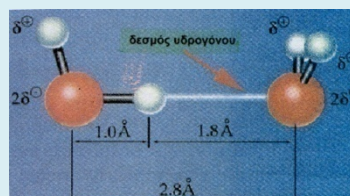
Η ισχύς των δεσμών ιόντος-διπόλου εξαρτώνται από το μέγεθος και το φορτίο των ιόντων και από το μέγεθος και τη διπολική ροπή μ των μορίων



Συμμετρική μέση κατανομή e^- σε μη πολικά μόρια και σχηματισμός στιγμιαίων διπόλων



Δεσμός H μεταξύ δύο μορίων H_2O



Σχήμα 5: Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκράτηση (και επομένως το διαχωρισμό) σε μια χρωματογραφική διαδικασία είναι η στατική φάση (είδος και ιδιότητες), η κινητή φάση (σύσταση και ιδιότητες), οι **διαμοριακές αλληλεπιδράσεις (intermolecular interactions)** ανάμεσα στον αναλύτη και τις δύο φάσεις, ο βαθμός αλληλεπίδρασης των δύο φάσεων και η γενικότερη επίδραση της θερμοκρασίας (T) στα φαινόμενα αυτά. **Επάνω:** Το «**τρίπτυχο αλληλεπίδρασης**» στατική φάση-κινητή φάση-αναλύτης **Κάτω:** **Διαμοριακοί δεσμοί** λέγονται οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των μορίων. Με τον όρο διαμοριακές δυνάμεις αναφερόμαστε σε αλληλεπιδράσεις **α) διπόλου-διπόλου** (είναι δυνάμεις ηλεκτροστατικής φύσης μεταξύ πολικών μορίων που συμπεριφέρονται ως ηλεκτρικά δίπολα και έχουν μόνιμη διπολική ροπή μ) **β) ιόντων-διπόλου** (οφείλονται σε δυνάμεις Coulomb όπου το θετικό/αρνητικό ιόν έλκει το αρνητικό/θετικό μέρος ενός ηλεκτρικά ουδέτερου μορίου με μόνιμη διπολική ροπή μ) **γ) διπόλου-επαγόμενου διπόλου** (μεταξύ μορίων με μόνιμη διπολική ροπή μ και μη πολικών μορίων) & **δυνάμεις διασποράς (London)** οι οποίες είναι ασθενείς ελκτικές δυνάμεις μεταξύ μη πολικών μορίων τα οποία στιγμιαία γίνονται ηλεκτρικά δίπολα λόγω άνισης κατανομής των e^- και **δ) δεσμών υδρογόνου (γέφυρες υδρογόνου)**, μια ειδική περίπτωση διαμοριακού δεσμού διπόλου-διπόλου που σχηματίζεται χάρη στους δεσμούς N-H, O-H, F-H μέσα σε ένα μόριο (ενδομοριακοί) ή ανάμεσα σε γειτονικά μόρια (διαμοριακοί). Θεωρούνται εκλεκτικές αλληλεπιδράσεις⁶⁹.

Οι δυνάμεις διασποράς (μη εκλεκτικές αλληλεπιδράσεις) αναφέρονται ως δεσμοί **Van der Waals**, αν και είθισται με την ονομασία αυτοί να αναφερόμαστε στο σύνολο των παραπάνω διαμοριακών δυνάμεων που αρχικά περιγράφηκαν για να εξηγήσουν τις αποκλίσεις πραγματικών αερίων από την καταστατική εξίσωση των ιδανικών (τέλειων) αερίων.

2.4.1 Χρωματογραφία προσρόφησης (Adsorption Chromatography)

Στη χρωματογραφία προσρόφησης ως στατική φάση χρησιμοποιείται ένα υπόστρωμα μεγάλης πολικότητας το οποίο φέρει μια ειδική στερεή επιφάνεια με ισχυρές προσροφητικές ικανότητες. Τα μόρια των αναλυτών **προσροφώνται** (*solutes adsorbed on surface of stationary phase*) σε συγκεκριμένες θέσεις (**δραστικά κέντρα**) αυτής της στατικής φάσης π.χ. με πρόσδεση σε ομάδες σιλανόλης (**ενεργές ομάδες**), Si-OH, και για κάθε χημικό είδος μορίων αποκαθίσταται μια δυναμική ισορροπία. Η στατική φάση συνίσταται από πολικά υλικά όπως η πηκτή πυριτίας (ή αλλιώς γέλη πυριτίου ή silica gel), SiO₂ (οξειδίο του πυριτίου), η αλούμινα (alumina), Al₂O₃ (οξειδίο του αργιλίου) και η μαγνησία, MgO₂ (οξειδίο του μαγνησίου). Η πολικότητα των υλικών αυτών οφείλεται στις **υδροξυλομάδες** που περιέχουν. Την κινητή φάση αποτελούν διάφοροι άπολοι ή ελάχιστα πολικοί διαλύτες, μη αναμιξιμοί με το νερό, οι οποίοι μάλιστα πολύ συχνά συνδυάζονται και δίνουν μίγματα. Παραδείγματα τέτοιων διαλυτών είναι το επτάνιο, το οκτάνιο, το εξάνιο, το CHCl₃, ο CCl₄ και το THF.

Αρχικά, στο χρωματογραφικό σύστημα δίνεται ο κατάλληλος χρόνος ώστε να λάβει χώρα μια επαρκής **«εξισορρόπηση»** της κινητής φάσης εντός της στατικής φάσης, και τα μόρια της πρώτης να σταθεροποιηθούν γύρω από τα σωματίδια της δεύτερης. Στη συνέχεια εισάγεται το δείγμα και τα μόρια των αναλυτών **«εκδιώκουν»** κάποια μόρια της κινητής φάσης, παίρνοντας τη θέση τους εντός της στατικής φάσης. Η έκταση του φαινομένου αυτού αυξάνεται όσο αυξάνεται η συγγένεια του αναλύτη με τη στατική φάση. Η επερχόμενη κατακράτηση ενός μορίου από τη στατική φάση οφείλεται στη **προσρόφηση** του σε αυτή. Η αλληλεπίδραση αυτή γίνεται χάρη στις χαρακτηριστικές ομάδες ή τους διπλούς δεσμούς των αναλυτών. Αναλύτες με όμοιο αλειφατικό τμήμα δε μπορούν να διαχωριστούν ικανοποιητικά. Η ενεργητική αυτή συγκράτηση του αναλύτη μέσα στο προσροφητικό μέσο πρέπει να είναι **αντιστρεπτή** ώστε να μπορεί στη συνέχεια να γίνει η **εκρόφηση** του με τη βοήθεια ενός κατάλληλου διαλύτη έκλυσης (εκδίωξη του αναλύτη κατά τη συνεχή ροή της κινητής φάσης).

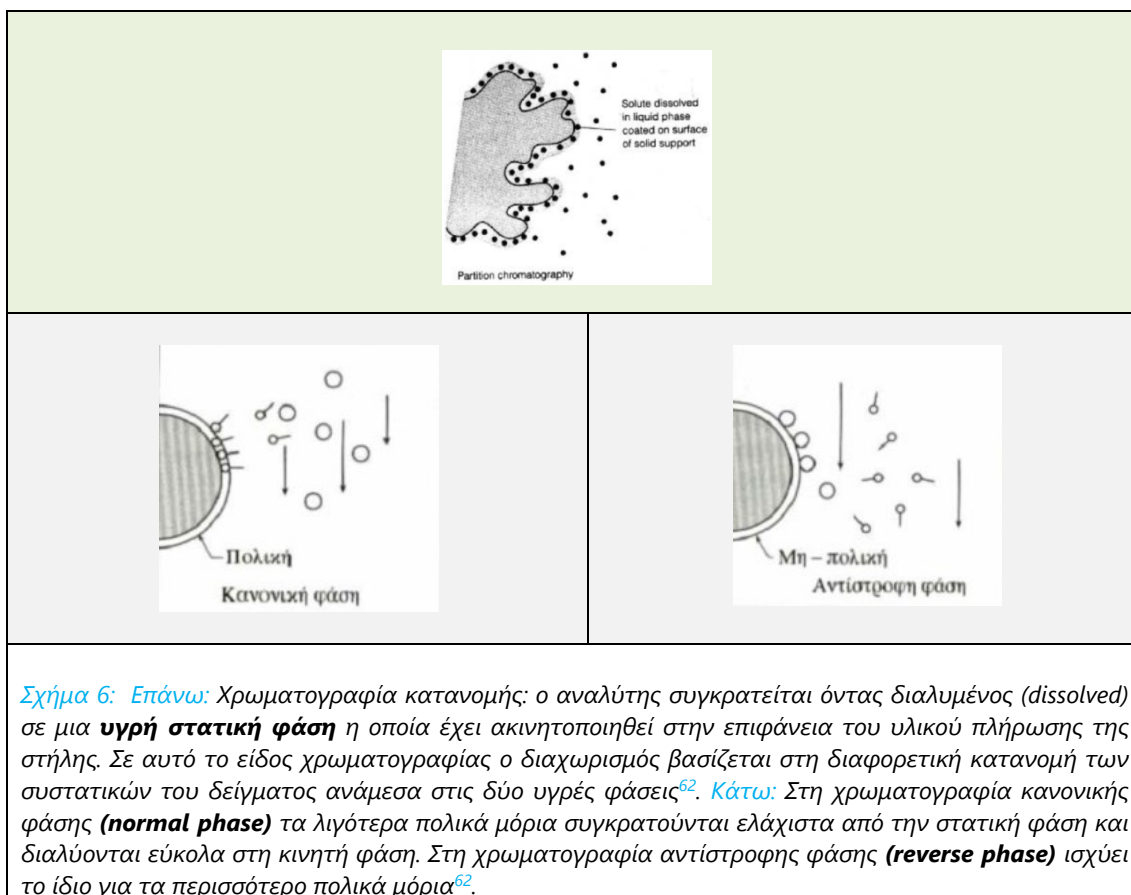
Γενικότερα, ως προσροφητικά μέσα μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες χημικές ουσίες με την προϋπόθεση ότι είναι **πρακτικά αδιάλυτες** στους χρησιμοποιούμενους διαλύτες (κινητές φάσεις) και **χημικά αδρανείς** προς τους αναλύτες. Πρέπει επίσης να έχουν μεγάλο **εμβαδόν επιφάνειας** (2.5.1.3) και ικανοποιητική **προσροφητική ικανότητα**. Η ισχύς της προσρόφησης, και ως εκ τούτου οι τιμές του παράγοντα χωρητικότητας (k), αυξάνει με την εξής σειρά: κοροσμένοι υδρογονάνθρακες, ολεφίνες, αρωματικές ενώσεις, σουλφίδια, αιθέρες, νίτρο-ενώσεις, εστέρες, αλδεΐδες-κετόνες, αλκοόλες, αμίνες, αμίδια, καρβοξυλικά οξέα.

2.4.2 Χρωματογραφία κατανομής (Partition Chromatography)

Όπως γνωρίζουμε, στην υγροχρωματογραφία (liquid chromatography, LC) η κινητή φάση είναι υγρή ενώ η στατική φάση μπορεί να είναι είτε στερεή είτε υγρή. Η ταχεία εξέλιξη των χρωματογραφικών τεχνικών οδήγησε λίγες μόλις δεκαετίες μετά την πρωτοποριακή εργασία του Tswett, στην αντικατάσταση της κλασικής στερεής φάσης από υγρή φάση από τους A.J.P. Martin και R.L. Synge⁶⁴. Συγκεκριμένα, επάνω στο στερεό (πορώδες) υλικό υπό μορφή μικρών σωματιδίων (πολύ λεπτής σκόνης), σταθεροποιήθηκε **μηχανικά** μια **λεπτή στοιβάδα υγρού**. Πλέον, το στερεό υπόστρωμα αποτελούσε απλά μια αδρανή **βάση** και δε συμμετείχε στη χρωματογραφική διαδικασία. Έτσι περάσαμε στη **χρωματογραφία κατανομής**, όπου οι αναλύτες δεν ήταν πλέον προσροφημένοι (adsorbed) σε μια στερεή στατική φάση, αλλά διαλυμένοι (dissolved) σε μια υγρή στατική φάση η οποία είχε ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης της στήλης (**Σχήμα 6 επάνω**). Σε αυτό το είδος χρωματογραφίας ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών του δείγματος ανάμεσα στις δύο υγρές φάσεις, όπως συμβαίνει σε μια διαδικασία εκχύλισης μέσα σε μία διαχωριστική χοάνη.

Η δυνατότητα της «**κατεργασίας**» των στερεών στατικών φάσεων μέσω της δέσμευσης **υγρών στοιβάδων** επάνω σε αυτές, οδηγεί στη τροποποίηση των ιδιοτήτων τους ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του ακινητοποιημένου υγρού. Έτσι, διακρίνουμε τη χρωματογραφία κατανομής **κανονικής φάσης**, όπου η στατική φάση είναι περισσότερο πολική από τη κινητή φάση, και τη χρωματογραφία κατανομής **αντίστροφης φάσης** όπου ισχύει το αντίστροφο (**Σχήμα 6 κάτω**). Στην πρώτη περίπτωση προηγείται η έκλυση των λιγότερο πολικών μορίων (διαλύονται εύκολα στη κινητή φάση), ενώ στη δεύτερη περίπτωση προπορεύονται τα περισσότερο πολικά μόρια (συγκρατούνται ελάχιστα από τη σχετικά άπολη στατική φάση).

Η χρωματογραφία κατανομής είναι ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος τύπος χρωματογραφίας, ενώ η **ποιότητα** των ειδικών υγρών στατικών φάσεων εξελίσσεται συνεχώς τα τελευταία χρόνια. Αυτό αφορά τόσο **το σημείο ζέσεως** των υγρών αυτών στοιβάδων (υψηλότερο σημείο ζέσεως → καλύτερη αντοχή) όσο και την **υφή** τους, καθώς καθίσταται δυνατή η χρήση όλο και πιο **λεπτών ομοιόμορφων υμένων** οι οποίοι εμποδίζουν τη δημιουργία ανεπιθύμητων κοιλοτήτων στις οποίες «λιμνάζει» η κινητή φάση. Χρονολογικά, η **χρωματογραφία κατανομής** διακρίνεται σε δύο υποομάδες: *κατανομής υγρού-υγρού και χημικά συνδεδεμένων φάσεων*.



Σχήμα 6: *Επάνω:* Χρωματογραφία κατανομής: ο αναλύτης συγκρατείται όντας διαλυμένος (*dissolved*) σε μια **υγρή στατική φάση** η οποία έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης της στήλης. Σε αυτό το είδος χρωματογραφίας ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών του δείγματος ανάμεσα στις δύο υγρές φάσεις⁶². *Κάτω:* Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης (**normal phase**) τα λιγότερα πολικά μόρια συγκρατούνται ελάχιστα από την στατική φάση και διαλύονται εύκολα στη κινητή φάση. Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (**reverse phase**) ισχύει το ίδιο για τα περισσότερα πολικά μόρια⁶².

2.4.2.1 Χρωματογραφία κατανομής υγρού-υγρού

Στη χρωματογραφία κατανομής υγρού-υγρού η υγρή στατική φάση **συγκρατείται** υπό μορφή λεπτής στοιβάδας επάνω στην επιφάνεια του πορώδους στερεού υλικού πλήρωσης με **προσρόφηση** (η διαδικασία αυτή δε θα πρέπει να συγχέεται με το φαινόμενο της συγκράτησης ενός αναλύτη στη χρωματογραφία προσρόφησης). Κατά τη φόρτωση του δείγματος, τα διάφορα συστατικά **δεν προσροφώνται** στη στατική φάση, αλλά **διαλύονται** σε αυτή (*solute dissolved in liquid phase coated on surface of solid support*). Μετά από λίγο χρόνο επιτυγχάνεται μια ισορροπία και τα μόρια κάθε αναλύτη **κατανέμονται** μεταξύ των δύο μη μειγνυόμενων υγρών φάσεων. Η μία υγρή φάση αποτελεί το διαλύτη (κινητή φάση) και η άλλη υγρή φάση αποτελεί τη στατική φάση.

Το να μην αναμειγνύονται μεταξύ τους οι δύο φάσεις είναι χαρακτηριστικό υψίστης σημασίας. Διαφορετικά, η κατανομή των αναλυτών θα ήταν αδύνατο να επιτευχθεί. Επιπλέον, η **διαλυτοποίηση** της στατικής φάσης εντός της κινητής φάσης θα επέφερε μόνιμη μείωση των τιμών k για τους αναλύτες, αύξηση του θορύβου στη γραμμή βάσης του χρωματογραφήματος, παρουσία άγνωστων κορυφών και, εν τέλει, σταδιακή μετατροπή της στατικής φάσης σε πληρωτικό υλικό προσρόφησης.

Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η χρήση πληθώρας **υγρών στατικών φάσεων** τόσο για τη χρωματογραφία κατανομής κανονικής φάσης (π.χ. DMSO με κινητή φάση ισοοκτάνιο, νερό ή νερό/αιθυλενογλυκόλη ή CH_3NO_2 με κινητή φάση

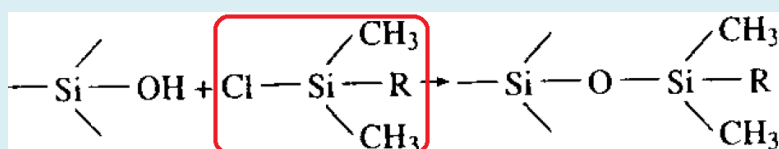
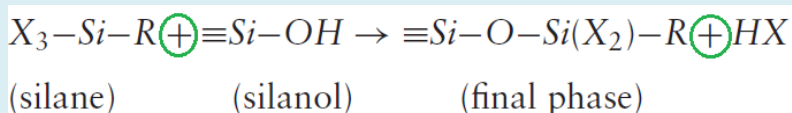
εξάνιο ή μίγμα εξάνιο/CCl₄) όσο και για τη χρωματογραφία κατανομής αντίστροφης φάσης (π.χ. υδρογονάνθρακες και διμεθυλοπολυσιλοξάνια με κινητή φάση μίγματα MeOH/H₂O ή ACN/H₂O) (Σχήμα 7). Πλέον, η εφαρμογή της χρωματογραφίας κατανομής υγρού-υγρού στις αναλύσεις ρουτίνας έχει σχεδόν εκλείψει λόγω αντικατάστασης από τη χρωματογραφία χημικά συνδεδεμένων φάσεων.

2.4.2.2 Χρωματογραφία χημικά συνδεδεμένων φάσεων

Όπως είδαμε αμέσως πιο πάνω, η δυνατότητα της «κατεργασίας» των προσροφητικών μέσων με διάφορα αντιδραστήρια μπορεί να οδηγήσει σε νέες στατικές φάσεις οι οποίες θα έχουν **συγκεκριμένες** και **επιλεγμένες** ιδιότητες, ανάλογα με το είδος της επεξεργασίας τους. Η χρωματογραφία χημικά συνδεδεμένων φάσεων διαδέχθηκε τη χρωματογραφία κατανομής υγρού-υγρού. Εδώ, η στερεή στατική φάση **δεσμεύεται χημικά** επάνω στην επιφάνεια του πορώδους στερεού υλικού πλήρωσης (χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις) χάρη σε **εξειδικευμένες αντιδράσεις** οι οποίες εισάγουν **συγκεκριμένες χημικές ομάδες**. Δηλαδή, η διαδικασία βασίζεται στη **χημική τροποποίηση** δραστικών ομάδων όπως οι ομάδες σιλανόλης, Si-OH (chemical modification of the silica gel surface).

Αν και αναφέρεται συχνά σαν ξεχωριστό είδος χρωματογραφίας, εν τούτοις ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία της χρωματογραφίας κατανομής, καθώς ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική **κατανομή** των συστατικών του δείγματος μεταξύ της υγρής κινητής φάσης και της στερεής στατικής φάσης. Η χρωματογραφία χημικά συνδεδεμένων φάσεων κατέχει τη πρώτη θέση σε επίπεδο εφαρμογών (διάφοροι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί). Και εδώ, οι δύο φάσεις είναι διαφορετικής πολικότητας και επομένως ανάλογα με τη πολικότητα των **υποκαταστατών** που έχουν **«συνδεθεί»** στη στατική φάση, δύναται να έχουμε χρωματογραφία κατανομής κανονικής φάσης ή χρωματογραφία κατανομής αντίστροφης φάσης. Η χρωματογραφία HPLC αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) είναι η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη μορφή της HPLC, ενώ άπτεται του πειραματικού μέρους της παρούσας διπλωματικής εργασίας και σχολιάζεται στην ενότητα 3.1.

Στην RP-HPLC, τα πληρωτικά υλικά (RPC packings) σχηματίζονται από μια χαρακτηριστική ομοιοπολική αντίδραση (αναφέρεται ως δέσμευση="bonding") ενός **οργανοσιλανίου** με τις **δραστικές σιλανόλες** της επιφάνειας ενός σωματιδίου σίλικα (silica particle) ή γενικά κάποιου παρόμοιου σωματιδίου, για να σχηματιστεί μια νέα, χημικά συνδεδεμένη φάση (bonded-phase column packing). Οι λειτουργικές ομάδες (X) συνήθως είναι -Cl ή -OEt συχνά μαζί με -CH₃, οπότε το παραπροϊόν της αντίδρασης (HX) είναι HCl ή αιθανόλη αντίστοιχα (Σχήμα 7).



Σχήμα 7 Επάνω: Χρωματογραφία κατανομής υγρού-υγρού: Η επιφάνεια του προσροφητικού υλικού (γνωστού από τη χρωματογραφία προσρόφησης) έχει τροποποιηθεί, καθώς **καλύπτεται** από ένα υγρό μη αναμίξιμο με τη κινητή φάση (**υγρή στατική φάση**). Δύναται να **συγκρατηθούν** (υπό μορφή λεπτής στοιβάδας) διάφορα χημικά είδη⁶⁰.

Κάτω: Χρωματογραφία χημικά συνδεδεμένων φάσεων: Το υπόστρωμα της στατικής φάσης είναι στερεό (**στερεή στατική φάση**) και προέρχεται όχι από συγκράτηση αλλά από **χημική κατεργασία** της πηκτής πυριτίας (ή κάποιου άλλου στερεού προσροφητικού υλικού που διαθέτει ενεργές ομάδες) με διάφορα αντιδραστήρια (συνδεδεμένοι υποκαταστάτες)⁶³.

Στην RP-HPLC, τα πληρωτικά υλικά (RPC packings) σχηματίζονται από μια ομοιοπολική αντίδραση (δέσμευση="bonding") ενός **οργανοσιλανίου** με τις **δραστικές σιλανόλες** της επιφάνειας ενός σωματιδίου σίλικα (silica particle) ή κάποιου παρόμοιου σωματιδίου, για να σχηματιστεί μια συνδεδεμένη φάση (bonded stationary phase)⁵⁹.

Στο επάνω μέρος του σχήματος που ακολουθεί (**Σχήμα 8**), παρουσιάζονται διάφορες περιπτώσεις «**προκατεργασίας**» της σίλικα στις οποίες η χημικά δεσμευόμενη επίστρωση είναι μη πολική. Συνηθέστερα, η ομάδα R του παραγόμενου σιλοξανίου είναι μια αλυσίδα **C8** (*n*-οκτύλιο) ή μια αλυσίδα **C18** (*n*-δεκαοκτύλιο) όπου R=C₁₈H₃₇ ή αλλιώς (CH₂)₁₇CH₃. Η τελευταία είναι γνωστή ως πηκτή πυριτίας ODS και είναι μια μη πολική στατική φάση ανθεκτική σε κινητές φάσεις με τιμές pH=2,5-8. Σε τιμές pH εκτός του εύρους αυτού, αρχίζει η υδρόλυση του σιλοξανίου και το υλικό πλήρωσης αποικοδομείται. Ακόμη, τα βουτυλιωμένα σιλοξάνια (**C4**) αποτελούν χρήσιμες εναλλακτικές των στατικών φάσεων ODS. Επίσης, η πηκτή πυριτίας με φαινυλιωμένα σιλοξάνια (**Ph**) είναι χρήσιμη για ελαφρά εκλεκτικότερες αναλύσεις ενώσεων που φέρουν μεγάλο αριθμό αρωματικών δακτυλίων όπως η προπρανόλη και το ναπροξένη. Οι αναλύσεις αυτές είναι πιο εκλεκτικές διότι είναι πιθανόν να εμφανιστούν πρόσθετες

(αλλά γενικά αμυδρές) π-π αλληλεπιδράσεις των αναλυτών με τις φαινυλομάδες της στατικής φάσης.

Φυσικά, είναι δυνατόν να παραχθούν και πληρωτικά υλικά πολικής επίστρωσης, όπως η στατική φάση **διόλης** η οποία επίσης παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα. Πρόκειται για υλικό που φέρει ομάδες **-OH** οι οποίες το καθιστούν από τα πλέον πολικά, περίπου όμοιας πολικότητας με τη σίλικα. Χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για ενώσεις που σχηματίζουν ΔΗ και είναι ειδικό για διαχωρισμούς τετρακυκλικών, οργανικών οξέων και στεροειδών. Εξ ίσου γνωστές είναι οι στατικές φάσεις με ομάδες **-NH₂**, οι οποίες χρησιμοποιούνται εκλεκτικά στην ανάλυση γλυκοσιδών και σακχάρων και οι στατικές φάσεις με ομάδες **-NO₂** οι οποίες είναι εκλεκτικές για αρωματικές ενώσεις. Οι στατικές φάσεις νιτριλίου (**-CN**) είναι υλικά σχετικά χαμηλής πολικότητας και προτιμώνται για το διαχωρισμό ενώσεων με διπλούς δεσμούς, ενώ συναντώνται πολύ συχνά στην ανάλυση τρικυκλικών αντικαταθληπτικών. Διαχωρίζουν μίγματα ουσιών με τον ίδιο τρόπο όπως η σίλικα, αλλά δίνουν μικρότερες τιμές *k* για μια δεδομένη κινητή φάση.

Τέλος, τα πληρωτικά υλικά στηλών **υβριδικής τεχνολογίας** και τα **πολυμερή παράγωγα της πηκτής πυριτίας** είναι μια πολύ σημαντική κατηγορία στατικών φάσεων, καθώς οδηγούν σε σαφή βελτίωση του σχήματος των κορυφών και είναι ανθεκτικά σε μια ευρεία περιοχή pH των κινητών φάσεων (pH=1-12) και θερμοκρασίας. Τα πολυμερή παράγωγα πυριτίας οδηγούν σε στατικές φάσεις **πολυσιλοξανίου**. Γενικά, η μέγιστη θερμοκρασία για στατική φάση σίλικα είναι ~120 °C ενώ η αντίστοιχη τιμή για (τις σαφώς πιο ευαίσθητες) χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις είναι ~80 °C.

Το επόμενο σχήμα παρουσιάζει ένα ακόμη φαινόμενο που αξίζει να σχολιαστεί. Στο κάτω μέρος του εν λόγω σχήματος ([Σχήμα 8](#)) παρουσιάζεται μια πιο ρεαλιστική εικόνα των υλικών πλήρωσης που παράγονται μετά από κατεργασία του διοξειδίου του πυριτίου. Στην επιφάνεια μιας ενυδατωμένης πυριτίας συναντάμε τουλάχιστον τρία διαφορετικά είδη **ενεργών ομάδων σιλανόλης**, Si-OH (free, germinal, associated silanols). Ακόμη, τα **αντιδραστήρια σιλανοποίησης (σιλάνια)** δύναται να αντιδρούν σε περισσότερα από ένα σημεία τους (monofunctional, difunctional, trifunctional silanes). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι στη πράξη υπάρχουν διάφοροι δυνατοί **προσανατολισμοί** για τις αντιδράσεις σιλανοποίησης (silica-silane reactions), οδηγεί στην ανάπτυξη συνδεδεμένων φάσεων (bonded phases) σε κάθετες, οριζόντιες ή μονομερείς κατευθύνσεις. Κάθε μία περίπτωση συνοδεύεται από διαφορετικές ιδιότητες.

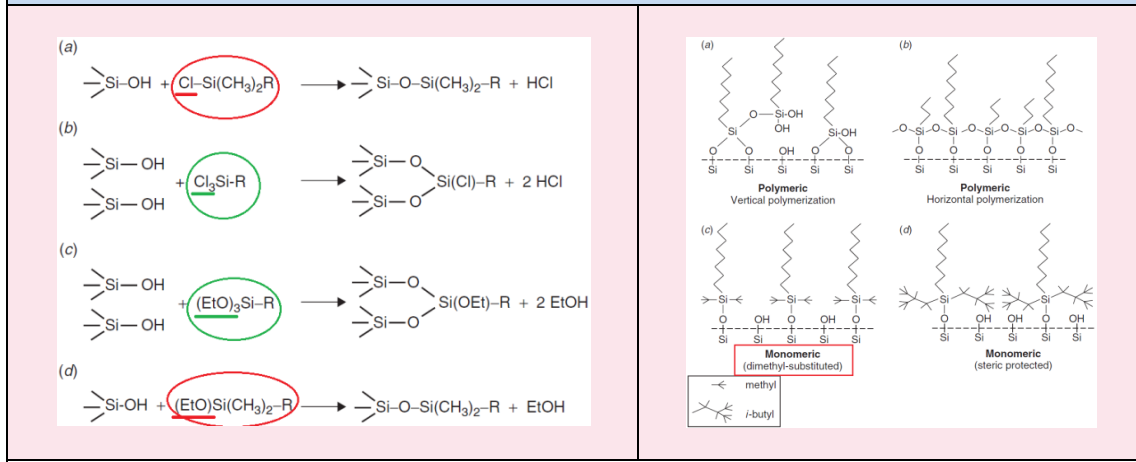
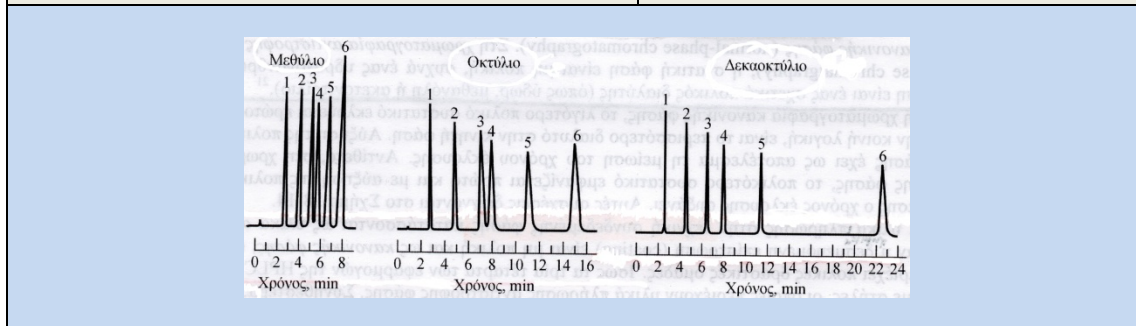
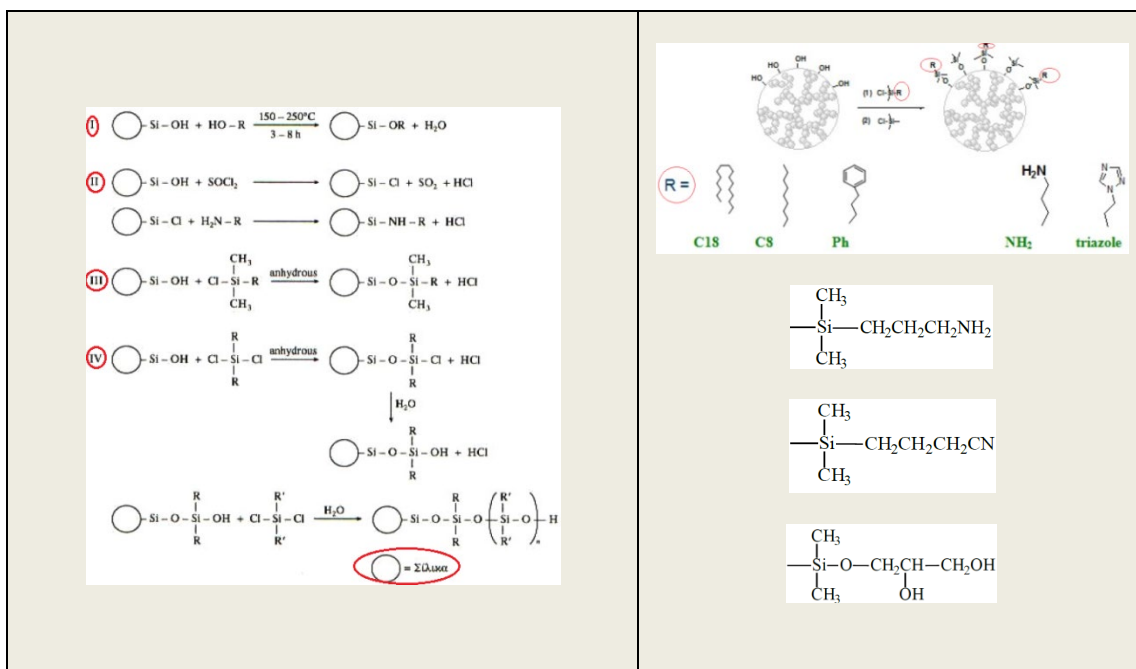
Η πιο απλή από τις περιπτώσεις αναφέρεται σε μια «μονή» αντίδραση (monofunctional reaction) ανάμεσα σε ένα απλό σιλάνιο (single silane reagent) όπως π.χ. είναι το χλωροδιμέθυλο δεκαοκτύλιο (R=C18), με μία απλή σιλανόλη (single surface-silanol), προς σχηματισμό μιας μονομερούς στήλης C18 (monomeric dimethyl-substituted C18 column). Στην περίπτωση του **κάθετου**

(vertical) προσανατολισμού, οι στατικές φάσεις τείνουν να είναι πιο σταθερές από τις μονομερείς τόσο σε υψηλά όσο και σε χαμηλά pH. Όσο πιο «βαριά» είναι η επικάλυψη της επιφάνειας πλήρωσης (surface coverage of the packing) τόσο πιο δύσκολη είναι η επίδραση της κινητής φάσης στη σίλικα (βάση στήριξης) και στο δεσμό σίλικα-υποκαταστάση (R). Επομένως, η αλλοίωση της στατικής φάσης καθυστερεί. Ωστόσο, οι αναλύσεις υπολείπονται σε επαναληψιμότητα (σχετικά με τους χρόνους t_R και την εκλεκτικότητα) διότι η έκταση των αντιδράσεων των σιλανίων ελέγχονται πολύ δύσκολα.

Στον **οριζόντιο (horizontal) προσανατολισμό**, τα άτομα Si των γειτονικών σιλανίων ενώνονται χάρη στα άτομα οξυγόνου (γέφυρες σιλοξανίου, Si-O-Si) ενώ ταυτόχρονα το κάθε σιλάνιο δεσμεύεται στη σίλικα με τον κλασικό δεσμό (silica-silane reactions). Οι στήλες αυτού του είδους έχει αναφερθεί ότι επιδεικνύουν εξαιρετική σταθερότητα τόσο σε υψηλά όσο και σε χαμηλά pH, ωστόσο η εμπορική κατασκευή τους είναι πιο περιορισμένη.

Στη πράξη, οι **στήλες μονομερούς φάσης (monomeric phase columns)** είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες στήλες αντίστροφης φάσης. Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία (υποκαταστάτες R) εμπορικά διαθέσιμων πληρωτικών υλικών αυτού του είδους. Σε αυτά, οι πλευρικές ομάδες (side groups) των σιλανίων είναι συνήθως μεθύλια (CH₃) ή βουτυλομάδες για **στερική προστασία** (steric protection) ώστε να μην είναι εκτεθειμένες σε παράπλευρες αντιδράσεις οι ελεύθερες σιλανόλες που δεν αντέδρασαν (Σχήμα 8) και οι αποχωρούσες ομάδες είναι ομάδες -Cl ή EtO-, δηλαδή **Cl-Si(CH₃)₂R** ή **Cl₃Si-R**, ή **(EtO)₃Si-R**, ή **(EtO)-Si(CH₃)₂R**. Χάρη σε αυτές τις απλοποιημένες αντιδράσεις (one to one reactions), οι διαχωρισμοί είναι επαναλήψιμοι, ερμηνεύσιμοι και σε μεγάλο βαθμό προβλέψιμοι. Τα πληρωτικά υλικά αυτού του είδους επιδεικνύουν την υψηλότερη αποδοτικότητα στήλης λόγω της ταχείας διάχυσης των αναλυτών εντός και εκτός της μη πολύπλοκης επίστρωσης της στατικής φάσης. Στον αντίποδα, τα πολύπλοκα πληρωτικά υλικά χαρακτηρίζονται από αργή διάχυση των αναλυτών και υψηλές τιμές N, ειδικά σε μεγάλες ταχύτητες ροής (less-crowded vs multifunctional surface layers).

Αξίζει να αναφερθεί ότι η δέσμευση των ομάδων σιλανόλης μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, πέραν της αντίδρασης με -μόνο και -δίχλωρο σιλάνια προς δημιουργία του **δεσμού O-Si-C** (οι πιο σταθερές χημικά τροποποιημένες φάσεις). Έτσι λοιπόν, δύναται να γίνει αντίδραση εστεροποίησης της σιλανόλης (Σχήμα 8 επάνω αριστερά, i) επάνω στην επιφάνεια της πυριτικής πηκτής (Si-OH+ROH) και οι διάφοροι υποκαταστάτες (R=αλκύλια κλπ) να σχηματίζουν «ουρές» και «κλάδους». Ωστόσο, οι κινητές φάσεις με νερό ή αλκοόλη προκαλούν ταχεία υδρόλυση της εστεροποιημένης πηκτής πυριτίας, δηλαδή του **δεσμού RO-Si-C**. Τέλος, με επίδραση θειόνυλοχλωριδίου (Si-OH+SOCl₂) λαμβάνονται χλωρίδια τα οποία αντιδρούν περαιτέρω με αμίνες και σχηματίζουν **δεσμούς Si-N**. Τα παράγωγα αυτά είναι πιο ανθεκτικά σε υδρολυτικές διασπάσεις (Σχήμα 8 επάνω αριστερά, ii).



Σχήμα 8: Επάνω: Διάφορες περιπτώσεις «προκατεργασίας» της σίλικα, όπου το οξείδιο του πυριτίου είναι **συζευγμένο** με ομάδες R όπως αλκύλια (ακετύλιο, οκτώλιο, δεκαοκτώλιο) άλλα και φαινύλια, διόλες, αμινομάδες, νιτροομάδες, κυανομάδες κλπ⁶². **Μέση:** Επίδραση του μήκους της αλυσίδας της ομάδας R (αλκυλομάδας) στην ποιότητα του χρωματογραφήματος. Οι βραχύτερες αλυσίδες συνήθως οδηγούν σε μικρότερους χρόνους κατακράτησης των αναλυτών. Αντίθετα, όταν το φορτίο άνθρακα στην επιφάνεια της πηκτής πυριτίας (υλικό στήριξης) είναι υψηλό, τότε το ποσοστό της στατικής φάσης που είναι **προσβάσιμο (διαθέσιμο)** για την κατανομή των αναλυτών αυξάνεται (1=ουρακίλη, 2=φαινόλη, 3=ακετοφαινόνη, 4=νιτροβενζόλιο, 5=βενζοϊκό μεθύλιο, 6=τολουόλιο)⁵⁹. **Κάτω:** Είδη αντιδράσεων σιλανοποίησης (silica-silane reactions) ανάλογα με το είδος των **σιλανολών (Si-OH)**, το είδος των **σιλανίων (X-Si(Y)₂R)** και τον **προσανατολισμό** των αντιδράσεων. Οι διαφορές στις συνθήκες αντίδρασης οδηγούν σε εναλλακτικές χημικά συνδεδεμένες φάσεις (alternative bonded-phase column packings)⁶³.

Ολοκληρώνοντας το σχολιασμό του εδαφίου 2.4.2.2, θα παρουσιάσουμε το **μηχανισμό κατακράτησης** των αναλυτών σε μια στατική φάση πηκτής πυριτίας C18 (στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως ODS-coated silica gel). Κατά την εξισορρόπηση της στήλης, οι μακριές αλυσίδες των υδρογονανθράκων ευθυγραμμίζονται παράλληλα η μία προς την άλλη και κάθετα προς την επιφάνεια την οποία συγκροτούν τα σωματίδια της πηκτής πυριτίας. Η προκύπτουσα δομή συχνά αναφέρεται ως «δομή ψήκτρας». Είναι το στάδιο όπου η κινητή φάση σταθεροποιείται εντός της στατικής φάσης και τα μόρια της πρώτης περιβάλλουν τα σωματίδια της δεύτερης. Μετά την εισαγωγή του δείγματος και τη συνεχή ροή νέων ποσοτήτων κινητής φάσης εντός του πληρωτικού υλικού, τα μόρια των αναλυτών «βυθίζονται» μέσα στις χημικά συζευγμένες **λιπόφιλες αλυσίδες** (Σχήμα 9). Το φαινόμενο είναι αντιστρεπτό και οι αναλύτες «αποβυθίζονται» κατά την έκπλυση της στατικής φάσης με κινητή φάση ίδιας ή ελαφρώς τροποποιημένης σύστασης. Έτσι, ολοκληρώνεται η διαδικασία της κατανομής των αναλυτών μεταξύ των δύο φάσεων. Πέραν των στατικών φάσεων C18, η παραπάνω πορεία διαχωρισμού ισχύει (με μικρές τροποποιήσεις ανά περίπτωση) για κάθε είδος χημικά συζευγμένης στατικής φάσης.

Παρόλα αυτά, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο οι επιφάνειες αυτές συγκρατούν τους αναλύτες δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Μερικοί επιστήμονες πιστεύουν ότι η ψήκτρα συμπεριφέρεται ως ένα «υγρός υδρογονάνθρακας», δηλαδή ως ένα μέσο με φύση παρόμοια με μια κοινή στατική φάση υγρού-υγρού. Άλλοι επιστήμονες θεωρούν τα υλικά επίστρωσης με δομή ψήκτρας ως «τροποποιημένες στερεές επιφάνειες» στις οποίες πραγματοποιείται φυσική προσρόφηση. Στην περίπτωση αυτή, τα μόρια της κινητής φάσης ανταγωνίζονται τα μόρια του αναλύτη για μια θέση επάνω στην **οργανική επιφάνεια**. Ωστόσο, ανεξάρτητα από το τις λεπτομέρειες κάθε μηχανισμού και το είδος της εκδοχής που υπερσχύει, ένα υλικό επίστρωσης συνδεδεμένης φάσης μπορεί να θεωρηθεί ως ένα συμβατικό, φυσικά κατακρατούμενο υγρό.

Σε πολλές περιπτώσεις καλούμαστε να αντιμετωπίσουμε το πρόβλημα της **ατελούς επικάλυψης** των ομάδων σιλανόλης (Si-OH), το οποίο εμφανιζόταν ιδιαίτερα στις πρώτες στατικές φάσεις πηκτής πυριτίας ODS. Η κάλυψη μιας επιφάνειας οξειδίου του πυριτίου με σιλανοποίηση περιορίζεται σε $\sim 4 \mu\text{moles}/\text{m}^2$ ή λιγότερο, λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων. Κάποιες από τις μακριές υδρόφοβες αλυσίδες C18 δε μπορούν να εισχωρήσουν, να αντιδράσουν και έτσι να επικαλύψουν όλες τις ομάδες -OH των σιλανολών. Ακόμα και με τη σύζευξη μικρότερων αλυσίδων (π.χ. C4, C8 κλπ) και την ελάττωση των στερικών περιορισμών (optimum bonding conditions) το φαινόμενο συνεχίζει να παρατηρείται. Ωστόσο, μια τυπική αντιπροσωπευτική επιφάνεια πλήρως υδροξυλιωμένης (fully hydroxylated) πυριτίας φέρει συνήθως μια επιφανειακή στρώση (surface layer) ομάδων σιλανόλης (Si-OH) σε συγκέντρωση $\approx 8 \mu\text{moles}/\text{m}^2$. Ως εκ τούτου, θα υπάρξουν **ομάδες που δεν αντέδρασαν** (residual silanol groups).

Αυτές οι όξινες ομάδες θα προσδώσουν ανεπιθύμητη πολικότητα στην επιφάνεια και αυτό δύναται να οδηγήσει σε αντιδράσεις με πολικούς αναλύτες (unwanted secondary analyte interactions), ιδιαίτερα τους βασικούς και εν δυνάμει ιονιζόμενους, και στο σχηματισμό «ουρών» (tailing) των κορυφών.

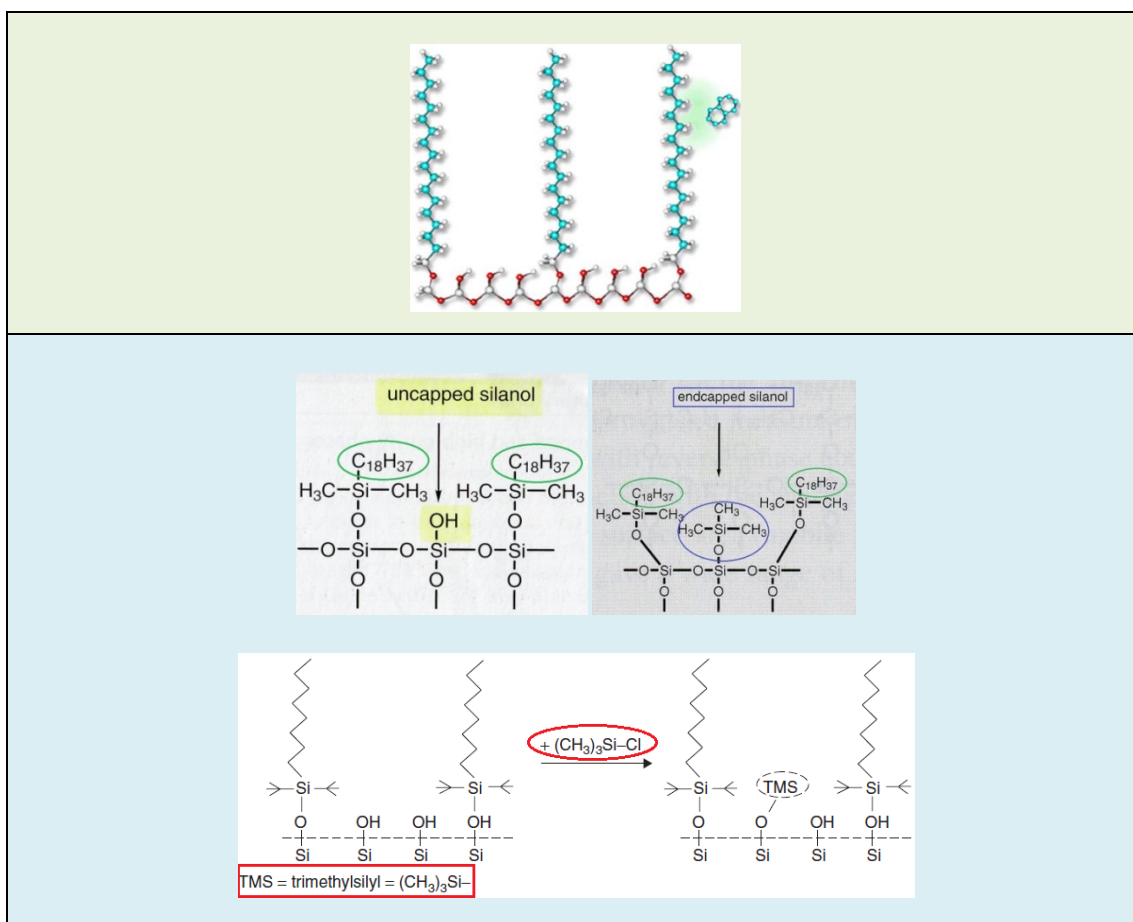
Με άλλα λόγια, **κάποιοι αναλύτες αντί να «βυθισθούν» στις συνδεδεμένες φάσεις, θα προσροφηθούν μη αντιστρεπτά σε αυτές.** Οι δευτερογενείς αυτές αλληλεπιδράσεις είναι γενικά γνωστές ως **σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις**. Για παράδειγμα, πολλές αμίνες προσροφώνται ισχυρά στις «ακάλυπτες» ομάδες -OH και ο χρόνος κατακράτησής τους (t_R) αυξάνεται σημαντικά. Όπως γνωρίζουμε, όσο πιο πολύ καθυστερεί η έκλυση μιας ουσίας από τη στήλη, τόσο περισσότερο μεγαλώνει το εύρος και η ασυμμετρία της κορυφής της.

Για την ελάττωση του παραπάνω φαινομένου (base deactivation of free silanols), συχνά πραγματοποιείται μια **επιπλέον αντίδραση** (παραγωγοποίηση) στα υλικά πλήρωσης τα οποία κατά τη παραγωγή τους έχουν βασιστεί σε επιστρώσεις σιλοξανίων. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως **ακροκάλυψη (end-capping)**. Το πιο γνωστό αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται είναι το χλωροτριμεθυλοσιλάνιο (TMS), ένα μικρό, δραστικό και ευκίνητο σιλάνιο (**silylating reagent**) το οποίο λόγω του μικρότερου μεγέθους του δεσμεύει πολλές από τις σιλανολικές ομάδες που δεν αντέδρασαν (unreacted/uncapped silanols) ([Σχήμα 9](#)). Έτσι, τα σχετικά με τη συγκράτηση μεγέθη (t_R , k) επηρεάζονται μόνο από τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις των αναλυτών με τις δύο φάσεις. Τα τελευταία χρόνια, είναι εμπορικά διαθέσιμες διάφορες επικαλυμμένες φάσεις υψηλής καθαρότητας (σχεδόν πλήρως επικαλυμμένες φάσεις) με χαμηλό περιεχόμενο μετάλλων (τα μεταλλικά ιόντα είναι προσμίξεις οι οποίες μειώνουν το βαθμό καθαρότητας και αυξάνουν την οξύτητα της πηκτής, αφαιρώντας e^- δια της έλξης από το άτομο του οξυγόνου -έτσι δυσχεραίνεται η επαρκής της επίστρωση (coating) με σιλάνια). Πλέον, επιτυγχάνεται η ανάλυση ακόμα και ισχυρά βασικών αναλυτών οι οποίοι στο παρελθόν έτειναν να εμφανίζουν κορυφές με «ουρά».

Στην πράξη, η διαδικασία end-capping μειώνει τη συγκέντρωση των μη επικαλυμμένων σιλανολών (unreacted silanols) σε μέτριο βαθμό. Το ποσοστό των δεσμευμένων σιλανολών (reacted silanols) αυξάνεται κατά περίπου 20-30 %. Αυτό σημαίνει ότι οι ανεπιθύμητες αντιδράσεις με τις πολικές ομάδες των αναλυτών (silanol-solutes interactions) δεν εξαλείφονται πλήρως. Επίσης, οι υποκαταστάτες R των μικρών end-capping σιλανίων (TMS, DMS) είναι ευπαθείς στην υδρόλυση σε χαμηλές τιμές pH και αυτό δύναται να μεταβάλλει τη κατακράτηση και την εκλεκτικότητα. Γενικότερα, οι end-capped στατικές φάσεις είναι πιο σταθερές σε ενδιάμεσα και υψηλότερα pH.

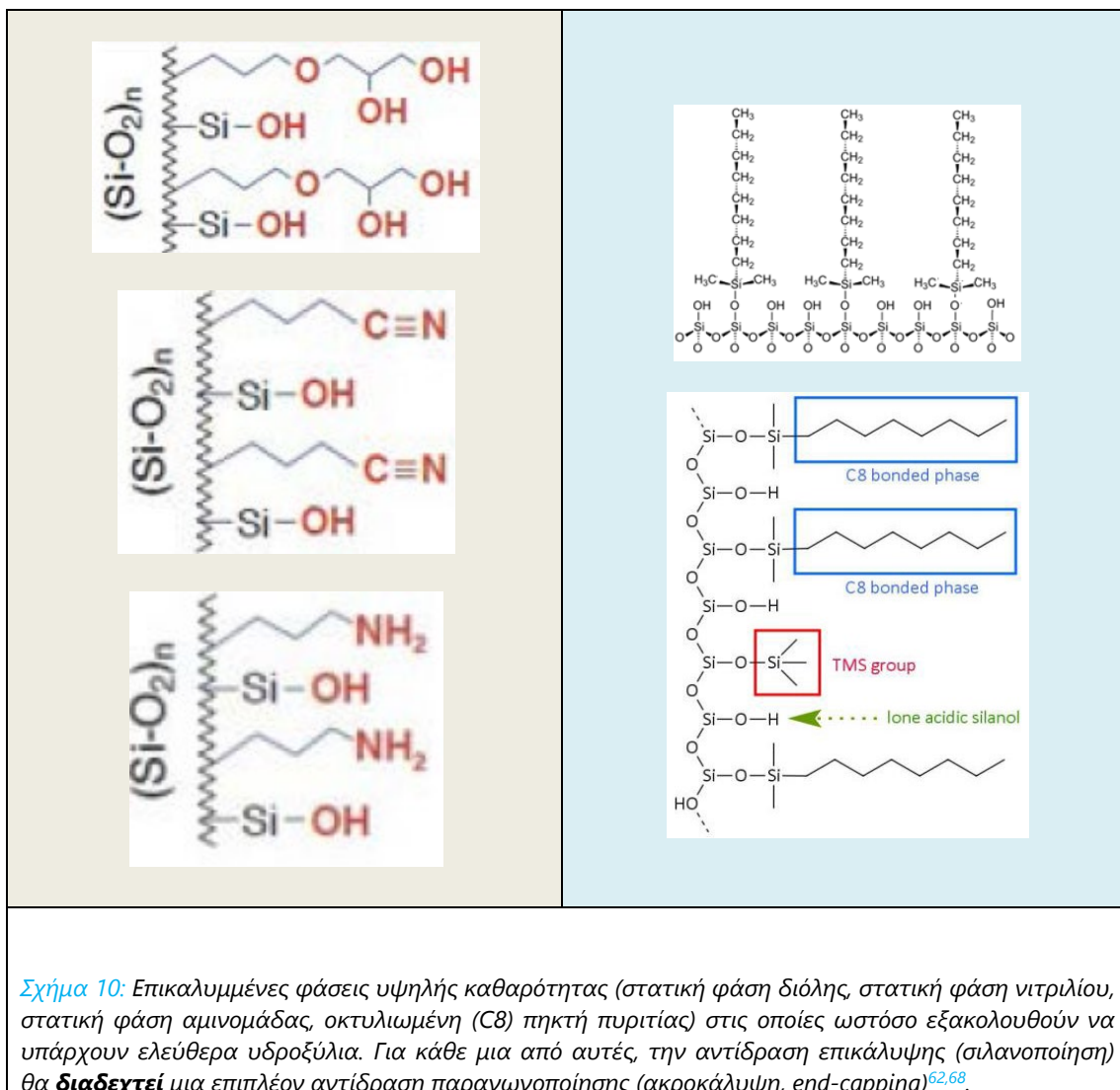
Φυσικά, επειδή δεν είναι πάντα δυνατή η αγορά «ακροκαλυμμένων» (end-capped) φάσεων υψηλής καθαρότητας, τα πρωτόκολλα των διαχωρισμών συχνά περιλαμβάνουν τη χρήση ουσιών που δρουν ως απενεργοποιητές.

Έτσι, προστίθενται στη κινητή φάση ενώσεις (π.χ. αμίνες) οι οποίες μπορούν να **επιδρούν** επί των ελεύθερων -OH και να **συναγωνίζονται** την ισχυρή και ίσως μη αντιστρεπτή δέσμευση (προσρόφηση) των αναλυτών. Αυτό μειώνει τη τιμή του παράγοντα k και συνεισφέρει σημαντικά στη λήψη οξειών και συμμετρικών κορυφών. Οι πιο γνωστοί από τους απενεργοποιητές είναι συγκεκριμένες βάσεις (**sacrificial bases**) οι οποίες προστίθενται σε μικρές αλλά ικανοποιητικές ποσότητες, ώστε να διασφαλιστεί η **απενεργοποίηση (deactivation)** της βασισμένης στη σίλικα επιφάνειας κάθε χρονική στιγμή (βλ. παράγραφο 3.3.3).



Σχήμα 9: Επάνω: Ο μηχανισμός συγκράτησης των αναλυτών σε μια στατική φάση πηκτής πυριτίας C18 (ODS-coated silica gel). Κατά την εξισορρόπηση της στήλης, οι μακριές αλυσίδες των υδρογονανθράκων ευθυγραμμίζονται παράλληλα η μία προς την άλλη και κάθετα προς την επιφάνεια την οποία συγκροτούν τα σωματίδια της πηκτής πυριτίας (δομή ψήκτρας). Μετά την εισαγωγή του δείγματος τα μόρια των αναλυτών «βυθίζονται» μέσα στις χημικά συζευγμένες λιπόφιλες αλυσίδες (υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις). Το φαινόμενο είναι αντιστρεπτό και οι αναλύτες «αποβυθίζονται» κατά την έκπλυση της στατικής φάσης με κινητή φάση ίδιας ή ελαφρώς τροποποιημένης σύστασης⁶². **Κάτω:** Απενεργοποίηση (deactivation) μιας επιφάνειας πηκτής πυριτίας. Τυχόν ελεύθερα υδροξύλια ευθύνονται για τις **σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις** με τις πολικές ομάδες αναλυτών και την πρόκληση tailing στις κορυφές αυτών. Για την άρση του φαινομένου, πραγματοποιούνται **επιπλέον** αντιδράσεις επικάλυψης (end-capping) με μικρά σιλάνια (τριμέθυλοχλωροσιλάνιο ή διμέθυλοδιχλωροσιλάνιο)^{61,63}.

Η εμπορική διάθεση αρχικά επικαλυμμένων και μετέπειτα «ακροκαλυμμένων» φάσεων (στηλών) υψηλής καθαρότητας (end-capped high-purity phases), δεν περιορίζεται μόνο στις στήλες οκταδεκυλιωμένης σίλικα. Για την επίτευξη των εξαιρετικά απαιτητικών αναλύσεων έχουν αναπτυχθεί στήλες με ποικιλία ιδιοτήτων (ως προς το σιλάνιο επίστρωσης) τόσο για τη NP-HPLC όσο και για τη RP-HPLC. Για κάθε μια από αυτές (Σχήμα 10), την αντίδραση επικάλυψης (σιλανοποίηση) ακολουθεί μια επιπλέον αντίδραση παραγωγοποίησης, δηλαδή η προαναφερθείσα ακροκάλυψη (end-capping).



2.4.2.3 Διαλύτες (κινητές φάσεις) στη χρωματογραφία κατανομής

Η επιλογή ενός διαλύτη δε βασίζεται στο είδος του μηχανισμού κατακράτησης αλλά στη διαφορά της πολικότητας μεταξύ των δύο φάσεων. Η τελευταία υποδεικνύει αν πρόκειται για RP-HPLC ή για NP-HPLC. Η χημική δομή

των μορίων ενός διαλύτη καθορίζει και τις ιδιότητές του, και αυτές με τη σειρά τους παίζουν ρόλο στην ευκολία (ταχύτητα) με την οποία ο διαλύτης αυτός μπορεί να εκλουσει τα συστατικά που «βυθίστηκαν» στις μακριές αλυσίδες των στατικών φάσεων. Όπως γνωρίζουμε, η εκλουστική ισχύς (ϵ^0) είναι ένα μέγεθος που μεταβάλλεται με την ανάμειξη διαλυτών, ενώ χάρη στην ανάμειξη δύο ή περισσότερων διαλυτών μπορούμε να πετύχουμε μια συγκεκριμένη τιμή πολικότητας για μία κινητή φάση και έτσι να καθορίσουμε την εκλουστική ισχύ αυτής.

Κατά το στάδιο της ανάπτυξης μιας μεθόδου (method development) μπορούμε να βελτιώσουμε την εκλεκτικότητα του χρωματογραφικού συστήματος, εξετάζοντας τη χρήση και το συνδυασμό διαφορετικών διαλυτών (εκτενέστερη ανάλυση γίνεται στο εδάφιο 3.7.2.2). Το ποσοστό κάθε διαλύτη θα πρέπει να είναι αυστηρά καθορισμένο ώστε η πολικότητα της κινητής φάσης να διατηρείται σταθερή (οπότε να διατηρούνται σταθεροί και οι συντελεστές k) αλλά ταυτόχρονα να μπορεί να βελτιωθεί η εκλουστική ισχύς της κινητής φάσης. Έτσι, αυξάνεται η εκλεκτικότητα του συστήματος και επομένως ο διαχωρισμός γίνεται πιο ικανοποιητικός. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τη γνωστή μας σχέση

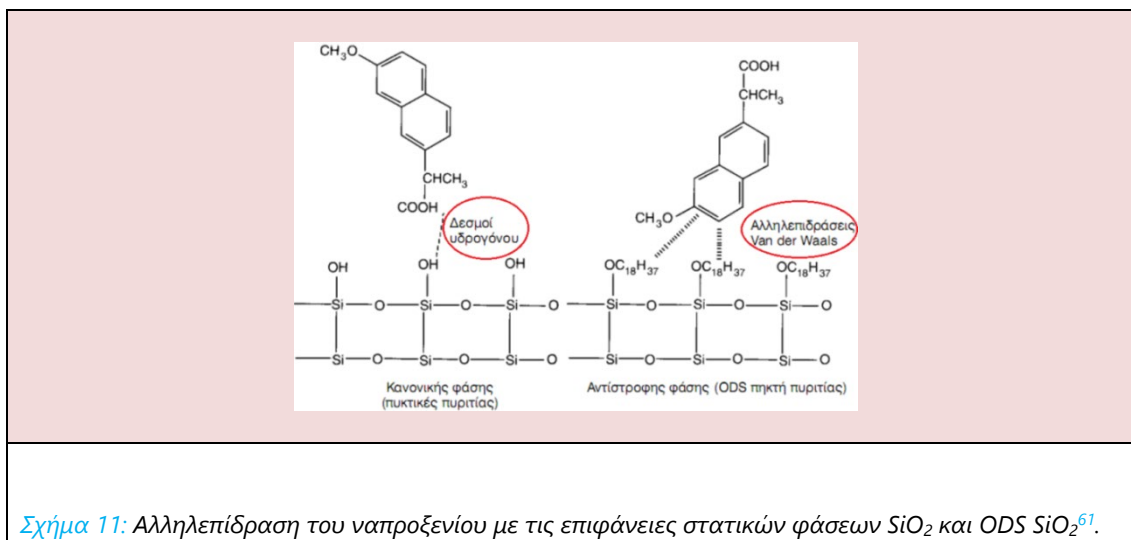
$$P_{ολικό} = P_x * \Phi_x + P_y * \Phi_y \quad (1)$$

, όπου Φ το κλάσμα (%) ενός διαλύτη στο μίγμα και $P_{ολικό}$ η τιμή της πολικότητας της κινητής φάσης η οποία συνίσταται από δύο διαλύτες x, y .

Γενικότερα, σε ό,τι αφορά τη συγκράτηση και εν συνεχεία την έκλυση ενός αναλύτη, πρέπει πάντα να αναλογιζόμαστε ότι η χημική δομή των αναλυτών υποδεικνύει τα διαφορετικά είδη αλληλεπιδράσεων στα οποία θα στηριχτεί η συγκράτησή τους, καθώς και το βαθμό συνεισφοράς κάθε δεσμού στη συνολική συγκράτηση, ανά περίπτωση ενός συγκεκριμένου μορίου. Αυτό σημαίνει ότι το φαινόμενο δεν είναι μονοδιάστατο και υπάρχει πιθανότητα να έχουμε συνδυασμό δεσμών όπως ΔΗ ή π-π αλληλεπιδράσεις ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις κλπ. Φυσικά, καθοριστικό ρόλο στην έκταση της συνεισφοράς κάθε δεσμού παίζει το υπόστρωμα των αλληλεπιδράσεων (Σχήμα 11), δηλαδή η στατική φάση (στήλη) που έχουμε επιλέξει για τη διεκπεραίωση της ανάλυσης (βλ. εδάφιο 2.4.2.2).

Όταν έχουμε πολικές στατικές φάσεις (π.χ. πηκτή πυριτίας), τότε όσο πιο πολική είναι η κινητή φάση τόσο περισσότερο επιδρά επί του πληρωτικού υλικού και παραλαμβάνει τους αναλύτες. Αυτός είναι ο λόγος που το H_2O αναφέρεται ως ισχυρός διαλύτης στη χρωματογραφία προσρόφησης αλλά και στη χρωματογραφία κατανομής κανονικής φάσης. Όταν έχουμε λιγότερο πολικές στατικές φάσεις (π.χ. πηκτή πυριτίας ODS ή C8), τότε όσο λιγότερη πολική είναι η κινητή φάση τόσο περισσότερο επιδρά επί των υδρόφοβων αλκυλομάδων και

παραλαμβάνει τους αναλύτες. Αυτός είναι ο λόγος που η MeOH, το ACN και ακόμη περισσότερο το THF αναφέρονται ως ισχυροί διαλύτες στη χρωματογραφία χρωματογραφία κατανομής αντίστροφης φάσης.



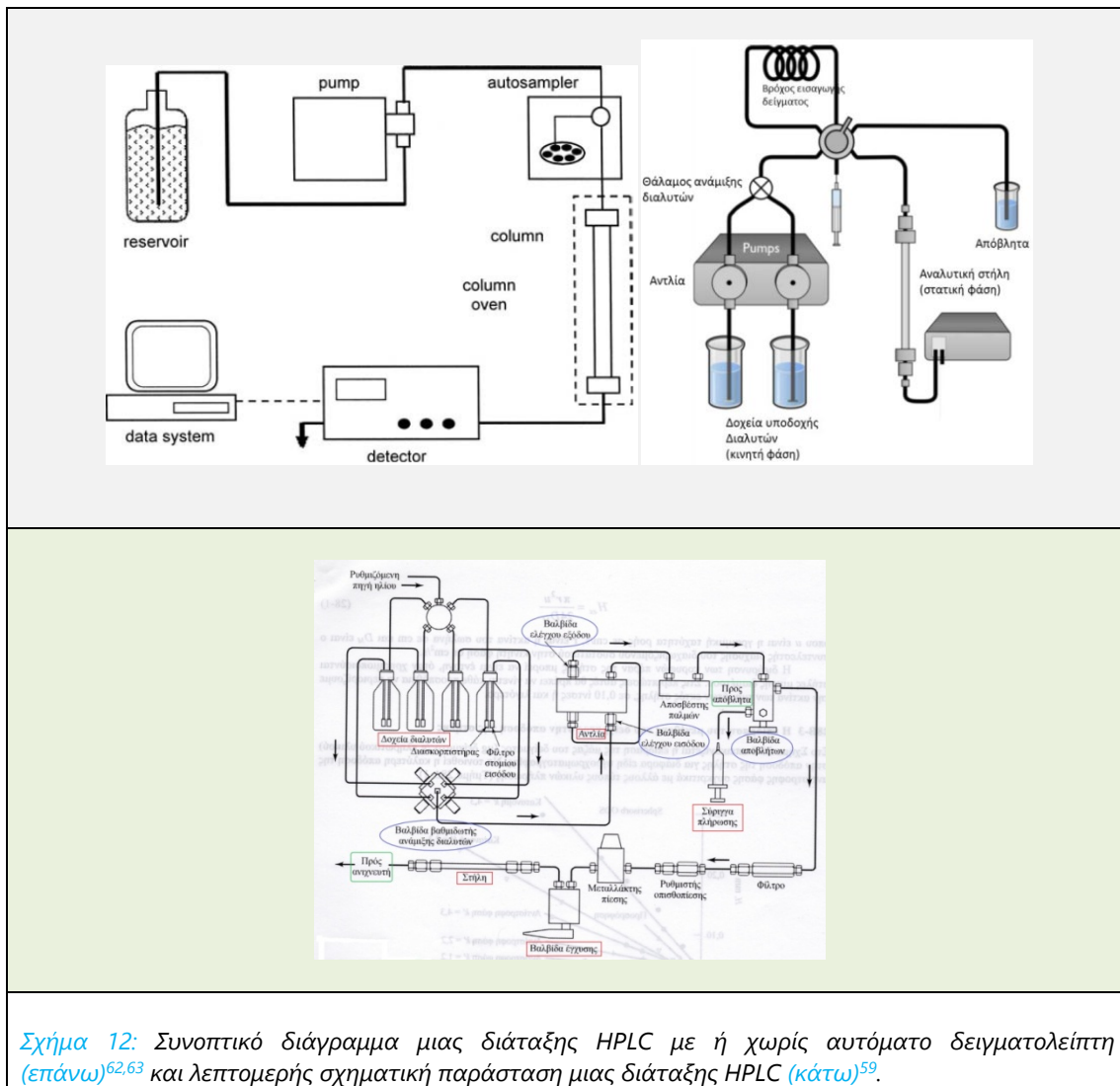
2.5 Οργανολογία HPLC

Τα **διακριτά μέρη (modules)** μιας συσκευής HPLC, στο σύνολό τους συνιστούν την οργανολογία ενός χρωματογραφικού συστήματος. Κατά τις τελευταίες δεκαετίες, ο εξοπλισμός των συστημάτων HPLC έχει φτάσει σε υψηλά επίπεδα τεχνολογικής αρτιότητας και έτσι δε παρατηρούνται πλέον ριζικές αλλαγές στο σχεδιασμό ή στις ιδιότητες των πειραματικών διατάξεων. Φυσικά, η εμπορική διάθεση κάθε νέου μοντέλου συνοδεύεται από μικρές αλλαγές που βελτιώνουν ακόμη περισσότερο τα επιμέρους χαρακτηριστικά του.

Συνοπτικά, μια διάταξη HPLC αποτελείται από το σύστημα παροχής της κινητής φάσης (περιέκτες διαλυτών, θάλαμος ανάμιξης διαλυτών, απαερωτές κενού, αντλίες), το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, τη στατική φάση (η χρωματογραφική στήλη και ο φούρνος θερμοστάτησής της), το σύστημα ανίχνευσης, τη δεξαμενή αποβλήτων και τέλος τη μονάδα καταγραφής, επεξεργασίας και παρουσίασης των πειραματικών δεδομένων (data system) (Σχήμα 12). Το τελευταίο μέρος συγκροτεί ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής ο οποίος είναι εφοδιασμένος με κατάλληλα λογισμικά (system controllers) που ελέγχουν το χρωματογραφικό σύστημα γενικότερα (έλεγχος αντλίας, έλεγχος δειγματολήπτη, ρυθμίσεις ανιχνευτή, αποθήκευση δεδομένων). Στα σύγχρονα συστήματα HPLC, πολλές λειτουργίες που για χρόνια επιτελούνταν χειροκίνητα πλέον ελέγχονται μέσω υπολογιστή.

Ένα ολοκληρωμένο χρωματογραφικό σύστημα HPLC λειτουργεί είτε συγχρονίζοντας σε ταυτόχρονη λειτουργία τα επιμέρους τμήματά του (individual

components-separate modules) είτε αποκτώντας από έναν προμηθευτή μία ενιαία διάταξη (integrated system). Στη πρώτη περίπτωση (modular system) και επειδή ο χώρος σε έναν εργαστηριακό πάγκο είναι πάντοτε πολύτιμος, τα ξεχωριστά μέρη (π.χ. ένας ανιχνευτής, ένας εξωτερικός κλίβανος που φέρει τη στήλη) είναι γενικά σχεδιασμένα ώστε να καταλαμβάνουν μικρό όγκο.



2.5.1 Αναλυτική στήλη χρωματογραφίας και φούρνος θερμοστάτησης^{59-63,68}

Οι κύριες παράμετροι που χαρακτηρίζουν μια στήλη είναι τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της (μήκος, εσωτερική διάμετρος, διάμετρος σωματιδίων), τα οποία ανήκουν στους **μηχανικούς παράγοντες**. Οι τιμές των παραμέτρων αυτών επηρεάζουν άμεσα την αποδοτικότητα (N) της στήλης και δύνανται να διαφέρουν ανάλογα με την τάξη της ουσίας που μας ενδιαφέρει να αναλύσουμε. Το είδος της στατικής φάσης ανήκει στους **χημικούς παράγοντες** και επηρεάζει τη συγκράτηση (k), την εκλεκτικότητα (α) και το βαθμό διαχωρισμού (R_s).

Οι στατικές φάσεις είναι ακινητοποιημένες (περιέχονται) ως πληρωτικά υλικά σε στενές σωληνοειδείς (κυλινδρικές) στήλες κατασκευασμένες από αδρανή υλικά όπως ειδικά μέταλλα ή ανοξείδωτο χάλυβα (stainless steel). Οι διαστάσεις μιας στήλης δίνονται υπό τη μορφή (εσωτερική διάμετρος * μήκος L). Το μήκος των στηλών κυμαίνεται μεταξύ **3-25 cm (30-250 mm)**, ενώ η εσωτερική τους διάμετρος κυμαίνεται μεταξύ **2-10 mm**. Οι στήλες **4,6 * 250 mm** είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες.

Ένα ακόμη κρίσιμο και αυστηρά καθοριζόμενο χαρακτηριστικό των στηλών είναι το **μέγεθος (διάμετρος)** των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης αλλά και το **μέγεθος (διάμετρος)**, δηλαδή των **εύρος** των πόρων των σωματιδίων αυτών. Το οξείδιο του πυριτίου (SiO₂) αποτελεί το πιο γνωστό πληρωτικό υλικό και χρησιμοποιείται είτε αυτούσιο είτε χημικά τροποποιημένο.

- Τα σφαιρικά σωματίδια του SiO₂ συνήθως έχουν μέγεθος (διάμετρο) κυμαινόμενο μεταξύ **3** έως **5 μm**. Τα τελευταία χρόνια έχουν παραχθεί σωματίδια της τάξεως ακόμα και των **1,5 μm**, στα πλαίσια των εφαρμογών της UPLC. Γενικότερα, όσο μεγαλύτερη πίεση εφαρμόζεται σε ένα χρωματογραφικό σύστημα (στη UPLC φτάνει τα 15.000-17.000 psi) τόσο πιο μικρά, σφαιρικά και μεταξύ τους ισομεγέθη σωματίδια απαιτούνται για την εδραίωση μιας **μηχανικής σταθερότητας** και την επίτευξη ικανοποιητικών και επαναλήψιμων διαχωρισμών (βλ. αναλυτικά εδάφιο 2.5.1.3).
- Το μέγεθος (άνοιγμα) των πόρων των σωματιδίων SiO₂ κυμαίνεται γενικά μεταξύ **100-1000 Å**. Για το διαχωρισμό μικρών μορίων περισσότερο κοινή είναι διάμετρος πόρων 100 Å (βλ. αναλυτικά εδάφιο 2.5.1.3).

Σε ό,τι αφορά τους **χημικούς παράγοντες** και ανάλογα με το είδος (φύση) και τον τρόπο παρασκευής της στατικής φάσης, για κάθε στήλη καθορίζονται αυστηρά και δηλώνονται πάντοτε οι εξής προδιαγραφές:

- Το διάστημα των τιμών του **pH** και της **θερμοκρασίας** (operating range/upper pH or T limit) όπου αυτή λειτουργεί αποτελεσματικά χωρίς πρόκληση φθοράς του πληρωτικού υλικού. Σε χαμηλές τιμές pH προκαλείται **όξινη υδρόλυση** του αιθερικού πυριτικού δεσμού (silyl ether linkage) ανάμεσα στη σίλικα και στη συζευγμένη στατική φάση. Σε υψηλές τιμές pH προκαλείται **βασική υδρόλυση** της επιφάνειας της σίλικα αυτής καθ' εαυτής (silica dissolution). Τα παραγόμενα λεπτά τμήματα (sub-particles) δύναται να φράξουν τόσο τους πόρους των σωματιδίων όσο και το στόμιο εξόδου της στήλης. Η πρώτη επίπτωση προκαλεί ατελείς διαχωρισμούς, ενώ η δεύτερη επίπτωση προκαλεί υπερβολική πίεση και καταστροφή της πειραματικής διάταξης HPLC. Σχετικά με την αυξημένη θερμοκρασία, πέραν της πιθανής επίδρασής της στη δομική ακεραιότητα των αναλυτών (ερευνάται στο στάδιο method development), αυτή

δύναται επίσης να προκαλέσει **βασική υδρόλυση** της σίλικα και **όξινη υδρόλυση** της χημικά τροποποιημένης σίλικα.

- Η μέγιστη πίεση στην οποία αυτή μπορεί να υποβληθεί χωρίς να προκληθούν αλλαγές στο ύψος (H) και στον αριθμό (N) των θεωρητικών πλακών για ένα διαχωρισμό, αλλά και πιθανή καταστροφή της.

Ακόμη, σχετικά με τη θερμοκρασία μιας ανάλυσης και πέρα από το κίνδυνο καταστροφής της στήλης τον οποίο προαναφέραμε, γνωρίζουμε ότι η πρώτη επηρεάζει σημαντικά το χρόνο t_R , την εκλεκτικότητα και την επαναληψιμότητα ενός διαχωρισμού (βλ. ενότητα 3.5) Γι' αυτό το λόγο οι στήλες τοποθετούνται εντός ειδικών κλιβάνων (column ovens) όπου και θερμοστατούνται με ακρίβεια. Επίσης, για τον ακριβή έλεγχο της θερμοκρασίας, οι στήλες μπορεί να συνδέονται με μανδύες ύδατος τροφοδοτούμενους από υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας.

Τα σωματίδια των πληρωτικών υλικών της HPLC μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τα διαφορετικά είδη διαμορφώσεων (configurations) με τα οποία εμφανίζονται, καθώς και με βάση το υλικό κατασκευής τους.

2.5.1.1 Ταξινόμηση σωματιδίων με βάση το **είδος** της διαμόρφωσης τους

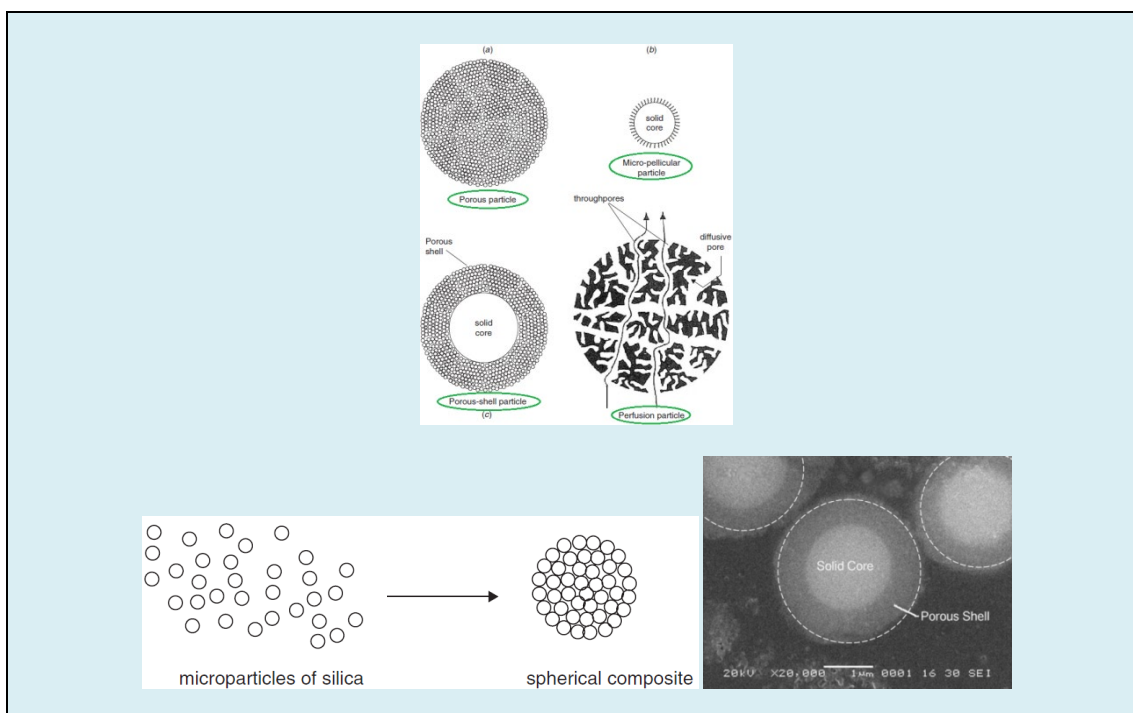
Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα ([Σχήμα 13](#)), διάφορες διαμορφώσεις σωματιδίων (**particle configurations**) είναι διαθέσιμες για μια στατική φάση HPLC. Τα πλήρως πορώδη σωματίδια σίλικα (**totally porous silica particles**) είναι τα πιο κοινά και ευρέως χρησιμοποιούμενα. Αυτό συμβαίνει διότι χαρακτηρίζονται από εντονότερη συγκράτηση (επιτρέποντας την εισαγωγή δειγμάτων μεγάλου μοριακού βάρους) και είναι κατάλληλα για ποικιλία επιλογών (σχετικά με το είδος της στατικής φάσης, τις διαστάσεις της στήλης, το μέγεθος των σωματιδίων και το εύρος των πόρων των σωματιδίων). Συνήθως έχουν διάμετρο 1,5-5 μm και παράγονται από συσσωμάτωση πολύ μικρότερων σφαιρικών σωματιδίων.

Τα υμενοειδή σωματίδια (**pellicular particles**) συνίστανται από συμπαγείς σφαίρες, κατασκευασμένες από SiO_2 ή πολυμερείς, καλυμμένες με μια πολύ λεπτή επιφανειακή στρώση στατικής φάσης. Έχουν μέγεθος (διάμετρο) 1,5-2,5 μm και χαρακτηρίζονται από μεγάλες τιμές N και υψηλή διαχωριστική ικανότητα (R_s) για αναλύσεις μακρομορίων (π.χ. μεγάλα βιομόρια), λόγω της μικρής συνεισφοράς του όρου C (βλ. εξίσωση Van Deemter) στη διεύρυνση των ζωνών. Συνδέονται με μικρές τιμές για το εμβαδό ειδικής επιφάνειας (και επομένως μειωμένη συγκράτηση των αναλυτών) και γι' αυτό το λόγο δε προτιμώνται σε αναλύσεις δειγμάτων μικρού μοριακού βάρους. Χρησιμοποιούνται με μικρούς όγκους δείγματος και ανιχνευτές υψηλής ευαισθησίας. Προτείνονται για αναλύσεις κύριων συστατικών και όχι προσμίξεων.

Τα επιφανειακώς πορώδη σωματίδια (**superficially porous particles**) έχουν

συμπαγή πυρήνα με πορώδες εξωτερικό κέλυφος. Συναντώνται επίσης με τις ονομασίες σωματίδια συντηγμένου πυρήνα (fused-core particles) και πορώδη κελυφοειδή σωματίδια (porous shell particles). Έχουν μέγεθος (διάμετρο) 2-5 μm με πάχος 0,25-0,5 μm για τα πορώδη κέλυφη. Λόγω των μεγάλων τιμών για το εμβαδό ειδικής επιφάνειας (και επομένως αυξημένη συγκράτηση των αναλυτών) και των λεπτών πορώδων εξωτερικών κελυφών, επιτρέπουν την ανάλυση δειγμάτων μεγαλύτερου μοριακού βάρους και μεγαλύτερες τιμές N σε σύγκριση με τα πλήρως πορώδη σωματίδια.

Τα σωματίδια διάχυσης (perfusion particles) χαρακτηρίζονται από πολύ μεγάλους πόρους (400-800 nm = 4.000-8.000 Å) οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι σε ένα δίκτυο μικρότερων πόρων (30-100 nm = 300-1.000 Å). Οι αντίστοιχες τιμές για τα σωματίδια των προηγούμενων κατηγοριών ήταν της τάξης των 8-30 nm = 80-300 Å). Λόγω της μειωμένης αντίστασης των αναλυτών στη μεταφορά μάζας (C_m) τα σωματίδια αυτά σχετίζονται με σχετικά μειωμένα εύρη ζωνών. Το σχετικά μεγάλο μέγεθός τους (~10 μm) δεν επιτρέπει την εφαρμογή ιδιαίτερα υψηλών πιέσεων. Προτιμούνται κυρίως για διαχωρισμούς προπαρασκευαστικής κλίμακας όπως οι αναλύσεις μακρομορίων π.χ. πρωτεϊνών.



Σχήμα: 13 *Επάνω:* Διαφορετικές **διαμορφώσεις** σωματιδίων (*particle configurations*) πληρωτικών υλικών HPLC⁶³ *Κάτω:* Αριστερά: **Συσσωμάτωση** (*aggregation*) μικροσωματιδίων για το σχηματισμό πλήρως πορώδων σωματιδίων (*totally porous particles*)⁶³ Δεξιά: Επιφανειακά πορώδες σωματίδιο (**superficially porous particle, Halo™**) με εύρος πόρων 9 nm. Τα σωματίδια αυτά, καθώς και τα υμενοειδή σωματίδια (**pellicular particles**), είναι ανθεκτικά σε πιέσεις έως και 15.000 psi λόγω του συμπαγούς πυρήνα τους⁶³ (*Courtesy of Advanced Material Technology*)

2.5.1.2 Ταξινόμηση σωματιδίων με βάση το υλικό κατασκευής τους

Η πηκτική πυριτίας (γέλη πυριτίου ή silica gel) είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο υλικό (support material) για τη παρασκευή σωματιδίων HPLC (**porous silica particles**). Το βασικό χαρακτηριστικό των σωματιδίων SiO₂ είναι η μηχανική αντοχή, η οποία καθιστά τις παραγόμενες στατικές φάσεις λειτουργικές για μεγάλες χρονικές περιόδους και κάτω από απαιτητικές συνθήκες. Επίσης, σε σύγκριση με στατικές φάσεις άλλων υλικών, πραγματοποιούνται διαχωρισμοί μεγάλης αποδοτικότητας (N). Είναι δυνατή η σύνθεση σφαιρικών σωματιδίων διαφορετικών μεγεθών π.χ. 1,5, 2,7, 3,5, 5 μm (Σχήμα 14 & 15), διαφορετικού εύρους πόρων (10, 30, 100 nm) (βλ. εδάφιο 2.5.1.3) και, όπως είδαμε αμέσως πιο πάνω, διαφορετικών διαμορφώσεων (Σχήμα 13).

Η σίλικα, όπως περιγράψαμε αναλυτικά στο εδάφιο 2.4.2.2, δεσμεύεται εύκολα με υποκαταστάτες που φέρουν διαφορετικές λειτουργικές ομάδες (C8, C18, phenyl, cyano κλπ) οι οποίες προσδίδουν στη στήλη διαφορετικές ιδιότητες ανά περίπτωση. Οι χημικά συνδεδεμένες φάσεις πυριτίας (stationary phases attached to SiO₂ support) είναι συμβατές με όλους τους οργανικούς διαλύτες και το νερό. Ακόμη, σε αντίθεση με τα πολυμερή σωματίδια, δεν συρρικνώνονται σε μια ενδεχόμενη αλλαγή στο ποσοστό ή στο είδος των διαλυτών (αναλύσεις βαθμιδωτής έκλυσης). Τα σωματίδια της σίλικα είναι κυρίως σφαιρικά διότι επιδεικνύουν ιδιαίτερη μηχανική αντοχή (mechanical strength) και επιτρέπουν την ομοιογενή πλήρωση της στήλης (βλ. εδάφιο 2.5.1.3). Τα μεγαλύτερα σωματίδια ακανόνιστου σχήματος χρησιμοποιούνται κυρίως σε προπαρασκευαστικούς διαχωρισμούς όπου οι απαιτήσεις κόστους και απόδοσης (N) είναι μειωμένες.

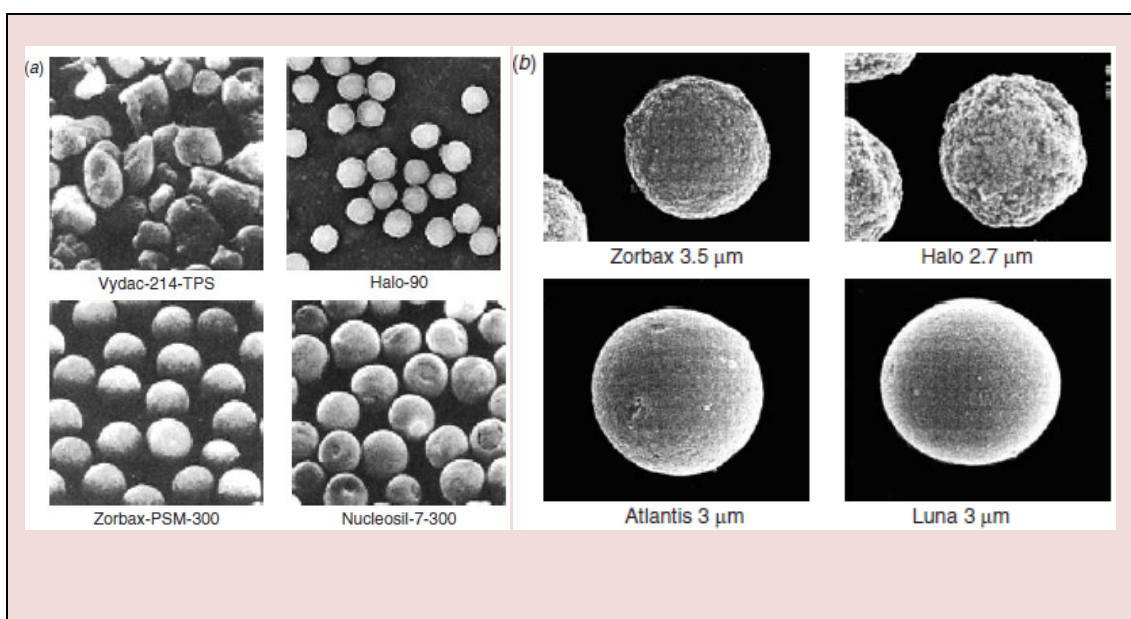
Όπως γνωρίζουμε, στα μειοκτήματα της σίλικα περιλαμβάνεται η αποσύνθεση σε ακραία pH και η εμφάνιση «ουρών» (tailing) των κορυφών σε διαχωρισμούς βασικών αναλυτών. Το πρόβλημα μειώνεται με χρήση γέλης πυριτίου υψηλής καθαρότητας (σίλικα τύπου B).

Πέραν της σίλικα, οι στατικές φάσεις μπορούν να συνίσταται από άλλα πολικά υλικά όπως η αλούμινα (**alumina**) (οξείδιο του αργιλίου, Al₂O₃) και η **μαγνησία** (οξείδιο του μαγνησίου, MgO₂). Επίσης, τα πορώδη πολυμερή σωματίδια (**porous polymeric particles**) χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη χρωματογραφία RP-HPLC, στη χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων και στη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Τα σωματίδια πολυστυρενίου είναι τα πιο γνωστά σωματίδια της κατηγορίας αυτής (cross-linked polystyrene particles). Όπως και στην περίπτωση της πυριτίας, είναι δυνατή η παραγωγή φάσεων με υποκαταστάτες διαφορετικών λειτουργικών ομάδων (C8, C18, phenyl, cyano κλπ) ή ιοντιζόμενων ομάδων (NH₂, NR³⁺, SO₃H) στην περίπτωση της χρωματογραφίας ανταλλαγής ιόντων. Ωστόσο, στην περίπτωση των πολυμερικών υλικών η εμπορικά διαθέσιμη γκάμα των υποκαταστατών είναι σημαντικά μικρότερη σε σύγκριση με τις στατικές φάσεις που βασίζονται στη σίλικα (silica-based packings vs polymer-based packings).

Το πλεονέκτημα των πολυμερών σωματιδίων είναι η απουσία περιορισμών στη τιμή του pH και η καταλληλότητα για ανάλυση ισχυρά βασικών ενώσεων χωρίς πρόκληση tailing (απουσία σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων). Χάρη στην αντοχή στο pH, είναι δυνατός ο καθαρισμός μιας στήλης από τις ισχυρά κατακρατούμενες προσμίξεις (μετά το πέρας ενός μεγάλου αριθμού αναλύσεων) με χρήση NaOH 0,1 M. Για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων (π.χ. πρωτεΐνες) χρησιμοποιούνται σωματίδια μεγάλου μεγέθους πόρων και αντίστροφα.

Το μειονέκτημα των πολυμερών σωματιδίων είναι η μειωμένη απόδοση στους διαχωρισμούς (N) σε σύγκριση με στήλες πυριτίας πληρωμένες με σωματίδια του ίδιου μεγέθους. Ακόμη, ένα δυνητικό πρόβλημα είναι η καταστροφή λόγω διόγκωσης (ή/και συστολής) των στατικών φάσεων με μια ενδεχόμενη αλλαγή στο ποσοστό ή στο είδος των διαλυτών, ειδικά όταν οι κινητές φάσεις είναι λιπόφιλες και όχι ισχυρά υδατικές. Επομένως, τα σωματίδια αυτού του είδους συνιστανται για αναλύσεις ισοκρατικής έκλουσης και όχι βαθμιδωτής έκλουσης.

Τέλος, οι **μονολιθικές στήλες** αποτελούν ένα ιδιαίτερο πεδίο ενδιαφέροντος από το 1990 και έπειτα. Πρόκειται για συμπαγείς, ανθεκτικούς κυλίνδρους που παράγονται με in situ πολυμερισμό και βασίζονται σε σίλικα ή σε πολυμερή ως πρώτη ύλη.



Σχήμα: 14 Οπτική απεικόνιση σωματιδίων σίλικα (**silica supports**) πληρωτικών υλικών RP-HPLC. Στη δεξιά εικόνα η μεγέθυνση είναι επταπλάσια της αριστερής⁶³.

2.5.1.3 Κριτήρια επιλογής στήλης για έναν χρωματογραφικό διαχωρισμό

Τα χαρακτηριστικά ενός πληρωτικού υλικού είναι αυτά που καθορίζουν την καταλληλότητά του (ή μη) για μια δεδομένη ανάλυση. Συνοπτικά, είναι τα εξής:

Μέγεθος (διάμετρος) των σωματιδίων (Particle size/Particle diameter), d_p :

Το μέγεθος των σωματιδίων αφορά τη **μέση διάμετρο** (average diameter) των σωματιδίων (π.χ. σωματίδια SiO_2) από τα οποία συντίθεται το πληρωτικό (column packing particles). Το μέγεθος αυτός συνήθως δηλώνεται μαζί με τις πληροφορίες διαστάσεων της στήλης, δηλαδή παρουσιάζεται με τη μορφή (εσωτερική διάμετρος στήλης * μήκος L στήλης * μέγεθος σωματιδίων). Για παράδειγμα, μια πολύ γνωστή κατηγορία στατικών φάσεων είναι οι στήλες **4, 6 mm * 250 mm * 5 μm** .

Κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων (Particle size distribution):

Το μέγεθος αυτό παρέχει μια **εκτίμηση της κατανομής του μεγέθους των σωματιδίων** τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για την πλήρωση της στήλης. Είναι επιθυμητό να έχουμε μια «στενή» κατανομή διότι αυτό οδηγεί σε ομοιογενή πλήρωση της στήλης (**homogeneous packing**) και εν τέλει σε επαναλήψιμους διαχωρισμούς. Για παράδειγμα, μια κατανομή της τάξεως του 10 %, δηλαδή $d_p \pm 10\%$, σημαίνει ότι το 90 % των σωματιδίων έχουν μέγεθος κυμαινόμενο μεταξύ 9-11 μm αν υποθέσουμε μια «μέση πλήρωση» (average d_p packing) της τάξεως των 10 μm . Όπως έχουμε αναφέρει, τα σωματίδια ενός πληρωτικού υλικού θέλουμε εκτός από μικρά, σφαιρικά, πορώδη και μηχανικά σκληρά να είναι επίσης μεταξύ τους **ισομεγέθη**.

Για την αξιολόγηση της ποιότητας ενός υλικού σχετικά με την ομοιογένειά του, συχνά παρατίθεται από τον κατασκευαστή ο λόγος D10/D90. Το κλάσμα αυτό χρησιμοποιείται σαν εργαλείο μιας σχετικής μέτρησης της κατανομής της διαμέτρου (μεγέθους) των σωματιδίων. Ο όρος D10 αναφέρεται στη διάμετρο στο 10 % της συνολικής κατανομής μεγέθους (total size distribution) ενώ ο όρος D90 αναφέρεται στο 90 % της συνολικής κατανομής μεγέθους. Όσο πιο κοντά τείνει στο μονάδα ο παραπάνω λόγος, τόσο πιο ομοιογενές θεωρείται το πληρωτικό υλικό.

Μέγεθος (διάμετρος) των πόρων (Pore size/Average Pore diameter) των σωματιδίων:

Η διάμετρος των πόρων συνδέεται ευθέως με τον υδροδυναμικό όγκο των μορίων του δείγματος. Το **εύρος των πόρων** εκφράζεται είτε σε nm είτε πιο συχνά σε Å (1 nm = 10 Å). Οι ευρείς πόροι επιτρέπουν την πρόσβαση μεγάλων μορίων στη στατική φάση (χημικά συζευγμένη φάση στην περίπτωση της RP-HPLC) και οδηγούν στη μέγιστη διαχωριστική ικανότητα. Για δείγματα μοριακού βάρους >2.000 Da επιλέγονται πόροι εύρους >300 Å ενώ για δείγματα μικρού μοριακού βάρους επιλέγονται πόροι εύρους <150 Å. Ένας πρακτικός κανόνας είναι ότι το

εύρος των πόρων πρέπει να είναι τουλάχιστον τριπλάσιο της υδροδυναμικής διαμέτρου του υπό ανάλυση μορίου.

Κατανομή του μεγέθους (εύρους) των πόρων των σωματιδίων (Pore size distribution/ Pore diameter distribution):

Κατ' αντιστοιχία με την κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων, το μέγεθος αυτό παρέχει μια **εκτίμηση της κατανομής του εύρους (άνοιγμα) των σωματιδίων** τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για την πλήρωση της στήλης. Και εδώ, μια ομοιογενής και «στενή» κατανομή οδηγεί σε επαναλήψιμους διαχωρισμούς.

Σχήμα των σωματιδίων (Particle shape):

Τα σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες ως προς τη μορφή τους: στα **σφαιρικά σωματίδια** και στα **σωματίδια ακανόνιστου σχήματος (Σχήμα 15)**. Συχνά τη συνολική διαδικασία παραγωγής και επεξεργασίας (milling) μιας επιφάνειας σίλικα ακολουθεί μια διαδικασία «κοσκινίσματος» (sieving), ώστε να δημιουργηθούν λεπτότερα κλάσματα και το υλικό να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις του μεγέθους και του εύρους της κατανομής του μεγέθους αυτού (βλ. πιο πάνω) των (requirements of particle size and particle size distribution). Αυτό είναι δυνατόν να οδηγήσει σε σωματίδια ακανόνιστου σχήματος. Τα σωματίδια αυτά χαρακτηρίζονται από πιο σύντομες και λιγότερο δαπανηρές παραγωγικές διαδικασίες, ωστόσο σχετίζονται με κατά πολύ μικρότερες τιμές αποδοτικότητας (pore efficiency) σε σχέση με τα σφαιρικά σωματίδια. Αυτό συμβαίνει διότι ο τρόπος με τον οποίο τα σωματίδια «**στοιβάζονται**» και «**πληρώνουν**» τη στήλη HPLC (packing) δε χαρακτηρίζεται από μεγάλη ομοιογένεια (**packing homogeneity**). Έτσι, αυξάνεται ο βαθμός συνεισφοράς των όρων Van Deemter A και C στη διεύρυνση κάθε ζώνης, δηλαδή αυξάνεται η έκταση της διεύρυνσης περιδίνησης (A) και η έκταση της διεύρυνσης μεταφοράς μάζας (διεύρυνση λόγω αντίστασης στη μεταφορά μάζας, C).

Χάρη στη σημερινή τεχνολογία παραγωγής στατικών φάσεων, η πυκνότητα της πλήρωσης των στηλών είναι μεγάλη (packing homogeneity) ενώ οι συνεχώς βελτιούμενες υγρές στατικές φάσεις έχουν τη μορφή εξαιρετικά λεπτών ομοιόμορφων υμένων. Οι δύο αυτές εξελίξεις περιορίζουν τη δημιουργία κοιλοτήτων μέσα στις οποίες ενδέχεται να λιμνάζει η κινητή φάση.

Εμβαδόν ειδικής επιφάνειας (Surface area):

Το εμβαδόν ειδικής επιφάνειας αναφέρεται στη **συνολική έκταση** της στερεής επιφάνειας της στατικής φάσης. Μετράται σε m^2/g και είναι **αντιστρόφως ανάλογο** του εύρους των πόρων. Όσο μικρότερο είναι, τόσο μικρότερη είναι η τιμή του παράγοντα χωρητικότητας k. Υπολογίζεται χάρη σε ευρέως αποδεκτές τεχνικές μέτρησης όπως η μέθοδος Brunauer-Emmett-Teller (BET). Αυτή υπολογίζει το εμβαδό μιας επιφάνειας στηριζόμενη στη φυσική

προσρόφηση N₂ ή Ar σε αυτή. Η έκταση της επιφάνειας δύναται να έχει επίδραση επάνω σε πολλές χρωματογραφικές παραμέτρους.

Γενικότερα, οι στήλες με στατικές φάσεις μεγάλης επιφάνειας (**high surface area columns**) χαρακτηρίζονται από εντονότερη συγκράτηση, χωρητικότητα και διαχωριστική ικανότητα. Από την άλλη, οι στατικές φάσεις μικρής επιφάνειας (**low surface area packings**) παρουσιάζουν πολύ μικρότερους χρόνους σταθεροποίησης και εξισορρόπησης της κινητής φάσης εντός της στατικής φάσης. Αυτό είναι πολύ σημαντικό στη χρωματογραφία βαθμιδωτής έκλυσης όπου επιθυμούμε μια ταχεία επαναφορά του συστήματος μετά τη μεταβολή του % ποσοστού κάθε διαλύτη.

Φορτίο άνθρακα (Carbon load):

Το φορτίο άνθρακα αναφέρεται στο **στοιχειακό φορτίο άνθρακα** που χαρακτηρίζει τη στατική φάση. Το φορτίο αυτό αποκτάται μετά τη χημική κατεργασία του πληρωτικού υλικού, καθώς η στατική φάση στη πρώιμη μορφή της (κατά τη παρασκευή μιας επιφάνειας SiO₂) δεν περιέχει άνθρακα (carbon free). Ωστόσο, τα σωματίδια υβριδικής τεχνολογίας (π.χ. BEH, XBridge, TriArt, Gemini), περιέχουν εγγενώς ένα μίγμα ανόργανης síλικα και οργανικών ομάδων και έτσι έχουν εξ ορισμού ένα μεγαλύτερο υπόβαθρο οργανικού περιεχομένου ακόμα και στην πρώιμη (ακατέργαστη) μορφή τους.

Το φορτίο άνθρακα εκφράζεται με το % ποσοστό σε άνθρακα (C) και όσο μεγαλύτερο είναι, τόσο ισχυρότερη είναι η συγκράτηση. Όπως είναι λογικό, οι στήλες C18 χαρακτηρίζονται πάντοτε από μεγαλύτερες τιμές φορτίου άνθρακα σε σχέση με τις υπόλοιπες στήλες οι οποίες φέρουν στατικές φάσεις από βραχύτερες υδροφobes αλυσίδες. Σε γενικές γραμμές, δε θα πρέπει να συγκρίνονται ως προς το φορτίο άνθρακα στήλες οι οποίες έχουν υποστεί διαφορετικές διαδικασίες ακροκάλυψης (end-capping). Ο λόγος είναι ότι το % ποσοστό σε C για τα διάφορα αντιδραστήρια (silylating reagents) ακροκάλυψης ποικίλει σημαντικά και έτσι η σύγκριση δεν είναι αντιπροσωπευτική.

Κάλυψη επιφάνειας (surface coverage) και Ακροκάλυψη (Endcapping):

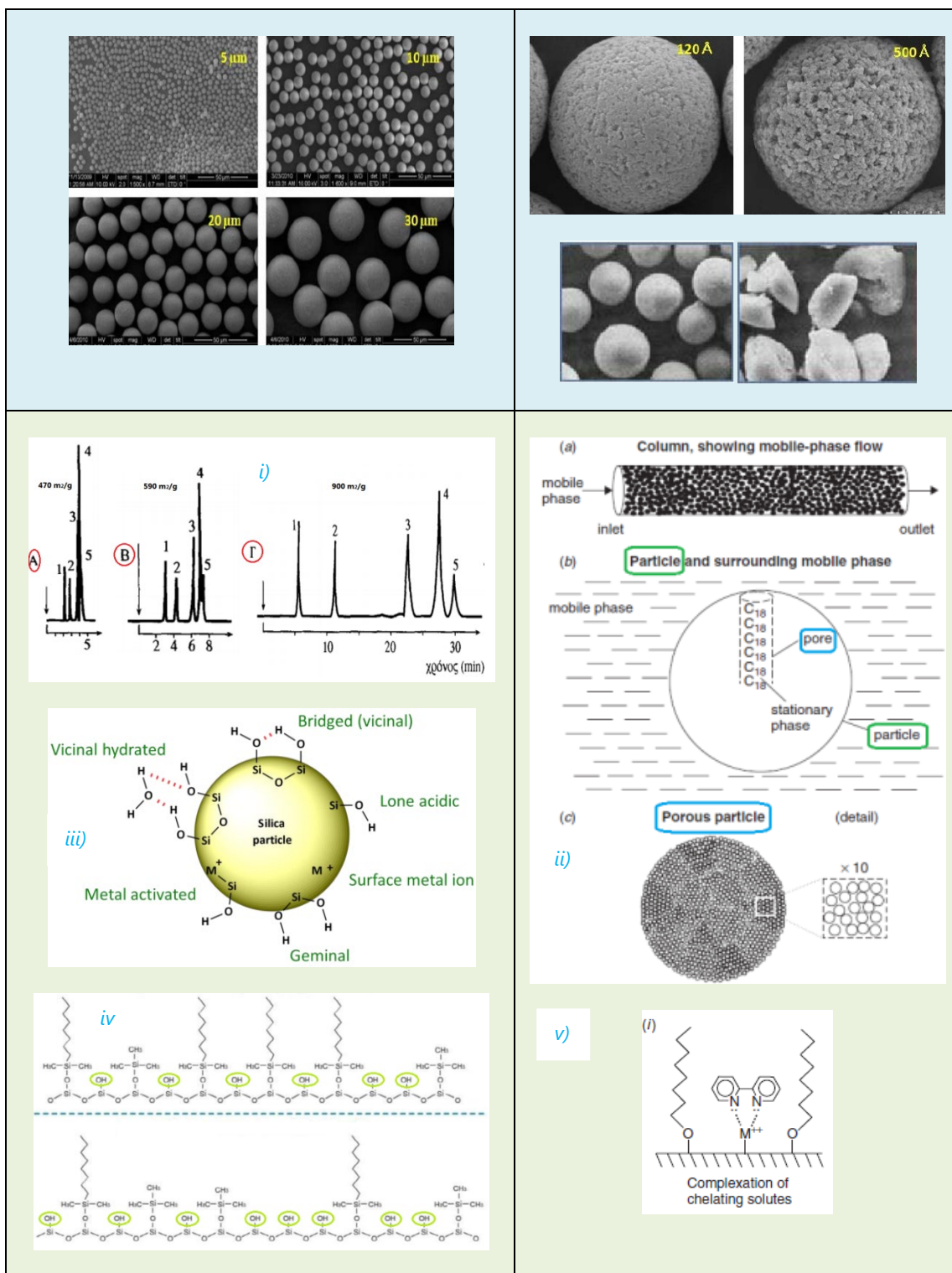
Η κάλυψη επιφάνειας παρέχει μια καλύτερη εικόνα της υδροφοβικότητας αλλά και της ικανότητας συγκράτησης των αναλυτών μιας στατικής φάσης. Αναφέρεται στη **συγκέντρωση στατικής φάσης ανά μονάδα επιφάνειας συζευγμένης στο υλικό στήριξης** και εκφράζεται σε $\mu\text{moles}/\text{m}^2$ (Σχήμα 15). Το φαινόμενο της **ατελούς επικάλυψης** των ομάδων σιλανόλης (Si-OH) αντιμετωπίζεται με αντιδράσεις παραγωγοποίησης με μικρότερα αντιδραστήρια (end-capping) και έχει περιγραφεί αναλυτικά στο εδάφιο 2.4.2.2 Οι κατασκευαστές παραθέτουν ποιοτικές πληροφορίες σχετικά με την ακροκάλυψη μιας στατικής φάσης (end-capped/non end-capped stationary phase). Ενίοτε, η διαδικασία της ακροκάλυψης πραγματοποιείται εις διπλούν (double end-capped stationary phase).

Τύπος σίλικα (silica type):

Τα υλικά στήριξης (supports) για την πλειονότητα των υλικών πλήρωσης παρασκευάζονται από άκαμπτη (rigid) πυριτία ή από σύνθεση που βασίζεται σε πυριτία. Τα σωματίδια της σίλικα και τα παραγόμενα πληρωτικά υλικά (packings) μιας στήλης κατηγοριοποιούνται ως **τύπου A** ή **τύπου B**, με βάση το βαθμό καθαρότητας, δηλαδή της **φύση** της επιφάνειας. Η καθαρότητα της σίλικα (purity of the silica support) επηρεάζει άμεσα την οξύτητά της. Στην επιφάνεια μιας ενυδατωμένης σίλικα παρατηρούμε κυρίως διαφορετικά είδη **ενεργών ομάδων** σιλανόλης οι οποίες δημιουργούν ένα «δικτυωτό πλέγμα». Η απόδοση μιας στήλης επηρεάζεται σημαντικά από την οξύτητα των ομάδων αυτών (silanol acidity effect). Οι «ελεύθερες σιλανόλες» (σιλανόλες χωρίς Δ.Η) είναι σχετικά πιο όξινες από τις υπόλοιπες και σχετίζονται με παράπλευρες αντιδράσεις (βλ. παράγραφο 3.3.3) και χαμηλές τιμές θεωρητικών πλακών, N (lone surface silanols) ([Σχήμα 15](#)).

Οι επιφάνειες τύπου A (αναφέρονται και ως I silica) είναι **μη** ομοιογενείς επιφάνειες **υψηλής** ενέργειας και **μεγάλης** πυκνότητας όξινων ομάδων Si-OH. Τα προβλήματα που προκαλούν είναι **1)** μη ικανοποιητική αλληλεπίδραση με τους πολικούς αναλύτες στην (σπάνια πλέον) περίπτωση της χρωματογραφίας προσρόφησης και **2)** δυσχεραίνουν την επίστρωση (coating) της επιφάνειας με σιλάνια και τη παρασκευή πλήρως επικαλυμμένων φάσεων στην (ως επί το πλείστον συναντώμενη) περίπτωση της χρωματογραφίας κατανομής. Για την παρασκευή επιφανειών τύπου B (αναφέρονται και ως II silica) οι κατασκευαστές πραγματοποιούν **πλήρη υδροξυλίωση** της σίλικα πριν τη χημική της κατεργασία με σιλάνια. Έτσι, ένα πολύ μεγάλο ποσοστό της επιφάνειας καθίσταται ομοιογενές και στη κατάσταση **χαμηλής** ενέργειας (geminal και vicinal δομές), όπου η πυκνότητα των όξινων ομάδων Si-OH έχει μειωθεί σημαντικά.

Επιπλέον, το όξινο αυτό βήμα της υδροξυλίωσης μειώνει σημαντικά τις μεταλλικές προσμίξεις σε επίπεδα κάτω των 3 ppm. Τα ιόντων συγκεκριμένων μετάλλων, ειδικά τα ιόντα Al^{3+} και Fe^{3+} , μειώνουν το βαθμό καθαρότητας και μπορούν να αυξήσουν την οξύτητα της πηκτής, αφαιρώντας e^- δια της έλξης από το άτομο του οξυγόνου καθώς και αντιδρώντας απευθείας με αναλύτες που μπορούν να σχηματίσουν χημικά σύμπλοκα ([Σχήμα 15](#)). Συνέπεια αυτής της **«μεταλλικής μόλυνσης»** μπορεί να είναι η έντονη ασυμμετρία καθώς και η φτωχή ανάκτηση μερικών αναλυτών του δείγματος. Η μεταλλική μόλυνση ενίοτε προκύπτει από τις διαδικασίες παρασκευής (milling) της σίλικα ωστόσο συνήθως είναι αποτέλεσμα της επαφής της σίλικα με τις λεπίδες «κοσκινίσματος» (sub-sieve sizing blades), ώστε να δημιουργηθούν λεπτότερα κλάσματα και το υλικό να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις του μεγέθους και του εύρους της κατανομής του μεγέθους αυτού. Τέλος, στην αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων των μετάλλων μπορεί να οδηγήσει η επαφή με μη απενεργοποιημένες μεταλλικές επιφάνειες (non-passivated stainless steel surfaces).

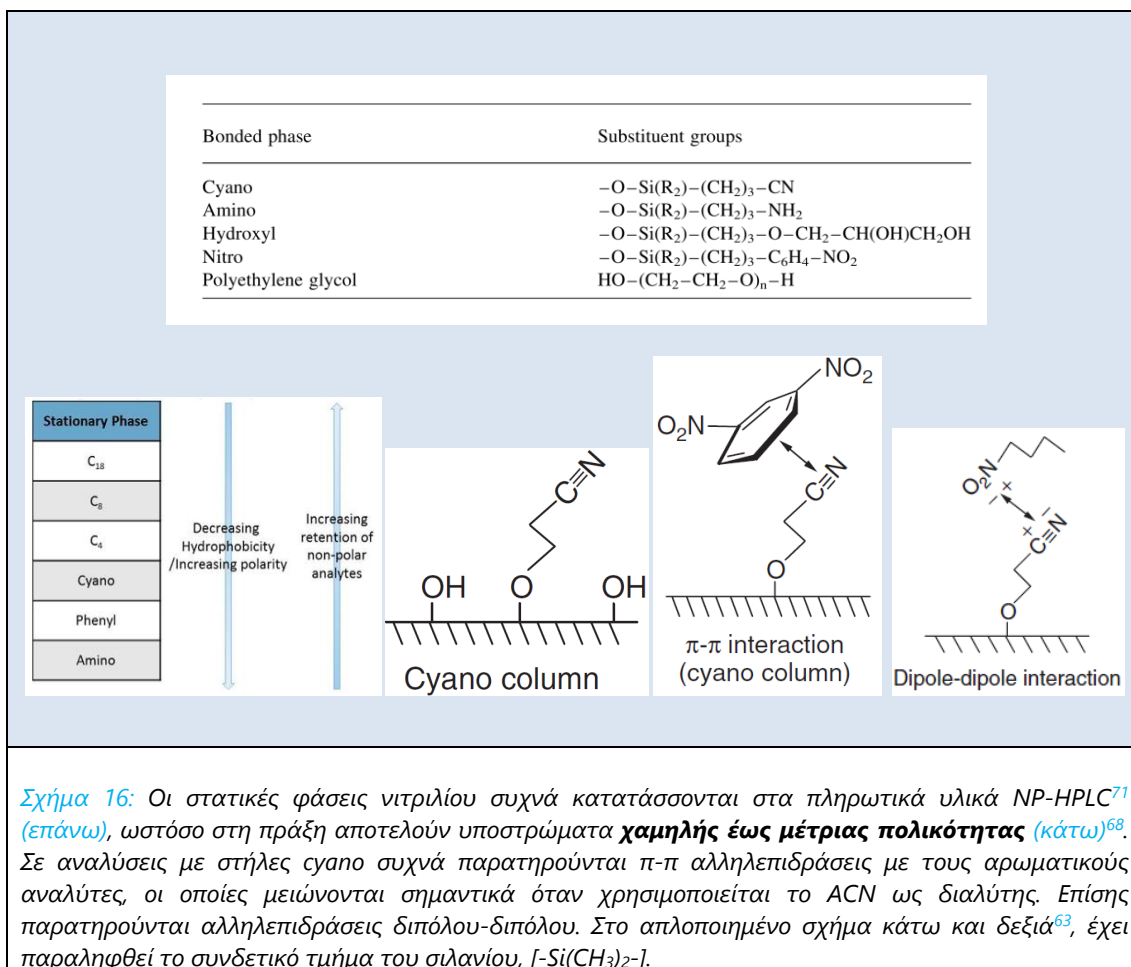


Σχήμα 15: Ιδιότητες των σωματιδίων (**φυσικά χαρακτηριστικά**) και των πληρωτικών υλικών γενικότερα (κριτήρια επιλογής μιας στήλης για ένα διαχωρισμό). **Επάνω:** σωματίδια SiO₂ διαφορετικού μεγέθους (διάμετρος σε μm), εύρους πόρων (Å)⁶² και σχήματος (σφαιρικό/ακανόνιστο)⁶⁸. **Κάτω:** *i*) επίδραση του **εμβαδού ειδικής επιφάνειας** πυριτίας στο διαχωρισμό 5 αναλυτών⁶² *ii*) πλήρωση (racking) μιας στήλης με **σφαιρικά σωματίδια** SiO₂ (εξασφάλιση **μηχανικής αντοχής και ομοιογενούς πλήρωσης**), σχηματική παράσταση ενός «ιδανικού» πόρου που φέρει ομάδες C18 και ρεαλιστική παράσταση ενός πορώδους σωματιδίου⁶³ *iii*) διαφορετικά είδη ομάδων Si-OH στην επιφάνεια της síλικα⁶⁸ *iv*) κάλυψη επιφάνειας (μmoles/m²). Στη 1^η περίπτωση (High surface coverage/High ligand density) τα ελεύθερα -OH είναι σαφώς λιγότερα⁶⁸ *v*) συμπλοκοποίηση ενός **χηλικού αναλύτη** με μια **μεταλλική πρόσμιξη** στην επιφάνεια ενός σωματιδίου⁶³.

2.5.1.4 Στατικές φάσεις νιτριλίου

Στο εδάφιο αυτό θα σχολιάσουμε τις ιδιότητες των στατικών φάσεων νιτριλίου (στήλες χρωματογραφίας ομάδας -κυανο, **ciano columns**). Οι στήλες αυτές διαχωρίζουν μίγματα ουσιών με τον ίδιο τρόπο όπως η σίλικα, αλλά δίνουν μικρότερες τιμές k για μια δεδομένη κινητή φάση. Στη κατηγορία αυτή ανήκει η αναλυτική στήλη η οποία χρησιμοποιήθηκε στο πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Όπως γνωρίζουμε, ο υποκαταστάτης R ενός σιλανίου (π.χ. του σιλανίου $X-Si(CH_3)_2R$) φέρει λειτουργικές ομάδες οι οποίες προσδίδουν σε μια στήλη τις ιδιότητες που επιθυμούμε. Τόσο η βιβλιογραφία όσο και αρκετοί κατασκευαστές κατατάσσουν τις στήλες κύανο στη **χρωματογραφία κανονικής φάσης**, θεωρώντας ότι η ομάδα -CN η οποία έχει συνδεθεί επάνω στη καθαρή σίλικα είναι μια πολική ομάδα (Σχήμα 16). Ωστόσο, στην ομολογουμένως ευρεία κλίμακα πολικότητας των υλικών επίστρωσης κανονικής φάσης, οι κυανομάδες θεωρούνται ως οι λιγότερο πολικές. Τα υλικά πλήρωσης με διόλη παρουσιάζουν ενδιάμεση πολικότητα, ενώ οι αμινομάδες θεωρούνται ως οι περισσότερο πολικές.

Παρόλα αυτά, σε πολλές αναφορές οι στατικές φάσεις νιτριλίου κατατάσσονται στη **χρωματογραφία αντίστροφης φάσης**, ευρισκόμενες όμως στη πρώτη θέση της κλίμακας αυξανόμενης πολικότητας των σχετικά άπολων υλικών επίστρωσης. Από όλα αυτά συνάγεται το συμπέρασμα ότι οι στήλες -CN εμπεριέχουν στατικές φάσεις «**χαμηλής έως μέτριας πολικότητας**» (στη βιβλιογραφία αναφέρονται ως **moderately polar phases**⁶¹), ενώ προτείνονται από τους αρμόδιους προμηθευτές⁷⁰ για εφαρμογές τόσο κανονικής όσο και αντίστροφης φάσης, αλλά και για συστήματα HILIC χρωματογραφίας. Επιπλέον, συστήνονται ως εξαιρετικές επιλογές για αναλύσεις διαχωρισμού πρωτονιομένων βάσεων⁷⁰, όπως δηλαδή η κιτρική βουταμιράτη. Η λειτουργική ομάδα -CN εμφανίζεται επάνω σε σκελετούς δύο (-C₂H₄-CN) ή τριών (-C₃-CN) ατόμων άνθρακα, ωστόσο το πιο συνηθισμένο αντιδραστήριο είναι το κυανο-πρόπυλο σιλάνιο (**cyanopropylsilane**) το οποίο δίνει μια κυανο-πρόπυλο ομάδα.



Σχήμα 16: Οι στατικές φάσεις νιτριλίου συχνά κατατάσσονται στα πληρωτικά υλικά NP-HPLC⁷¹ (επάνω), ωστόσο στη πράξη αποτελούν υποστρώματα **χαμηλής έως μέτριας πολικότητας** (κάτω)⁶⁸. Σε αναλύσεις με στήλες cyano συχνά παρατηρούνται π-π αλληλεπιδράσεις με τους αρωματικούς αναλύτες, οι οποίες μειώνονται σημαντικά όταν χρησιμοποιείται το ACN ως διαλύτης. Επίσης παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου. Στο απλοποιημένο σχήμα κάτω και δεξιά⁶³, έχει παραληφθεί το συνδετικό τμήμα του σιλανίου, [-Si(CH₃)₂-].

2.5.1.5 Εξισορρόπηση, συντήρηση και χρόνος ζωής μια στήλης (column lifetime)

Κατά την εκκίνηση της λειτουργίας μιας διάταξης HPLC (έναρξη της ροής της κινητής φάσης) θα πρέπει, πριν την έγχυση του δείγματος, να παρέλθει ένα δεδομένο χρονικό διάστημα μέχρις ότου η κινητή φάση εξισορροπήσει εντός της στατικής φάσης (column equilibration). Το διάστημα αυτό κυμαίνεται από 30 έως και 60 min. Το απαιτούμενο διάστημα αυτό ενδέχεται να μειωθεί αν η έκπλυση της στήλης (πριν την αποθήκευσή της) πραγματοποιηθεί με την κινητή φάση της ανάλυσης στην οποία αναμένεται να χρησιμοποιηθεί. Ωστόσο, στο τέλος κάθε ημέρας είθισται οι στήλες να εκπλένονται (flushing) με 100 % οργανικό διαλύτη ή οργανικό διαλύτη μαζί υπερκάθαρο νερό. Οι διαδικασίες ποικίλλουν ανάλογα με τη πολιτική του εργαστηρίου και τις οδηγίες του κατασκευαστή (columns Maintenance & Cleanup). **Σε καμία περίπτωση δε πρέπει να παραμείνουν υπολείμματα άλατος εντός της στήλης.**

Αν για κάποιο λόγο πραγματοποιηθεί μεταβολή της κινητής φάσης (στα πρωτόκολλα βαθμιδωτής έκλυσης ή στη διάρκεια των διαφόρων δοκιμών κατά τη ανάπτυξη μιας μεθόδου ή στη χρήση της στήλης για άλλη ανάλυση), θα πρέπει να πραγματοποιηθεί η διέλευση όγκου διαλύτη τουλάχιστον δεκαπλάσιου του όγκου της στήλης, πριν από τη νέα ένεση. Κατά την προσάρτηση

μιας καινούριας στήλης στη διάταξη HPLC είναι πιθανό να απαιτηθεί περισσότερος χρόνος εξισορρόπησης για μια δεδομένη ανάλυση. Η επίτευξη ή μη της εξισορρόπησης μπορεί να ελεγχθεί με επαναλαμβανόμενες ενέσεις ενός δείγματος και παρατήρηση των διαδοχικών χρωματογραφημάτων. Η χρήση συγκεκριμένων βάσεων μικρού μεγέθους που δρουν ως απενεργοποιητές (**sacrificial bases**) (παράγραφος 3.3.3) είναι πιθανό να αυξήσει σημαντικά τον απαιτούμενο χρόνο εξισορρόπησης της στήλης.

Με την πάροδο του χρόνου η στατική φάση σταδιακά αλλοιώνεται και μειώνεται ο βαθμός στον οποίο αυτή επικαλύπτει το υλικό στήριξης (rigid support). Γενικά, οι κινητές φάσεις διαβρώνουν τη στήλη και καταστρέφουν είτε τον αιθερικό πυριτικό δεσμό (**silyl ether linkage**) ανάμεσα στη σίλικα και στη συζευγμένη στατική φάση (όξινη υδρόλυση σε χαμηλά pH ή υψηλές T) είτε την επιφάνεια της σίλικα αυτής καθ' εαυτής (βασική υδρόλυση, **silica dissolution**). Αυτό οδηγεί σε αύξηση των όρων Van Deemter A και C, σε μείωση του διαχωρισμού (R_s), σε εμφάνιση πλασματικών κορυφών (spurious peaks) και σε διαταραχές της γραμμής βάσης (baseline). Διαλύτες, νερό και αντιδραστήρια κακής ποιότητας δύναται να προκαλέσουν βαθμιαία καταστροφή (deterioration) της στήλης. Επίσης, η στήλη κινδυνεύει από μη προκατεργασμένα δείγματα και από άλατα υψηλής συγκέντρωσης. Τα κιτρικά άλατα διαβρώνουν τα ανοξειδωτα τμήματα όλων των τμημάτων ενός συστήματος HPLC. Μια στήλη αντικαθίσταται όταν η εκλεκτικότητά της έχει χαθεί σε σημαντικό βαθμό και οι διαχωρισμοί είναι μη αποδεκτοί.

2.5.2 Σύστημα παροχής της κινητής φάσης^{59,61-63}

Το σύστημα παροχής κινητής φάσης ξεκινάει με τους **περιέκτες αποθήκευσης (mobile phase reservoirs)** των διαλυτών, οι οποίοι αποτελούν ένα απλό αλλά πολύ σημαντικό τμήμα. Για εφαρμογές ισοκρατικής έκλουσης απαιτείται ένα μόνο δοχείο αποθήκευσης στο οποίο τοποθετείται η ήδη αναμιγμένη (pre-mixed/hand-mixed) κινητή φάση. Ωστόσο, οι σύγχρονες διατάξεις HPLC διαθέτουν θαλάμους ανάμιξης και απαέρωσης διαλυτών όπου η κινητή φάση συντίθεται αυτόματα (on-line blended) την ώρα της ανάλυσης. Η τελευταία διαδικασία ελέγχεται χάρη σε μια ειδική μονάδα προγραμματισμού την οποία διαθέτει το λογισμικό του συστήματος (system controller) και είναι απαραίτητη για εφαρμογές βαθμιδωτής έκλουσης, αν και συνήθως προτιμάται σε όλες τις περιπτώσεις. Κάθε διαλύτης αποθηκεύεται σε ξεχωριστό δοχείο από όπου αντλείται (drawn) (Σχήμα 17) χάρη στην αντλία.

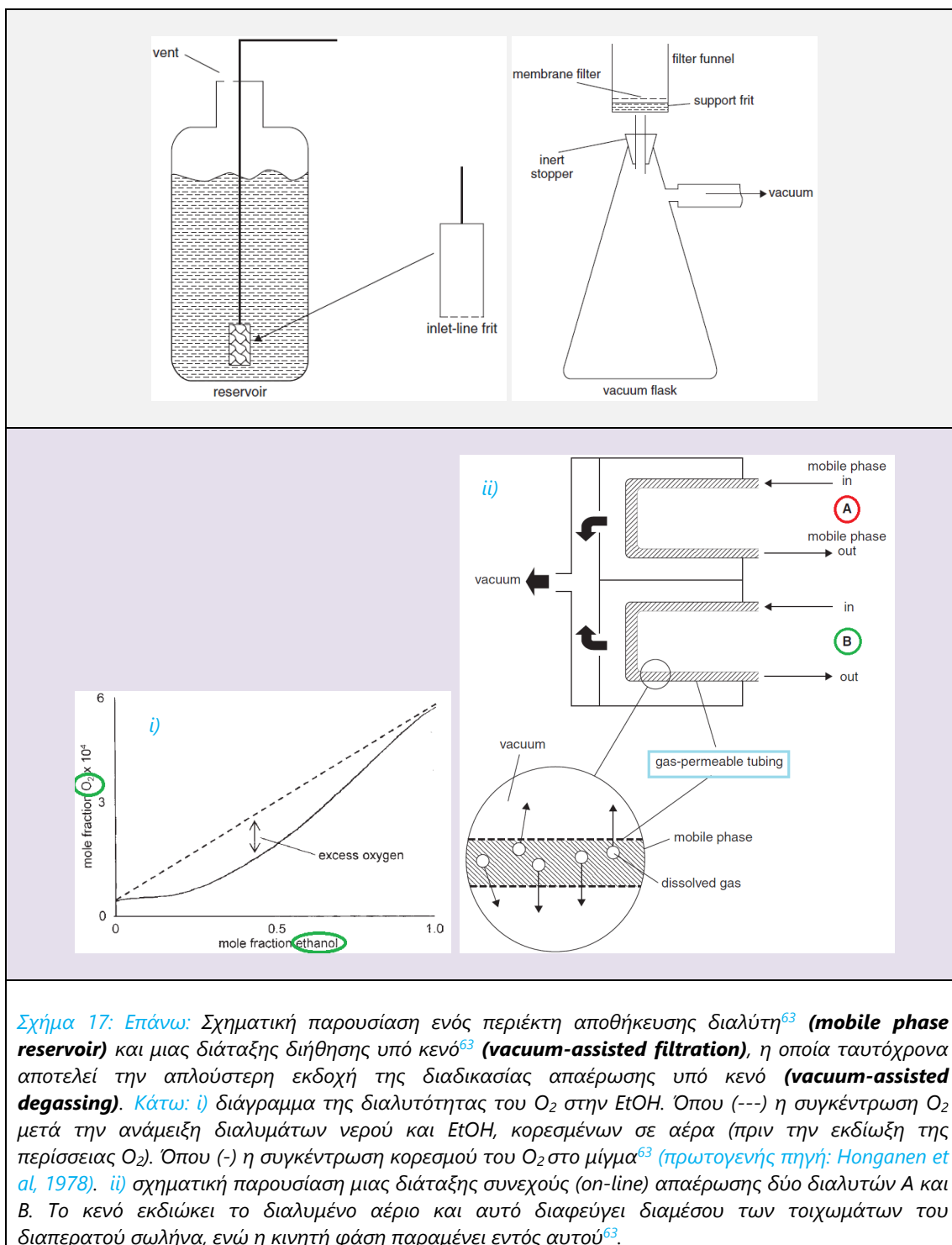
Τα δοχεία υποδοχής των διαλυτών είναι γυάλινα με εξαίρεση συγκριμένες εφαρμογές (π.χ. προσδιορισμός ιόντων Na^+ με ιοντική χρωματογραφία). Γενικά, χρησιμοποιούνται γυάλινα μητρικά μπουκάλια στα οποία αποστέλλονται οι διαλύτες από έναν προμηθευτή. Πολλές φορές, μια διάταξη HPLC συνοδεύεται από δοχεία διαλυτών ειδικά σχεδιασμένα για αυτή. Η αδράνεια (inertness) προς τη κινητή φάση και η καθαριότητα (cleanliness) ενός περιέκτη είναι εξαιρετικά

σημαντικά χαρακτηριστικά. Οι περιέκτες καθαρίζονται συνήθως σε εβδομαδιαία βάση και πάντοτε καλύπτονται μετά το άνοιγμα τους, ώστε να αποφευχθεί η είσοδος σωματιδίων και η εξάτμιση των διαλυτών. Η ολοκληρωτική κάλυψη ενός δοχείου θα προκαλέσει «κενό» κατά την άντληση του διαλύτη από την αντλία. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται κατάλληλα πώματα με σπές αερισμού ή σκέτα φύλλα αλουμινίου τα οποία επιτρέπουν την ταχεία εξισορρόπηση της πίεσης κατά την άντληση (closure techniques). Η χρήση πολυμερών φύλλων (parafilm) συνήθως αποφεύγεται λόγω της πιθανής μόλυνσης της κινητής φάσης με «ξένα» συστατικά.

Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 17), ένα φίλτρο εισόδου (inlet-line frit) επιτρέπει την άντληση του διαλύτη. Το στόμιο βρίσκεται στην άκρη της πλαστικής σωλήνωσης και δρα σαν βαρίδι, εξασφαλίζοντας τη βύθισή της εντός του περιέκτη. Βέβαια, η βασική του λειτουργία είναι το φιλτράρισμα του διαλύτη για την απομάκρυνση τυχόν σωματιδίων (π.χ. σκόνη). Φυσικά, αυτό το «υποτυπώδες» φιλτράρισμα δεν αποτελεί τη κύρια διεργασία καθαρισμού των διαλυτών και έτσι το πορώδες στόμιο φέρει ανοίγματα $\geq 10\mu\text{m}$, ώστε να μην εμποδίζεται η ροή του διαλύτη.

Ωστόσο, η παρουσία αιωρούμενων σωματιδίων μπορεί να διαταράξει την ομαλή λειτουργία διαφόρων τμημάτων μιας διάταξης HPLC, όπως των βαλβίδων ελέγχου, των βαλβίδων καθορισμού της ανάμιξης διαλυτών, των σωληνώσεων, των συστημάτων έγχυσης και των στομιών της στήλης (έμφραξη). Επομένως, η κινητή φάση πρέπει να είναι ελεύθερη σωματιδίων (particulate-free mobile phase). Συνήθως αγοράζονται προ-φιλτραρισμένοι διαλύτες κατάλληλης καθαρότητας (HPLC grade, UPLC grade) οι οποίοι έχουν περαστεί από κατάλληλα φίλτρα (συνήθως $0,2\ \mu\text{m}$) από τον προμηθευτή. Το ίδιο ισχύει και για το νερό που χρησιμοποιείται (HPLC grade water), αν και συχνά τα εργαστήρια διαθέτουν ειδικές συσκευές καθαρισμού του νερού (Milli-Q water purification). Όταν δεν είναι διαθέσιμοι έτοιμοι διαλύτες υψηλής καθαρότητας ή όταν προστίθενται στερεά συστατικά στο υδατικό μέρος της κινητής φάσης (π.χ. φωσφορικό άλας), τότε όλα τα υγρά πρέπει να φιλτράρονται. Τα εργαστήρια συνήθως διαθέτουν καθορισμένες διαδικασίες λειτουργίας (SOPs) οι οποίες καθορίζουν τη στρατηγική που ακολουθείται. Γενικότερα, οι μη καθαροί διαλύτες δύναται να προκαλέσουν διάφορα προβλήματα (βλ. ενότητα 3.2)

Το φιλτράρισμα της κινητής φάσης βασίζεται στη δημιουργία κενού χάρη σε μια εξωτερική αντλία (Σχήμα 17). Στη διήθηση υπό κενό (**vacuum-assisted filtration**) χρησιμοποιούνται ειδικά μικροπορώδη (millipore filters) φίλτρα ($\approx 0,5\ \mu\text{m}$) διαφορετικών κατηγοριών. Για παράδειγμα, τα φίλτρα που είναι κατασκευασμένα από υδρόφοβες ενώσεις είναι αποτελεσματικά στη διήθηση καθαρά οργανικών διαλυτών (MeOH, ACN), ωστόσο δεν επιτρέπουν το γρήγορο και ικανοποιητικό διαχωρισμό υδατικών διαλυμάτων. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα $0,45\ \mu\text{m}$ (βλ. ενότητα 4.1)



Σχήμα 17: Επάνω: Σχηματική παρουσίαση ενός περιέκτη αποθήκευσης διαλύτη⁶³ (**mobile phase reservoir**) και μιας διάταξης διήθησης υπό κενό⁶³ (**vacuum-assisted filtration**), η οποία ταυτόχρονα αποτελεί την απλούστερη εκδοχή της διαδικασίας απαέρωσης υπό κενό (**vacuum-assisted degassing**). **Κάτω: i)** Διάγραμμα της διαλυτότητας του O_2 στην EtOH. Όπου (---) η συγκέντρωση O_2 μετά την ανάμειξη διαλυμάτων νερού και EtOH, κορεσμένων σε αέρα (πριν την εκδίωξη της περίσσειας O_2). Όπου (-) η συγκέντρωση κορεσμού του O_2 στο μίγμα⁶³ (πρωτογενής πηγή: *Honganen et al, 1978*). **ii)** Σχηματική παρουσίαση μιας διάταξης συνεχούς (on-line) απαέρωσης δύο διαλυτών A και B. Το κενό εκδιώκει το διαλυμένο αέριο και αυτό διαφεύγει διαμέσου των τοιχωμάτων του διαπερατού σωλήνα, ενώ η κινητή φάση παραμένει εντός αυτού⁶³.

Πέραν των αιωρούμενων σωματιδίων, η παρουσία φυσαλίδων αέρα (O_2 και N_2) στην κινητή φάση είναι ένα πολύ κοινό πρόβλημα στις αναλύσεις HPLC. Οι φυσαλίδες προκαλούν 1) πρακτικά προβλήματα στην άντληση της κινητής φάσης (rump operation) και 2) χημικά προβλήματα, οδηγώντας συχνά σε καταγραφή ψευδών κορυφών (spurious peaks) από τους ανιχνευτές. Αντιμετωπίζονται με το βήμα της **απαέρωσης (degassing)** των διαλυτών πριν τη χρήση τους. Το πρόβλημα έγκειται στο ότι καθώς ο αέρας διαλύεται σε ένα

διάλυμα, αυτό καθίσταται κορεσμένο (air saturated solution) και είναι πολύ πιθανό να απελευθερώσει αέρια ή ατμούς (outgassing) κατά την άντληση μέσω του φίλτρου εισόδου (inlet-line filter) που είδαμε πιο πάνω ή κατά την εισαγωγή του στη σχετικά χαμηλής πίεσης περιοχή της κυψελίδας του ανιχνευτή. Αυτό μπορεί να προκαλέσει την πτώση της πίεσης του συστήματος (μηχανική αστάθεια) κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού. Ως εκ τούτου η διαδικασία της απαέρωσης συνίσταται ισχυρά για την εξασφάλιση της ομαλής και αξιόπιστης λειτουργίας μιας διάταξης (HPLC operational reliability), ειδικά για τις εφαρμογές της RP-HPLC.

Η απαιτούμενη έκταση της απαέρωσης σχετίζεται με τον τεχνολογικό σχεδιασμό και την αντοχή της κάθε αντλίας. Στο παραπάνω σχήμα (Σχήμα 17), το διάγραμμα αφορά καθαρό νερό και καθαρή EtOH, κορεσμένα σε O₂. Κατά την ανάμιξη των διαλυμάτων, η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου O₂ είναι περίπου ανάλογη της συγκέντρωσής του στον κάθε διαλύτη ξεχωριστά (διακεκομμένη γραμμή). Ωστόσο, το O₂ είναι πολύ λιγότερο διαλυτό στο μίγμα των διαλυτών (supersaturated solution) (συνεχής γραμμή) και έτσι είτε διαφεύγει αμέσως είτε διαφεύγει κατά την επαφή του με μια «ενεργή επιφάνεια» π.χ. τη σκληρή επιφάνεια του φίλτρου εισόδου (inlet-line filter). Το φαινόμενο αυτό ισχύει και στην περίπτωση αέρα (O₂ και N₂) αντί σκέτου O₂, παρουσία ρυθμιστικών διαλυμάτων αλάτων και διαφόρων άλλων οργανικών διαλυτών όπως το ACN ή η MeOH η οποία χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αυτή. Επομένως, δεν είναι απαραίτητη η απομάκρυνση όλης της ποσότητας του αέρα από ένα μίγμα, παρά μόνο τόσης ώστε η διαλυμένη ποσότητα που παραμένει σε αυτό να βρίσκεται κάτω από τη συνεχή καμπύλη κορεσμού του παραπάνω διαγράμματος.

Σχετικά με τα χημικά προβλήματα, η παρουσία φυσαλίδων προκαλεί υποβάθμιση της απόδοσης ενός ανιχνευτή. Ειδικά στην περίπτωση των ανιχνευτών UV-vis, η ανίχνευση σε χαμηλά λ (~185 nm) είναι αδύνατη αν δεν έχει προηγηθεί απαέρωση της κινητής φάσης (π.χ. διοχέτευση He) ώστε να απομακρυνθεί το O₂ από το οπτικό μονοπάτι του ανιχνευτή. Διαφορετικά, παρατηρείται αυξημένος θόρυβος (baseline noise) και το σήμα υποβάθρου (background signal) μεγαλώνει συνεχώς. Ακόμη και σε μεγαλύτερα λ (π.χ. >254 nm), το πρόβλημα παραμένει. Πιθανή αιτία είναι η διαφορά στη τιμή του δείκτη διάθλασης (RI) της κινητής φάσης. Επίσης, το O₂ του διαλυμένου αέρα είναι πιθανό να αντιδρά με κάποιους αναλύτες κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού.

Η διοχέτευση ενός αδιάλυτου στο διαλύτη αδρανούς αερίου, π.χ. He (Helium sparging) είναι η πιο αποτελεσματική τεχνική απαέρωσης, καθώς απομακρύνει έως και το 80-90% του διαλυμένου αέρα. Το He διαφεύγει και συμπαρασύρει μαζί του τις διαλυμένες φυσαλίδες. Φυσικά, την απαλλαγή από τον αέρα επιτυγχάνει σε ικανοποιητικό βαθμό και η διήθηση υπό κενό (**vacuum-assisted filtration**) η οποία περιγράφηκε πιο πάνω. Στην απλούστερη εκδοχή της, η απαέρωση υπό κενό (**vacuum-assisted degassing**) συμβαίνει κατά τη διάρκεια αυτού του φιλτραρίσματος της κινητής φάσης. Μια απαέρωση υπό κενό διάρκειας

10-15 λεπτών μπορεί να απομακρύνει το 60-70% ενός αερίου. Μάλιστα, προς ενίσχυση της διαδικασίας, μια συνήθης πρακτική μετά το φιλτράρισμα όλου του υγρού είναι το σφράγισμα της ειδικής κωνικής φιάλης με αδρανές πώμα και η συνέχιση της εφαρμογής κενού για λίγα ακόμη λεπτά. Για καλύτερο αποτέλεσμα, πολλοί αναλυτές πραγματοποιούν τη παραπάνω διαδικασία εντός λουτρού υπερήχων. Παρ' όλα αυτά, στην πράξη συναντώνται δυσκολίες διότι όταν η διαδικασία απαέρωσης σταματήσει, ο εκτεθειμένος στο περιβάλλον διαλύτης θα πραγματοποιήσει εκ νέου ταχεία εξισορρόπηση με τον αέρα. Σε αναλύσεις που απαιτούν εξαιρετικά μεγάλη καθαρότητα για τη κινητή φάση, πέρα της ασυνεχούς απαέρωσης (off-line degassing) απαιτούνται συστήματα τα οποία να απομακρύνουν το O₂ καθόλη τη διάρκεια της ροής της κινητής φάσης.

Τέτοια συστήματα αποτελούν οι διατάξεις συνεχούς παροχής He (continuous He sparging) ή οι διατάξεις συνεχούς απαέρωσης υπό κενό (on-line vacuum degassing). Οι τελευταίες αποτελούν την πιο γνωστή και ευρέως χρησιμοποιούμενη λύση, λόγω εξοικονόμησης χρόνου και χρημάτων. Πλέον, κάθε για σύστημα HPLC διαθέτει ένα **θάλαμο απαέρωσης και ανάμιξης των διαλυτών** (on-line degasser) είτε σαν βασικό είτε σαν προαιρετικό εξοπλισμό. Τα συστήματα αυτά αποτελούν ένα κρίσιμο μέρος του συστήματος παροχής της κινητής φάσης.

Όπως φαίνεται και στο παραπάνω σχήμα (Σχήμα 17), η λειτουργία ενός απαερωτή βασίζεται στην εκλεκτική διαπερατότητα μιας πολυμερικής σωλήνωσης σε αέριο (gas-permeable polymeric tube). Μετά την άντλησή του και την απομάκρυνση από τον περιέκτη, κάθε διαλύτης διέρχεται από τη στενή αυτή σωλήνωση η οποία βρίσκεται εντός του θαλάμου σε συνθήκες κενού. Το κενό εκδιώκει το αέριο και αυτό διαφεύγει διαμέσου των τοιχωμάτων του διαπερατού σωλήνα, ενώ η κινητή φάση παραμένει εντός αυτού. Ο απαερωτής τοποθετείται πριν το σημείο ανάμιξης των διαλυτών. Χάρη στα διαρκώς εξελισσόμενα συστήματα, διατίθενται σωληνώσεις φοβερά μικρών όγκων (sub-mL volumes) και η απόδοση της απαέρωσης είναι ανάλογη μιας αντίστοιχης παρατεταμένης απαέρωσης υπό κενό σε στατικές (off-line) συνθήκες.

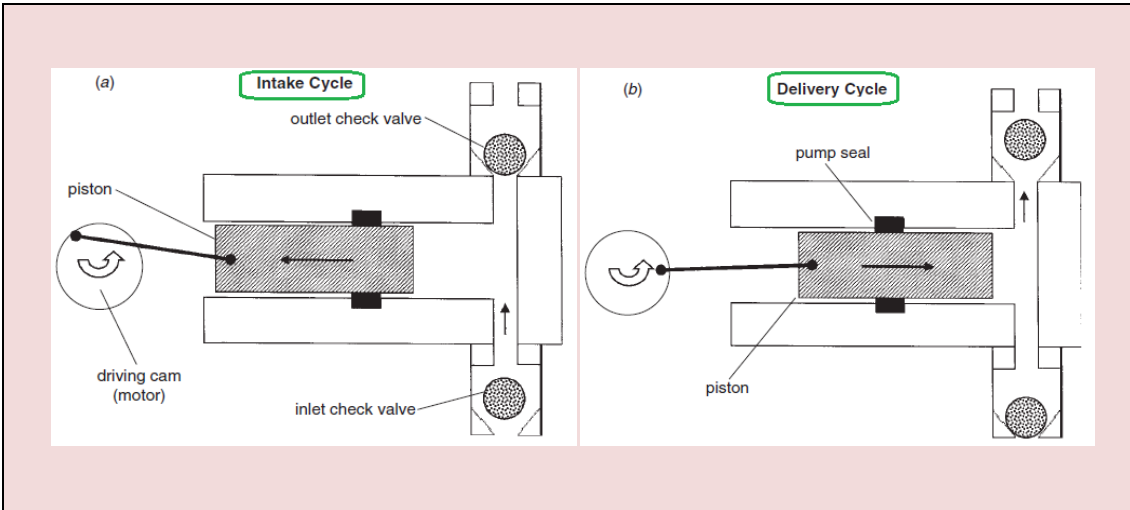
Η μελέτη του συστήματος παροχής της κινητής φάσης ολοκληρώνεται με την αντλία **υψηλής πίεσης** η οποία απομακρύνει (αντλεί) τους διαλύτες από τα δοχεία αποθήκευσης, τους αναμιγνύει σε καθορισμένα ποσοστά (αν η διάταξη HPLC διαθέτει μονάδα προγραμματισμού) και τους προωθεί προς τη χρωματογραφική στήλη. Ο ρόλος της αντλίας είναι πολύ σημαντικός διότι εξασφαλίζει τη διοχέτευση σταθερής ροής κινητής φάσης (mL/min) σε όλη τη διάρκεια του διαχωρισμού, χρησιμοποιώντας συνήθως παλινδρομικό έμβολο ή έμβολα. Για την επίτευξη ροών 0,5-5 mL/min σε στήλες διαμέτρου 1-5 mm και μήκους 100-500 mm απαιτούνται πιέσεις 70-350 atm. Σχεδόν όλα τα **συστήματα άντλησης (pumping systems)** που χρησιμοποιούνται στις αναλύσεις σήμερα (~90% των εμπορικά διαθέσιμων συστημάτων HPLC) βασίζονται σε παραλλαγές των *παλινδρομικών αντλιών (reciprocating pumps)*, οι οποίες έχουν εξελιχθεί

σημαντικά με τα χρόνια και αποτελούν αξιόπιστες διατάξεις παρέχοντας εκατοντάδες ώρες λειτουργίας χωρίς γενική συντήρηση (Σχήμα 18). Φυσικά, υπάρχουν διάφορα είδη αντλιών με βάση το μηχανισμό λειτουργίας, των οποίων η μελέτη ξεφεύγει από το αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Οι τρεις κύριοι τύποι αντλιών είναι οι παλινδρομικές αντλίες, οι αντλίες σύριγγας (ή εκτόπισης) και οι πνευματικές αντλίες (ή σταθερής πίεσης).

Στις καθημερινές αναλύσεις ρουτίνας χρησιμοποιούνται αντλίες οι οποίες έχουν σχεδιαστεί να λειτουργούν σε πιέσεις έως και 6.000 psi (pounds per square inch), δηλαδή 400 bar (**1 atm=14.696 psi, 1 bar=14.505 psi**). Στη πράξη, τα συστήματα αυτά (conventional HPLC systems) λειτουργούν συνήθως στη περιοχή των 2.000-3.000 psi (150-200 bar), κάτι που ισχύει και για το πρωτόκολλο αναλυτικού προσδιορισμού της εργασίας αυτής. Στη περίπτωση εξαιρετικά γρήγορων αναλύσεων χρησιμοποιούνται ειδικές διατάξεις (specialized equipment) οι οποίες επιτρέπουν τη εφαρμογή ακόμη υψηλότερων πιέσεων (8.000-15.000 psi / 550-1.000 bar) και στις οποίες το πληρωτικό υλικό της στήλης αποτελείται από σωματίδια μεγέθους (διαμέτρου) <2 μm.

Οι απαιτήσεις ενός συστήματος άντλησης περιλαμβάνουν την απαλλαγή από παλμούς ροής, την ακρίβεια στην ανάμιξη διαλυτών, τον ικανοποιητικό έλεγχο ροής με επαναληψιμότητα 0,5% ή και ακόμα καλύτερη και την ανθεκτικότητα στη διάβρωση. Η τελευταία απαίτηση εξασφαλίζεται χάρη σε τμήματα (π.χ. φλάτζες) από ανοξείδωτο χάλυβα ή Teflon. Τα έμβολα (πιστόνια) συνήθως κατασκευάζονται από ζαφείρι ή πιο σπάνια από κεραμικά υλικά. Οι συνήθεις αντλίες αναπτύσσουν ταχύτητες ροής από 0,1 έως 9,9 mL/min και διακρίνονται σε αντλίες **μονού** και **διπλού πιστονιού** καθώς και σε αντλίες βαθμιδωτής ή ισοκρατικής έκλουσης. Η ρήξη ενός τμήματος του συστήματος μπορεί να οδηγήσει σε διαρροές (leaks). Είναι σημαντικό να λαμβάνονται μέτρα για την αποφυγή αυτών των διαρροών. Για παράδειγμα, τα διάφορα σημεία ενώσεων (αρμοί) πρέπει να σφίγγονται, ενώ τα χρωματογραφικά αναλώσιμα όπως οι βαλβίδες ελέγχου των σφαιριδίων (inlet & outlet check valves) και οι στεγανωτικοί δακτύλιοι (pump seals) πρέπει να αλλάζονται τακτικά (~κάθε 1 χρόνο).

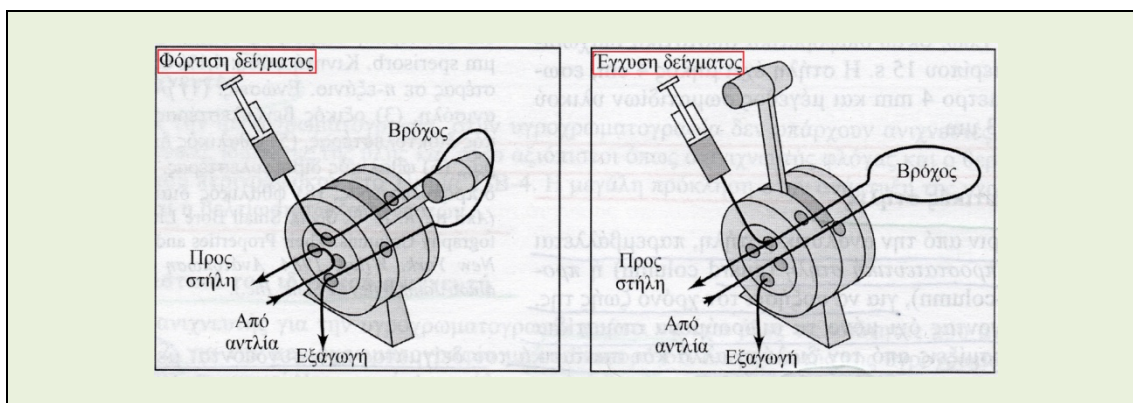
Οι αντλίες μονού πιστονιού (single-piston pumps) είναι η βάση της εξέλιξης όλων των επόμενων εκδοχών άντλησης. Το πλεονέκτημα τους είναι οι μικροί εσωτερικοί όγκοι (35 έως 400 μL), η δυνατότητα εφαρμογής υψηλών πιέσεων αν χρειαστεί (έως και 10.000 psi), η εύκολη προσαρμογή στη βαθμιδωτή έκλουση και οι σταθερές ταχύτητες ροής, οι οποίες είναι ανεξάρτητες από την οπισθοπίεση της στήλης και το ιξώδες του διαλύτη. Το μειονέκτημά τους είναι η παραγωγή παλμών ροής (παλμοί από τη ροή της κινητής φάσης) κατά τη λειτουργία της αντλίας, οι οποίοι πρέπει να αποσβέννυνται διότι εμφανίζονται ως θόρυβος στη γραμμή βάσης (baseline noise). Συχνά, εντός του δικτύου της οργανολογίας, παρεμβάλλονται ειδικές συσκευές απόσβεσης των παλμών αυτών.



Σχήμα 18: Μια **αντλία παλινδρόμησης μονού πιστονιού** (single-piston reciprocating pump). Σε ένα μικρό θάλαμο, ο διαλύτης αντλείται παλινδρομικά με ένα έμβολο (**piston**) το οποίο κινείται μηχανικά, χάρη στον κινητήρα (**pump motor/driving cam**). Δύο σφαιρικές βαλβίδες (**check valves**) ανοίγουν και κλείνουν εκ περιτροπής, ελέγχοντας με ακρίβεια τη κατεύθυνση της ροής του διαλύτη μέσα και έξω από έναν κύλινδρο. Ο διαλύτης είτε βρίσκεται σε άμεση επαφή με το έμβολο είτε του μεταδίδεται πίεση από ένα εύκαμπτο διάφραγμα, το οποίο λειτουργεί χάρη σε ένα ακόμη παλινδρομικό έμβολο. Οι διαρροές προλαμβάνονται χάρη σε ειδικούς στεγανωτικούς δακτύλιους (**pump seals**). Το στάδιο της άντλησης της κινητής φάσης (**intake cycle**) ακολουθείται από το στάδιο της προώθησής της (**delivery cycle**) και η διαδικασία επαναλαμβάνεται⁶³.

2.5.3 Σύστημα εισαγωγής του δείγματος^{59,61-63}

Το σύστημα δειγματοληψίας και εισαγωγής (έγχυσης) του δείγματος αποτελεί ένα κομβικό σημείο στη χρωματογραφία HPLC. Προκειμένου να είναι αξιόπιστος ένας ποσοτικός προσδιορισμός, θα πρέπει μια αυστηρά καθορισμένη ποσότητα δείγματος να προστεθεί στην (υπό συνεχή πίεση) ρέουσα κινητή φάση. Η εισαγωγή του δείγματος στην HPLC βασίζεται σε ειδικές διατάξεις οι οποίες πληρώνονται με μια ποσότητα του υπό ανάλυση διαλύματος. Οι διατάξεις αυτές καλούνται **βρόγχοι δείγματος (sample loops)** και συνίστανται από ένα αλληλένδετο τμήμα ενός υγροχρωματογράφου με βρόγχους όγκου από 5 έως 500 μL (5-500 λ), των οποίων η λειτουργία στηρίζεται σε ειδικές βαλβίδες (Σχήμα 19). Με βρόγχους τέτοιου τύπου εισάγονται δείγματα σε πιέσεις έως και 7.000 psi με επαναληψιμότητα μερικών δεκάτων %. Η έγχυση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χειροκίνητα (**manual sample injection**) είτε αυτόματα (**automatic sample injection**) με τη βοήθεια ειδικών δειγματοληπτών (auto-samplers for automated, unattended analysis). Η τελευταία εκδοχή σχεδόν εξαλείφει κάθε πιθανότητα «ανώμαλης» εισαγωγής του δείγματος στη κορυφή της στήλης και καθιστά χρονικά δυνατή την ανάλυση εκατοντάδων δειγμάτων σε καθημερινή βάση.



Σχήμα 19: Βρόγχος δειγματοληψίας υγροχρωματογραφίας. Με τη βοήθεια μιας σύριγγας, ο βρόγχος (sample loop) γεμίζει με δείγμα (αριστερά). Η βαλβίδα βρίσκεται στη **θέση φόρτωσης**. Όταν η βαλβίδα (injection valve) αλλάξει θέση (**θέση εισαγωγής**) χάρη σε μια χειρολαβή (δεξιά), τότε ο βρόγχος **παρεμβάλλεται** μεταξύ αντλίας και στήλης, οπότε η κινητή φάση διέρχεται μέσα από αυτόν και μεταφέρει το δείγμα προς τη στήλη⁵⁹.

Συνοπτικά, είτε πρόκειται για αυτόματη ένεση είτε πρόκειται για χειροκίνητη ένεση, η διαδικασία έχει ως εξής: το διάλυμα του δείγματος ενίεται (με τον ενσωματωμένο δειγματολήπτη ή με μια εξωτερική σύριγγα) στο βρόγχο έγχυσης (**injection loop**). Κάθε βρόγχος μπορεί να πληρωθεί με καθορισμένο και σταθερό όγκο δείγματος, π.χ. 5, 10, 20, 50, 100 μL (fixed-volume loop) και φέρει μία βαλβίδα έγχυσης (**injection valve**) η οποία αρχικά βρίσκεται στη θέση απομόνωσης του βρόγχου από τη ρέουσα κινητή φάση. Στην περίπτωση του αυτόματου δειγματολήπτη, ο όγκος τους βρόγχου είναι μεταβλητός και ρυθμίζεται αυτόματα εντός ενός διαθέσιμου εύρους. Μόλις ενεθεί όλη η ποσότητα του δείγματος, η βαλβίδα περιστρέφεται (switching) είτε αυτόματα είτε χειροκίνητα με τη βοήθεια μιας χειρολαβής (**Σχήμα 19**) στη θέση η οποία επιτρέπει στην κινητή φάση να περάσει μέσα από το βρόγχο και να παραλάβει ποσοτικά (να παρασύρει) το δείγμα προς τη στατική φάση (στήλη). Αν πρόκειται για χειροκίνητη ένεση, η αλλαγή της θέσης της βαλβίδας από τον αναλυτή πρέπει να γίνει ταχύτατα, διαφορετικά υπάρχει ο κίνδυνος της φτωχής παγίδευσης του αναλύτη στην κεφαλή της στήλης και την εξαγωγή κορυφών μεγάλου εύρους και κακής συμμετρίας (βλ. **Σχήμα 24**, ενότητα 3.3).

Κατά κανόνα, όλες οι σύγχρονες διατάξεις HPLC διαθέτουν αυτόματους δειγματολήπτες οι οποίες παραλαμβάνουν μια ποσότητα δείγματος από ειδικά φιαλίδια (vials) και την ενίουν στο βρόγχο εισαγωγής. Ωστόσο, άσχετα με τον τρόπο που θα εισαχθεί το δείγμα στο χρωματογραφικό σύστημα, η βαλβίδα έγχυσης αποτελεί τον «πυρήνα» του συστήματος εισαγωγής. Αν και υπάρχουν διάφοροι τύποι, ο πιο διαδεδομένος είναι αυτός της περιστροφικής βαλβίδας έξι διαύλων (**six-port rotary valve**), ο ένας εκ των οποίων οδηγεί στη στήλη. Η βαλβίδα αυτή είναι συνήθως κατασκευασμένη από ανοξείδωτο χάλυβα και περιλαμβάνει ένα δίκτυο υδραυλικών συνδέσεων: το σημείο εισόδου του δείγματος

(s), το σημείο εκροής των αποβλήτων (w), το βρόγχο, το σημείο εισόδου της κινητής φάσης από την αντλία (p) και το σημείο προώθησης προς τη στήλη (c). Τα σημεία s και w είναι τοποθετημένα σε αντίθετα άκρα της συνολικής διάταξης (του βρόγχου), ενώ το σημείο p είναι συνδεδεμένο με το σημείο c. Όπως φαίνεται από τη σχηματική περιγραφή ενός βρόγχου (Σχήμα 19) αλλά και στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 20), υπάρχουν δύο δυνατές θέσεις για τη βαλβίδα (**load position, inject position**).

Ανάλογα με τον «τρόπο κυκλοφορίας» του δείγματος μέσα στη βαλβίδα εισαγωγής και με τον τρόπο υπολογισμού του όγκου του, διακρίνουμε τις περιπτώσεις ένεσης πληρωμένου βρόγχου (filled-loop injection) και ένεσης μερικώς πληρωμένου βρόγχου (partial-loop injection).

- Στην πρώτη ρύθμιση, ο όγκος του δείγματος V_s καθορίζεται με βάση το συνολικό όγκο του βρόγχου. Για παράδειγμα, σε ένα βρόγχο 20 μL (οι πιο συνηθισμένοι βρόγχοι), το δείγμα ρέει συνεχώς μέχρις ότου οι πρώτες ποσότητες περιόσεως αυτού αρχίσουν να εξέρχονται προς τα απόβλητα (w). Στη συνέχεια η βαλβίδα μετακινείται στη θέση εισαγωγής (inject position) και ο παγιδευμένος πλέον όγκος δείγματος ($V_s = 20 \mu\text{L}$) προωθείται προς τη στήλη. Οι ενέσεις αυτού του είδους είναι ακριβείς και επαναλήψιμες, αρκεί ο βρόγχος να είναι βαθμονομημένος και να γεμίζεται πλήρως (overfilled loop). Ωστόσο, επειδή η συχνή αλλαγή βρόγχων διαφορετικών όγκων δεν είναι βολική, η λειτουργία αυτή συνήθως αποφεύγεται σε περιπτώσεις τακτικών αλλαγών της τιμής του όγκου V_s , π.χ. κατά τη διάρκεια του σταδίου method development.
- Στη δεύτερη ρύθμιση, η διαδικασία είναι παρόμοια με τη παραπάνω λειτουργία με τη διαφορά ότι ο όγκος του βρόγχου είναι αρκετά μεγαλύτερος από τον όγκο δείγματος V_s και η εισαγόμενη σε αυτόν ποσότητα δείγματος πρέπει να είναι μετρημένη με ακρίβεια. Για παράδειγμα για την εισαγωγή μιας ποσότητας δείγματος 20 μL θα χρησιμοποιηθεί μια βαθμονομημένη σύριγγα και θα γίνει ένεση σε ένα βρόγχο συνήθως 100 μL . Στη συνέχεια ένας ρότορας (valve rotor) μετακινεί τη βαλβίδα στη θέση εισαγωγής και το δείγμα προωθείται προς τη στήλη. Οι ενέσεις αυτού του είδους είναι ακριβείς και επαναλήψιμες, αρκεί η μέτρηση του όγκου του δείγματος να είναι σωστή, η εισαγωγή του να είναι ελεγχόμενη και ποσοτική και ο όγκος του βρόγχου να είναι τουλάχιστον διπλάσιος του όγκου V_s ($V_s < 50\%$ του βρόγχου).

Σημείωση: Παρατηρούμε ότι οι διάφορες υδραυλικές διασυνδέσεις είναι τέτοιες ώστε η κατεύθυνση της ροής μέσα στο βρόγχο να είναι αντίστροφη σε ότι αφορά τις δύο θέσεις της βαλβίδας (load position, inject position). Αυτό εξασφαλίζει την ακεραιότητα της εισαγωγής του δείγματος: στις περιπτώσεις όπου το δείγμα πρέπει να «ταξιδέψει» εντός ενός μεγάλου βρόγχου, εγκυμονεί ο κίνδυνος του φαινομένου

μόλυνσης εκ μεταφοράς (carry over) και εν τέλει της ανεπιθύμητης διεύρυνσης των κορυφών.

Ένα σύνθετο πρόβλημα που ανακύπτει και έχει να κάνει με ακρίβεια και την ακεραιότητα της εισαγωγής του δείγματος, παρουσιάζεται στο δεύτερο μέρος του παρακάτω σχήματος (Σχήμα 20). Διαφορετικοί όγκοι V_s ενός διαλύματος εισήχθησαν σε ένα βρόγχο όγκου 20 μL . Η απόκριση του ανιχνευτή αντανακλούσε με ακρίβεια την εισαχθείσα ποσότητα και ήταν γραμμική ως προς τον όγκο V_s μόνο στις περιπτώσεις όπου ήταν $V_s < 10 \mu\text{L}$ και $V_s > 40 \mu\text{L}$, δηλαδή σε τιμές μικρότερες του 50% ή μεγαλύτερες του 200% του όγκου του βρόγχου. Είναι φανερό ότι στη πρώτη περίπτωση μιλάμε για partial-loop ένεση, ενώ στη δεύτερη για περίσσεια δείγματος και filled-loop ένεση. Για τις τιμές του V_s εντός του εύρους 10-40 μL παρατηρήθηκε μια καμπύλωση του σήματος.

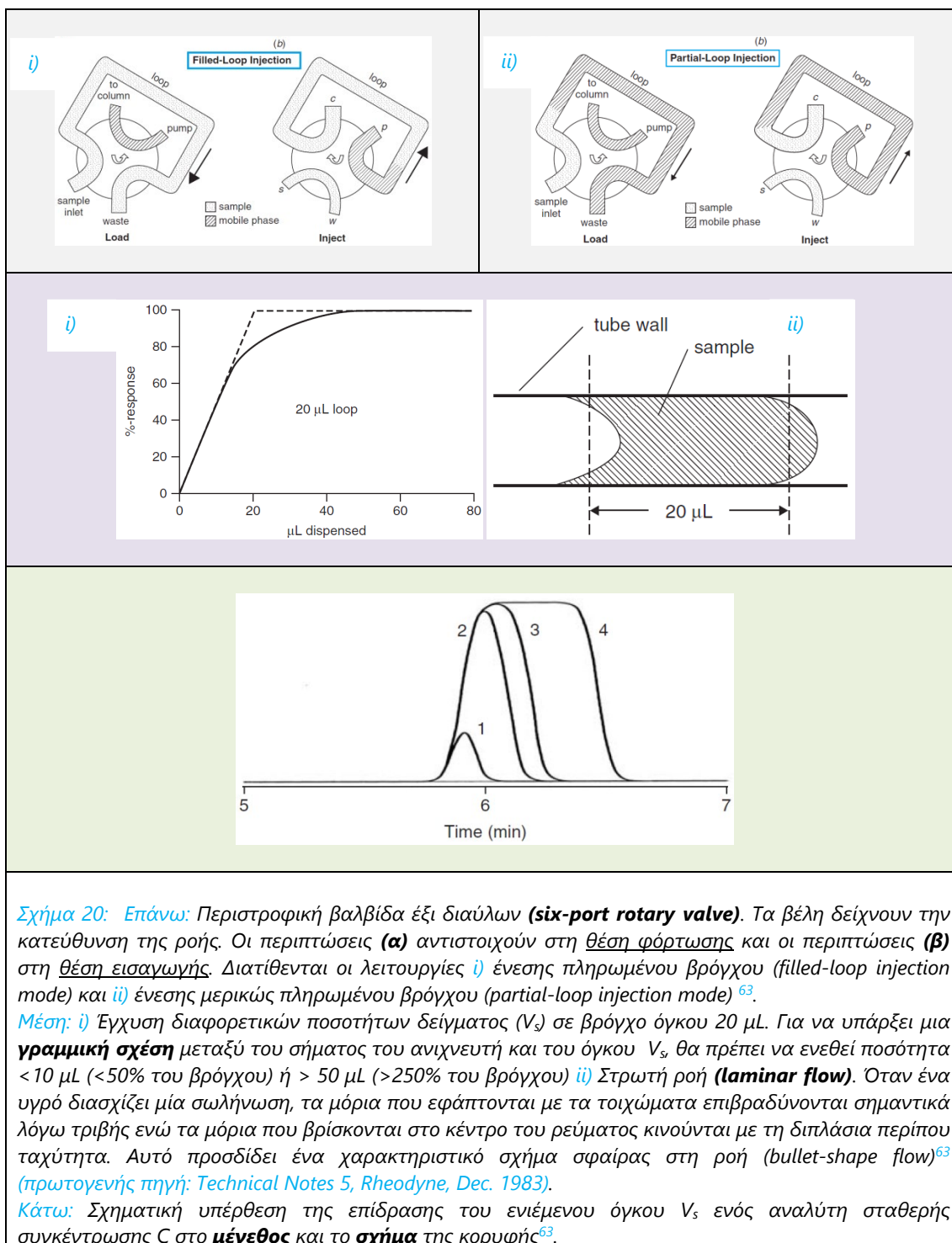
Η καμπύλωση αυτή σχετίζεται με τα χαρακτηριστική μορφή της ροής του δείγματος (laminar flow) τόσο πριν αυτό εισέλθει στο βρόγχο (κατά την έγχυσή του στη βαλβίδα εισαγωγής) όσο και κατά τη διάρκεια της διέλευσής του από αυτόν. Όταν ένα υγρό διασχίζει μία σωλήνωση, τα μόρια που εφάπτονται με τα τοιχώματα επιβραδύνονται σημαντικά λόγω τριβής ενώ τα μόρια που βρίσκονται στο κέντρο του ρεύματος κινούνται με τη διπλάσια περίπου ταχύτητα. Αυτό προσδίδει ένα χαρακτηριστικό σχήμα σφαίρας στη ροή (bullet-shape flow). Έτσι λοιπόν, όταν μια ποσότητα δείγματος π.χ. 20 μL εισαχθεί σε ένα βρόγχο του ίδιου όγκου (στη θέση φόρτωσης/load position), κάποια μόρια θα φτάσουν ταχέως στο σημείο εξόδου προς τα απόβλητα (w) την ώρα που κάποια άλλα ίσως να μην έχουν ξεκινήσει καν το «ταξίδι» μέσα στο χώρο του βρόγχου. Όταν η βαλβίδα γυρίσει στη θέση εισαγωγής (inject position), κάποια μόρια θα μείνουν εκτός και το αποτέλεσμα θα είναι η εισαγωγή μικρότερης ποσότητας από την επιζητούμενη εντός της στήλης. Γι' αυτό το λόγο, στις περιπτώσεις χειροκίνητης ένεσης, συνίσταται ο όγκος ένεσης (injected volume) να είναι μόνιμα $\leq 50\%$ ή $\geq 200\%$ του όγκου του βρόγχου (loop volume). Συνήθως ενίουμε ποσότητα 3-4 φορές μεγαλύτερη από τον όγκο του βρόγχου.

Από όλα όσα αναφέρθηκαν έως τώρα για το σύστημα δειγματοληψίας και εισαγωγής του δείγματος, καθίσταται φανερό ότι ο τρόπος εισαγωγής των αναλυτών στη στήλη είναι ο βασικός περιοριστικός παράγοντας για την εξασφάλιση επαναληψιμότητας σε μια σειρά μετρήσεων. Η διαδικασία πρέπει να γίνεται με τρόπο απόλυτα ελεγχόμενο. Ακόμη, το πρόβλημα δύναται να επιδεινωθεί με τη διεύρυνση (broadening) των κορυφών την οποία προκαλεί η υπερφόρτωση των στηλών. Συνεπώς, οι όγκοι V_s πρέπει να είναι οι ελάχιστοι δυνατοί, από μερικές δεκάδες μL έως (σπάνια) 500 μL . Πλέον, είναι διαθέσιμες βαλβίδες έγχυσης (injection valves) για μικρό-όγκους, με βρόγχους δείγματος χωρητικότητας < 5 μL (από 0,5 μL έως 5 μL). Τα συστήματα αυτά υποστηρίζονται από ειδικές μικρό-στήλες και αντλίες εξαιρετικά χαμηλών ροών (nano-συστήματα) σε σχέση με τις συνηθισμένες. Εξίσου σημαντικό είναι να μη προκαλείται

αποσυμπίεση του συστήματος κατά την εισαγωγή του δείγματος.

Θα ολοκληρώσουμε τη παράγραφο 2.5.3 με μια σύντομη αναφορά στην υπερφόρτωση των στηλών (**column overload**) και στους τρόπους αποφυγής της. Τα προβλήματα που σχετίζονται με το μέγεθος του δείγματος (**sample-size effects**) αφορούν είτε τον όγκο του δείγματος (sample volume) είτε το μοριακό βάρος (sample weight). Κατά κανόνα, τα αναλυτικά πρωτόκολλα των διαχωρισμών στην HPLC περιλαμβάνουν μικρούς όγκους V_s . Στις περιπτώσεις αυτές, μια μικρή αύξηση της ενιέμενης ποσότητας θα επηρεάσει το ύψος και το εμβαδό της κορυφής (peak height & peak area) αλλά όχι τα μεγέθη t_R , W και R_s . Οι μικρές αυξήσεις στον όγκο V_s συνήθως πραγματοποιούνται κατά την αναζήτηση του μεγαλύτερης δυνατής τιμής με σκοπό την εξασφάλιση της μέγιστης ευαισθησίας του ανιχνευτή, χωρίς ταυτόχρονη πρόκληση προβλημάτων στη μορφή του χρωματογραφήματος.

Ωστόσο, η περαιτέρω αύξηση των ήδη σχετικά μεγάλων όγκων V_s είναι πολύ πιθανό να προκαλέσει ανεπιθύμητες αλλαγές στο διαχωρισμό των αναλυτών, και συγκεκριμένα αύξηση του πλάτους (W) και μείωση του διαχωρισμού (R_s) (peak broadening). Γενικότερα, οι αλλαγές στο διαχωρισμό και στην κατακράτηση οι οποίες προκύπτουν από ενέσεις μεγάλων ποσοτήτων διαλυμάτων ή ενέσεις αναλυτών υψηλού μοριακού βάρους, αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως υπερφόρτωση όγκου (*volume overload / sample-volume effects*) και υπερφόρτωση μάζας (*mass overload / sample-mass effects*) αντίστοιχα. Οι αλλαγές αυτές συχνά προκαλούν φαινόμενα ασυμμετρίας στις κορυφές μέσω ενός συγκεκριμένου είδους tailing (column-overload tailing). Έτσι καθίσταται δύσκολος (ή και ανέφικτος) ο διαχωρισμός των αναλυτών αλλά και η επιτυχημένη ολοκλήρωση μιας κορυφής (βλ. παράγραφο 3.3.1).



Στο τρίτο μέρος του παραπάνω σχήματος (Σχήμα 20), παρουσιάζεται η επίδραση του ενιέμενου όγκου V_s ενός δείγματος στο διαχωρισμό, για μια σταθερή και αμετάβλητη από ένεση σε ένεση συγκέντρωση C του αναλύτη. Επίσης, θεωρείται ότι το μοριακό βάρος του αναλύτη είναι μικρό και δεν υπάρχουν επιδράσεις υπερφόρτωσης μάζας (mass overload). Παρατηρούμε ότι καθώς ο όγκος V_s αυξάνεται στη σειρά των μετρήσεων 1 έως 4, η κορυφή διευρύνεται (αύξηση W) και ταυτόχρονα αλλάζει το σχήμα της, αναπτύσσοντας μια επίπεδη

επιφάνεια. Προφανώς, αυτό θα οδηγήσει σε προβλήματα διαχωρισμού (μείωση R_s) και επικάλυψης με τυχόν γειτονικές κορυφές.

Σε τυπικούς διαχωρισμούς συνήθους μήκους (50-250 mm) και εσωτερικής διαμέτρου (4-5 mm), το βάρος της κάθε χημικής ένωσης (αναλύτη) στο δείγμα θα πρέπει να είναι ≤ 50 μg και ο όγκος V_s του δείγματος θα πρέπει να είναι ≤ 25 μL (όταν η κινητή φάση χρησιμοποιείται και ως διαλύτης έγχυσης). Για στήλες μικρότερης εσωτερικής διαμέτρου, το μέγεθος του δείγματος είθισται να μειώνεται κατ' αναλογία με το τετράγωνο της διαμέτρου. Μεγάλοι όγκοι δείγματος (~ 100 μL) χρησιμοποιούνται ορισμένες φορές σε αναλύσεις προσμίξεων σε φαρμακευτικές ενώσεις. Στη συγκεκριμένη εργασία οι ενιέμενες ποσότητες που δοκιμάστηκαν ήταν 5, 10 και 20 μL .

Σημείωση: Πρακτικά, αν υπάρχει η αμφιβολία ότι το μέγεθος (βάρος ή/και όγκος) ενός δείγματος είναι πολύ μεγάλο και υποβαθμίζει το διαχωρισμό, συνήθως επαναλαμβάνεται η ανάλυση στο μισό του αρχικού όγκου V_s . Αν δεν υπάρξει καμία αλλαγή στη κατακράτηση και στο διαχωρισμό, τότε το αρχικό μέγεθος δείγματος δεν ήταν απαγορευτικά μεγάλο.

2.5.4 Σύστημα ανίχνευσης^{59,61-63}

Οι ανιχνευτές στην HPLC είναι όργανα ζωτικής σημασίας διότι καθιστούν ορατό το διαχωρισμό που έχει προηγηθεί εντός της στήλης. Χωρίς αυτούς, όσο αποτελεσματική και αν είναι η χρωματογραφική διαδικασία, δεν είναι δυνατή η λήψη δεδομένων τα οποία να ερμηνεύουν τη πορεία της ανάλυσης. Η μεγαλύτερη πρόκληση στην ανάπτυξη της υδροχρωματογραφίας είναι η βελτίωση των ανιχνευτών. Υπάρχει ακόμα ανάγκη για πιο εξελιγμένους (και αξιόπιστους) ανιχνευτές οι οποίοι θα μπορούν να ανιχνεύουν ενώσεις που δε διαθέτουν κάποιο χρωμοφόρο. Φυσικά, εξ ίσου σημαντική είναι η πολυπλοκότητα και το κόστος ενός ανιχνευτή, ώστε αυτός να μπορεί να χρησιμοποιηθεί εύκολα στη πράξη από ένα εργαστήριο.

Οι ανιχνευτές συνδέονται όσο γίνεται πιο κοντά στην έξοδο της χρωματογραφικής στήλης (για μείωση του νεκρού όγκου, V_o , και αποφυγή της διεύρυνσης των κορυφών) και αναγνωρίζουν έναν αναλύτη ο οποίος εκλύεται από αυτή, ανταποκρινόμενοι σε κάποια ιδιότητά του (solute property detectors). Η παρουσία του αναλύτη προκαλεί μια αλλαγή της σύστασης της κινητής φάσης, η οποία καταγράφεται σαν ηλεκτρικό σήμα που μετατρέπεται σε ψηφιακό ώστε να μεταφερθεί στον ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου θα επεξεργαστεί. Σε ό,τι αφορά τα **χαρακτηριστικά ποιότητας** ενός **ιδανικού** ανιχνευτή, αυτά σχεδόν ταυτίζονται με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά των ανιχνευτών της GC. Ωστόσο, στην LC δεν υπάρχει απαίτηση ανταπόκρισης σε τόσο μεγάλη περιοχή θερμοκρασιών. Στην πράξη, κανένας ανιχνευτής δε συνδυάζει όλες τις επιθυμητές (ιδανικές)

ιδιότητες και μάλιστα ορισμένες από αυτές αποκλείουν την ύπαρξη κάποιων άλλων.

Ανάμεσα σε όλα τα επιδιωκόμενα χαρακτηριστικά, είναι σημαντικό ο ανιχνευτής να μην ανταποκρίνεται στην καθαρή κινητή φάση, να επιτρέπει χαμηλά όρια ανίχνευσης και να έχει μεγάλο εύρος γραμμικότητας, δηλαδή να παρέχει γραμμική απόκριση (να παρέχει σήμα ανάλογο της $C_{\text{ανάλυτη}}$ στο ενιέμενο δείγμα) στη καθορισμένη περιοχή των αναμενόμενων συγκεντρώσεων (γραμμική περιοχή). Έτσι, καθίσταται εφικτή η χρήση του στη ποσοτική ανάλυση. Ακόμη, είναι απαραίτητο να αποκρίνεται ταχύτατα ώστε να καταγράφει τις γειτονικές (και συχνά μικρές) κορυφές. Η ιδιότητα αυτή εκφράζεται μέσα από τη σταθερά χρόνου (response factor, τ) η οποία ορίζεται ως ο ελάχιστος απαιτούμενος χρόνος για τη καταγραφή του 63% της πλήρους τιμής μιας κορυφής. Μικρή σταθερά χρόνου προκαλεί αύξηση του θορύβου (baseline noise).

Τέλος, ο εσωτερικός όγκος της κυψελίδας του ανιχνευτή πρέπει να είναι μικρός για να μη προκαλείται διεύρυνση των κορυφών, γι' αυτό συνήθως δεν υπερβαίνει το 10% του εκλούσματος που απαιτείται για τη καταγραφή της πρώτης κορυφής. Ταυτόχρονα, ο όγκος αυτός πρέπει να είναι αρκούντως μεγάλος ώστε η ποσότητα του δείγματος να είναι επαρκής για τη καταγραφή ευκρινούς σήματος, ενώ το σχήμα της κυψελίδας πρέπει να αποτρέπει την κατακράτηση δείγματος (συνεχής ροή, ρεαλιστική καταγραφή σήματος). Οι κλασικές κυψελίδες στη χρωματογραφία HPLC έχουν όγκο 8 μL , ενώ οι αντίστοιχες κυψελίδες στην nano-HPLC έχουν όγκο 3 nL.

Στη φαρμακευτική ανάλυση συναντάται κατά κόρον ο συνδυασμός της HPLC με ανίχνευση στη περιοχή του υπεριώδους-ορατού (UV/Vis), καθώς παρέχει μια ακριβής, επαναλήψιμη και ανθεκτική μέθοδο επιλογής. Αποτελεί την καθιερωμένη μέθοδο (standard method) της βιομηχανίας (~80% των περιπτώσεων) για τη ποσοτική ανάλυση (quantitative analysis) είτε καθαρών φαρμακευτικών ουσιών (pure drug substances) είτε φαρμάκων στα σκευάσματά τους (drugs in formulations). Φυσικά, οι διάφορες εφαρμογές της HPLC συχνά επιτελούνται με πολλούς άλλους ανιχνευτές (ανιχνευτές φθορισμού, ανιχνευτές IR, ανιχνευτές δείκτη διάθλασης, ανιχνευτές σκέδασης ακτινοβολίας, ανιχνευτές χημειοφωταύγειας, αγωγιμομετρικούς ανιχνευτές, ηλεκτροχημικούς ανιχνευτές (αμπερομετρικούς), ανιχνευτές NMR, φασματομέτρα μαζών/MS).

2.5.4.1 Ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

Στο φασματοφωτόμετρο αυτό, το σήμα που καταγράφεται (ένδειξη της απορρόφησης) υπολογίζεται από το νόμο των Lambert-Beer, δηλαδή τη σχέση

$$A = \varepsilon * b * C \quad (28) \quad \text{ή} \quad A = \alpha * b * C \quad (2)$$

,όπου **A** η απορρόφηση (absorbance), **b** η διαδρομή του φωτός σε cm κατά τη διέλευσή του από τη κυψελίδα (μήκος κυψελίδας)

ε η μοριακή απορροφητικότητα (molar absorptivity) του αναλύτη σε L/mol * cm (είναι μια σταθερά αναλογίας)

α η απορροφητικότητα (absorptivity) του αναλύτη σε L/g * cm

C η συγκέντρωση του αναλύτη στο διάλυμα σε mol/L (28) ή σε g/100 mL (29)

Οι κυψελίδες των ανιχνευτών UV-Vis είναι κυψελίδες ροής κατασκευασμένες από χαλαζία, χαρακτηριστικού σχήματος «Z» (Σχήμα 21) με εσωτερική διάμετρο 1 mm (0,1 cm), μήκος 10 mm (1 cm) και εσωτερικό όγκο 8 μ L. Οι ανιχνευτές UV-Vis είναι ευρέως γνωστοί λόγω της ευκολίας στη χρήση, της σχετικά μεγάλης αντοχής και του χαμηλού κόστους. Παρουσιάζουν πολύ καλή ευαισθησία (υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμες διατάξεις με ευαισθησία 0,002 μονάδες απορρόφησης και θόρυβο ~1%), επιτρέποντας την ανίχνευση μικρών ποσοτήτων (π.χ. ng/mL) με περιορισμένη απορρόφηση στο UV. Επιπλέον, η μεγάλη γραμμική δυναμική περιοχή τους ($\sim 10^5$) καθιστά εφικτό τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό των κύριων συστατικών (π.χ. APIs) και των ιχνοποσοτήτων (π.χ. IMPs) στο ίδιο χρωματογράφημα. Φυσικά, το δείγμα πρέπει να αραιωθεί επαρκώς πριν από τη χρωματογραφική ανάλυση, ώστε η συγκέντρωση ελέγχου να εμπίπτει εντός τους εύρους γραμμικότητας του ανιχνευτή. Εξίσου σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι ανιχνευτές αυτού του τύπου επηρεάζονται ελάχιστα από αλλαγές στη θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη σύσταση της κινητής φάσης.

Κατά το σχεδιασμό ενός πειραματικού πρωτοκόλλου, συνήθως επιλέγεται η τιμή του μήκους κύματος (λ) για το οποίο παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση της εκπεμπόμενης από τη πηγή ακτινοβολίας (εξασφάλιση ευαισθησίας). Ταυτόχρονα, το επιλεγμένο μήκος κύματος πρέπει να χαρακτηρίζεται από την απουσία (ή τουλάχιστον τη μείωση) τυχόν παρεμποδίσεων από άλλα συστατικά (π.χ. προσμίξεις) του δείγματος (εξασφάλιση εκλεκτικότητας).

Οι πρώιμες διατάξεις λειτουργούσαν σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος (fixed-wavelength detectors) το οποίο συνήθως ήταν τα 254 nm. Η τιμή αυτή επιλεγόταν διότι οι περισσότερες ενώσεις απορροφούν ισχυρά σε αυτό το μήκος κύματος λόγω της ύπαρξης ατόμων όπως το O, το N και το S, τα οποία φέρουν μη δεσμικά ζεύγη e^- και ταυτόχρονα σχηματίζουν δεσμό με C που συμμετέχει σε διπλό δεσμό. Πλέον οι ανιχνευτές μπορούν να ρυθμιστούν ώστε να λειτουργούν σε

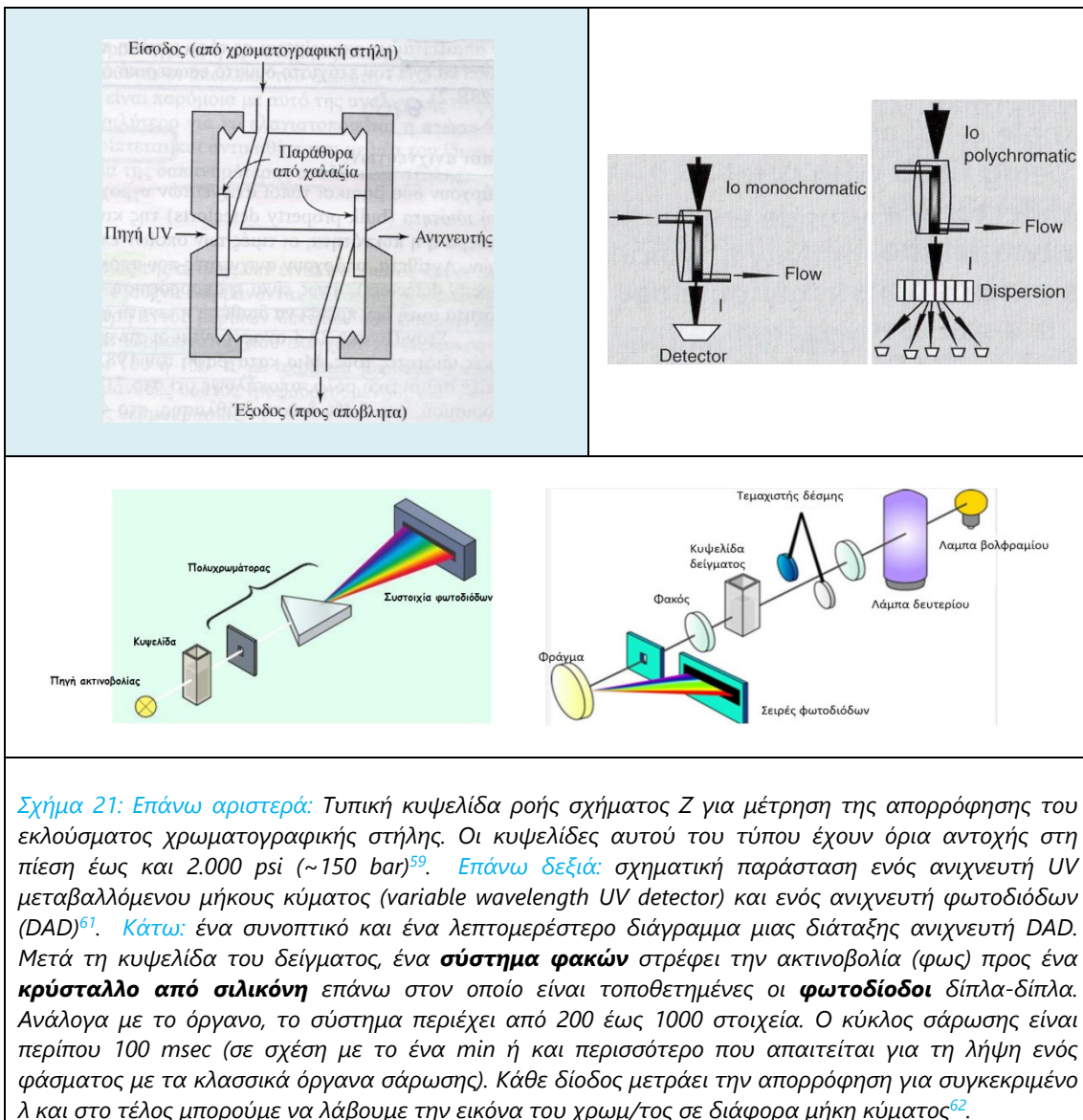
οποιοδήποτε μήκος κύματος εντός της περιοχής UV-Vis. Γενικά, υπάρχουν τρεις τύποι ανιχνευτών: **α)** ανιχνευτές σταθερού λ, **β)** ανιχνευτές πολλαπλών σταθερών λ και **γ)** ανιχνευτές μεταβαλλόμενου λ.

2.5.4.2 Ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA)

Ο ανιχνευτής αυτός είναι ένας εξελιγμένος ανιχνευτής UV-Vis και είναι ο πιο αποδοτικός εκ των φασματοφωτομετρικών ανιχνευτών υπεριώδους. Μπορεί να παρακολουθεί και να καταγράφει την απορρόφηση ενός δείγματος σε όλο το εύρος της περιοχής υπεριώδους-ορατού (~200-780 nm) ταυτόχρονα, παρέχοντας μια διαχωριστική ικανότητα περίπου 1 nm. Αυτό επιτυγχάνεται χάρη σε μια **σειρά (συστοιχία) φωτοδιόδων** οι οποίες ανιχνεύουν το φως που εκπέμπεται από την πηγή, διασπείρεται (dispersion) από ένα σταθερό πολυχρωμάτορα σε όλο το εύρος των μηκών κύματος και διέρχεται μέσα από την κυψελίδα του ανιχνευτή. Η διαδικασία παρουσιάζεται λεπτομερειακά στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 21). Σαν πηγή ακτινοβολίας για το ορατό συνήθως χρησιμοποιείται μια λάμπα W, ενώ για το υπεριώδες μια λάμπα De. Στη βιβλιογραφία συναντάται με το όνομα DAD (Diode array detector) ή PDA detector (Photodiode Array Detector) ή απλώς σαν «συστοιχίες φωτοδιόδων».

Τα συστήματα PDA βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στον έλεγχο της καθαρότητας των χρωματογραφικών κορυφών (**peak purity**): Κάθε χρονική στιγμή λαμβάνεται ένα ολόκληρο φάσμα UV κατά μήκος της χρωματογραφικής κορυφής, στην προκαθορισμένη από το χειριστή του οργάνου περιοχή μηκών κύματος. Η λειτουργία αυτή είναι εξαιρετικά χρήσιμη στη περίπτωση πολύπλοκων μιγμάτων των οποίων τα συστατικά απορροφούν σε εντελώς διαφορετικές περιοχές (π.χ. φαρμακευτικό σκεύασμα με διάφορα συστατικά) **αλλά και** στη περίπτωση μιγμάτων των οποίων οι αναλύτες δίνουν επικαλυπτόμενες κορυφές. Αν και αυτό αποτελεί σοβαρό εμπόδιο από χρωματογραφική άποψη (ατελής διαχωρισμός), εντούτοις μπορεί να γίνει διάκριση των εκλούμενων συστατικών με βάση την απορρόφηση στο UV. Συλλέγονται και αποθηκεύονται φασματικά δεδομένα (ένα πλήρες φάσμα UV) για την κάθε κορυφή του χρωματογραφήματος, οδηγώντας στην ταυτοποίηση των αγνώστων. Ένας συνήθης τύπος παρουσίασης των φασματικών δεδομένων μιας κορυφής είναι το τρισδιάστατο γράφημα.

Σημείωση: Για το ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών στη παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε διάταξη HPLC με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA detector). Επίσης, κατά τη μελέτη του σταδίου της ενδιάμεσης πιστότητας (5.3.6.3) χρησιμοποιήθηκε σαν δεύτερο όργανο μια διάταξη HPLC με ανιχνευτή UV-Vis μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (variable wavelength UV detector).



Σχήμα 21: *Επάνω αριστερά:* Τυπική κυψελίδα ροής σχήματος Z για μέτρηση της απορρόφησης του εκλούσματος χρωματογραφικής στήλης. Οι κυψελίδες αυτού του τύπου έχουν όρια αντοχής στη πίεση έως και 2.000 psi (~150 bar)⁵⁹. *Επάνω δεξιά:* σχηματική παράσταση ενός ανιχνευτή UV μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (variable wavelength UV detector) και ενός ανιχνευτή φωτοδίοδων (DAD)⁶¹. *Κάτω:* ένα συνοπτικό και ένα λεπτομερέστερο διάγραμμα μιας διάταξης ανιχνευτή DAD. Μετά τη κυψελίδα του δείγματος, ένα **σύστημα φακών** στρέφει την ακτινοβολία (φως) προς ένα **κρύσταλλο από σιλικόνη** επάνω στον οποίο είναι τοποθετημένες οι **φωτοдиодοι** δίπλα-δίπλα. Ανάλογα με το όργανο, το σύστημα περιέχει από 200 έως 1000 στοιχεία. Ο κύκλος σάρωσης είναι περίπου 100 msec (σε σχέση με το ένα min ή και περισσότερο που απαιτείται για τη λήψη ενός φάσματος με τα κλασσικά όργανα σάρωσης). Κάθε δίοδος μετράει την απορρόφηση για συγκεκριμένο λ και στο τέλος μπορούμε να λάβουμε την εικόνα του χρωμ/τος σε διάφορα μήκη κύματος⁶².

2.5.5 Ηλεκτρονικοί υπολογιστές-Λογισμικά^{59,61-63}

Η οργανολογία ενός χρωματογραφικού συστήματος ολοκληρώνεται με τη μονάδα καταγραφής (data recording), επεξεργασίας (data processing) και παρουσίασης (report generation) των πειραματικών δεδομένων. Οι διαδικασίες αυτές αναφέρονται και ως **data handling**. Το μέρος αυτό συγκροτεί ένας Η/Υ (Σχήμα 22) ο οποίος είναι εφοδιασμένος με ένα εξειδικευμένο και φυσικά συμβατό λογισμικό (software). Χάρη σε αυτό, εκτός των παραπάνω λειτουργιών παρέχεται η δυνατότητα ελέγχου του χρωματογραφικού συστήματος γενικότερα, όπως α) ο καθορισμός της λειτουργίας της αντλίας, β) ο καθορισμός της θερμοκρασίας της στήλης, γ) ο έλεγχος του δειγματολήπτη και δ) η ρύθμιση του ανιχνευτή (**operational control of all the HPLC hardware functions**). Επομένως, μπορούμε να πούμε ότι το υπολογιστικό σύστημα μιας διάταξης HPLC συνίσταται από δύο επιμέρους και μεταξύ τους συνδυαζόμενα συστήματα: **data system** (ή *data processor*) και **system controller**. Στις σύγχρονες διατάξεις HPLC πολλές λειτουργίες που για χρόνια επιτελούνταν χειροκίνητα πλέον ελέγχονται μέσω υπολογιστή (automation of the HPLC process).

Όλες οι πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία ενός τμήματος (operational settings) και τις πειραματικές συνθήκες (ροή, T, P, % σύσταση διαλύτη, λ) μιας ανάλυσης καταχωρούνται σε ηλεκτρονικά αρχεία (method records). Αυτό καθιστά εύκολη τόσο την επανάληψη των διαφόρων αναλύσεων σε καθημερινή βάση όσο και τη μεταφορά μιας μεθόδου από μια διάταξη HPLC σε μια άλλη (π.χ. νέο όργανο). Επιπλέον, απλοποιείται αρκετά η διαδικασία της τροποποίησης (modification) μιας μεθόδου ή της ανάπτυξης (development) νέων μεθόδων χρησιμοποιώντας ως πρότυπα (templates) κάποιες παλαιότερες.

2.5.5.1 Έλεγχος της λειτουργίας ενός χρωματογραφικού συστήματος

Σε ό,τι αφορά της παροχή της κινητής φάσης, η ταχύτητα ροής u (mL/min) αυτής καθορίζεται με ακρίβεια και υπολογίζεται από τη πτώση της πίεσης σε ένα αναστολέα τοποθετημένο στην έξοδο της αντλίας. Επίσης, χάρη στη μονάδα προγραμματισμού του συστήματος παροχής της κινητής φάσης είναι δυνατός ο αυτόματος και ακριβής καθορισμός της σύστασης της κινητής φάσης (on-line blending) και η επακόλουθη τροποποίηση της με όποιο τρόπο επιθυμείται (είτε βαθμιαία είτε κατά τακτά χρονικά διαστήματα). Οι διατάξεις HPLC διαθέτουν ξεχωριστά κανάλια άντλησης και ειδικές βαλβίδες οι οποίες επιτρέπουν την ανάμιξη μέχρι και τεσσάρων διαλυτών. Αν και οι λειτουργίες αυτές βοηθούν ως επί το πλείστον στις εφαρμογές βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution), εντούτοις είναι χρήσιμες και στις εφαρμογές ισοκρατικής έκλουσης (isocratic elution). Αυτό συμβαίνει διότι η χειροκίνητη παρασκευή της κινητής φάσης (hand-mixed blending) εγκυμονεί πάντα κινδύνους ύπαρξης διαλυμένων φυσαλίδων αέρα (πρόβλημα για την αντλία και τον ανιχνευτή) καθώς και κινδύνους αστοχιών στην επιδιωκόμενη % σύσταση.

Σχετικά με την εισαγωγή του δείγματος, η απαιτούμενη ταχεία εισαγωγή

των αναλυτών εξασφαλίζεται μέσω της ένεσης από αυτόματους δειγματολήπτες (auto-samplers). Η τεχνική αυτή σχεδόν εξαλείφει κάθε πιθανότητα «ανώμαλης» εισαγωγής του δείγματος στη κορυφή της στήλης και επιπλέον επιτρέπει τη διαδοχική ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων (χάρη σε ειδικές πλάκες που δέχονται έως και 96 vials) σε συνθήκες ρουτίνας. Συνεχίζοντας, η θερμοκρασία μιας ανάλυσης καθορίζεται με ακρίβεια και μεταβάλλεται πολύ εύκολα ανάλογα με τις ερευνητικές ανάγκες. Οι περισσότερες διατάξεις διαθέτουν εσωτερικούς φούρνους στηλών, οι οποίοι είναι εξ' αρχής συνδεδεμένοι με έναν Η/Υ.

Τέλος, σχετικά με το σύστημα ανίχνευσης, η λειτουργία των ανιχνευτών ελέγχεται επίσης με κατάλληλα λογισμικά. Στις περιπτώσεις όπου έχει αποφασιστεί η προμήθεια των διαφόρων τμημάτων (individual components-separate modules) μιας διάταξης HPLC ξεχωριστά, θα πρέπει να ελέγχεται εκ των προτέρων η συμβατότητα ενός ανιχνευτή (και όλων των τμημάτων γενικότερα) με το χρησιμοποιούμενο από τον Η/Υ λογισμικό (software compatibility).

2.5.5.2 Εξαγωγή των πειραματικών αποτελεσμάτων

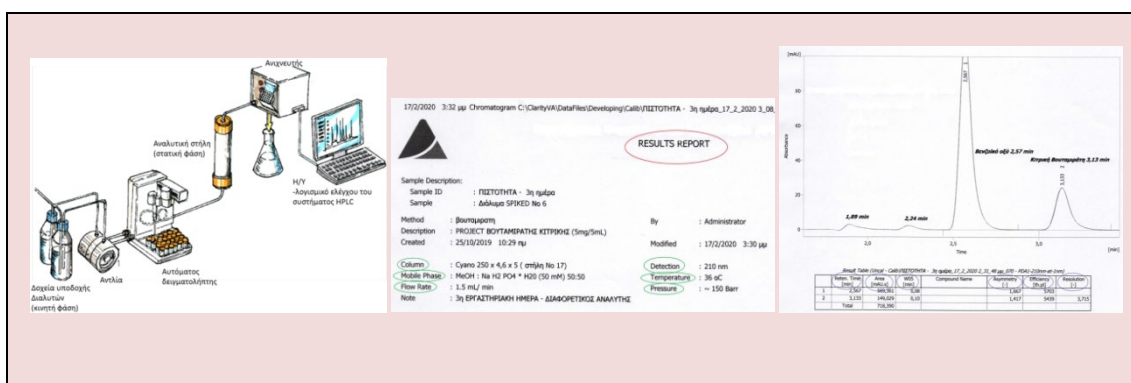
Ο ρόλος των υπολογιστικών συστημάτων σε μια χρωματογραφική ανάλυση τύπου HPLC ολοκληρώνεται με την υποδοχή, τη καταγραφή και την επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων από τα αντίστοιχα τμήματα αυτών. Τα συστήματα αυτά (data systems) μπορούν να δεχτούν αναλογικά ή ψηφιακά δεδομένα εισόδου (analog or digital inputs). Οι περισσότερες ανιχνευτές, πριν εξάγουν το ηλεκτρικό σήμα που καταγράφουν, διαθέτουν τη δυνατότητα μετατροπής του τόσο σε αναλογική όσο και σε ψηφιακή μορφή (analog or digital outputs). Όπως είναι λογικό, ο συγχρονισμός ενός ανιχνευτή με ένα σύστημα καταγραφής είναι πιο εύκολος στη περίπτωση των ενιαίων διατάξεων HPLC από τον ίδιο προμηθευτή (integrated system).

Άπαξ και αποθηκευτούν, οι πειραματικές πληροφορίες μπορούν να επεξεργαστούν ανά πάσα χρονική στιγμή. Αρχικά πραγματοποιείται μια σύντομη οπτική αξιολόγηση (visual inspection) της ποιότητας ενός χρωματογραφήματος από τον αναλυτή. Για την αποφυγή της συσσώρευσης μεγάλου όγκου αρχείων, τα γραφήματα αυτά συνήθως ελέγχονται σε ηλεκτρονική μορφή και αποθηκεύονται (paperless records). Στη συνέχεια ξεκινάει η επεξεργασία του χρωματογραφήματος (π.χ. ολοκλήρωση) με σκοπό την εξαγωγή των πρώτων βασικών πληροφοριών (output tables) για τις τιμές t_R και για τα εμβαδά (ή ύψη) των κορυφών (time-and-area results). Η περαιτέρω επεξεργασία των στοιχείων αυτών, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των βαθμονομήσεων, οδηγεί στην εξαγωγή των τελικών αποτελεσμάτων (π.χ. τη συγκέντρωση ενός αναλύτη στο δείγμα).

Σε ό,τι αφορά τον υπολογισμό της επιφάνειας μιας κορυφής (ολοκλήρωση), αυτός πραγματοποιείται χάρη σε ενσωματωμένους ηλεκτρονικούς ψηφιακούς ολοκληρωτές (data integrators) με τους οποίους είναι εφοδιασμένα τα σύγχρονα όργανα χρωματογραφίας. Ιστορικά, πριν την εμφάνιση αυτών των διατάξεων ακριβείας, οι πρώτες ολοκληρώσεις γίνονταν με το χέρι.

Το τελευταίο στάδιο είναι αυτό της σύνταξης της έκθεσης των πειραματικών αποτελεσμάτων (analysis report generation). Τόσο τα αρχικά όσο και τα τελικά πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν, π.χ. χρωματογραφήματα, πίνακες, διαγράμματα, στατιστικά αποτελέσματα (graphic data outputs, tabular data outputs), μεταφέρονται και ενσωματώνονται σε μία επίσημη φόρμα παρουσίασης (Σχήμα 22). Τονίζεται ότι χάρη στα σύγχρονα πακέτα λογισμικών, αυτή η μεταφορά και η σύνταξη μιας έκθεσης γίνεται με αυτόματο ή κατά το ήμισυ αυτόματο τρόπο. Ως εκ τούτου, επιτυγχάνεται η εξοικονόμηση πολύτιμου χρόνου προς όφελος του εργαστηρίου και τα ταυτόχρονα εξαλείφονται τα οποιαδήποτε ανθρώπινα «λάθη μεταφοράς» ενός αναλυτή. Η χρήση επικυρωμένων (validated) λογισμικών πακέτων αυξάνει ακόμη περισσότερο το κύρος των αποτελεσμάτων.

Πέραν αυτών όμως, οι αυστηρά καθορισμένες διαδικασίες σχετικά με την επεξεργασία και την παρουσίαση των πειραματικών δεδομένων, διασφαλίζουν την ακεραιότητα των αποτελεσμάτων που προκύπτουν (data integrity). Αυτό συμβάλει στην εναρμόνιση των εργαστηρίων με τις κατευθυντήριες οδηγίες (regulatory guidelines) των δημόσιων αλλά και των ιδιωτικών νομοθετικών σωμάτων. Για παράδειγμα, η οποιαδήποτε παρέμβαση ενός αναλυτή (manual adjustment-intervention) στη γραμμή βάσης ενός χρωματογραφήματος κατά την ολοκλήρωση, θα πρέπει να δηλωθεί και να δικαιολογηθεί ώστε να χαρακτηριστεί αποδεκτή κατά τη διενέργεια ενός ελέγχου (π.χ. μιας εξωτερικής επιθεώρησης). Άλλωστε, όλες οι εξωτερικές παρεμβάσεις καταγράφονται (tracking) από το λογισμικό (electronic audit trail). Τα τελευταία χρόνια, η βελτίωση των λογισμικών προσανατολίζεται στην ικανοποίηση των διαρκώς αυξανόμενων νομοθετικών απαιτήσεων.



Σχήμα 22: Αριστερά: Το σύστημα της οργανολογίας μιας διάταξης HPLC ολοκληρώνεται με έναν Η/Υ ο οποίος είναι εφοδιασμένος με ένα κατάλληλο λογισμικό (software) για τη συλλογή, την επεξεργασία και παρουσίαση των πειραματικών δεδομένων (data handling) και τον έλεγχο της λειτουργίας του κάθε διακριτού μέρους (αυτοματοποίηση διαχωρισμού)⁶². Μέση & δεξιά: Report generation. Παράδειγμα μιας επίσημης έκθεσης αποτελεσμάτων για μια χρωματογραφική ανάλυση. Οι διαδικασίες εξαγωγής των αποτελεσμάτων είναι αυστηρά καθορισμένες, ενώ υπάρχει περιορισμένη δυνατότητα εξωγενούς παρέμβασης (data integrity) Πηγή: πειραματικά δεδομένα της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Κεφάλαιο 3: Αρχές της Υγροχρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (RP-HPLC)

Η χρωματογραφία HPLC αντίστροφης φάσης είναι η **πιο** κοινώς χρησιμοποιούμενη μορφή της HPLC αλλά και **γενικότερα** η **περισσότερο** χρησιμοποιούμενη μέθοδος διαχωρισμού για αναλυτικούς σκοπούς. Κατά προσέγγιση, τα 3/4 των εφαρμογών της HPLC πραγματοποιούνται με στήλες πληρωτικών υλικών αντίστροφης φάσης. Στην RP-HPLC συναντάμε κατά κανόνα σχετικά άπολες στατικές φάσεις π.χ. υδρόφοβες (hydrophobic) αλυσίδες υδρογονανθράκων με πιο γνωστή την αλυσίδα C18 (ODS-coated stationary phase), δεσμευμένες επάνω σε υλικό στήριξης (support material) σίλικα ή και κάποιο άλλο υλικό (εδάφιο 2.5.1.2).

3.1 Αναλύτες που προσδιορίζονται με RP-HPLC⁶⁸

Στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς προπορεύονται τα μόρια ουσιών με πολικότητα αντίστοιχη της κινητής φάσης και αντίθετη της στατικής φάσης. Η χρωματογραφία HPLC εφαρμόζεται ευρέως σε αναλύσεις σχετικά μικρών μορίων (< 2.000 Da) είτε πολικών είτε άπολων (**polar and non-polar neutral analytes**). Στη περίπτωση αυτή, η κινητή φάση αποτελείται από H₂O (ισχυρά πολικός διαλύτης) και ένα (κατ' αρχήν) χαμηλό % ποσοστό οργανικού τροποποιητή (organic modifier). Ο τροποποιητής αυτός μεταβάλλει (μειώνει) τη συγκράτηση χάρη στη τη μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης όσο τα επίπεδα του αυξάνονται. Αντίθετα, η αύξηση του ποσοστού του H₂O οδηγεί σε ισχυρότερη αλληλεπίδραση των υδρόφοβων αυτών αναλυτών (hydrophobic analytes) με τη στατική φάση.

Ωστόσο, το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό της RP-HPLC είναι ότι μπορεί να επεκταθεί σε διαχωρισμούς ενώσεων που φέρουν μόνιμο φορτίο ή μπορούν να ιοντιστούν π.χ. τα ασθενή οξέα και οι ασθενείς βάσεις (**ionic and ionizable analytes**). Ο βαθμός ιοντισμού (ionization state) καθορίζει την υδροφοβικότητα (hydrophobicity) και ως εκ τούτου τη συγκράτηση των αναλυτών αυτών. Στις περιπτώσεις αυτές η κινητή φάση αποτελείται από **υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα αλάτων** (και όχι απλά από νερό) με σκοπό τον έλεγχο του βαθμού ιοντισμού των ενώσεων μέσα από την αυστηρά καθορισμένη ρύθμιση του pH. Η επίτευξη της τελικής τιμής του pH επιτυγχάνεται με τη χρήση **πρόσθετων ουσιών (additives)**, συνήθως παρόμοιας φύσης με το άλας. Το τελευταίο εξασφαλίζει την ταχεία δημιουργία των απαιτούμενων «ζευγών» ασθενούς οξέος με το άλας του ή ασθενούς βάσης με το άλας της (βλ. ενότητα 3.4). Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το δισόξινο φωσφορικό νάτριο στη μονοϋδρική του μορφή, (NaH₂PO₄) * H₂O, (IUPAC: sodium dihydrogen phosphate monohydrate), ενώ για την ακριβή ρύθμιση του pH του διαλύματος χρησιμοποιήθηκε φωσφορικό οξύ (H₃PO₄).

Σε πολλές περιπτώσεις, και ειδικά στους διαχωρισμούς που περιλαμβάνουν

αμίνες (π.χ. βουταμιράτη), είναι απαραίτητη η προσθήκη **τροποποιητών (modifiers)** οι οποίοι δρουν ως απενεργοποιητές και έχουν περιγραφεί αναλυτικά σε προηγούμενα μέρη. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τριαιθυλαμίνη, $N(Et)_3$ ή TEA (βλ. παράγραφο 3.3.3).

Τέλος, οι **ισχυρότερες βάσεις** (και τα οξέα) μπορούν να διαχωριστούν με κάποιες εφαρμογές ανάλογες με τη RP-HPLC αλλά αρκετά ειδικότερες, όπως η χρωματογραφία ζεύγους ιόντων (ion-pair chromatography). Τα ιοντισμένα μόρια των αναλυτών σχηματίζουν ζεύγη με ειδικά ιόντα (αντισταθμιστικά ιόντα, counter ions) που περιέχει η κινητή φάση. Σε ό,τι αφορά τους διαχωρισμούς **πεπτιδίων** και **πρωτεϊνών**, αυτοί πραγματοποιούνται συχνά με RP-HPLC. Βασική προϋπόθεση είναι η χρήση στατικών φάσεων με αλκύλια μικρής αλυσίδας και με σωματίδια μεγάλου ανοίγματος πόρων, ώστε να εξασφαλιστεί η πρόσβαση αυτών των ογκωδών μορίων στην εσωτερική επιφάνεια του πληρωτικού υλικού.

3.2 Κατηγοριοποίηση διαλυτών, επιθυμητές ιδιότητες & συνήθεις διαλύτες στη RP-HPLC^{62,68}

Στη χρωματογραφία RP-HPLC αλλά και στην HPLC γενικότερα, οι διαλύτες ταξινομούνται πρωτίστως με βάση τη **χημική τους δομή**. Έτσι λοιπόν, έχουμε τους διαλύτες με υδροξυλομάδες (R-OH, Ph-OH, RCOOH κλπ) οι οποίοι είναι γενικά υδρόφιλοι, τους οξυγονούχους διαλύτες (ROR', RCOOR', RCOR', DMSO) οι οποίοι είναι λιγότερο υδρόφιλοι, του αζωτούχους διαλύτες (αμίδια, αμίνες, νιτρίλια) και τους αλογονωμένους διαλύτες (CH_2Cl_2 , $CHCl_3$). Επίσης, υπάρχει η ταξινόμηση με βάση το μέγεθος της **διηλεκτρικής σταθεράς (ϵ)**, όπου έχουμε τους διαλύτες υψηλής ($\epsilon > 40$), ελάχιστης ($\epsilon < 15$) και ενδιάμεσης διάστασης ($15 < \epsilon < 40$).

Ένας ακόμη σημαντικός διαχωρισμός αφορά την **πολικότητα** των διαλυτών. Με μια αυστηρή προσέγγιση, οι διαλύτες ονομάζονται πολικοί ή μη ανάλογα με το αν παρουσιάζουν ή όχι μόνιμη διπολική ροπή (μ). Στη πράξη όμως ο πολικός χαρακτήρας περιλαμβάνει όλες τις δομικές ιδιότητες ενός μορίου (δακτύλιοι, ασύζευκτα e^- που δίνουν στιγμιαία μ , κατάσταση φόρτισης). Οι ιδιότητες αυτές οδηγούν σε διάφορες αλληλεπιδράσεις με τις προς διάλυση ενώσεις, πέρα από τις συνηθισμένες καθαρά ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (δυνάμεις coulomb). Ένας γενικός κανόνας είναι ότι η υδροφιλία (hydrophilicity) συμπίπτει με την πολικότητα (polarity). Τέλος, στο ίδιο μήκος κύματος με τη παραπάνω κατηγορία, γίνεται η ταξινόμηση των διαλυτών με βάση τις ειδικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσουν. Οι διαλύτες που φέρουν ομάδες με άτομα H επάνω σε ηλεκτραρνητικά άτομα (F, O, N) ονομάζονται **πρωτικοί** και σχηματίζουν με τους αναλύτες Δ.Η. (H_2O , R-OH, Ph-OH). Εκτός από το CH_3COOH , όλοι οι πρωτικοί διαλύτες είναι πολικοί και έχουν μεγάλη σταθερά ϵ . Οι **μη πρωτικοί** διαλύτες δε διαθέτουν ευκίνητα H, ωστόσο είναι εξίσου πολικοί και με μεγάλη σταθερά ϵ (DMSO, DMF).

Κάθε διαλύτης συνοδεύεται από συγκεκριμένες ιδιότητες (**solvent properties**) οι οποίες σχετίζονται με τη δομή του και παίζουν καθοριστικό ρόλο σε ό,τι αφορά

τη καταλληλότητά του για μια χρωματογραφική εφαρμογή. Άλλωστε, η εκλογή του σωστού διαλύτη είναι μια κρίσιμη αρχική παράμετρος λόγω της επίδρασής της στην εκλεκτικότητα ενός συστήματος. Η βελτιστοποίηση της εκλεκτικότητας της κινητής φάσης αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την αύξηση του διαχωρισμού (R_s) σε προβληματικές αναλύσεις. Ταυτόχρονα, υπεισέρχονται πρακτικά ζητήματα όπως το κόστος, η τοξικότητα και η αναμιξιμότητα με άλλους διαλύτες. Οι σημαντικότερες ιδιότητες είναι οι εξής:

- **Αναμιξιμότητα** (Miscibility) με το H_2O : Πρωτίστως, ο επιλεγμένος διαλύτης θα πρέπει να είναι επαρκώς αναμιξιμος με το υδατικό μέρος (νερό, υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα) της κινητής φάσης.
- **Ιξώδες** (Viscosity): έχει μονάδα το $mPa \cdot sec$ και συμβολίζεται με η , ενώ συνήθως αναφέρεται στους $20^\circ C$. Οι κινητές φάσεις χαμηλού ιξώδους βοηθούν στη μείωση της διασποράς, στη σταθεροποίηση μιας χαμηλής οπισθοπίεσης του συστήματος (system backpressure) και στην ανάπτυξη χαμηλής πίεσης γενικότερα (instrument pressure) κατά τη διάρκεια ενός διαχωρισμού. Ακόμη, οι χρόνοι ανάλυσης μειώνονται αισθητά χάρη στην αυξημένη μεταφορά μάζας για τα διάφορα συστατικά (μειωμένη τιμή του 3^{ου} όρου Van Deemter, C). Οι διαλύτες με ιξώδες μεγαλύτερο του H_2O ($\eta=1,00$) συνήθως είναι ακατάλληλοι για HPLC. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι η χρήση μιγμάτων οργανικών τροποποιητών οδηγεί σε κινητή φάση μεγαλύτερου ιξώδους (άρα και σε μεγαλύτερη πίεση) σε σύγκριση με τη χρήση καθαρών μορφών (π.χ. 100% MeOH ή 100% ACN ή 100% THF) (Σχήμα 23).
- **Σημείο αποκοπής** (UV Cutoff): Το μήκος κύματος (λ) στο οποίο η απορρόφηση του καθαρού διαλύτη έχει τιμή $A=1,00$, μετρημένη σε κυψελίδα οπτικής διαδρομής φωτός = 1 cm (διαπερατότητα $T= 10\%$). Είδαμε ότι στη φαρμακευτική ανάλυση συναντάται κατά κόρον ο συνδυασμός της HPLC με ανίχνευση στη περιοχή του υπεριώδους-ορατού (UV/Vis). Επομένως, θα πρέπει να είναι γνωστό το σημείο αποκοπής (λ_{cutoff}) της κινητής φάσης (οργανικοί διαλύτες, άλατα, πρόσθετα κλπ) ώστε να εξεταστεί η δυνητική παρεμβολή αυτού στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης (λ_{max}) του αναλύτη (Σχήμα 23).
- **Σημείο ζέσεως** (Boiling point): Τα πειραματικά πρωτόκολλα συχνά εμπεριέχουν την εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας για την επίτευξη ενός διαχωρισμού. Οι διαλύτες με χαμηλά Σ.Ζ. είναι ακατάλληλοι για τις εφαρμογές της HPLC καθώς μπορούν να παράγουν φουσαλίδες ατμών (vapor bubbles) στο χρωματογραφικό σύστημα. Οι φουσαλίδες προκαλούν 1) πρακτικά προβλήματα στην άντληση της κινητής φάσης (pump operation) και 2) χημικά προβλήματα, οδηγώντας συχνά σε καταγραφή ψευδών κορυφών (spurious peaks) από τους

ανιχνευτές. Ακόμη, είναι πολύ πιθανή η απώλεια ενός ποσοστού του διαλύτη (solvent loss) είτε κατά τη διαδικασία απαέρωσης είτε κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού.

- **Καθαρότητα** (Purity): Κατά τη μελέτη του συστήματος παροχής των διαλυτών (παράγραφος 2.5.2) είδαμε ότι η κινητή φάση πρέπει να είναι ελεύθερη σωματιδίων (particulate-free mobile phase), και γι' αυτό συνήθως αγοράζονται προ-φιλτραρισμένοι διαλύτες κατάλληλης καθαρότητας (HPLC grade, UPLC grade). Το ίδιο ισχύει και για το νερό που χρησιμοποιείται για τη παρασκευή των διαλυμάτων των δειγμάτων και της κινητής φάσης (HPLC grade water). Διαλύτες, νερό και αντιδραστήρια κακής ποιότητας δύναται να έχουν κακή επίπτωση στο διαχωρισμό (R_s), στην εμφάνιση πλασματικών κορυφών (ghost/erroneous/spurious peaks), σε διαταραχές της γραμμής βάσης (baseline) και στην βαθμιαία καταστροφή (deterioration) της στήλης (2.5.1.5). Οι διάφοροι οργανικοί επιμολυντές (contaminants) συνήθως προέρχονται από «μη καθαρό» νερό βρύσης, από διαρροή των φίλτρων των συσκευών καθαρισμού, από βακτηριακή μόλυνση των σωληνώσεων και των δοχείων αποθήκευσης και από απορρόφηση ουσιών της ατμόσφαιρας. Για παράδειγμα, οι βασικές κινητές φάσεις απορροφούν πολικές οργανικές ουσίες όπως φορμαλδεύδη, αμίνες και ατμοσφαιρικό CO_2 . Όσες από τις ουσίες αυτές φέρουν ενεργά χρωμοφόρα UV και βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα, παρεμβάλλονται στην ποσοτικοποίηση των αναλυτών και επίσης εμπλέκονται σε παράπλευρες αντιδράσεις με αυτούς.
- **Δείκτης διάθλασης** (Refractive Index): Συνήθως αναφέρεται η τιμή του στους 20°C (n_D^{20}). Η τιμή αυτή επηρεάζει την ευαισθησία ενός ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (R.I. detector) για ένα συγκεκριμένο δείγμα. Στις περιπτώσεις βαθμιδωτής έκλουσης ο δείκτης διάθλασης αλλάζει συνεχώς διότι αλλάζει και η σύσταση του εκλούσματος. Αυτό μπορεί να προκαλέσει προβλήματα ολίσθησης της γραμμής βάσης (drifting baselines) σε έναν ανιχνευτή UV. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητες οι προκαταρκτικές μετρήσεις σε διαλύτη ή η ανίχνευση σε ένα μήκος κύματος αναφοράς (reference wavelength).
- **Εκλουστική ισχύς** (Elution strength, ϵ^0): Στο εδάφιο 2.4.2.3 είδαμε ότι η χημική δομή των μορίων ενός διαλύτη παίζει ρόλο στην ευκολία (ταχύτητα) με την οποία αυτός μπορεί να εκλούσει τα συστατικά που συγκρατήθηκαν (προσορήθηκαν ή/και κατανεμήθηκαν) στις στατικές φάσεις. Η εκλουστική ισχύς (ϵ^0) κάθε διαλύτη έχει καθοριστεί εμπειρικά και αναφέρεται σε ένα συγκεκριμένο είδος στατικής φάσης (Σχήμα 23). Με βάση αυτή οι διαλύτες ταξινομούνται σε διάφορες εκλουστικές σειρές, ενώ το μέγεθος αυτό μεταβάλλεται με την ανάμειξη των κινητών φάσεων.

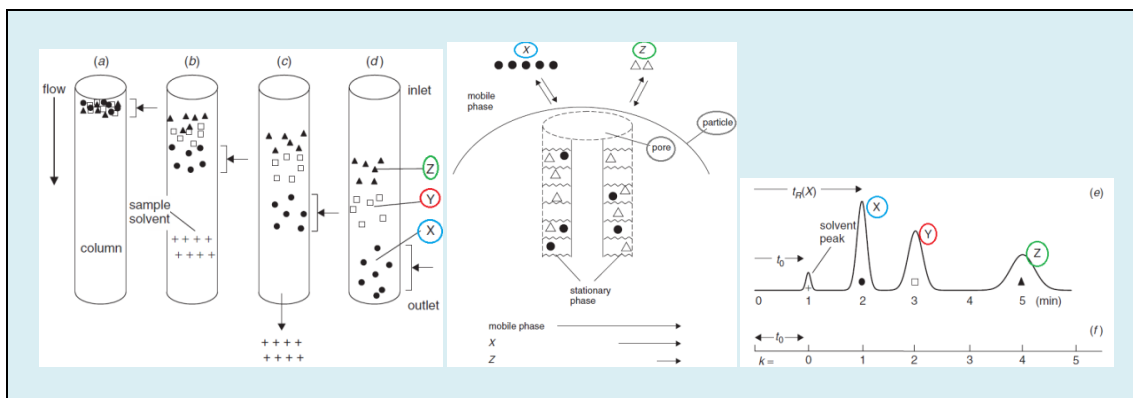
- **Σταθερότητα** (stability): Είναι πρακτικά αναγκαίο για έναν διαλύτη να είναι σταθερός για επαρκές χρονικό διάστημα, χωρίς να υπάρχει ο κίνδυνος αποικοδόμησης ή ταχείας εξάτμισης.
- **Δραστικότητα** (reactivity), **Τοξικότητα** (toxicity): Οι οποιεσδήποτε παράπλευρες αντιδράσεις του διαλύτη με τους αναλύτες θα δώσουν διάφορα παραπροϊόντα. Τα τελευταία ενδέχεται να οδηγήσουν σε πλασματικές κορυφές και σε λάθη ποσοτικοποίησης. Επίσης, θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση διαλυτών που είναι βλαβεροί για τον άνθρωπο και τοξικοί για το περιβάλλον (green chemistry). Σε κάθε περίπτωση, η διάθεση των τοξικών αποβλήτων πρέπει να γίνεται με βάση ειδικές διαδικασίες απόρριψης.

Τέλος, αναφέρουμε ότι ως εκλεκτικότητα ενός διαλύτη καλούμε την ικανότητα των διαφόρων κινητών φάσεων να μεταβάλλουν τον παράγοντα εκλεκτικότητας (α) δύο ή περισσότερων αναλυτών σε ένα μείγμα, και ότι αυτή εκφράζεται με τη παράμετρο πολικότητας P' και με την ικανότητα ακινητοποίησης m^{62} . Η παράμετρος P' είναι το μέτρο της διαλυτικής ικανότητας του διαλύτη και συνίσταται από τις ακόλουθες μεταβλητές (*solvochromatic parameters*):

- **Διπολικός χαρακτήρας** (π^*): Συναντάται και ως χ_n . Καλείται, επίσης, παράμετρος διπολικότητας ή μέτρο του διπολικού χαρακτήρα. Είναι μέτρο της ικανότητας ενός διαλύτη να αλληλεπιδρά με έναν αναλύτη χάρη σε ηλεκτροστατικές διαμοριακές δυνάμεις ανάμεσα σε μόνιμα δίπολα ή στιγμιαία δίπολα. Ως εκ τούτου, παίζει σημαντικό ρόλο στη συγκράτηση πολικών αναλυτών.
- **Οξύτητα** (α): Συναντάται και ως χ_d . Καλείται, επίσης, παράμετρος οξύτητας ή ιδιότητα δότη πρωτονίων ή μέτρο της τάσεως σχηματισμού Δ.Η. Είναι μέτρο της ικανότητας του διαλύτη να δρα σαν δότης σε Δ.Η. με βασικούς αναλύτες (δέκτες), ως εκ τούτου καθορίζει τη συγκράτηση βασικών δειγμάτων.
- **Βασικότητα** (β): Συναντάται και ως χ_e . Καλείται επίσης παράμετρος βασικότητας ή ιδιότητα δέκτη πρωτονίων ή μέτρο της τάσεως σχηματισμού Δ.Η. Είναι μέτρο της ικανότητας του διαλύτη να δρα σαν δέκτης σε Δ.Η. με όξινους αναλύτες (δότες), ως εκ τούτου καθορίζει τη συγκράτηση όξινων δειγμάτων.

Με βάση τις ιδιότητες αυτές (α, β, π^*) κατασκευάζονται τα «**τρίγωνα εκλεκτικότητας διαλυτών**» (βλ. εδάφιο 3.7.2.2), τα οποία αποτελούν πολύτιμα θεωρητικά εργαλεία και δρουν σαν γνώμονες στη προσπάθεια βελτίωσης της εκλεκτικότητας ενός διαχωρισμού. Σε αυτό το ιδιαίτερο σημείο του σταδίου method development, αναζητούνται κατάλληλοι διαλύτες οι οποίοι θα αντικαταστήσουν τον οργανικό τροποποιητή (**alternative solvents**) βελτιώνοντας τη συγκράτηση (k) και, κυρίως, το διαχωρισμό (R_s). Σε ό,τι αφορά τους χρησιμοποιούμενους διαλύτες, υπάρχει η δυνατότητα επιλογής πολυάριθμων κινητών φάσεων με βάση τις επιθυμητές ιδιότητες οι οποίες παρουσιάστηκαν

παραπάνω. Συνοπτικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι περισσότεροι διαλύτες της RP-HPLC αποτελούν εναλλακτικές λύσεις τριών βασικών επιλογών: του **THF**, της **MeOH** και του **ACN**. Κατά κανόνα, κάθε ένας από τους τρεις αυτούς διαλύτες οδηγεί σε πολύ αποδοτικούς διαχωρισμούς. Φυσικά, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός επιπλέον παραγόντων που πρέπει να συν-θεωρηθούν (είδος στήλης, θερμοκρασία, ροή, λανίχνευσης κλπ).



O
Water 10.2
 $\epsilon^\circ (C_{18}) = N/A$

CO
Methanol 5.1
 $\epsilon^\circ (C_{18}) = 1.0$

CC#N
Acetonitrile 5.8
 $\epsilon^\circ (C_{18}) = 3.1$

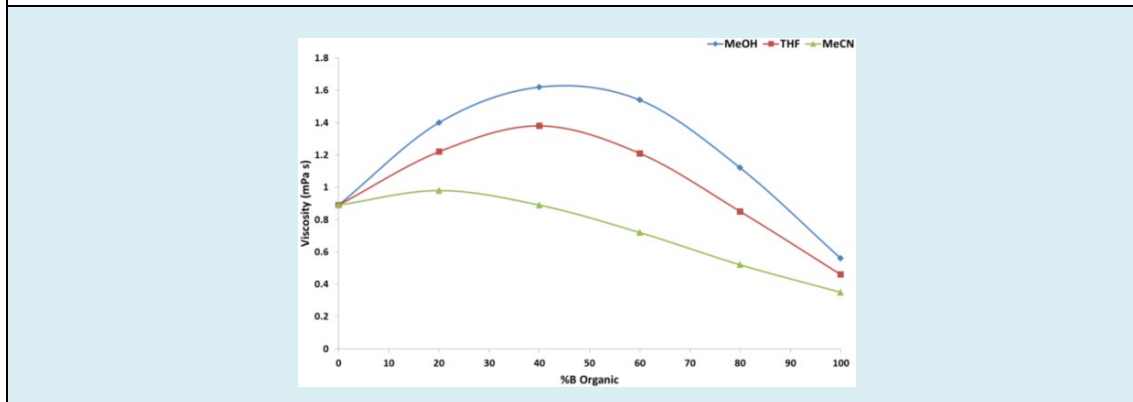
Solvent Properties

- Water
- Methanol
- Acetonitrile
- Tetrahydrofuran

\downarrow
Elution Strength
 \downarrow

\uparrow
Polarity
 \uparrow

C1CCOC1
Tetrahydrofuran (THF) 4.0
 $\epsilon^\circ (C_{18}) = 3.7$



Σχήμα 23: Επάνω: Η χημική δομή των μορίων (+) ενός διαλύτη καθορίζει τις ιδιότητές του (α, β, π^*) και την ευκολία (ταχύτητα) με την οποία αυτός μπορεί να εκλούσει τα μόρια των αναλυτών Z,Y,X που βρίσκονται σε **ισορροπία** με τη στατική φάση. Ο διαλύτης αλληλεπιδρά με **ξεχωριστό τρόπο** τόσο με τον κάθε αναλύτη όσο και με μια συγκεκριμένη στατική φάση⁶³.

Μέση: α Το νερό (υδατικό μέρος) και οι πιο κοινοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται ως οργανικοί τροποποιητές της κινητής φάσης στην RP-HPLC (συχνά συμβολίζονται ως %B). Αναγράφονται οι τιμές της **παραμέτρου πολικότητας P'** (δείκτης πολικότητας κατά Snyder⁷²) και της **εκλουστικής ισχύος ϵ^0** για μια στατική φάση C18⁶⁸ **β**) Μεταξύ των διαφόρων **επιθυμητών ιδιοτήτων** της κινητής φάσης είναι και η αποφυγή διαλυτών με υψηλά σημεία αποκοπής ($\lambda_{cutoffs}$) και διαλυτών που είναι βλαβεροί για τον άνθρωπο ή/και τοξικοί για το περιβάλλον (green chemistry)⁶⁸.

Κάτω: η χρήση **μιγμάτων οργανικών τροποποιητών** οδηγεί σε κινητή φάση μεγαλύτερου ιξώδους (άρα και σε μεγαλύτερη πίεση του χρωματογραφικού συστήματος) σε σύγκριση με τη χρήση καθαρών μορφών (π.χ. 100% MeOH, 100% ACN, 100% THF)⁶⁸.

3.3 Ασυμμετρία κορυφών (Peak asymmetry)^{61-63,68}

Το μοντέλο των θεωρητικών πλακών είναι ένα αμιγώς θεωρητικό μοντέλο για την αξιολόγηση της αποδοτικότητας μιας στήλης. Οι χρωματογραφικές κορυφές έχουν εύρος και αυτό σημαίνει ότι τα μόρια μιας ουσίας, αν και έχουν τον ίδιο παράγοντα χωρητικότητας (k), εντούτοις χρειάζονται διαφορετικό χρόνο για να μετακινηθούν μέσω της στήλης.

Ωστόσο, η θεωρία των πλακών δεν ερμηνεύει επαρκώς την επίδραση της ταχύτητας ροής (u) της κινητής φάσης και των διαφόρων χαρακτηριστικών της στήλης στη διεύρυνση μιας κορυφής, επομένως και στις παραμέτρους N, H. Έτσι, βασιζόμαστε στη θεωρία της ταχύτητας η οποία εξετάζει τη χρωματογραφική διεργασία σε πραγματικές συνθήκες, περιγράφοντας τη συμπεριφορά ενός ξεχωριστού μορίου του αναλύτη. Κάτω από πραγματικές (μη ιδανικές) συνθήκες, η διασπορά των μορίων μιας ουσίας μέσα στη στήλη αποκλίνει από τη διασπορά μιας κατανομής Gauss λόγω των διαφόρων θερμοδυναμικών και κινητικών διεργασιών. Ο χρόνος παραμονής τους παρουσιάζει υψηλή μεταβλητότητα και εξαρτάται από την τυχαία απόκτηση αρκετής θερμικής ενέργειας από το περιβάλλον του για να μεταφερθεί από τη μία φάση στην άλλη. Επομένως, η μέση U κάθε μορίου είναι διαφορετική.

Εκτός των παραπάνω απαιτήσεων για **οξείες κορυφές (narrow peaks)**, εξίσου σημαντική είναι η **συμμετρία (peak symmetry)** των κορυφών ενός χρωματογραφήματος. Στην πράξη, δεν παρατηρείται η ιδανική συμμετρία μιας κορυφής κατά Gauss. Οι ασύμμετρες κορυφές δυσχεραίνουν το έργο ενός ολοκληρωτή και οδηγούν σε ατελή και ανακριβή ολοκλήρωση μιας επιφάνειας (poor integrator performance). Αυτό συμβαίνει διότι η βασιζόμενη στα εμβαδά ποσοτικοποίηση εξαρτάται από τον καθορισμό των σωστών ορίων ολοκλήρωσης (integration limits).

3.3.1 Αξιολόγηση της ασυμμετρίας

Η πιο γνωστή έκφραση για την ποσοτικοποίηση και την αξιολόγηση της ασυμμετρίας είναι ο παράγοντας ασυμμετρίας, A_f ή A_s , ο οποίος υπολογίζεται στο 10% του ύψους (h) της κορυφής. Στο ύψος αυτό υπολογίζεται και το μέγεθος W_b , δηλαδή το εύρος μιας κορυφής. Ο παράγοντας ασυμμετρίας υπολογίζεται από τη σχέση

$$A_s = \frac{B}{A} \quad (3)$$

, όπου A είναι το πρόσθιο ήμισυ (leading half) της κορυφής υπολογισμένο στο 10% του ύψους της

και B είναι το ουραίο ήμισυ (trailing half) της κορυφής υπολογισμένο στο 10% του ύψους της

Ιδανικά, η τιμή του A_s πρέπει να εμπίπτει εντός της περιοχής 0,95-1,15. Αν $B \gg A$ τότε η κορυφή παρουσιάζει μια χαρακτηριστική «ουρά» και το φαινόμενο ονομάζεται tailing (Σχήμα 24α). Αν $A \gg B$ τότε μιλάμε για fronting (Σχήμα 24β). Μία ακόμη έκφραση για τον καθορισμό της ασυμμετρίας είναι ο παράγοντας tailing, T_f ή TF (Σχήμα 24), ο οποίος υπολογίζεται από μετρήσεις στο 5% του ύψους της κορυφής και δίνεται από τη σχέση

$$T_f = \frac{A+B}{2 \cdot A} \quad (4)$$

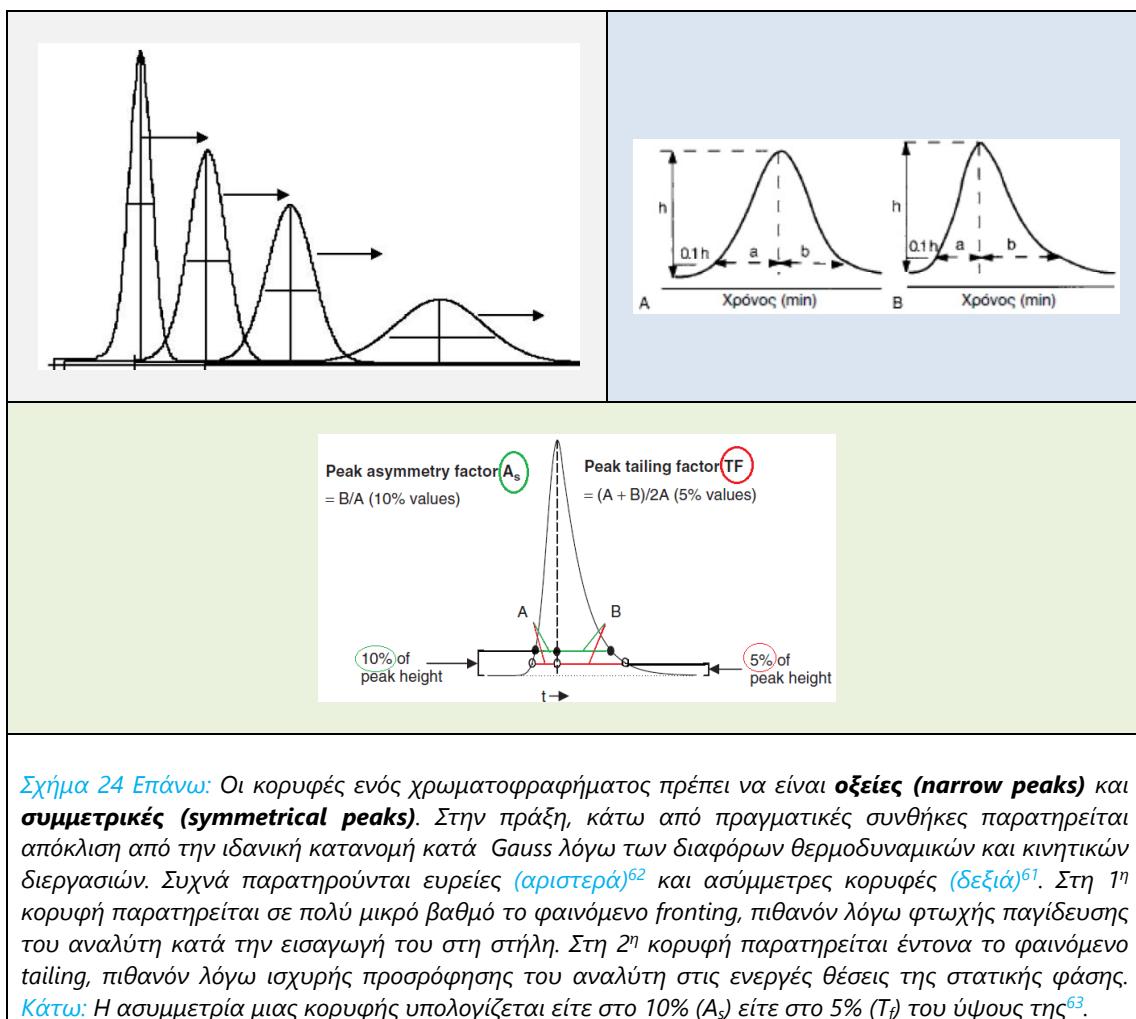
, όπου A είναι το πρόσθιο ήμισυ (leading half) της κορυφής υπολογισμένο στο 5% του ύψους της

και B είναι το ουραίο ήμισυ (trailing half) της κορυφής υπολογισμένο στο 5% του ύψους της

Επομένως, ο παράγοντας T_f σχετίζεται με το πλάτος $W_{0,05}$ της κορυφής. Γενικά, οι τιμές του παράγοντα ασυμμετρίας (A_s) και του παράγοντα tailing (T_f) είναι παρόμοιες και συνδέονται κατά προσέγγιση με τη σχέση

$$A_s \approx 1,5 * (T_f - 1) + 1 \quad (5)$$

Ως εκ τούτου, στη πράξη οι τιμές A_s είναι ελάχιστα μεγαλύτερες από τις τιμές T_f . (Σχήμα 25). Οι τιμές $A_s = 1$ και $T_f = 1$ αντιστοιχούν σε μία πλήρως συμμετρική κορυφή.



Σχήμα 24 **Επάνω:** Οι κορυφές ενός χρωματογραφήματος πρέπει να είναι **οξείες (narrow peaks)** και **συμμετρικές (symmetrical peaks)**. Στην πράξη, κάτω από πραγματικές συνθήκες παρατηρείται απόκλιση από την ιδανική κατανομή κατά Gauss λόγω των διαφόρων θερμοδυναμικών και κινητικών διεργασιών. Συχνά παρατηρούνται ευρείες (αριστερά)⁶² και ασύμμετρες κορυφές (δεξιά)⁶¹. Στη 1^η κορυφή παρατηρείται σε πολύ μικρό βαθμό το φαινόμενο fronting, πιθανόν λόγω φτωχής παγίδευσης του αναλύτη κατά την εισαγωγή του στη στήλη. Στη 2^η κορυφή παρατηρείται έντονα το φαινόμενο tailing, πιθανόν λόγω ισχυρής προσρόφησης του αναλύτη στις ενεργές θέσεις της στατικής φάσης. **Κάτω:** Η ασυμμετρία μιας κορυφής υπολογίζεται είτε στο 10% (A_s) είτε στο 5% (T_f) του ύψους της⁶³.

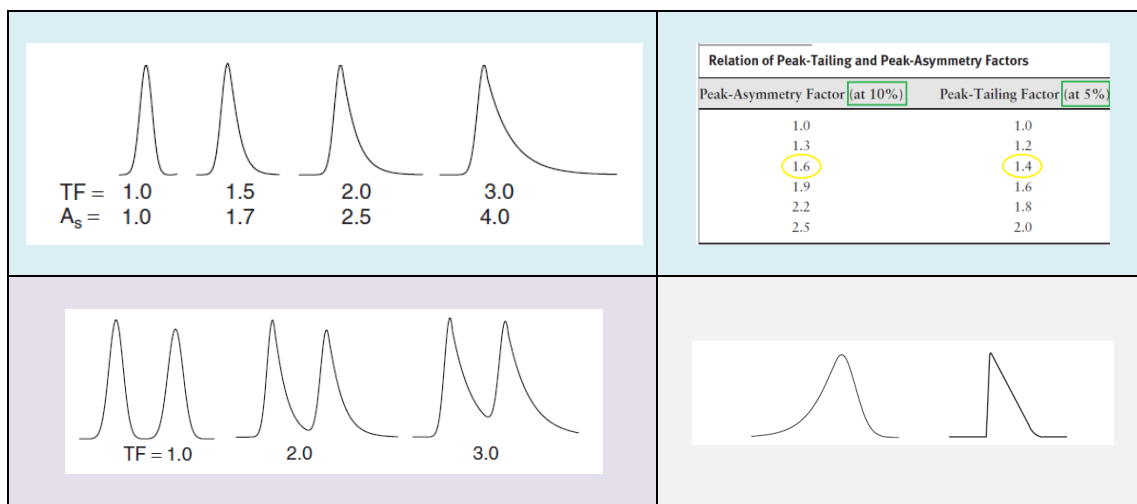
Η ασυμμετρία μιας κορυφής προκαλεί προβλήματα όχι μόνο στην **ολοκλήρωση** μιας επιφάνειας αλλά και στο **διαχωρισμό** δύο γειτονικών κορυφών (R_s), όπως φαίνεται στο κάτω μέρος του παρακάτω σχήματος (Σχήμα 25) όπου η αξιολόγηση της ασυμμετρίας έχει γίνει με τον παράγοντα T_f . Όταν $A_s = T_f = 1$ (πλήρως συμμετρικές κορυφές), τότε ο διαχωρισμός είναι πλήρης. Γενικά, όταν $T_f \leq 1,2$ η ασυμμετρία είναι ασήμαντη και έχει αμελητέα επίδραση στο διαχωρισμό, με εξαίρεση τις περιπτώσεις όπου οι δύο γειτονικές κορυφές διαφέρουν κατά πολλές τάξεις μεγέθους (π.χ. 1.000:1), όπως η κορυφή μιας δραστικής με τη κορυφή μιας πρόσμιξης.

Το φαινόμενο fronting ($T_f < 1$) είναι ένας πιο σπάνιος αλλά εξ ίσου κρίσιμος δυνητικός παράγοντας παρεμπόδισης ενός διαχωρισμού. Κατά κανόνα, στις συνήθεις αναλύσεις ρουτίνας επιδιώκεται μια τιμή $T_f \leq 1,5$ ($A_s \leq 1,75$) για όλες τις κορυφές. Όταν παρατηρείται $T_f = 2$ ή $T_f > 2$ (δηλαδή $A_s > 2,5$), τότε τόσο η ολοκλήρωση όσο και η ποσοτικοποίηση είναι σχεδόν ανέφικτες. Πρέπει να λαμβάνονται αμέσως μέτρα άρσης του φαινομένου, είτε πρόκειται για ανάλυση ρουτίνας είτε πρόκειται για διαδικασία ανάπτυξης μια μεθόδου (method development). Η ασυμμετρία των κορυφών συνήθως αποτελεί μία από τις

αποκρίσεις που εξετάζονται και καταγράφονται κατά τον έλεγχο καταλληλότητας συστήματος (system suitability measurements) (βλ. εδάφιο 3.7.2.2).

Σημείωση: Στον πειραματικό προσδιορισμό της παρούσας εργασίας, οι ουσίες ενδιαφέροντος (κιτρική βουταμιράτη & βενζοϊκό οξύ) διαχωρίστηκαν εξ' αρχής ικανοποιητικά ($R_s > 3,5$). Επομένως, δεν υπήρξε κίνδυνος αλληλοεπικάλυψης των κορυφών. Έτσι, δεν θεωρήθηκε ιδιαίτερα επιτακτική η ανάγκη μείωσης της ασυμμετρίας σε εξαιρετικά χαμηλές τιμές, παρά μόνο σε μια ενδεικτική τιμή-στόχο $\leq 1,6$ ώστε να μην επηρεάζεται η ακεραιότητα της ολοκλήρωσης.

Τέλος, είναι σημαντικό να αποσαφηνιστεί η διαφορά δύο ξεχωριστών ειδών ασυμμετρίας. Το **εκθετικό (exponential) tailing** χαρακτηρίζεται από μια σταδιακή «επιστροφή» της κορυφής στη γραμμή βάσης. Όλα τα παραπάνω παραδείγματα αφορούν στο εκθετικό tailing. Αντίθετα, το **tailing λόγω υπερφόρτωσης της στήλης (column-overload tailing)** οδηγεί σε μια «δεξιόμορφη απεικόνιση τριγώνου» (right-triangle appearance) για μια κορυφή και οφείλεται στην μεγάλη ποσότητα ή/ και στο μεγάλο μοριακό βάρος ενός δείγματος (sample-size effects, βλ. παράγραφο 2.5.3). Αυτό το είδος tailing μειώνεται με μείωση του όγκου ή του μοριακού βάρους του δείγματος. Αντίθετα, η ενέργεια αυτή ίσως να μην αλλάξει (ή ακόμα και να αυξήσει) το εκθετικό tailing. Επομένως, πριν ξεκινήσει μια προσπάθεια μείωσης της ασυμμετρίας είναι κρίσιμη η διαλεύκανση της προέλευσης της ασυμμετρίας.



Σχήμα 25: Επάνω: Το σχήμα μιας κορυφής ως συνάρτηση των τιμών A_s και T_f . Οι τιμές αυτές είναι παρόμοιες και συνδέονται μεταξύ τους με μια μαθηματική προσέγγιση⁶³.

Κάτω: Επίδραση της ασυμμετρίας στο διαχωρισμό γειτονικών κορυφών (αριστερά)⁶³. Το φαινόμενο fronting ($T_f < 1$) είναι ένας πιο σπάνιος αλλά εξ ίσου κρίσιμος δυνητικός παράγοντας παρεμπόδισης ενός διαχωρισμού, ενώ το φαινόμενο tailing λόγω υπερφόρτωσης της στήλης (column-overload tailing) οδηγεί σε μια «δεξιόμορφη απεικόνιση τριγώνου» (δεξιά)⁶³.

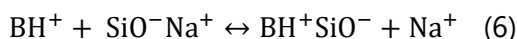
3.3.2 Αίτια πρόκλησης της ασυμμετρίας

Οι κορυφές με κακές ή/και μη αποδεκτές τιμές των παραγόντων A_s και T_f είναι δυνατόν να προκληθούν από τους εξής λόγους:

- Υπερφόρτωση της στήλης με δείγμα (πρόκληση column-overload tailing), βλ. παραγράφους 2.5.3 και 3.3.1.
- Αποικοδόμηση του δείγματος (π.χ. λόγω υψηλής θερμοκρασίας). Τα προϊόντα αποικοδόμησης (DPs) με παρόμοια δομή με την ουσία ενδιαφέροντος θα εκλουστούν σε παρόμοιους χρόνους με αυτή. Οι ανιχνευτές DAD (εδάφιο 2.5.4.2) προσφέρουν τη δυνατότητα του ελέγχου καθαρότητας (peak purity) μιας κορυφής.
- Ισχυρή (και συχνά μη αντιστρεπτή) προσρόφηση του αναλύτη στις ενεργές θέσεις της στατικής φάσης, λόγω της αλληλεπίδρασης των πολικών τμημάτων μιας ουσίας με τις ελεύθερες ομάδες Si-OH. Αντιμετωπίζεται με τη προσθήκη απενεργοποιητών στη κινητή φάση (βλ. παράγραφο 3.3.3).
- Φτωχή παγίδευση του αναλύτη κατά την εισαγωγή του στήλη. Σχετίζεται με τη πρόκληση του φαινομένου fronting και προκαλείται από αργή ένεση (έγχυση) του δείγματος. Η χρήση αυτόματων δειγματοληπτών σχεδόν εξαλείφει κάθε πιθανότητα «ανώμαλης» εισαγωγής του δείγματος.
- Υπερβολικό νεκρό όγκο (dead volume ή void volume, V_0) του χρωματογραφικού συστήματος. Με τον όρο **νεκρός όγκο** καλούμε **το μήκος και ο όγκος των σωληνώσεων** από το σημείο ένεσης του δείγματος μέχρι και τον ανιχνευτή, εντός του οποίου δεν πραγματοποιείται χρωματογραφικός διαχωρισμός. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει τα διάφορα τμήματα να συνδέονται μεταξύ τους με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται ο όγκος μεταξύ του σημείου εισαγωγής του δείγματος (βαλβίδα εισαγωγής) και της κεφαλής της στήλης, αλλά και μεταξύ της εξόδου της στήλης και του σημείου εισαγωγής του δείγματος στην κυψελίδα του ανιχνευτή. Γενικά, η στήλη συνδέεται τόσο με τη σύστημα εισαγωγής του δείγματος όσο και με τον ανιχνευτή με στενές σωληνώσεις εσωτερικής διαμέτρου $\sim 0,2$ mm. Ένας εναλλακτικός ορισμός του νεκρού όγκου είναι ο όγκος της κινητής φάσης που απαιτείται για να διαλύσει και εν συνεχεία να εκλούσει ένα μη συγκρατούμενο συστατικό.

3.3.3 Αντιμέτωπιση της ασυμμετρίας στους διαχωρισμούς βασικών ενώσεων

Οι **όξινοι αναλύτες** που φέρουν φορτίο (dissociated/ionized acids) εκκλούνται σχετικά γρήγορα από μια στήλη κατά της διάρκεια ενός διαχωρισμού RP-HPLC. Αντίθετα, οι φορτισμένοι **βασικοί αναλύτες** (protonated bases) κατακρατούνται πολύ πιο έντονα από τη στατική φάση και συχνά παρουσιάζουν μια μη αντιστρεπτή (και φυσικά ανεπιθύμητη) προσρόφηση σε αυτή. Αυτή η χρωματογραφική συμπεριφορά οφείλεται στις ανεπιθύμητες δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις με τις τυχόν ελεύθερες σιλανόλες (residual silanol groups) της «βάσης» του πληρωτικού υλικού (συνήθως σίλικα) ([Σχήμα 26](#)), όπως έχει αναλυθεί λεπτομερώς στο εδάφιο 2.4.2.2. Η αντίδραση ανταλλαγής ιόντων που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:



,αν υποθέσουμε ότι έχει χρησιμοποιηθεί ένα ρυθμιστικό διάλυμα μετά νατρίου άλατος, όπως π.χ. το $(\text{NaH}_2\text{PO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$ που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία.

Οι «ελεύθερες σιλανόλες» (σιλανόλες χωρίς Δ.Η) είναι σχετικά πιο όξινες από τις υπόλοιπες και σχετίζονται με χαμηλές τιμές θεωρητικών πλακών (N) και αυξημένη ασυμμετρία κορυφών (peak tailing) στο διαχωρισμό βασικών αναλυτών. Ακόμη, είδαμε ότι τα μεταλλικά ιόντα είναι προσμίξεις οι οποίες μειώνουν το βαθμό καθαρότητας και αυξάνουν την οξύτητα της πηκτής, αφαιρώντας e^- δια της έλξης από το άτομο του οξυγόνου. Έτσι δυσχεραίνεται η επίστρωση (coating) με σιλάνια και αυξάνεται η πιθανότητα παράπλευρων αντιδράσεων με τους αναλύτες. Αυτό οδηγεί σε μη επαναλήψιμους διαχωρισμούς. Γι' αυτό το λόγο επιδιώκεται η χρήση στηλών υψηλής καθαρότητας (type B-silica).

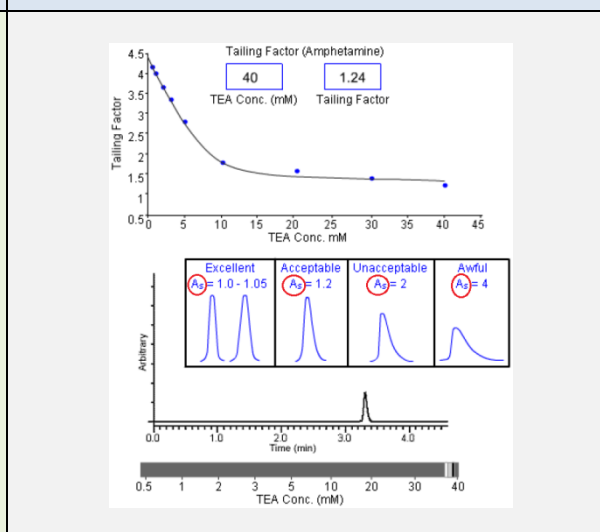
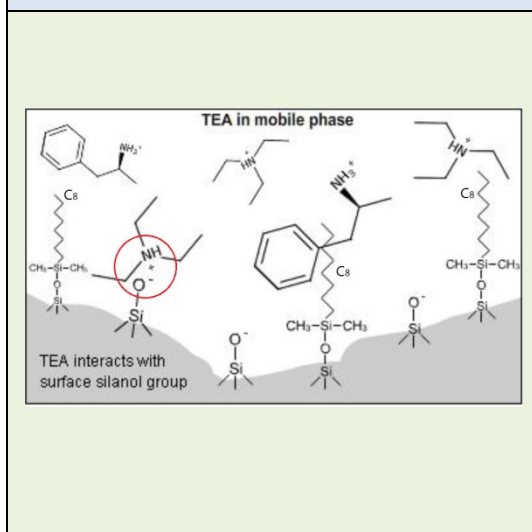
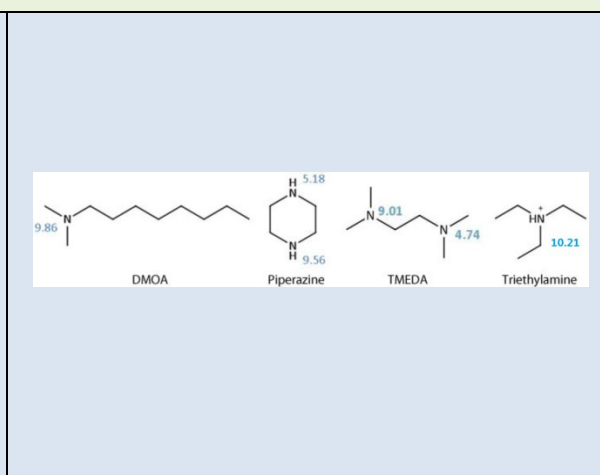
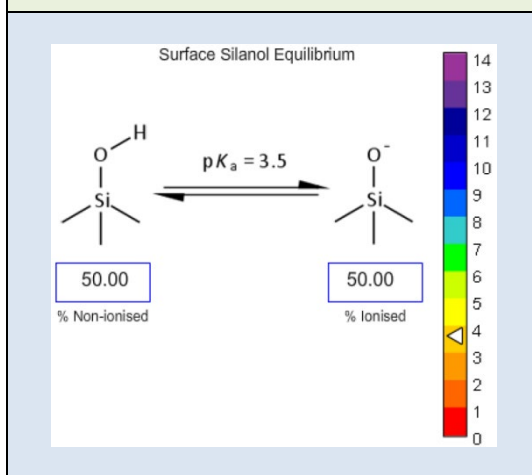
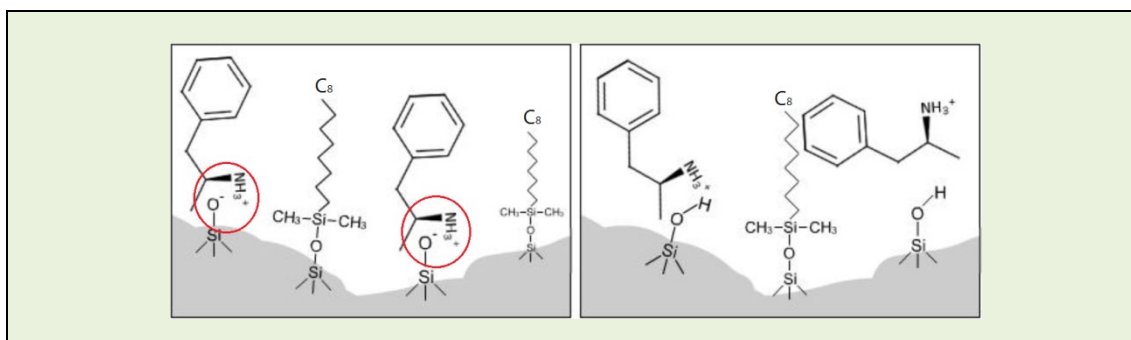
Για την παρασκευή επιφανειών τύπου B οι κατασκευαστές πραγματοποιούν **πλήρη υδροξυλίωση** της επιφάνειας της σίλικα πριν από τη **χημική κατεργασία της σιλανοποίησης**. Έτσι, ένα πολύ μεγάλο ποσοστό της επιφάνειας καθίσταται ομοιογενές και στη κατάσταση χαμηλής ενέργειας (geminal και vicinal δομές), όπου η πυκνότητα των όξινων ομάδων Si-OH έχει μειωθεί σημαντικά. Επιπλέον, το όξινο αυτό βήμα της υδροξυλίωσης μειώνει σημαντικά τις μεταλλικές προσμίξεις σε επίπεδα κάτω των 3 ppm. Τα τελευταία χρόνια είναι εμπορικά διαθέσιμες διάφορες επικαλυμμένες φάσεις υψηλής καθαρότητας (σχεδόν πλήρως επικαλυμμένες φάσεις). Ακόμη, όπως αναλύσαμε σε προηγούμενα μέρη, συχνά πραγματοποιείται μια επιπλέον αντίδραση (παραγωγοποίηση) η οποία είναι γνωστή ως **ακροκάλυψη (end-capping)**. Ενίοτε, η διαδικασία της ακροκάλυψης πραγματοποιείται εις διπλούν (double end-capped stationary phases). Το πιο γνωστό αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται είναι το χλωροτριμεθυλοσιλάνιο (TMS), ένα μικρό, δραστικό και ευκίνητο σιλάνιο (silylating reagent) το οποίο λόγω

του μικρότερου μεγέθους του δεσμεύει πολλές από τις σιλανολικές ομάδες που δεν αντέδρασαν. Έτσι, τα σχετικά με τη συγκράτηση μεγέθη (t_R , k) επηρεάζονται σχεδόν αποκλειστικά από τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις των αναλυτών με τις δύο φάσεις.

Στην πράξη, ακόμη και η διαδικασία end-capping δεσμεύει τις ελεύθερες σιλανόλες μόνο κατά περίπου 20-30%. Αυτό σημαίνει ότι οι ανεπιθύμητες αντιδράσεις με τις πολικές ομάδες των βασικών αναλυτών (silanol-solutes interactions) δεν εξαλείφονται πλήρως. Ως εκ τούτου, οι διαχωρισμοί των βασικών αναλυτών (weak bases) εΐθισται να πραγματοποιούνται σε χαμηλές τιμές pH ώστε οι όποιες τυχόν ελεύθερες σιλανόλες να βρίσκονται σε μη ιοντισμένη κατάσταση ($pK_a \approx 3,5$). Παρόλα αυτά, **η έντονη μεταλλική μόλυνση (ιόντα M^+) οδηγεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις $[Si-O^-]$ σε όλες τις τιμές pH.** Η αύξηση του pH της κινητής φάσης ώστε να κυριαρχήσει η ουδέτερη μορφή των αναλυτών (**ion suppression**) δε συνηθίζεται διότι οι στατικές φάσεις χημικά τροποποιημένης πυριτικής πηκτής χρησιμοποιούνται σε μια σχετικά περιορισμένη κλίμακα pH η οποία εκτείνεται μεταξύ 2-7,5 (pK_a βουταμιράτης = 9,41), αν και πλέον υπάρχουν εναλλακτικές στήλες αντοχής σε ακραία pH π.χ. πολυμερείς στήλες.

Ο βαθμός ιοντισμού μιας ομάδας Si-OH επηρεάζει άμεσα τη συμμετρία της κορυφής ενός βασικού μορίου (π.χ. κιτρική βουταμιράτη). Σε pH=3,5 οι ελεύθερες σιλανόλες βρίσκονται κατά ~50% στη μορφή Si-OH και κατά ~50% στη μορφή Si-O⁻ (Σχήμα 26). Φυσικά, όσο το pH μειώνεται, η επιθυμητή ουδέτερη μορφή κυριαρχεί (~100% για pH<1,5). Παρ' όλα αυτά, δε θα πρέπει να ξεχνάμε ότι οι στατικές φάσεις (ειδικά οι χημικά συνδεδεμένες) είναι **εξαιρετικά ευαίσθητες** σε πολύ όξινα διαλύματα. Αντί αυτού, η πιο κοινή στρατηγική είναι η επιλογή ενός **χαμηλού αλλά όχι ακραίου pH** και η προσθήκη ειδικών ενώσεων οι οποίοι μπορούν να **επιδρούν** επί των ελεύθερων -OH και να **συναγωνίζονται** την ισχυρή και ίσως μη αντιστρεπτή δέσμευση (προσρόφηση) των βασικών αναλυτών. Οι πιο γνωστοί απενεργοποιητές είναι συγκεκριμένες βάσεις μικρού μεγέθους (**sacrificial bases**) (Σχήμα 26) οι οποίες προστίθενται σε μικρές αλλά ικανοποιητικές ποσότητες, ώστε να διασφαλιστεί η απενεργοποίηση (deactivation) της βασισμένης στη σίλικα επιφάνειας κάθε χρονική στιγμή. Ωστόσο, αξίζει να τονιστεί ότι η χρήση των βάσεων αυτών μπορεί να αυξήσει σημαντικά τον απαιτούμενο χρόνο εξισορρόπησης της στήλης. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η βάση τριαιθυλαμίνη, $N(Et)_3$ ή αλλιώς TEA, σε ποσοστό 1%.

Σημείωση: Η έκταση του **tailing** δύναται να επηρεαστεί από τη φύση του διαλύτη. Γενικά, τις καλύτερες επιλογές αποτελούν η MeOH και το THF. Ακολουθεί το ACN. Επίσης, το **tailing** κατά κανόνα μειώνεται όταν χρησιμοποιούνται υψηλές θερμοκρασίες και όταν αυξάνεται το οργανικό ποσοστό (% B) διότι μειώνονται οι τιμές των σταθερών k . Τέλος, τα ιόντα K^+ , Li^+ , NH_4^+ των ρυθμιστικών αλάτων, είναι πιο αποτελεσματικά από τα ιόντα Na^+ στον ανταγωνισμό με τους αναλύτες για την αντίδραση με τις σιλανόλες (**silanols suppressing**).



Σχήμα 26: Επάνω⁶⁸: Δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις μορίων αμφεταμίνης με τις ελεύθερες σιλανόλες (*residual silanol groups*) της «βάσης» του πληρωτικού υλικού, το οποίο είναι μια οκτυλιωμένη πηκτική πυριτίας (C8). Οι αντιδράσεις αυτές αποφεύγονται όταν οι σιλανόλες βρίσκονται στην ουδέτερη (μη ιοντισμένη) μορφή (δεξιά).

Μέση⁶⁸: Η επίδραση του pH της κινητής φάσης στο **βαθμό ιοντισμού μιας σιλανόλης**. Σε pH=3,5 οι ελεύθερες σιλανόλες βρίσκονται κατά ~50% στη μορφή Si-OH και κατά ~50% στη μορφή Si-O⁻ (αριστερά). Ευρέως χρησιμοποιούμενες βάσεις (**sacrificial bases**) που χρησιμοποιούνται για την απενεργοποίηση της σίλικα, δηλαδή τη δέσμευση των ελεύθερων ομάδων Si-OH (δεξιά).

Κάτω⁶⁸: Η TEA ανταγωνίζεται τα μόρια του βασικού αναλύτη αμφεταμίνη για την αλληλεπίδραση με τις ελεύθερες Si-OH (αριστερά). Βελτίωση της ασυμμετρίας της κορυφής της αμφεταμίνης ($pK_a=10,01$) με τη προσθήκη TEA ($pK_a=10,21$). Με την αύξηση του % ποσοστού της TEA η ασυμμετρία μειώνεται μέχρι που φτάνει σε ένα plateau, όπου έχει γίνει σχεδόν πλήρης δέσμευση των ελεύθερων σιλανολών (δεξιά). Οι τιμές υπολογίστηκαν με τη χρήση ειδικού λογισμικού.

3.4 Ρυθμιστικά διαλύματα στη RP-HPLC - κριτήρια επιλογής^{63,68}

Στους διαχωρισμούς μορίων που φέρουν κέντρα ιοντισμού (ασθενή οξέα και ασθενείς βάσεις), ο αυστηρός έλεγχος του pH της κινητής φάσης είναι απαραίτητος προκειμένου να επιτυγχάνονται επαναλήψιμες χρωματογραφικές συμπεριφορές (συγκράτηση, εκλεκτικότητα, βαθμός διαχωρισμού). Η απαίτηση για σαφή καθορισμό του pH γίνεται κατανοητή αν αναλογιστούμε ότι όταν ένας αναλύτης (όξινος ή βασικός) είναι ιοντισμένος κατά 50%, τότε μια ενδεχόμενη αλλαγή της τάξεως των 0,1 μονάδων στο pH θα επέφερε κατά προσέγγιση μια αλλαγή της τάξεως του 10% στη σταθερά k . Αυτή η μεταβολή δύναται να είχε αντίκτυπο στο διαχωρισμό (R_s) έως και $\pm 2,5$ μονάδες. Το τελευταίο σημαίνει ότι θα μπορούσαμε να περάσουμε από μια κατάσταση οριακού διαχωρισμού ($R_s \geq 1,5$) σε μια κατάσταση πλήρους επικάλυψης ($R_s = 0$).

Οι ανεπιθύμητες αλλαγές στο pH της κινητής φάσης συνήθως προκύπτουν όταν έρχεται σε επαφή ο διαλύτης του δείγματος (sample diluent) με τη κινητή φάση στη κορυφή της στήλης, κατά την εισαγωγή του δείγματος. Ακόμη, μια δυνητική αιτία είναι η εξάτμιση του οργανικού διαλύτη (% B) όταν η κινητή φάση παρασκευάζεται από πριν (hand-mixed) αλλά και η είσοδος (και διαλυτοποίηση) CO_2 της ατμόσφαιρας.

Κατά την εκλογή ενός συγκεκριμένου άλατος, το βασικό κριτήριο επιλογής είναι η σταθερά ιοντισμού pK_a η οποία θα καθορίσει τη ρυθμιστική ικανότητα (buffering capacity). Φυσικά, υπάρχουν πρόσθετοι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη. Συνοπτικά, τα κριτήρια επιλογής είναι τα εξής:

- **Ρυθμιστική ικανότητα** (buffering capacity): Ορίζεται ως η ικανότητα του ρυθμιστικού διαλύματος να ανθίσταται στις αλλαγές που αναφέρθηκαν πιο πάνω και να διατηρεί πρακτικά σταθερό το pH του διαλύτη. Η μέγιστη ικανότητα σταθεροποίησης (maximum buffering) προκύπτει όταν ισχύει ότι $\text{pH}_{\text{κινητής φάσης}} = pK_a$ ρυθμιστικού διαλύματος, δηλαδή ισχύει ότι $\text{HA} = \text{A}^-$ για τα συστατικά του άλατος. Η ικανότητα αυτή μειώνεται όσο αυξάνεται η διαφορά των τιμών των δύο παραπάνω σταθερών. Επομένως, η σημαντικότερη απαίτηση για την επιλογή ενός άλατος είναι η ότι η διαφορά της σταθεράς pK_a από το pH που έχει επιλεγεί, θα πρέπει να είναι το πολύ ± 1 μονάδα (ελαστικά $\pm 1,5$ μονάδα αν η συγκέντρωση του άλατος είναι μεγάλη). Έτσι, με βάση τη σταθερά pK_a ορίζεται το εύρος δράσης του άλατος (pH operating range). Κάποια άλατα φέρουν παραπάνω από ένα όξινα πρωτόνια (π.χ. NaH_2PO_4) και δίστανται σε δύο ή και τρία στάδια. Επομένως, είναι κατάλληλα για τη ρύθμιση του pH ανάμεσα σε δύο ή τρία διαφορετικά εύρη τιμών.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ρυθμιστική ικανότητα αυξάνεται περαιτέρω όσο μεγαλώνει η διαφορά της σταθεράς pK_a αναλύτη και του pH που έχει επιλεγεί (θα παρατηρείται το $\sim 100\%$ των μονομερών μορφών HA ή A^- για τον αναλύτη), όσο ελαττώνεται ο όγκος ένεσης και όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του άλατος. Η

συγκέντρωση ενός άλατος συνήθως κυμαίνεται από 5 έως 100 mM. Κατά κανόνα, **η αύξηση της συγκέντρωσης ενός άλατος βελτιώνει το διαχωρισμό και τη συμμετρία των κορυφών**. Αυτό συμβαίνει διότι αυξάνεται η ιονική ισχύς της κινητής φάσης και αυτό καταστέλλει τις ανεπιθύμητες αντιδράσεις ανταλλαγής ιόντων (ion exchange interactions) μεταξύ των ομάδων Si-OH και των βασικών αναλυτών στη μορφή BH⁺ (σχέση No 6). Ωστόσο, σε κινητές φάσεις χαμηλού pH (pH=3 για το υδατικό μέρος στην παρούσα εργασία) και ειδικά όταν χρησιμοποιούνται στήλες τύπου B (υψηλής καθαρότητας), το μέγεθος C_{άλατος} δε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Επιπλέον, η συγκράτηση είναι ένα πολύπλευρο φαινόμενο και η αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης ενδέχεται να επηρεάσει διαφορετικά τις σταθερές k σε ένα σύνολο αναλυτών διαφορετικής χημικής δομής. Τέλος, σε τιμές < 10 mM η C_{άλατος} έχει αμελητέα επίδραση στο διαχωρισμό.

Το παρακάτω σχήμα (Σχήμα 27) αφορά μια στατική φάση και ένα άλας όμοια με αυτά της παρούσας εργασίας. Παρά την υψηλή τιμή της C_{άλατος} (50 mM), η κορυφή παρουσιάζει ασυμμετρία (tailing) για pH=3, ενώ κατά τη μετάβαση στις τιμές 3,5 και 4 παρατηρείται έντονο fronting. Αυτό συμβαίνει διότι είναι pK_a αναλύτη=3,8 και pK_a ρυθμιστικού διαλύματος=2,1. Ως εκ τούτου, όσο το pH αυξάνεται σε τιμές πάνω από το 3, η διαφορά και pK_a ρυθμιστικού διαλύματος /pH μεγαλώνει ενώ η διαφορά pK_a αναλύτη /pH μικραίνει. Αυτός ο συνδυασμός οδηγεί σε μειωμένη ρυθμιστική ικανότητα.

- **Διαλυτότητα** (buffer solubility): Σε αντίθεση με τα οργανικά, τα ανόργανα ρυθμιστικά διαλύματα έχουν μειωμένη διαλυτότητα σε κινητές φάσεις οι οποίες είναι κυρίως οργανικές (μεγάλο % ποσοστό οργανικών τροποποιητών B) λόγω σημαντικών αλλαγών στη σταθερά pK_a. Είναι απαραίτητη η διεξαγωγή προκαταρκτικών ελέγχων προ-ανάμιξης διαφόρων ποσοστών όγκων %B με όγκους άλατος ώστε να διαπιστωθεί η εμφάνιση θολερότητας και η κατακρήμνιση (ή μη) ιζήματος. Διαφορετικά, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος καταστροφής της στήλης και του χρωματογραφικού συστήματος γενικότερα. Η διαλυτότητα αφορά κυρίως τα ανόργανα διαλύματα και ειδικά τα φωσφορικά. Όσο αυξάνεται η ιονική ισχύς (δηλαδή η συγκέντρωση του άλατος), τόσο αυξάνεται το φορτίο (H₂PO₄⁻ ↔ HPO₄²⁻) και η διαλυτότητα του άλατος στη κινητή φάση μειώνεται. Παρόλα αυτά, στους ισοκρατικούς διαχωρισμούς ιοντικών ενώσεων το οργανικό ποσοστό (% B) δεν είναι μεγάλο. Σε επίπεδα κάτω του 60%, συνήθως δε δημιουργούνται ζητήματα διαλυτότητας.
- **Σταθερότητα και συμβατότητα με τον εξοπλισμό** (stability & compatibility): Τα ανόργανα ρυθμιστικά διαλύματα είναι αρκετά σταθερά σε σύγκριση με άλλα υδατικά διαλύματα όπως αυτά των αμινών. Για παράδειγμα, η TEA (δεν απορροφά σε λ ≥ 200 nm) είναι επιρρεπής σε οξείδωση και επακόλουθη

αύξηση της απορρόφησης σε μήκη κύματος < 250 nm. Ακόμη, κάποια άλατα (π.χ. κιτρικά) διαβρώνουν τις ανοξειδωτες στήλες, αν δεν πραγματοποιηθεί επαρκής έκπλυση. Γενικά, πέραν από το υδατικό μέρος (ανόργανο ή οργανικό άλας), θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η σταθερότητα όλων των χρησιμοποιούμενων χημικών ειδών (νερό HPLC grade, οργανικοί διαλύτες HPLC grade κλπ) (Σχήμα 27).

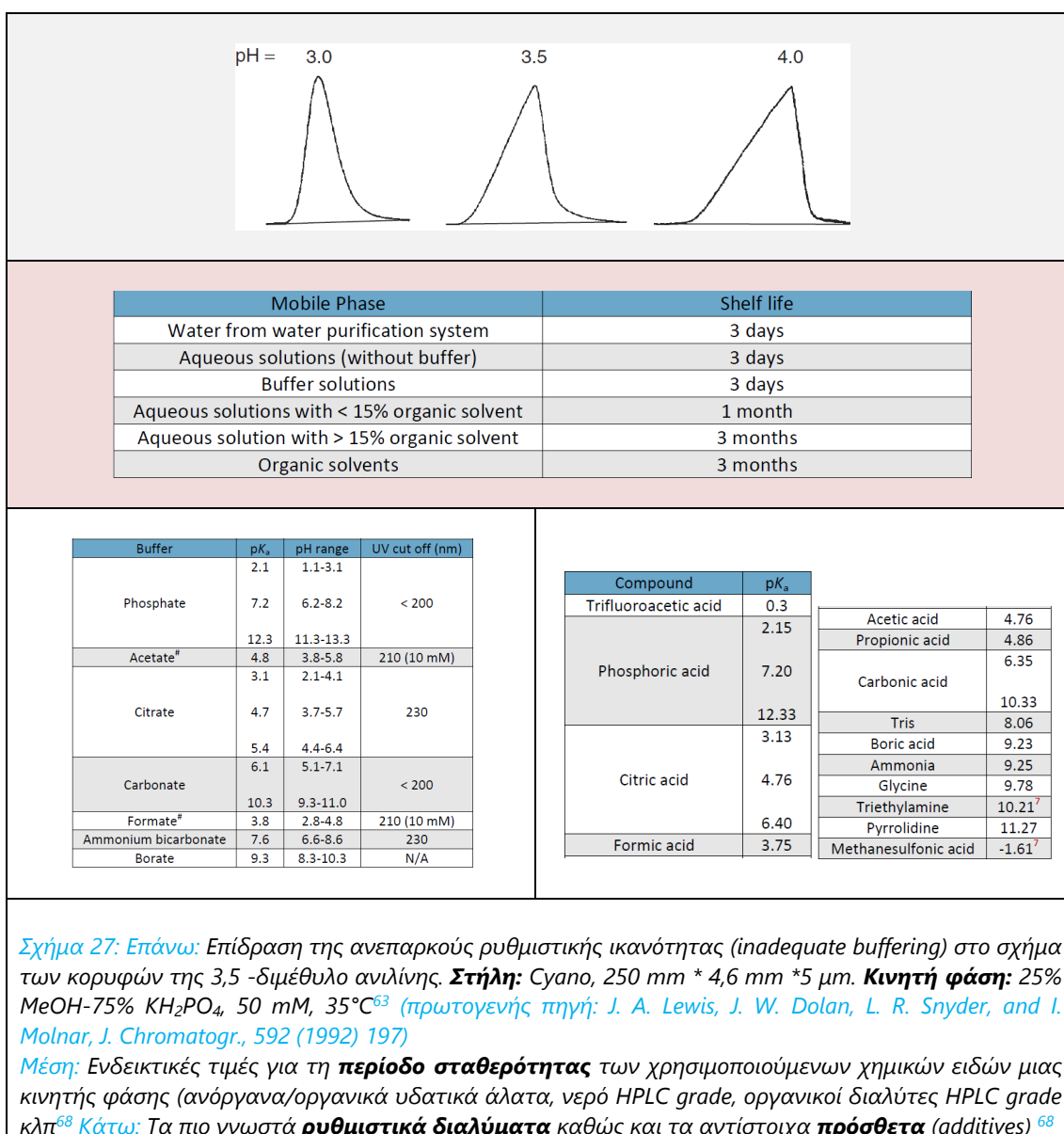
- **Συμπεριφορά απέναντι στον ανιχνευτή** (detector requirements): Σχετικά με την απορρόφηση στο UV-Vis, αυτή είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του άλατος. Έτσι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση, η συνολική απορρόφηση της κινητής φάσης (μίγμα υδατικού άλατος με οργανικό διαλύτη) μπορεί να αυξηθεί σημαντικά. Επομένως, κρίνεται απαραίτητη η χρήση αλάτων με χαμηλά σημεία αποκοπής (cutoffs).
- **Σχηματισμός ιόντων με τον αναλύτη** (ion-pairing): Πέραν του καθορισμού της κινητής φάσης, τα ιοντισμένα ιόντα του αλατος X^+ ή X^- είναι δυνατόν να αντιδράσουν με τις αντίστοιχες μορφές A^- και BH^+ των αναλυτών και να δώσουν τις υδρόφοβες (και περισσότερο κατακρατούμενες μορφές) AX και BHX . Η διεργασία αυτή αφορά κυρίως τα οργανικά άλατα (π.χ. TFA) ενώ συμβαίνει σε ελάχιστο βαθμό στα φωσφορικά άλατα.

Τα ρυθμιστικά διαλύματα αποτελούνται από ένα ασθενές οξύ ή μια ασθενή βάση τα οποία συνυπάρχουν διαλυμένα με το αντίστοιχο άλας τους (π.χ. $CH_3COOH/CH_3COO^-Na^+$). Για τη παρασκευή ενός διαλύματος συγκεκριμένης συγκέντρωσης (mM), μια υπολογισμένη ποσότητα άλατος διαλύεται στο νερό και στη συνέχεια το pH ρυθμίζεται επ' ακριβώς με την υπό ανάδευση προσθήκη του αντίστοιχου ασθενούς οξέος ή ασθενούς βάσης. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το δισόξινο φωσφορικό νάτριο στη μονοϋδρική του μορφή, $(NaH_2PO_4) \cdot H_2O$, ενώ για την ρύθμιση του pH του διαλύματος χρησιμοποιήθηκε φωσφορικό οξύ (H_3PO_4). Τα πιο γνωστά ρυθμιστικά καθώς και τα αντίστοιχα πρόσθετα (additives) παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 27).

Σημείωση: Αν η παρασκευή του ρυθμιστικού υδατικού διαλύματος γίνει παρουσία του οργανικού μέρους (% B), τότε η μέτρηση του pHμέτρου δε θα είναι ικανοποιητικά ακριβής. Το ηλεκτρόδιο απόκρισης τείνει να «ολισθαίνει» σε μη καθαρά υδατικά διαλύματα. **Γι' αυτό το λόγο συνηθίζεται η ρύθμιση του pH να γίνεται στο υδατικό μέρος (% A) πριν τη προσθήκη του οργανικού διαλύτη προς σχηματισμό της τελικής κινητής φάσης.** Άλλωστε, όπως είδαμε στη παράγραφο 2.5.2, οι σύγχρονες διατάξεις HPLC διαθέτουν θαλάμους ανάμιξης και απαέρωσης διαλυτών όπου η κινητή φάση συντίθεται αυτόματα (on-line blended) την ώρα της ανάλυσης. Φυσικά, μετά την ανάμιξη του υδατικού διαλύματος με τον οργανικό διαλύτη (π.χ. MeOH), η τιμή του pH θα αλλάξει. Ωστόσο, εφόσον τα

ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάζονται με τον ίδιο τρόπο ΣΕ ΟΛΑ τα στάδια της ανάπτυξης και επικύρωσης της μεθόδου, αυτή η μεταβολή πρακτικά δε θεωρείται κρίσιμη στις αναλύσεις ρουτίνας (ίδια επίπεδα ιοντισμού, παρόμοια συγκράτηση). Στα συνήθη διαλύματα αλάτων (π.χ. φωσφορικό άλας) η προσθήκη οργανικού διαλύτη καταστέλλει τον ιοντισμό, μειώνοντας τη συγκέντρωση των H⁺. **Κατά προσέγγιση, αν ο οργανικός διαλύτης καταλάβει το 50% της κινητής φάσης, το pH θα αυξηθεί κατά 1-1,5 μονάδα.**

Για μείωση των πιθανοτήτων ανεπαρκούς ρυθμιστικής ικανότητας, ειδικά όταν έχουμε χαμηλές C_{άλατος}, είθισται ο διαλύτης έγχυσης του δείγματος (**diluent**) να είναι η κινητή φάση. Η διαλυτότητα αυξάνεται όσο περνάμε από τα μετά νατρίου άλατα στα μετά καλίου και ακόμη περισσότερο στα μετά αμμωνίου άλατα.



3.5 Ο ρόλος της θερμοκρασίας στη RP-HPLC^{63,68}

Η θερμοκρασία είναι ένας κρίσιμος παράγοντας στη χρωματογραφία RP-HPLC αλλά και στην HPLC γενικότερα, διότι επηρεάζει σημαντικά την συγκράτηση των αναλυτών και την εκλεκτικότητα ενός διαχωρισμού. Αυτό συμβαίνει διότι οι σταθερές pK_a των **αναλυτών** και των **ρυθμιστικών αλάτων** μεταβάλλονται ανάλογα με τη θερμοκρασία, κάτι που παρατηρείται επίσης μετά από μεταβολές στο ποσοστό του οργανικού διαλύτη (% B). Είναι επομένως φανερό ότι η ρύθμιση της θερμοκρασίας είναι πολύ κρίσιμη για δείγματα αναλυτών με κέντρα ιοντισμού. Συχνά απαιτείται θερμοστάτηση ακριβείας. Ωστόσο, οι αλλαγές στη θερμοκρασία πρέπει να εξετάζονται με ιδιαίτερη προσοχή διότι μπορεί να επιφέρουν καταστροφικές συνέπειες για τη λειτουργία του χρωματογραφικού συστήματος. Είναι απαραίτητη η συν-θεώρηση των διαφόρων πρακτικών ζητημάτων που ανακύπτουν.

Για τα περισσότερα δείγματα και για συνήθεις συνθήκες ανάλυσης, η μέση χρωματογραφική συμπεριφορά ενός αναλύτη σχετίζεται με τη θερμοκρασία μέσω της σχέσης Van't Hoff:

$$\log k = A + B/T_K \quad (7)$$

, όπου A, B είναι σταθερές εξαρτώμενες από τη θερμοκρασία (για δεδομένο αναλύτη και για μηδενική μεταβολή στις υπόλοιπες συνθήκες) και T_K η θερμοκρασία σε Kelvin. Για αυξανόμενες τιμές της θερμοκρασίας (θετικό πρόσημο της σταθεράς B) η σταθερά k **συνήθως μειώνεται** (1-2 % μείωση για κάθε 1 °C). Για παράδειγμα, μια αύξηση κατά 50 °C θα επέφερε σχεδόν υποδιπλασιασμό της σταθεράς k. Αυτό συμβαίνει διότι πέραν των μεταβολών στο βαθμό ιοντισμού, ελαττώνεται η συνεισφορά του όρου C της εξίσωσης Van Deemter, δηλαδή της αντίστασης στη μεταφορά μάζας π.χ. διευκολύνεται η μετακίνηση των μορίων εντός και εκτός των πόρων.

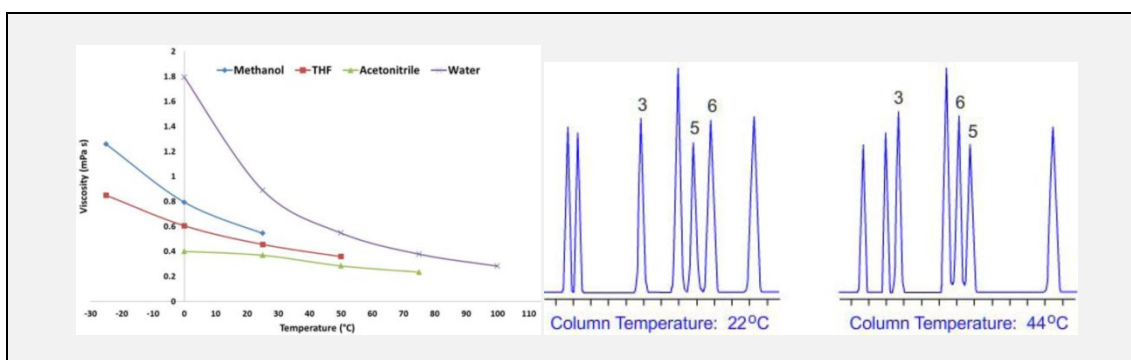
Ωστόσο, οι **αποκλίσεις** από τη παραπάνω σχέση είναι πολύ συχνές και οφείλονται στη διαφορετική επίδραση της θερμοκρασίας στον ιοντισμό του αναλύτη (ή στη χημική διαμόρφωση του αναλύτη γενικότερα) και στη στατική φάση. Ανάλογα με τη δομή των αναλυτών, ο βαθμός διαχωρισμού (R_s) μπορεί επίσης είτε να μειωθεί είτε να αυξηθεί. Για τις πρωτονιομένες βάσεις όπως η βουταμιράτη, η αύξηση της θερμοκρασίας επιφέρει μείωση της pK_a και συνεπώς μείωση του ιοντισμού και σχετική αύξηση της συγκράτησης. Στην πράξη δεν υπάρχουν κατευθυντήριες γραμμές για τη «διόρθωση» των τιμών των σταθερών pK_a για κάθε μεταβολή της θερμοκρασίας. Ωστόσο, στη πλειοψηφία των διαχωρισμών, η θερμοκρασία σπάνια ποικίλει εντός ευρείας κλίμακας (συνήθως δεν ξεπερνάει τους 50°C). Επομένως, η απόκλιση από τις τιμές pK_a της

βιβλιογραφίας να μην συμβαίνει, αλλά θεωρείται αμελητέα.

Σε ό,τι αφορά τα πιο **πρακτικά ζητήματα**, η αύξηση της θερμοκρασίας μειώνει **το ιξώδες των διαλυτών** και αυτό προκαλεί τη συνολική μείωση της πίεσης του χρωματογραφικού συστήματος. Το τελευταίο δύναται να οδηγήσει στην αύξηση της αποδοτικότητας της στήλης (Σχήμα 28). Φυσικά, μια υπέρμετρη αύξηση της θερμοκρασίας δύναται να οδηγήσει σε καταστροφή του δείγματος ή αποσύνθεση των διαλυτών της κινητής φάσης. Επίσης, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος δημιουργίας φυσαλίδων στη κινητή φάση και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε παρεμβολές στην απορρόφηση και σε προβλήματα στη λειτουργία του ανιχνευτή (ασταθής γραμμή βάσης, ψευδείς κορυφές).

Εξίσου σημαντικό είναι ότι η επιτρεπόμενη θερμοκρασία για μια στατική φάση από καθαρή síλικά είναι ~80°C ενώ για χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις είναι ~120°C. Σε θερμοκρασίες εκτός των ειδικών αυτών ορίων (operating limits) προκαλείται **βασική υδρόλυση** της επιφάνειας της síλικά αυτής καθ' εαυτής (silica dissolution) και **όξινη υδρόλυση** του αιθερικού πυριτικού δεσμού (silyl ether linkage) ανάμεσα στη síλικά και στη συζευγμένη στατική φάση. Τέλος, η αύξηση της θερμοκρασίας καθιστά απαραίτητη την αύξηση της ταχύτητας ροής ώστε να διατηρηθεί η βέλτιστη γραμμική ταχύτητα μετά τη μείωση του ιξώδους των διαλυτών.

Σημείωση: Ένας προσεγγιστικός και σε καμία περίπτωση απόλυτος πειραματικός κανόνας είναι ότι η αύξηση της θερμοκρασίας (ή/και η αύξηση του οργανικού μέρους της κινητής φάσης), συνήθως οδηγούν σε μείωση της ασυμμετρίας των κορυφών. Επίσης, το ίδιο αποτέλεσμα αναμένεται να παρατηρηθεί στις σταθερές k.



Σχήμα 28: Η αύξηση της θερμοκρασίας μειώνει το ιξώδες των διαλυτών και αυτό προκαλεί τη συνολική μείωση της πίεσης του χρωματογραφικού συστήματος. Το τελευταίο δύναται να οδηγήσει στην αύξηση της αποδοτικότητας της στήλης⁶⁸ (πρωτογενής πηγή διαγράμματος: Lide, D. R. ed., CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2005, <<http://www.hbcnetbase.com>>, CRC Press, Boca Raton, FL, 2005).

3.6 Ο ρόλος του pH και της σταθεράς pK_a στη RP-HPLC^{63,68}

Για τους αναλύτες που φέρουν φορτίο (όχι μόνιμο) ή είναι αφόρτιστοι αλλά μπορούν να ιοντισθούν κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες (ionizable analytes), συνήθως υιοθετείται μια συγκεκριμένη τακτική προσέγγισης της ανάλυσης. Οι διαχωρισμοί αυτοί έχουν πολλά πλεονεκτήματα, ωστόσο συνοδεύονται από διάφορες **προκλήσεις** και **δυσκολίες**. Η κατάσταση φόρτισης των μορίων (charge state) επηρεάζει τη συγκράτησή τους και εξαρτάται από το pH της κινητής φάσης, το οποίο με τη σειρά του καθορίζεται από τη σταθερά pK_a του χρησιμοποιούμενου ρυθμιστικού άλατος. Η σύγκριση της διαφοράς των τιμών του pH του διαλύματος και της σταθεράς pK_a του αναλύτη καθορίζει το βαθμό ιοντισμού του τελευταίου.

3.6.1 Η σταθερά ιοντισμού pK_a

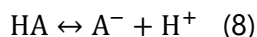
Για την πλειονότητα των οργανικών ενώσεων οι σταθερές pK_a έχουν υπολογιστεί τόσο πειραματικά (experimental pK_a values) όσο και θεωρητικά βάσει τη δομής ενός μορίου, με ειδικά λογισμικά (predicted pK_a values). Οι τιμές που αναγράφονται στη βιβλιογραφία συνήθως αναφέρονται σε θερμοκρασία δωματίου και σε υδατικό διάλυμα. Ακόμα και αν η ακριβής τιμή της σταθεράς ιοντισμού για ένα συγκεκριμένο αναλύτη δεν είναι γνωστή, μπορούμε να βασιστούμε στη βιβλιογραφική τιμή για τη λειτουργική ομάδα που αυτός φέρει (-COOH, -NH₂ κλπ). Το ίδιο ισχύει για διάφορες άλλες χρήσιμες φυσικοχημικές πληροφορίες. Για παράδειγμα η τιμή της καρβοξυλομάδας του βενζοϊκού οξέος ($pK_a=4,19$) μπορεί να θεωρηθεί με σχετικά καλή προσέγγιση ως «οδηγός» για όλα τα αρωματικά καρβοξυλικά οξέα.

Η αναγκαιότητα για τη γνώση των σταθερών ιοντισμού/ισορροπίας (dissociation equilibrium constants) pK_a και pK_b αφορά τα ασθενή οξέα και τις ασθενείς βάσεις αντίστοιχα, διότι οι ενώσεις αυτές είναι μερικώς ιοντισμένες σε εύρος pH=0-14. Για λόγους ευκολίας στη σύγκριση όξινων και βασικών μορίων, είθισται να χρησιμοποιούνται μόνο οι τιμές pK_a . Όσο ισχυρότερο είναι ένα οξύ, τόσο μικρότερη είναι η pK_a . Όσο ισχυρότερη είναι μια βάση, τόσο μεγαλύτερη είναι η pK_a . Φυσικά, για να χαρακτηριστεί ένα μόριο ως όξινο ή βασικό θα πρέπει να είναι γνωστή η φύση όλων των λειτουργικών ομάδων που φέρει, διότι αυτές διαμορφώνουν τον τελικό χαρακτήρα του. Για παράδειγμα, η ασπιρίνη και η διαζεπάμη έχουν παρόμοιες τιμές pK_a (3,5 και 3,3 αντίστοιχα), ωστόσο μιλάμε για ένα ασθενές οξύ και μια ασθενή βάση αντίστοιχα.

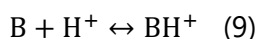
3.6.2 Η ρύθμιση του pH-αντιθετικές προσεγγίσεις

Η ρύθμιση του pH της κινητής φάσης αποτελεί ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο στη χρωματογραφία (κυρίως στη RP-HPLC) διότι καθορίζει **εμμέσως** τη

χρωματογραφική συμπεριφορά (κατακράτηση) του κάθε αναλύτη. Επομένως, μεταβάλλει την εκλεκτικότητα και το βαθμό διαχωρισμό ενός χρωματογραφικού συστήματος. Συγκεκριμένα, το pH ελέγχει τη δυναμική ισορροπία των χημικών εξισώσεων της διάστασης ενός ασθενούς οξέος:



, αλλά και της διάστασης μιας ασθενούς βάσης:



, η οποία συχνά αναγράφεται και ως



Ακολουθως, ο βαθμός ιοντισμού των ενώσεων υπαγορεύει την έκταση της υδροφοβικότητάς τους. Πραγματοποιείται μια συνεχής μετατροπή των μορίων των αναλυτών μεταξύ των **δύο μορφών** (uncharged species, charged species). Οι ιοντισμένες μορφές είναι πολύ πιο πολικές και κατά κανόνα υδρόφιλες (hydrophilic). Έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για τη κινητή φάση παρά για τη στατική φάση και χαρακτηρίζονται από μικρούς χρόνους t_R . Οι ουδέτερες μορφές είναι αρκετά υδρόφοβες (hydrophobic) και έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για τη στατική φάση. Χαρακτηρίζονται από σχετικά μεγάλους χρόνους t_R . Έτσι, στα συνήθη δείγματα των αναλύσεων ρουτίνας (μίγματα οξίνων και βασικών μορίων), μεταβάλλεται η εκλεκτικότητα και η διαχωριστική ικανότητα R_s .

Σημείωση: Είδαμε πιο πάνω ότι κατά προσέγγιση, μια ενδεχόμενη αλλαγή της τάξεως των 0,1 μονάδων στο pH για έναν αναλύτη ιοντισμένο κατά 50% (όξινο ή βασικό), θα επέφερε μια αλλαγή της τάξεως του 10% στη σταθερά k . Αυτή η μεταβολή ίσως να είχε αντίκτυπο στο διαχωρισμό (R_s) έως και $\pm 2,5$ μονάδες. Το τελευταίο σημαίνει ότι θα μπορούσαμε να περάσουμε από μια κατάσταση οριακού διαχωρισμού ($R_s \geq 1,5$) σε μια κατάσταση πλήρους επικάλυψης ($R_s = 0$).

Στην πράξη, η **αξιόλογη** και **κρίσιμη** αλλαγή στο βαθμό ιοντισμού λαμβάνει χώρα εντός μιας **περιορισμένης περιοχής pH** (Σχήμα 29). Λόγω της λογαριθμικής κλίμακας των τιμών pH και pK_a , με απομάκρυνση 1 μονάδας από την τιμή της pK_a ενός αναλύτη, η μεταβολή στο βαθμό ιοντισμού φτάνει περίπου το **90%**. Για διαφορά 2 μονάδων το ποσοστό προσεγγίζει το **99%**. Στις 3 μονάδες έχουμε μια μεταβολή της τάξεως του **99,9%** κλπ. Η στρατηγική αυτή για την πρόβλεψη του βαθμού ιοντισμού ενός αναλύτη είναι γνωστή ως «**κανόνας των δύο μονάδων pH**» (2 pH rule). Θυμίζουμε ότι για τα ρυθμιστικά διαλύματα η μέγιστη ικανότητα σταθεροποίησης (maximum buffering) προκύπτει όταν ισχύει ότι $\text{pH} = pK_a$ ρυθμιστικού διαλύματος, δηλαδή όταν ισχύει ότι $\text{HA} = \text{A}^-$ για τα συστατικά του άλατος.

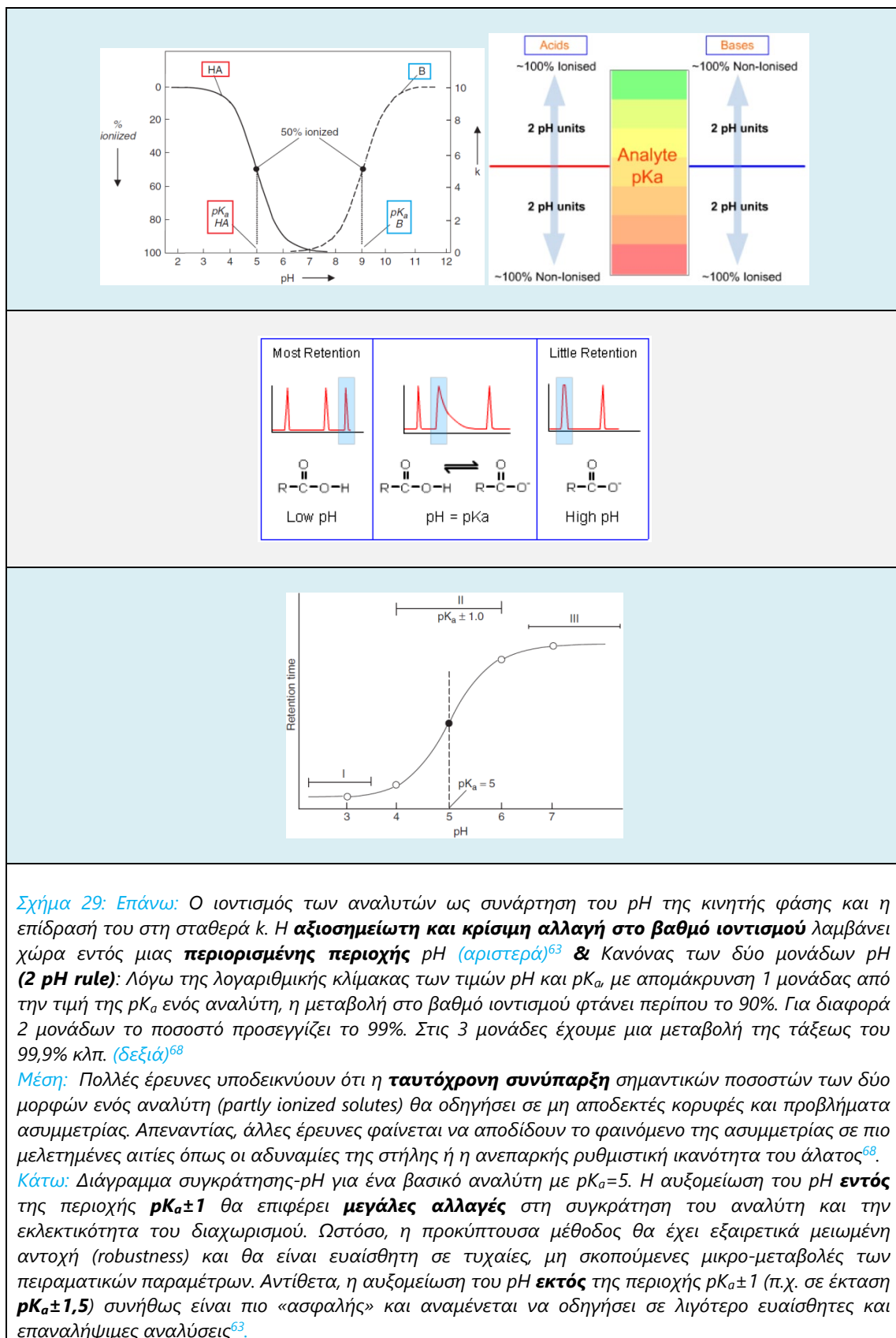
Αντίστοιχα, όταν αυτό ισχύει για τον αναλύτη ενδιαφέροντος, δηλαδή όταν $pK_{a \text{ αναλύτη}} = pH$, τότε τα μόρια του αναλύτη περνάνε ταχύτατα από τη μία μορφή (HA ή B) στην άλλη (A^- ή BH^+). Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό και ως **δευτερογενής ισορροπία** (secondary equilibria), σε αντίθεση με τη πρωτογενή ισορροπία ενός συστατικού με τη στατική φάση. Αυτό γίνεται πολλές φορές κατά τη διάρκεια ενός χρονικού διαστήματος ίσου με χρόνο t_R , επόμενος ο επικρατών χαρακτήρας του μορίου (υδρόφιλος ή υδρόφοβος) δεν είναι σαφώς καθορισμένος. **Πολλές έρευνες** υποδεικνύουν ότι η **ταυτόχρονη συνύπαρξη** σημαντικών ποσοστών των δύο μορφών ενός αναλύτη (**partly ionized solutes**) θα οδηγήσει σε μη αποδεκτές κορυφές και σε σημαντικά προβλήματα ασυμμετρίας (Σχήμα 29). Απεναντίας, άλλες έρευνες φαίνεται να αποδίδουν το φαινόμενο της ασυμμετρίας σε καλά μελετημένους παράγοντες όπως οι αδυναμίες της στήλης ή η ανεπαρκής ρυθμιστική ικανότητα του άλατος και όχι στην παραπάνω ισορροπία.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η υπερβολική αύξηση ή μείωση του pH έξω από κάποια όρια ($\sim pK_a \pm 2$) δε βελτιώνει περαιτέρω τη χρωματογραφική συμπεριφορά ενός αναλύτη. Η ενίσχυση ή η καταστολή (suppression) του ιοντισμού ενός ασθενούς οξέος ή βάσης σε ποσοστό άνω του 90% είναι **πρακτικά αδύνατη**, και επίσης δεν αναμένεται να επιφέρει καμία αισθητή αλλαγή στη συγκράτηση ενός μορίου. Αντίθετα, η υπέρμετρη αύξηση του pH εντείνει τους κινδύνους καταστροφής της στήλης.

Τέλος, σε κάθε διαχωρισμό καλούμαστε να επιλέξουμε ανάμεσα σε δύο **αντιθετικές προσεγγίσεις** σχετικά με τα επίπεδα του pH: Η αυξομείωση του pH **εντός** της περιοχής $pK_a \pm 1$ για τους αναλύτες ενδιαφέροντος (Σχήμα 29-περιοχή II), θα επιφέρει μεγάλες αλλαγές στη συγκράτηση των μορίων και την εκλεκτικότητα του διαχωρισμού. Ωστόσο, η προκύπτουσα μέθοδος θα έχει εξαιρετικά μειωμένη αντοχή (robustness) και θα είναι ευαίσθητη σε τυχαίες, μη σκοπούμενες (unintended) μικρο-μεταβολές των πειραματικών παραμέτρων. Για παράδειγμα, μικρο-μεταβολές στο pH συμβαίνουν αν εξατμιστεί ένα ποσοστό του οργανικού διαλύτη ή με την είσοδο (και διαλυτοποίηση) στην κινητή φάση CO_2 της ατμόσφαιρας. Αντίθετα, η αυξομείωση του pH **εκτός** της περιοχής $pK_a \pm 1$ (π.χ. σε έκταση $pK_a \pm 1,5$ αλλά όχι έξω από $pK_a \pm 2$) (Σχήμα 29-περιοχές I & III), συνήθως είναι πιο «ασφαλής» και αναμένεται να οδηγήσει σε λιγότερο ευαίσθητες και επαναλήψιμες αναλύσεις.

Σημείωση: Λόγω των παραπάνω περιορισμών και επειδή στη πράξη η σταθεροποίηση του pH σε επίπεδα καλύτερα των $\pm 0,05$ έως $\pm 0,10$ μονάδων είναι επίπονη και σχεδόν ανέφικτη, οι αναλύσεις συνήθως σχεδιάζονται **έξω** από τη περιοχή $pK_a \pm 1$. Λόγω της μόνιμης ανάγκης για καταστολή του ιοντισμού των ομάδων Si-OH, επιλέγονται **οι χαμηλές τιμές pH** ($pK_a - 1$). Η πλειοψηφία των αναλυτών (είτε οξέων είτε βάσεων) έχει τιμές $pK_a > 4$. Ως εκ τούτου, επιλέγονται

τιμές $2 \leq \text{pH} \leq 3$. Ο ακριβής ρόλος του pH σε ένα χρωματογραφικό διαχωρισμό αποτελεί ακόμα αντικείμενο εντατικής έρευνας.



3.7 Ο σχεδιασμός ενός διαχωρισμού: αρχικές προσεγγίσεις και ανάπτυξη μεθόδου (method development)^{61-63,68}

Κάθε χρωματογραφικός διαχωρισμός αφορά μια συγκεκριμένη ομάδα αναλυτών και περιγράφεται από το δικό του πειραματικό πρωτόκολλο. Ωστόσο, υπάρχει ένα «κοινό σκεπτικό» το οποίο καθοδηγεί ένα εργαστήριο ώστε να σχεδιάσει μια ανάλυση. Ο σχεδιασμός αυτός καθορίζεται από τη **φύση** των αναλυτών ενδιαφέροντος και από τους **πειραματικούς στόχους** που έχουν τεθεί. Στην ενότητα αυτή θα παρουσιαστούν με συντομία οι συνήθεις κατευθυντήριες οδηγίες για τη προετοιμασία και το στήσιμο μιας ανάλυσης, προσαρμοσμένες στη τακτική που ακολουθήθηκε στον ποσοτικό προσδιορισμό της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

3.7.1 Βασικές πληροφορίες για τα συστατικά του δείγματος - pK_a και $\log P$

Το προκαταρκτικό βήμα για το σχεδιασμό ενός διαχωρισμού είναι η κατανόηση της **φυσικοχημικής συμπεριφοράς** καθενός από τους εμπλεκόμενους αναλύτες. Έτσι λοιπόν, συγκεντρώνονται πληροφορίες για τις φυσικές ιδιότητες (π.χ. pK_a , $\log P$, σημείο ζέσεως κλπ) των μορίων των αναλυτών και ταυτόχρονα μελετώνται οι δυνητικές χημικές αντιδράσεις (επιθυμητές ή όχι) παραγωγοποίησης ή αποικοδόμησης αυτών. Σε πολλές κατηγορίες ενώσεων, και ειδικά στις φαρμακευτικές ενώσεις, συναντάμε μόρια που φέρουν πολλές λειτουργικές ομάδες διαφορετικής φύσεως. Η συνεισφορά της κάθε ομάδας έχει ως αποτέλεσμα την **τελική διαμόρφωση** των ιδιοτήτων ενός αναλύτη.

Όπως είδαμε στην ενότητα 3.6, η γνώση της τιμής της σταθεράς pK_a (αλλά και των παραγόντων που τη μεταβάλλουν) είναι κρίσιμη για τη πρόβλεψη του βαθμού ιοντισμού. Πέραν από τις αναλυτικές διαδικασίες όμως, ο ιοντισμός των φαρμακευτικών μορίων καθορίζει το σχεδιασμό των φαρμακοτεχνικών μορφών (formulations). Επίσης, επηρεάζει την απορρόφηση από το σώμα (εισαγωγή στη κυκλοφορία του αίματος) και την κατανομή τους στους διάφορους ιστούς.

Κατ' αντιστοιχία, η λιποφιλία (υδροφοβικότητα) είναι μια φυσικοχημική ιδιότητα πρωταρχικής σημασίας για τη βιολογική δράση και τις διαδικασίες σύνδεσης ενός μορίου. Σε ό,τι αφορά την ανάλυση και κυρίως τη χρωματογραφία RP-HPLC, **η υδροφοβικότητα αποτελεί τον πρωταρχικό δείκτη ερμηνείας της συγκράτησης ενός μορίου, ανεξάρτητα από το αν πρόκειται για ουδέτερη ή δυνητικά ιοντιζόμενη ένωση.**

Σημείωση: Αν πρόκειται για ουδέτερα μόρια, τότε η προσοχή επικεντρώνεται στο πόσα/ποια πολικά και λιπόφιλα τμήματα αυτά φέρουν (συχνά για την εκτίμηση της πολικότητας συν-εξετάζεται ο αριθμός και η ισχύς των ΔΗ). Αν πρόκειται για μόρια με κέντρα ιοντισμού, τότε στα παραπάνω κριτήρια προστίθεται η δυνατότητα «εκμετάλλευσης» της παραμέτρου του pH. Η τελευταία περίπτωση αφορά τη πλειοψηφία των φαρμακευτικών ενώσεων. Αυτός είναι και ο λόγος που, όπως έχουμε τονίσει επανειλημμένα, στην πράξη παρατηρείται επικάλυψη των

διαφόρων μηχανισμών (π.χ. κατανομής και προσρόφησης) πέραν του επιδιωκόμενου μηχανισμού (π.χ. κατανομή).

Η υδροφοβικότητα συνήθως εκφράζεται με το συντελεστή μερισμού P (partition coefficient) ή (πιο συχνά) με τον όρο $\log P$. Περιγράφει την κατανομή της μονομερούς αδιάστατης μορφής ενός αναλύτη (HA ή B) μεταξύ δύο συγκεκριμένων και μη αναμίξιμων φάσεων, κάτω από καθορισμένες συνθήκες. Σχεδόν πάντα οι μετρήσεις αναφέρονται στο σύστημα οκτανόλης-νερού διότι αυτό προσομοιάζει σε μεγάλο βαθμό τόσο τα βιολογικά συστήματα όσο και τις συνθήκες μιας ανάλυσης RP-HPLC. Φυσικά, αν το σύστημα αναφοράς αλλάξει (π.χ. διαφορετικός οργανικός διαλύτης) τότε θα αλλάξει και η τιμή του συντελεστή μερισμού. Για έναν όξινο ή βασικό αναλύτη ο συντελεστής μερισμού δίνεται από τις σχέσεις (11) και (12) αντίστοιχα:

$$\log P_{\text{oct/wat}} = \log ([\text{HA}]_{\text{oct}}/[\text{HA}]_{\text{wat}}) \quad (11)$$

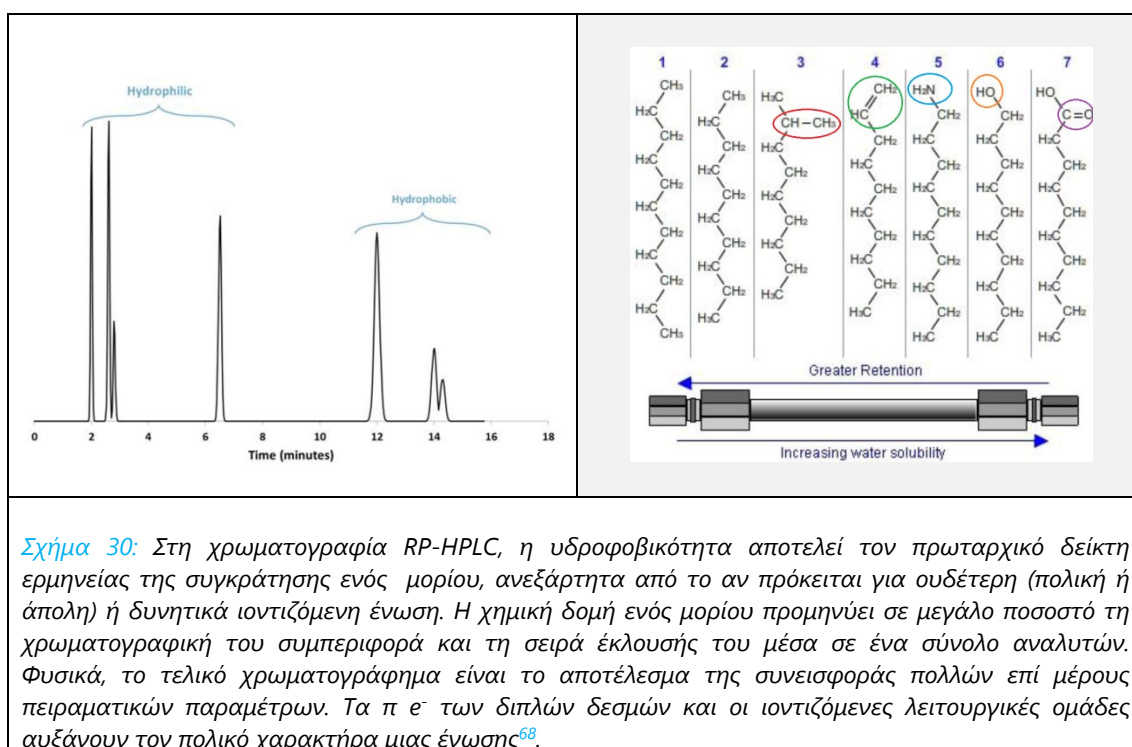
και

$$\log P_{\text{oct/wat}} = \log ([\text{B}]_{\text{oct}}/[\text{B}]_{\text{wat}}) \quad (12)$$

Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή $\log P$, τόσο πιο υδρόφοβο είναι ένα μόριο και η συγγενεία (affinity) του με την οργανική στοιβάδα αυξάνεται. Προφανώς ισχύει ότι $-1 \leq \log P \leq 1$. Για ένα μόριο που κατανέμεται εντός καθορισμένου συστήματος ίσων όγκων V για τις δύο φάσεις, η τιμή $P=10$ ($\log P=1$) σημαίνει ότι για κάθε μέρος στην υδατική στοιβάδα, δέκα μέρη της ένωσης βρίσκονται στην οργανική στοιβάδα. Η γνώση του συντελεστή μερισμού και η μελέτη της μεταβολής του με το pH, είναι πολύ χρήσιμες στην εκχύλιση (από τα σκευάσματα) και στην επακόλουθη χρωματογραφία των φαρμακευτικών ενώσεων.

Γενικότερα, η χημική δομή ενός μορίου **προμηνύει** σε μεγάλο ποσοστό τη χρωματογραφική του συμπεριφορά και τη σειρά έκλουσής του μέσα σε ένα σύνολο αναλυτών. Φυσικά, το τελικό χρωματογράφημα είναι το αποτέλεσμα της συνεισφοράς πολλών επί μέρους πειραματικών παραμέτρων. Συνοπτικά, μπορούμε να πούμε ότι η έκλυση καθορίζεται από τη διαλυτότητα στο νερό και από την % σύσταση σε άτομα C για μια ένωση. Συγκρίνοντας μια ομάδα αναλυτών παρόμοιας δομής κάτω από τις ίδιες συνθήκες για μια ανάλυση RP-HPLC, κάνουμε τις εξής παρατηρήσεις /προβλέψεις: Η συγκράτηση αυξάνεται όσο μειώνεται η διαλυτότητα και όσο αυξάνονται τα άτομα C (αύξηση υδροφοβικότητας). Αντίθετα, οι διακλαδώσεις (n-υδρογονάνθρακες) και η ακορεστικότητα (π.χ. διπλοί δεσμοί) οδηγούν σε μειωμένη συγκράτηση. Τέλος, οι ουδέτερες αλλά πολικές ενώσεις εκκλύονται σχετικά νωρίς ενώ οι φορτισμένες ενώσεις εκκλύονται πολύ γρήγορα,

και κάποιες φορές ακόμα και κοντά στο μέτωπο του διαλύτη (Σχήμα 30). Κατά αυξανόμενη ισχύ συγκράτησης, η προσεγγιστική σειρά έκλουσης έχει ως εξής: Ισχυρά οξέα κατά Lewis (καρβοξυλικά οξέα) < ασθενή οξέα κατά Lewis (αλκοόλες, φαινόλες) < ισχυρές βάσεις κατά Lewis (αμίνες) < ασθενείς βάσεις κατά Lewis (εστέρες, αλδεΐδες, κετόνες) < μόνιμα δίπολα (CHCl_3) < επαγόμενα δίπολα (CCl_4) < αλειφατικές ενώσεις.



3.7.2 Ανάπτυξη της μεθόδου (method development)

Το στάδιο ανάπτυξης της μεθόδου περιλαμβάνει ένα σύνολο από συγκεκριμένα βήματα (starting points), η κρισιμότητα καθενός από αυτά διαφέρει σημαντικά ανά περίπτωση και εξαρτάται από τις απαιτήσεις και την εγγενή δυσκολία κάθε ξεχωριστού διαχωρισμού. Συνοπτικά, τα βήματα αυτά είναι τα εξής:

- **Εξέταση και συνεκτίμηση** όλων των διαθέσιμων πληροφοριών για τα συστατικά του δείγματος. Πέραν των βασικών ιδιοτήτων που αναφέραμε στη παράγραφο 3.7.1 (π.χ. η εκλογή του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος ανάλογα με τη σταθερά pK_a ενός αναλύτη και το προσδοκώμενο pH), λαμβάνονται υπόψη πρόσθετα χαρακτηριστικά όπως το μοριακό βάρος του δείγματος (επηρεάζει άμεσα τον καθορισμό του όγκου ένεσης). Επίσης, σε ιδιαίτερες περιπτώσεις π.χ. εναντιομερείς ενώσεις, σχεδιάζονται ειδικές μέθοδοι.

Στο σημείο αυτό καθορίζονται και οι επιθυμητοί στόχοι (separation goals) οι οποίοι έχουν ως **βασικό άξονα** τον βέλτιστο «συμβιβασμό» ανάμεσα σε διαχωρισμό και συνολικό χρόνο: επιδιώκεται ο ικανοποιητικός διαχωρισμός σε σύντομο χρόνο (**conflicting goals**). Ανάλογα με το διαθέσιμο εξοπλισμό, οι απαιτήσεις προσαρμόζονται κατάλληλα και οι βασικοί στόχοι τροποποιούνται. Για παράδειγμα, η δυνατότητα βαθμιδωτής έκλουσης είναι σημαντική για τον προσδιορισμό των προσμίξεων, πέραν των δραστικών συστατικών (trace analysis).

- **Προκατεργασία του δείγματος (sample pretreatment).** Πολλές φορές η κατεργασία των δειγμάτων πριν από την ένεση σε μια στήλη HPLC είναι αναπόφευκτη. Αυτό συμβαίνει πρωτίστως για τη προστασία της στήλης (και του χρωματογραφικού συστήματος γενικότερα) και δευτερευόντως για την απομάκρυνση των δυνητικών παρεμποδιστών του διαχωρισμού. Πολλά πρωτόκολλα κατεργασίας είναι επίπονα (περισσότερο και από την επακόλουθη HPLC) και περιλαμβάνουν αρκετά στάδια. Για το λόγο αυτό συχνά προτιμάται να υιοθετούνται κάποια ήδη υπάρχοντα πρωτόκολλα (είτε του εργαστηρίου είτε της βιβλιογραφίας) τα οποία αφορούν δείγματα και μητρικά υλικά παρόμοιας σύστασης με το υπό ανάλυση δείγμα.
- **Επιλογή του είδους χρωματογραφίας.** Η χρωματογραφία RP-HPLC είναι μια σταθερή επιλογή σχεδόν για όλες τις περιπτώσεις. Ωστόσο, ανάλογα με τη φύση του δείγματος, κάποιες φορές προτιμάται η χρωματογραφία NP-HPLC διότι ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται πιο εύκολα ή πιο ικανοποιητικά. Συνήθως η τελευταία επιλέγεται όταν τα αρχικά πειράματα με χρήση πληρωτικών υλικών αντίστροφης φάσης έχουν αποτύχει.
- **Επιλογή του ανιχνευτή.** Βασίζεται στη χημική δομή των αναλυτών ενδιαφέροντος. Στη φαρμακευτική ανάλυση, η συχνή παρουσία χρωμοφόρων επάνω στα διάφορα μόρια συνήθως οδηγεί στην επιλογή ενός ανιχνευτή UV-Vis. Η έλλειψη χρωμοφόρων μπορεί να οδηγήσει στην επιλογή άλλων, μη ειδικών ανιχνευτών (ELSD, RID κλπ). Οι δυνατότητες ενός ανιχνευτή MS συχνά τον καθιστούν ως τον ανιχνευτή επιλογής για ποικίλους προσδιορισμούς ή ως συμπληρωματικό μέρος μιας ανάλυσης HPLC-UV.
- **Πρόβλεψη, εξακρίβωση και λύση δυνητικών προβλημάτων.** Η μεγάλη εγγενής δυσκολία ορισμένων διαχωρισμών είναι δυνατών να οδηγήσει σε προβλήματα διαφορετικής φύσεως. Είναι σημαντικό να γίνει εκ των προτέρων μια προσπάθεια πρόβλεψης και ταυτοποίησης αυτών των προβλημάτων, και ακολούθως να καθοριστούν ακριβείς διαδικασίες για την άρση αυτών (troubleshooting). Τα προβλήματα αυτά (μη αποδεκτές κορυφές, ολισθένουσες γραμμές βάσης, μηδενική συγκράτηση πολύ πολικών μορίων, κακή αναπαραγωγιμότητα μεταξύ των παρτίδων για μια στήλη κλπ) συνήθως

καταδεικνύουν ατέλειες στον εξοπλισμό, τα υλικά και τις τεχνικές του εργαστηρίου ενώ μπορούν να αποφευχθούν με την διεξαγωγή προκαταρκτικών πειραμάτων. Η πρόβλεψη όλων των προβλημάτων που δύναται να προκύψουν είναι πολύ δύσκολη και βασίζεται τόσο στην εμπειρία του αναλυτή όσο και στην πρόσβαση και εξοικείωσή του με την σχετική βιβλιογραφία.

- **Καθορισμός των κριτηρίων της καταλληλότητας του συστήματος.** Αφότου πραγματοποιηθεί ένας ικανοποιητικός αριθμός δοκιμών κατά το στάδιο της ανάπτυξης μεθόδου, καθορίζονται από τον αναλυτή τα **όρια** και τα **κριτήρια αποδοχής** του ελέγχου καταλληλότητας του συστήματος (System Suitability Test, SST). Ο έλεγχος αυτός αποτελεί ένα αναπόσπαστο κομμάτι του πειραματικού πρωτοκόλλου κάθε αναλυτικής μεθόδου και εξασφαλίζει την αξιοπιστία της πειραματικής διάταξης κατά την καθημερινή εφαρμογή της μεθόδου σε επίπεδο ρουτίνας, θέτοντας όρια αποδοχής για κάποιες από τις πειραματικές αποκρίσεις. Οι συνήθεις κατευθυντήριες οδηγίες για τον καθορισμό των παραπάνω κριτηρίων σχολιάζονται αναλυτικά στη παράγραφο 5.3.1.

3.7.2.1 Πειράματα εκκίνησης (*initial experiments*) - αρχικοί στόχοι

Έχοντας ως γνώμονα τη μοριακή δομή (ομόλογη σειρά, πολικότητα, μέγεθος μορίου) των αναλυτών ενδιαφέροντος (και των προσμίξεων) επιλέγουμε μια στατική φάση (στήλη) που θεωρούμε ότι είναι κατάλληλη. Η επιλογή γίνεται μετά από προσεκτική συν-εκτίμηση όλων των χαρακτηριστικών/προδιαγραφών για μια στήλη (εδάφιο 2.5.1.3) τα οποία δηλώνονται από τους εμπορικούς οίκους. Επίσης, παρέχονται αναλυτικές μελέτες της απόδοσης της στήλης σε σχέση με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αναλυτών και των αναμενόμενων προσμίξεων. **Ένας γενικός κανόνας είναι ότι η στατική φάση πρέπει να έχει παρόμοια πολικότητα με την(ις) προσδιοριζόμενη(ες) ένωση(εις).** Συνήθως συνίσταται η χρήση μιας καινούριας στήλης για την ανάπτυξη μιας μεθόδου, προκειμένου να εξαιρεθεί ο κίνδυνος φθοράς από προηγούμενα και διαφορετικού είδους δείγματα. Στη συνέχεια, με βάση τη διαθεσιμότητα του εργαστηρίου και τα εκάστοτε επιθυμητά χαρακτηριστικά (ενότητα 3.2) επιλέγεται ένας οργανικός διαλύτης ο οποίος, μαζί με το υδατικό μέρος, θα αποτελέσει τη κινητή φάση. Για μείωση των πιθανοτήτων ανεπαρκούς ρυθμιστικής ικανότητας, ειδικά όταν έχουμε χαμηλές $C_{\text{άλωτος}}$ ή μεγάλους όγκους έγχυσης, συνηθίζεται η κινητή φάση να είναι και διαλύτης έγχυσης του δείγματος (diluent).

Τα πρώτα πειράματα πραγματοποιούνται με σκοπό την εκπλήρωση του **αρχικού στόχου** ο οποίος αφορά τον αποδεκτό διαχωρισμό, δηλαδή μέτρια (έστω και οριακή) διαχωριστική ικανότητα σε ένα λογικό χρονικό διάστημα (**acceptable baseline resolution, reasonable run time**). Έτσι, υιοθετείται μια «κατευθυντήρια

προσέγγιση» που στηρίζεται σε δοκιμές (**trial-and-error approach**). Σε πρώτη φάση μεταβάλλεται η ισχύς του οργανικού διαλύτη ($\pm \%B$) έως ότου επιτευχθεί μια ικανοποιητική συγκράτηση της τάξεως του $1 \leq k \leq 10$. Το οργανικό ποσοστό καθορίζει το βαθμό διάστασης (μεταβολή της σταθεράς k_a) τόσο για το άλας όσο και για τους αναλύτες. Μια αύξηση επιπέδου 10% θα μπορούσε να μειώσει τη σταθερά k έως και 2-3 μονάδες. Σε δεύτερη φάση μεταβάλλονται επιπλέον παράγοντες όπως η θερμοκρασία, για τη ρύθμιση της εκλεκτικότητας (α) και του διαχωρισμού (R_s).

Σε τρίτη φάση, αν οι παραπάνω ενέργειες δεν είναι ικανοποιητικές, εξετάζονται οι αλλαγές στις συνθήκες της στήλης (column conditions). Αυτές μπορεί να αφορούν αλλαγές στη ροή, στο μήκος (L) ή στο μέγεθος των σωματιδίων ή ακόμη και ολικές αλλαγές στο είδος του υποκαταστάτη (silane coating-agent). Γενικά, η αλλαγή της στήλης αναμένεται να έχει μέτρια συνεισφορά στην αύξηση των πλακών (N) και στην βελτίωση του διαχωρισμού (R_s), και μάλιστα σε βάρος του χρόνου ανάλυσης. Όταν ο διαχωρισμός είναι εγγενώς εύκολος και ικανοποιητικός εξ' αρχής ($R_s \gg 2$), τότε συνήθως εφαρμόζονται υψηλές ταχύτητες ροής ή χρησιμοποιείται μικρότερη στήλη με σκοπό την εξοικονόμηση χρόνου.

Η μεταβολή των διαφόρων παραμέτρων ($\%B$, T , ροή, στήλη) έχει σημαντικότερη επίδραση στα δείγματα ιοντιζόμενων ενώσεων σε σχέση με τα δείγματα ουδέτερων ενώσεων. Επίσης, σε ό,τι αφορά τα πρώτα, η ρύθμιση του pH είναι πιο σημαντική από το είδος και τη συγκέντρωση του ρυθμιστικού άλατος. Προσεγγιστικά, η κρισιμότητα των διαφόρων παραγόντων ιεραρχείται ως εξής:

pH > είδος οργανικού διαλύτη \approx τύπος στήλης > % ποσοστό διαλύτη > T >>
C_{άλατος} και τύπος άλατος

Σημείωση: Στις περιπτώσεις UHPLC (σωματίδια $< 2\mu m$) στόχος είναι μια συγκράτηση της τάξεως του $0,5 \leq k \leq 5$. Στην περίπτωση δειγμάτων που αποτελούνται από διάφορους αναλύτες και είναι πολύπλοκα, συνήθως αφιερώνεται σαφώς περισσότερος χρόνος για προκαταρκτικά πειράματα (scouting experiments). Η μελέτη της ανάλογης βιβλιογραφίας μπορεί να βοηθήσει όχι μόνο στην επιλογή των αρχικών συνθηκών (starting conditions) αλλά και στην επιλογή του ανιχνευτή ή της διαδικασίας προκατεργασίας του δείγματος.

Επειδή τα ιοντισμένα μόρια αναμένεται να εκλουστούν σχετικά εύκολα και γρήγορα σε μια χρωματογραφία RP-HPLC, το τελικό ποσοστό $\%B$ είναι συνήθως χαμηλό. Ωστόσο, οι πρώτες δοκιμές συνήθως ξεκινούν με υψηλό ποσοστό οργανικού διαλύτη (ακόμη και 80 %) και ακολουθεί σταδιακή μείωση μέχρι τη βέλτιστη τιμή. Αυτό συμβαίνει για εξοικονόμηση πολύτιμου χρόνου και για έλεγχο ύπαρξης εξαιρετικά άπολων ενώσεων, οι οποίες κατακρατούνται ισχυρά και

υπάρχει κίνδυνος να «χαθούν» σε μια τυπική ανάλυση χαμηλού ποσοστού %B. Για δείγματα που δεν είναι πολύπλοκα, η βαθμιδωτή έκλυση συνήθως αποφεύγεται. Τέλος, η εκλογή των αρχικών επιπέδων του pH είναι ένα ζήτημα πολύπλευρο και πολυπαραγοντικό, όπως είδαμε αναλυτικά στην **ενότητα 3.6**. Επιπλέον, εξαρτάται άμεσα από τους στόχους της ανάλυσης και από τις γνώσεις για το υπό ανάλυση δείγμα. **Οι διάφορες προσεγγίσεις δύναται να είναι πλήρως αντιφατικές και υπόκεινται στην κρίση του αναλυτή.** Ο ακριβής ρόλος του pH στη συγκράτηση εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας. Οι βασικοί «πυλώνες» για την επιλογή της αρχικής τιμής του pH είναι οι εξής:

- Είδη διαθέσιμων αλάτων συγκεκριμένου εύρους δράσης (pH range)
- Εξασφάλιση της προστασίας της στήλης (αποφυγή τιμών $\text{pH} \leq 2$ και $\text{pH} \geq 8$)
- Αντοχή (robustness) και μειωμένη ευαισθησία της μεθόδου (προτιμάται η αυξομείωση του pH **εκτός** της περιοχής $\text{pK}_a \pm 1$ για έναν αναλύτη, π.χ. σε έκταση $\text{pK}_a \pm 1,5$)
- Συμμετρία κορυφών (τιμές $\text{pH} \leq 3,5$ με σκοπό την καταστολή του ιοντισμού των ελεύθερων ομάδων Si-OH και των όξινων αναλυτών -ion suppression)
- Συμμετρία κορυφών (τιμές $\text{pH} \geq 7$ με σκοπό την καταστολή του ιοντισμού των βασικών αναλυτών -ion suppression)

Τα τελευταία χρόνια έχουν κατασκευαστεί στήλες ιδιαίτερα ανθεκτικές σε ασυνήθιστα υψηλές τιμές pH. Σε υψηλά pH είναι δυνατή η ένεση μεγάλων όγκων δειγμάτων υψηλού μοριακού βάρους (αύξηση ευαισθησίας του ανιχνευτή).

3.7.2.2 Πειράματα βελτιστοποίησης (optimization experiments) - τελικοί στόχοι

Αφού εξασφαλιστεί η επίτευξη ενός ικανοποιητικού διαχωρισμού πραγματοποιούνται περαιτέρω δοκιμές με σκοπό την **οριστικοποίηση** των τελικών πειραματικών παραμέτρων και την εκπλήρωση του **τελικού στόχου**. Αυτός αφορά τον επαρκή διαχωρισμό, δηλαδή τη μέγιστη δυνατή διαχωριστική ικανότητα στο ελάχιστο δυνατό χρονικό διάστημα (**maximum resolution, minimum run time**). Γενικά επιδιώκεται ένας διαχωρισμός $R_s \geq 2$ για όλες τις γειτονικές κορυφές. Η απαίτηση αυτή λαμβάνει υπόψη το ελάχιστο tailing που φυσιολογικά μπορεί να συνοδεύει μια κορυφή (πρακτικά οι τιμές $T_f=A_f=1$ είναι ανέφικτες) και τη σταδιακή διεύρυνση και ασυμμετρία των κορυφών λόγω παλαιότητας της στήλης. Το πιο «προβληματικό» ζευγάρι κορυφών ονομάζεται κρίσιμο ζεύγος και η προσοχή επικεντρώνεται πρωτίστως σε αυτό. Αν $R_s \leq 1,5$, τότε ελέγχεται ο λόγος «ύψος κορυφής προς κοιλάδα» (peak to valley ratio). Κατά την

κρίση του αναλυτή μπορεί να μεταβληθεί οποιαδήποτε από τις πειραματικές παραμέτρους που αναφέρθηκαν στο εδάφιο 3.7.2.1, αν και η ταυτόχρονη μεταβολή δύο παραμέτρων (two-variable procedures) θεωρείται σαφώς πιο αποδοτική στην αναζήτηση των συνθηκών που αντιστοιχούν στη βέλτιστη τιμή R_s .

Σημείωση: Η ταυτόχρονη μεταβολή ακόμη περισσότερων παραμέτρων είναι ακόμα πιο αποδοτική, ωστόσο προτιμάται στην περίπτωση ιδιαίτερα πολύπλοκων δειγμάτων. Προϋποθέτει τη χρήση ειδικού λογισμικού για τη διενέργεια πειραματικού σχεδιασμού και συνήθως οδηγεί σε ένα μεγάλο αριθμό πειραμάτων.

Ακολουθείται και πάλι μια «κατευθυντήρια προσέγγιση» που στηρίζεται σε δοκιμές (**hit-and-miss approach**), ωστόσο σε αυτές τις περιπτώσεις η χρήση ειδικών λογισμικών προσομοίωσης (simulation softwares) είναι ιδιαίτερη χρήσιμη. Επιδιώκεται μια τιμή k που να μην είναι υπερβολικά μεγάλη ή μικρή. Οι τιμές $k \leq 10$ συνήθως αντιστοιχούν σε στενές και ψηλές κορυφές, ενώ για $k < 1$ υπάρχει ο κίνδυνος επικάλυψης μιας κορυφής λόγω συνέκλωσης των συστατικών του μητρικού υλικού κοντά στον t_0 (junk peaks). Ανάλογα με το συνολικό αριθμό των αναλυτών, ο αναλυτής μπορεί κατά την κρίση του να διευρύνει τα όρια της σταθεράς k σε ένα επίπεδο της τάξεως του $0,5 \leq k \leq 20$. Σε περίπτωση ύπαρξης νομοθετικών ορίων (regulatory guidelines), αυτά ακολουθούνται πιστά.

Συνήθως, η μεταβολή της ισχύος του διαλύτη (%B) και της θερμοκρασίας αποτελούν τις πρώτες επιλογές. Ακολουθεί η μεταβολή του pH, η αλλαγή στήλης (αν η στατική φάση θεωρηθεί πλήρως ακατάλληλη) και, πιο συχνά, η αλλαγή του διαλύτη. Υπάρχει η δυνατότητα επιλογής (και συχνά ανάμιξης) πολλών διαλυτών με βάση τις επιθυμητές τους ιδιότητες οι οποίες παρουσιάστηκαν στην **ενότητα 3.2**. Ένας προσεγγιστικός κανόνας είναι ο εξής: 40% MeOH \equiv 33% ACN \equiv 23% THF. Γενικά, **η αντικατάσταση ενός διαλύτη είναι ο πλέον ισχυρός τρόπος μεταβολής της συγκράτησης (k) και της εκλεκτικότητας (α) ενός διαχωρισμού**. Η συγκράτηση μεταβάλλεται λόγω μεταβολής στην πολικότητα και στην ικανότητα επίδρασης επί της στατικής φάσης και παραλαβής των αναλυτών (ισχυροί διαλύτες, ασθενείς διαλύτες). Η **εκλεκτικότητα μεταβάλλεται λόγω διαφορετικής αλληλεπίδρασης κάθε διαλύτη (ιδιότητες α, β, π^*) με έναν αναλύτη, και έχει αντίκτυπο κυρίως στο διαχωρισμό (R_s)**. Τα «**τρίγωνα εκλεκτικότητας διαλυτών**» (Σχήμα 31) αποτελούν πολύτιμα θεωρητικά εργαλεία και δρουν σαν γνώμονες στη προσπάθεια βελτίωσης της εκλεκτικότητας ενός διαχωρισμού.

Πολλές δοκιμές βασίζονται σε ισοεκλουστικές σειρές διαλυτών. Στις περιπτώσεις αυτές ο χρόνος ανάλυσης μένει σχεδόν αμετάβλητος, ωστόσο παρατηρούνται έντονες διαφορές στην εκλεκτικότητα και εν τέλει στην παράμετρο R_s (Σχήμα 31). Και εδώ, είναι απαραίτητη η χρήση ειδικών λογισμικών προσομοίωσης (automated method development software packages) τα οποία «προβλέπουν» την καταλληλότερη σύσταση σε έναν ή παραπάνω διαλύτες.

Οι σύγχρονες διατάξεις διαθέτουν τη δυνατότητα ανάμιξης έως και τεσσάρων διαλυτών (on-line blending).

Σημείωση: Κατά τη μελέτη των διαλυτών (εδάφιο 2.4.2.3) είδαμε ότι αυτοί αναμιγνύονται με σκοπό της επίτευξης μιας δεδομένης πολικότητας (καθορισμός σταθεράς k). Με βάση τη σχέση Νο 1 ($P_{ολικό} = P_x * \Phi_x + P_y * \Phi_y$) η πολικότητα αυτή μπορεί να διατηρηθεί σταθερή. Με τροποποίηση του ποσοστού κάθε διαλύτη μεταβάλλεται θετικά ή αρνητικά η εκλεκτικότητα.

Η αντικατάσταση ενός διαλύτη (ή ο συνδυασμός του με άλλον διαλύτη) είναι δυνατόν να αλλάξει εξ' ολοκλήρου τη σειρά έκλυσης μιας κορυφής. Για παράδειγμα, οι πολύ μικρές κορυφές των εκδόχων (impurity peaks) προτιμάται να εκλύονται πριν από τη μεγάλη κορυφή μιας δραστικής. Ο λόγος είναι ότι σε περίπτωση ακόμη και ελάχιστου tailing της κορυφής αυτής, υπάρχει ο κίνδυνος επικάλυψης και απώλειας της διαχωριστικής ικανότητας ($R_s < 1$).

Η εκλουστική ισχύς του διαλύτη (ϵ^0) δεν εξαρτάται μόνο από τη συγγένεια με τους αναλύτες αλλά και από την αλληλεπίδραση με τη στατική φάση. Για τη **MeOH** ισχύει ότι $\epsilon^0 = 1, 0,95$ και $0,7$ για στήλες C18, Al₂O₃ και SiO₂ αντίστοιχα. Επίσης, σε αναλύσεις με στήλες **cyano** συχνά παρατηρούνται π-π αλληλεπιδράσεις με τους αρωματικούς αναλύτες, οι οποίες μειώνονται σημαντικά όταν χρησιμοποιείται το **ACN** ως διαλύτης. Το **THF** εκλύει γρήγορα τα μόρια ευθύγραμμης αλυσίδας και ακόμα τα μόρια με μεθόξυ ομάδες. Το **ACN** εκλύει γρήγορα τους εστέρες.

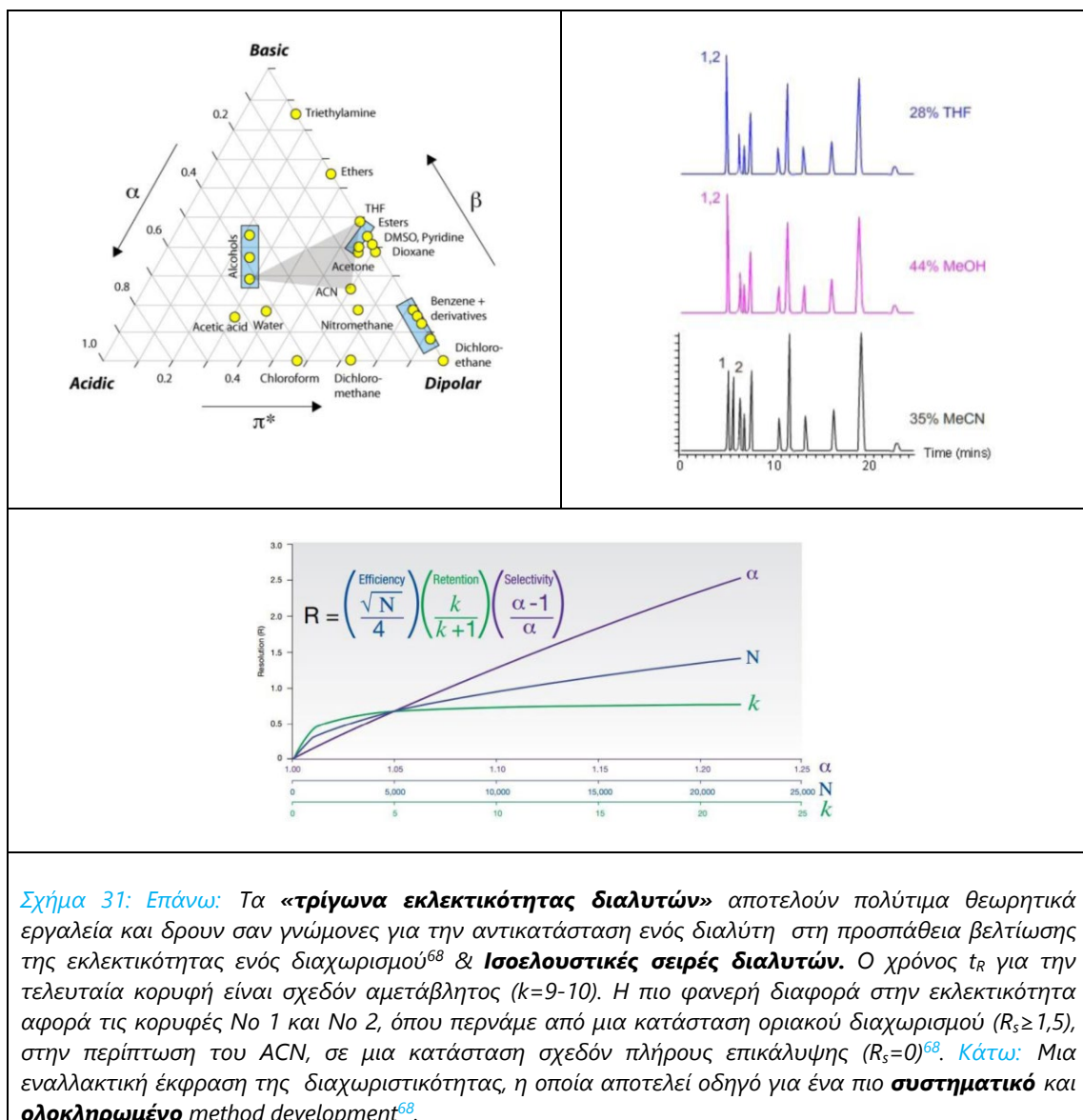
Τέλος, στα πλαίσια της μελέτης της γενικότερης εξάρτησης του όρου R_s από τις βασικές πειραματικές συνθήκες, η διαχωριστικότητα για δύο γειτονικές κορυφές με παρόμοιους χρόνους t_R (οπότε και εύρη $W_{b(1)} = W_{b(2)} = W$) εκφράζεται και ως

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} * \frac{k_2}{1+k_2} * \frac{(\alpha-1)}{\alpha} \quad (13)$$

Η παραπάνω σχέση προκύπτει μέσα από μετατροπές των σχέσεων που περιγράφουν τις θεμελιώδεις έννοιες της συγκράτησης, της εκλεκτικότητας, του διαχωρισμού και της αποτελεσματικότητας. Είναι εφαρμόσιμη σε αυτή τη μορφή αν η υπολογισμένη αποδοτικότητα της στήλης είναι ίδια για τις ενώσεις 1 και 2. Προσεγγίζει με έναν εναλλακτικό τρόπο προσέγγισης τη διαχωριστικότητα και αποτελεί οδηγό για ένα πιο **συστηματικό** και **ολοκληρωμένο** method development. Από τη παραπάνω σχέση προκύπτει ότι η διαχωριστική ικανότητα (R_s) μπορεί να βελτιωθεί με διαφορετικούς τρόπους (k , α , N), ωστόσο η εκλεκτικότητα (α) είναι μακράν **ο πιο αποτελεσματικός** (Σχήμα 31). Η τελευταία μεταβάλλεται, όπως είδαμε, κυρίως με αλλαγές στη σύσταση του διαλύτη και διατήρηση της συνολικής πολικότητας της κινητής φάσης ($P_{ολική}$) ώστε να μη μεταβληθεί η συγκράτηση. Η αύξηση του παράγοντα k (με αύξηση πολικότητας της

κινητής φάσης) να μην επιφέρει σημαντική βελτίωση του διαχωρισμού, ωστόσο αυξάνονται σημαντικά οι χρόνοι t_R .

Η αύξηση των θεωρητικών πλακών (N) μέσω μεταβολών στις συνθήκες της στήλης (column conditions) π.χ. μείωση στη ροή, αύξηση στο μήκος (L) ή μείωση στο μέγεθος των σωματιδίων, αναμένεται να έχει **μέτρια συνεισφορά** στην βελτίωση του διαχωρισμού (R_s). Η συνεισφορά αυτή είναι ακόμη μικρότερη όταν πρόκειται για ισοκρατικές αναλύσεις, και μάλιστα σε βάρος του συνολικού χρόνου ανάλυσης. Μάλιστα, όταν ο διαχωρισμός είναι εγγενώς καλός ($R_s \gg 2$), τότε ίσως επιλεχθεί μια μείωση στο μήκος L (μείωση του χρόνου ανάλυσης). Συνήθως, η πλήρης αντικατάσταση της στατικής φάσης (αλλαγή υποκαταστάτη R στο σιλάνιο) αποφεύγεται διότι υπάρχει κίνδυνος μεγάλων μεταβολών στην εκλεκτικότητα της στήλης.



Σχήμα 31: Επάνω: Τα «**τρίγωνα εκλεκτικότητας διαλυτών**» αποτελούν πολύτιμα θεωρητικά εργαλεία και δρουν σαν γνώμονες για την αντικατάσταση ενός διαλύτη στη προσπάθεια βελτίωσης της εκλεκτικότητας ενός διαχωρισμού⁶⁸ & **Ισοελουστικές σειρές διαλυτών**. Ο χρόνος t_R για την τελευταία κορυφή είναι σχεδόν αμετάβλητος ($k=9-10$). Η πιο φανερή διαφορά στην εκλεκτικότητα αφορά τις κορυφές Νο 1 και Νο 2, όπου περνάμε από μια κατάσταση οριακού διαχωρισμού ($R_s \geq 1,5$), στην περίπτωση του ACN, σε μια κατάσταση σχεδόν πλήρους επικάλυψης ($R_s=0$)⁶⁸. Κάτω: Μια εναλλακτική έκφραση της διαχωριστικότητας, η οποία αποτελεί οδηγό για ένα πιο **συστηματικό** και **ολοκληρωμένο** method development⁶⁸.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 4: Οργανολογία και αντιδραστήρια

4.1 Οργανολογία

Για την ανάπτυξη και εν συνεχεία την επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό της κιτρικής βουταμιράτης και του βενζοϊκού οξέος σε σιρόπι, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αναλυτικά όργανα, πειραματικές διατάξεις και αναλώσιμα γενικής χρήσης:

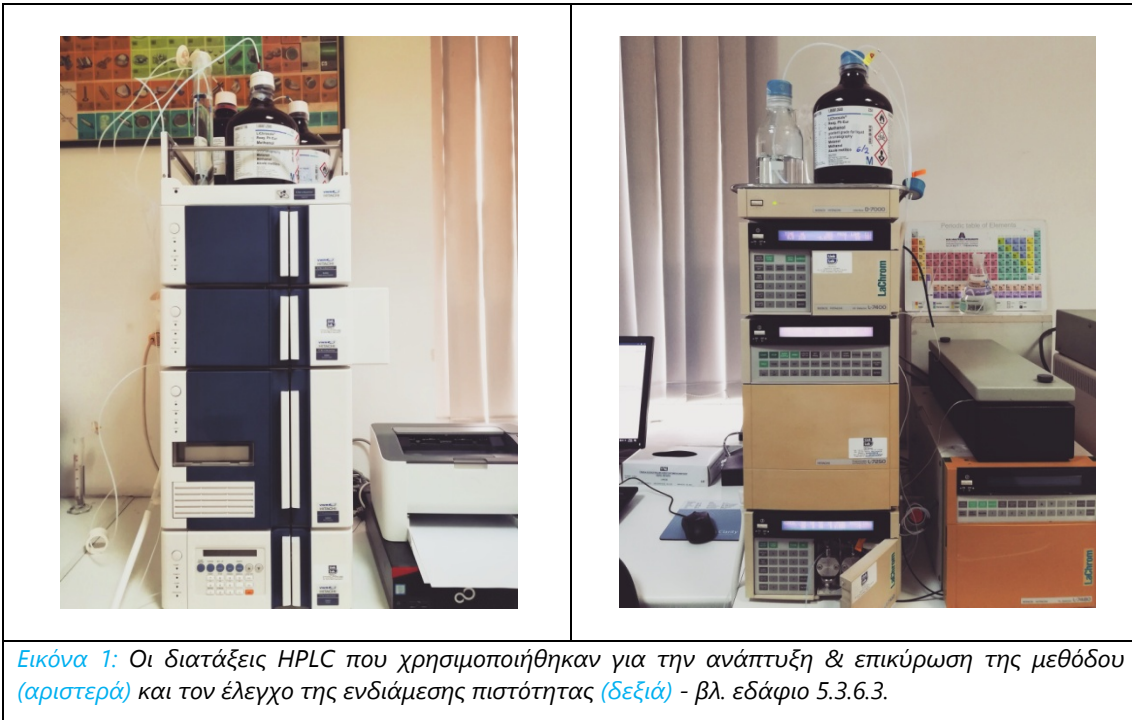
➤ **Συσκευές υγροχρωματογραφίας HPLC**

Η εκτέλεση των πειραμάτων βασίστηκε στο χρωματογραφικό σύστημα HPLC τύπου Chromaster της εταιρείας VWR Hitachi. Το σύστημα αυτό φέρει ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA Detector) με στοιχεία DAD 5430-P/N 893-8053 και λυχνίες D₂ και W. Επίσης, φέρει εσωτερικό φούρνο στηλών με στοιχεία Column Oven 5310, αυτόματο δειγματολήπτη βρόγχου 100 μL με στοιχεία Auto Sampler 5260 και σύστημα άντλησης με στοιχεία Pump 5160.

Στο πλαίσιο της μελέτης της **ενδιάμεσης πιστότητας** (βλ. εδάφιο 5.3.6.3) χρησιμοποιήθηκε ένα δεύτερο χρωματογραφικό σύστημα HPLC με επωνυμία Merck-Hitachi. Το σύστημα αυτό φέρει ανιχνευτή απορρόφησης UV-Vis μεταβλητού μήκους κύματος (190-600 nm) με στοιχεία UV Detector L-7400 και σύστημα διπλής δέσμης (variable wavelength UV detector). Επίσης, φέρει αυτόματο δειγματολήπτη βρόγχου 200 μL με στοιχεία L-7250 και σύστημα άντλησης με στοιχεία L-7100.

Τα παραπάνω χρωματογραφικά συστήματα ήταν συνδεδεμένα σε ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου και έγινε η καταγραφή, η επεξεργασία και η παρουσίαση των πειραματικών δεδομένων. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Clarity VA (Chromatography software) της εταιρείας DataApex.

- **Αναλυτική στήλη νιτριλίου (CN)** και συγκεκριμένα χημικά συνδεδεμένου μονομερούς κυανο-πρότυλο σιλανίου η οποία είχε ως «βάση» (υλικό στήριξης) σφαιρικά σωματίδια απενεργοποιημένης (base-deactivated) silica, με στοιχεία Pinnacle II Cyano 250 mm * 4,6 mm * 5 μm #15111579J και επωνυμία Restek (Restek Corporation, Bellefonte, PA).
- **Αναλυτικός ψηφιακός ζυγός** ακρίβειας ανάγνωσης 4 δεκαδικών ψηφίων επωνυμίας Precisa, μοντέλο 404 A, S/N 32164 (Calibration:27/02/2020). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε **αναλυτικός ψηφιακός ζυγός** ακρίβειας ανάγνωσης 2 δεκαδικών ψηφίων της εταιρείας A&D Instruments LTD, μοντέλο GF-2000 (Max 2.100 g-Min 0,5 g), S/N 14600297.
- **Φορητό Πεχάμετρο** ακρίβειας ανάγνωσης 3 δεκαδικών ψηφίων, μοντέλο 913 pH Meter με ηλεκτρόδιο υάλου της εταιρείας Metrohm



Εικόνα 1: Οι διατάξεις HPLC που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη & επικύρωση της μεθόδου (αριστερά) και τον έλεγχο της ενδιάμεσης πιστότητας (δεξιά) - βλ. εδάφιο 5.3.6.3.

- **Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου ύδατος** (καθαρότητας HPLC), μοντέλο MilliQ® με φίλτρα τύπου MilliPak® και εύρους πόρων 0,22 μm-S/N 0870, της εταιρείας Millipore
- **Συσκευή υπερήχων**, μοντέλο TransSonic 460 -S/N D-78224, της εταιρείας Elma®
- **Πλυντήριο καθαρισμού** σκευών εργαστηρίου, μοντέλο G-7783, Miele®
- **Διάταξη απαέρωσης** της κινητής φάσης μέσω διήθησης υπό κενό με φίλτρα μεγέθους 47 mm και εύρους πόρων 0,45 μm της εταιρείας Filtres Fioroni. Επίσης χρησιμοποιήθηκε **αντλία κενού-πίεσης** τύπου N86 Laborport της εταιρείας KNF.
- **Μαγνητικός αναδευτήρας** με θέρμανση, μοντέλο RCT Basic της εταιρείας IKA®
- **Φίλτρα σύριγγας** υλικού PVDF για τη διήθηση των διαλυμάτων των δειγμάτων πριν από τη πλήρωση των vials δειγματοληψίας, μεγέθους 25 mm και εύρους πόρων 0,45 μm, της εταιρείας Restek (Restek Corporation, Bellefonte, PA).
- **Γυάλινα φιαλίδια** διαμέτρου 11 mm, χωρητικότητας 2 mL με πώμα (11 mm Open Top Snap Caps & Septa) της εταιρείας Alwsci Technologies®



Εικόνα 2: Συσκευές, αναλυτικά όργανα, πειραματικές διατάξεις και αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη & επικύρωση της μεθόδου.



Cat.# 9416575

Pinnacle DB Cyano Columns (USP L10)

Stationary Phase Category: cyano (L10)
Ligand Type: cyanopropylsilane
Particle: 5 µm, spherical
Pore Size: 140 Å
Carbon Load: 4%
End-Cap: yes
Surface Area: 150 m²/g
pH Range: 2.5 to 8
Maximum Temperature: 80 °C

Similar Phase(s): Spherisorb Cyano, Zorbax CN



Εικόνα 3: Επάνω: Τα χαρακτηριστικά της στήλης κυανο-πρότυλο σιλανίου που χρησιμοποιήθηκε, όπως αναγράφονται από τον κατασκευαστή. Κάτω: Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης & επικύρωσης της μεθόδου. Πηγή: <https://www.restek.com/catalog/view/4724>

4.2 Αντιδραστήρια - Διαλύτες - Πρότυπες ουσίες

Παρακάτω αναφέρονται οι **διαλύτες** που χρησιμοποιήθηκαν ως μέσα (diluent) για τη προετοιμασία των διαλυμάτων παρακαταθήκης (stocks) και των διαλυμάτων εργασίας των καθαρών ουσιών ή των δειγμάτων, και ως κινητές φάσεις της χρωματογραφίας. Αναφέρονται επίσης τα πρόσθετα **αντιδραστήρια** της κινητής φάσης (additives) που χρησιμοποιήθηκαν για τη ρύθμιση του pH και ως απανεργοποιητές.

- **Νερό καθαρότητας UHPLC** (Water for UHPLC Supergradient-Transmittance at 210 nm: ≥98%), PanReac AppliChem[®], ITW Reagents
- **Μεθανόλη καθαρότητας HPLC** (Reag. Ph. Eur. Methanol Gradient Grade for LC- Purity ≥99,8%, Transmittance at 210 nm: ≥30%), LiChrosolv[®]
- **Φωσφορικό οξύ, H₃PO₄** (Phosphoric acid, puriss. p.a., ACS reagent, reag. ISO, reag. Ph. Eur., ≥85%)-Lot# SZBE2040V), Sigma-Aldrich[®]
- **Υδροξείδιο του νατρίου, NaOH 1 M (1 N)**, Honeywell Fluka[™]
- **Δισόξινο φωσφορικό νάτριο** στη μονοϋδρική μορφή, (NaH₂PO₄)*H₂O, (Sodium dihydrogen phosphate monohydrate for analysis, ACS reagent Ph. Eur.), M.B.:137,98 g/moL - Lot: AM 1173946 821, Merck[®]

- **Τριαυλαμίνη-N(Et)₃** (TEA), (≥99%-Type T0886)-Lot: STBH0066, Sigma-Aldrich®

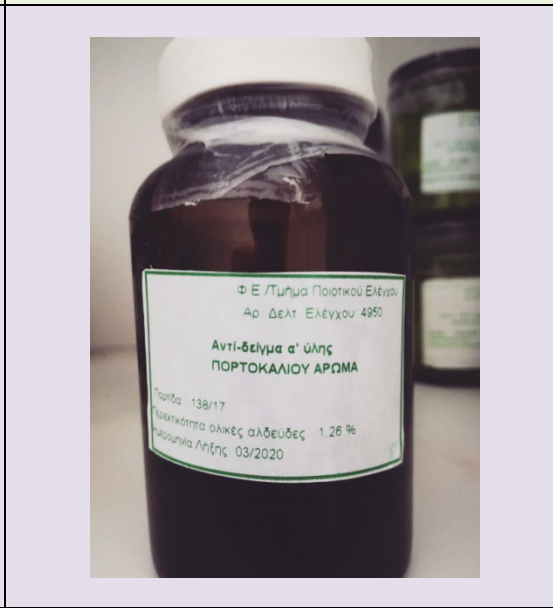
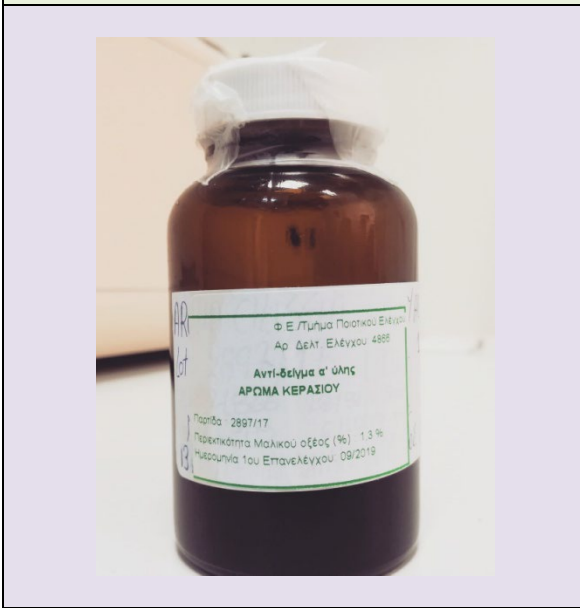
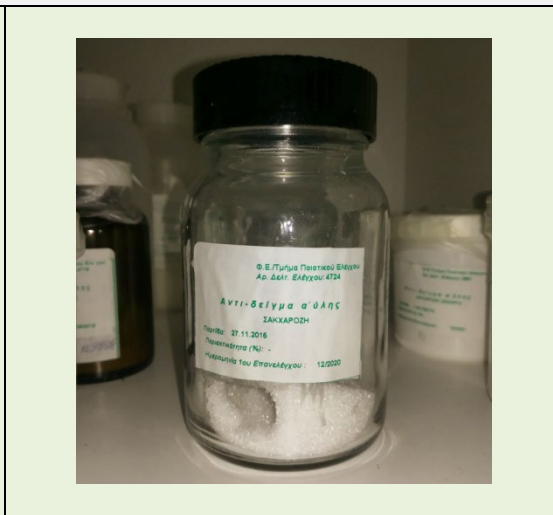
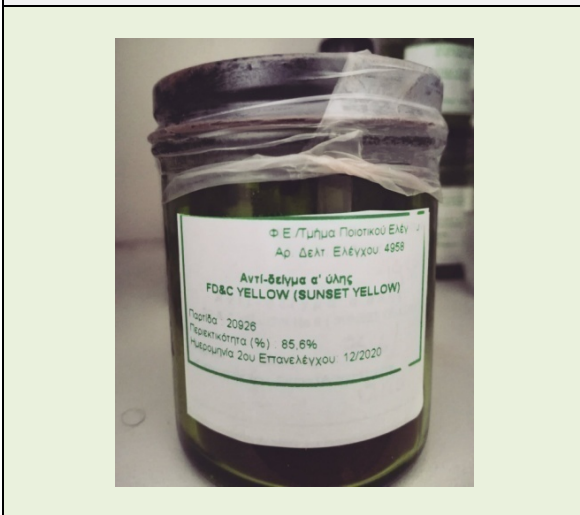
Για την παρασκευή των διαφόρων πρότυπων διαλυμάτων παρακαταθήκης (Stock Standard Solutions, SSTs) από τα οποία προέκυψαν τα πρότυπα διαλύματα εργασίας (Working Standard Solutions, WSSs) χρησιμοποιήθηκαν οι εξής **πρότυπες ουσίες**:

- **Home working standard (HWS)** Κιτρικής Βουταμιράτης (B.C.) καθαρότητας 99%, Lot #1910350, Ποσότητα 20,0 g (από αντι-δείγμα 1^{ης} ύλης- Lot #12030616), με Reference Standard Προτυποποίησης: B.C. Working Standard-Batch #04021200. Το δείγμα ανταποκρίθηκε στους όρους της Ph. Bohemica 2009 /MMIX (Ph. B. page 3.782-3.785, "Butamirate Citrate") η οποία περιέχει τις μονογραφίες της Ph. Eur. (6th Edition & 1st, 2nd Supplements).
- **Home working standard (HWS)** Βενζοϊκού οξέος (B.A.), καθαρότητας 99,7%, Lot #2006356

Για τη παρασκευή του διαλύματος placebo (διαδικασία επικύρωσης-στάδιο ελέγχου/απόδειξης της ειδικότητας της μεθόδου, παράγραφος 5.3.3) χρησιμοποιήθηκαν τα εξής **έκδοχα** και **διαλύτες** :

- **Αντι-δείγμα 1^{ης} ύλης** FD&C Yellow No 6 (σκόνη Sunset Yellow), $UV_{\text{απορ.}}=400-600 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{max}}=484 \text{ nm}$), καθαρότητας 85,6%, Lot #20926
- **Αντι-δείγμα 1^{ης} ύλης** Αιθέριου ελαίου (αρώματος) κερασιού (χυμός κερασιού), περιεκτικότητας 1,3% σε μαλικό οξύ ($C_4H_6O_5$), Lot #2897/17
- **Αντι-δείγμα 1^{ης} ύλης** Αιθέριου ελαίου (αρώματος) πορτοκαλιού (orange oil), $UV_{\text{απορ.}}=260-400 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{max}}=300\pm 3 \text{ nm}$), περιεκτικότητας 1,28% σε ολικές αλδεϋδες-υπολογισμένες ως δεκανόλη ($C_{10}H_{20}O$), Lot #138/17
- **Αντι-δείγμα 1^{ης} ύλης** Σακχαρόζης ($C_{12}H_{22}O_{11}$), Lot #27.11.2015
- **Αιθυλική αλκοόλη** (AnalaR NORMAPUR® analytical reagent, 99%) -Lot# 10F180516
- **Ύδωρ απεσταγμένο** (q.s.) από τη συσκευή MilliQ® (βλ. ενότητα 4.1)

Με βάση το δελτίο παραγωγής του αρμόδιου τμήματος του εργαστηρίου (τμήμα παραγωγής), έγινε αναγωγή της ποσότητας κάθε συστατικού στον τελικό όγκο του διαλύματος placebo που παρασκευάστηκε (200 mL σιρόπι στερούμενο B.C. και B.A.).



Εικόνα 4: Τα συστατικά του φαρμακευτικού σκευάσματος (δραστική ουσία, συντηρητικό, έκδοχα) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων παρακαταθήκης (Stock Standard Solutions, SSTs) και του διαλύματος placebo. Από αυτά προέκυψαν τα πρότυπα διαλύματα εργασίας (Working Standard Solutions, WSSs) και τα διαλύματα εργασίας placebo.

Κεφάλαιο 5: Ανάπτυξη και επικύρωση αναλυτικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της δραστικής ουσίας «Κιτρική Βουταμιράτη» και του συντηρητικού «Βενζοϊκό Οξύ» σε σιρόπι

5.1 Παρόμοιες μελέτες

Η βουταμιράτη χρησιμοποιείται ως κατασταλτικό του ξηρού, μη παραγωγικού βήχα και φέρεται να έχει κεντρική δράση^{12,13}. Συναντάται στα διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα με τη μορφή του κιτρικού άλατος, ενώ χορηγείται κυρίως στη φαρμακοτεχνική μορφή του σιροπιού^{16,17}. Το πόσιμο διάλυμα (σταγόνες) και τα δισκία ελεγχόμενης αποδέσμευσης¹¹ αποτελούν επιπλέον εμπορικά διατιθέμενες μορφές. Αν και πρόκειται για μια δραστική ουσία η οποία είναι ευρέως γνωστή στη διεθνή αγορά, εντούτοις αυτή **δεν** περιγράφεται από κάποια **μονογραφία** επίσημου φαρμάκου (1^η ύλης) ή σκευάσματος εντός κάποιας φαρμακοποιίας. Ωστόσο, στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία η βουταμιράτη αναφέρεται σαν χαρακτηρισμένη πρόσμιξη της οξελαδίνης¹⁸.

Η μοναδική μονογραφία η οποία αναφέρεται στη βουταμιράτη ως 1^η ύλη ανήκει στην Τσέχικη Φαρμακοποιία (**μονογραφία:** Butamirate Citrate/ Butamirati dihydrogenocitras). Από το 1997 και έπειτα η εν λόγω φαρμακοποιία (Pharmacopoea Bohemica MCMXCVII) εκδίδεται σαν μέρος της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας (συμπεριλήφθηκε για πρώτη φορά στην Ph. Eur. 3rd Ed.) Στη Τσέχικη Φαρμακοποιία του 2009 (Pharmacopoea Bohemica MMIX-Eur. 6th Ed.), η μονογραφία της κιτρικής βουταμιράτης περιγράφεται στις σελίδες **3.782-3.785**.

Έπειτα από ενδελεχή έρευνα στη διεθνή βιβλιογραφία από τις αρχές της δεκαετίας μέχρι και σήμερα, προκύπτει ότι ο αριθμός των μελετών σχετικά με την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό της βουταμιράτης δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλος. Αρκετές μελέτες έχουν βασιστεί στη φασματοφωτομετρία UV-Vis με επακόλουθη «παραγωγή» των ληφθέντων φασμάτων (derivative UV-Spectrophotometry)⁷³. Η προσέγγιση αυτή υιοθετείται επειδή όταν το μητρικό υλικό είναι σιρόπι, η παρουσία των διαφόρων εκδόχων καθιστά το φάσμα εξαιρετικά πολύπλοκο. Έτσι, η έγκυρη ερμηνεία των αποτελεσμάτων με απλή φασματοφωτομετρία (zero order UV-Spectrophotometry) είναι σχεδόν αδύνατη.

Σε μια παρόμοια μελέτη, η παραπάνω τεχνική συγκρίθηκε με μια δεύτερη προτεινόμενη μέθοδο χρωματογραφίας HPLC-DAD¹⁶. Οι δύο αυτές μέθοδοι αποδείχθηκαν επαρκώς κατάλληλες για το σκοπό τους, ωστόσο η τεχνική της φασματοφωτομετρίας UV-Vis με «παραγωγή» περιλάμβανε το επιπλέον στάδιο της εκχύλισης (extraction). Αν και η εκχύλιση ενισχύει την απόδοση μιας μεθόδου, αποτελεί ένα **επίπονο** και **χρονοβόρο** βήμα.

Επιπλέον, έχει αναφερθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός της κιτρικής βουταμιράτης με φασματοφωτομετρική μέτρηση έγχρωμων παραγώγων του μορίου⁷⁴. Και εδώ, θα πρέπει να τονιστεί ότι η διαδικασία της παραγωγοποίησης

(derivatization) μπορεί να αποβεί αρκετά **απαιτητική, χρονοβόρα και κοστοβόρα**. Η εκλογή του κατάλληλου αντιδραστηρίου (derivatization reagent) για την εξασφάλιση της μέγιστης απόδοσης της αντίδρασης αποτελεί το πιο κρίσιμο βήμα. Φυσικά, αυτό ισχύει και όταν η παραγωγοποίηση συνδυάζεται με διάφορες άλλες τεχνικές, όπως η χρωματογραφία HPLC. Είναι δυνατόν να μιλάμε για παραγωγοποίηση πριν (pre-column) ή μετά το διαχωρισμό (post-column) και φυσικά πριν το ανιχνευτή.

Πρόσφατα, η κιτρική βουταμιράτη προσδιορίστηκε μετά από χρήση ειδικών αντιδραστηρίων για το σχηματισμό ζεύγους ιόντων (methyl orange, bromothymol blue), εκχύλιση με δίχλωρο-μεθάνιο και μέτρηση της απορρόφησης του έγχρωμου προϊόντος. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν τόσο σε έτοιμο (χύμα) προϊόν όσο και σε φαρμακευτικό σκεύασμα⁷⁵. Στο παρελθόν έχει επιτευχθεί ο χειρόμορφος διαχωρισμός της βουταμιράτης από άλλα εναντιομερή με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση, χάρη στη βοήθεια μιας κυκλοδεξτρίνης (Chiral Solvating Agent)⁷⁶.

Γενικότερα, τα τελευταία χρόνια οι βιβλιογραφικές αναφορές για τον προσδιορισμό της βουταμιράτης βασίζονται ως επί το πλείστον σε **πρωτόκολλα χρωματογραφίας HPLC**^{17,26,77-79}, και συγκεκριμένα **HPLC-UV**. Κάποιες από αυτές είναι μέθοδοι ειδικές για τον έλεγχο της σταθερότητας (SIAMs) και αφορούν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της δραστικής και των προϊόντων διάσπασης αυτής. Όπως είναι λογικό, οι περισσότερες μελέτες αφορούν αναλύσεις σε σιρόπι. Σε ορισμένες από αυτές, οι μετρήσεις πραγματοποιούνται ταυτόχρονα τόσο σε σιρόπι όσο και σε δισκία²⁶.

Το βενζοϊκό οξύ είναι ένα από τα πιο γνωστά συντηρητικά τροφίμων τα οποία προστίθενται για να σταματήσουν ή να καθυστερήσουν την απώλεια θρεπτικών συστατικών εξαιτίας μικροβιολογικών, ενζυμικών ή χημικών αλλαγών των τροφών⁴⁷. Ωστόσο, πολλά από τα πρόσθετα τροφίμων είναι χρήσιμα και άκρως απαραίτητα συστατικά στα περισσότερα φαρμακοτεχνικά σκεύασματα, και ιδιαίτερα στα **σιρόπια**. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η ακεραιότητα των προϊόντων ή/και βελτιώνεται η γεύση, το χρώμα και η εμφάνιση, όπου αυτό είναι απαραίτητο⁴⁸. Ειδικά στα σιρόπια, η παρουσία συντηρητικού είναι απαραίτητη διότι τα έκδοχα και μερικές φορές ακόμα και το δραστικό συστατικό καταστρέφονται από διαφορετικούς μικροοργανισμούς και εν τέλει αλλοιώνεται η φαρμακοτεχνική μορφή στο σύνολό της⁴⁹.

Όπως και στον κλάδο των τροφίμων, έτσι και στις φαρμακευτικές παρασκευές, το βενζοϊκό οξύ και τα άλατα του (αναγνωριστικό της ταυτότητάς τους είναι το γράμμα E) είναι ένα τα πιο γνωστά συντηρητικά³³. Το βενζοϊκό οξύ είναι γνωστό ως E210. Ακόμη, τα συνθετικά συντηρητικά συνιστούν τη πιο μεγάλη και συχνά χρησιμοποιούμενη κατηγορία συντηρητικών στα φαρμακευτικά προϊόντα⁴⁹. Οι εστέρες του π-υδρόξυ βενζοϊκού οξέος με διάφορες αλκοόλες είναι γνωστοί ως υδρόξυ βενζοϊκά ή parabens (π.χ. methylparaben-MP, propylparaben-PP)⁵⁰. Χρησιμοποιούνται είτε ανεξάρτητα είτε συνδυασμένα, σαν αντιμικροβιακά

συντηρητικά⁴⁹.

Βιβλιογραφικά, το βενζοϊκό οξύ συναντάται σε πάρα πολλές μελέτες που αφορούν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του μαζί με μια δραστική ουσία ή/και διάφορα άλλα αντιμικροβιακά συντηρητικά (π.χ. parabens). Οι μέθοδοι αυτές αφορούν είτε φαρμακοτεχνικές μορφές σιροπιού^{31,48,49} είτε διάφορες άλλες φαρμακοτεχνικές μορφές (σκευάσματα) ή έτοιμο προϊόν³⁹, καθώς και έτοιμη (χύμα) 1^η ύλη³³. Παλαιότερα, έχει αναφερθεί ο ταυτόχρονος του προσδιορισμός βενζοϊκού οξέος και της κιτρικής βουταμιράτης. Αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια μέθοδος για τον έλεγχο της σταθερότητας (SIAM) σε σιρόπι, βασισμένη στη χρωματογραφία HPLC-UV¹⁷.

5.2 Ανάπτυξη μεθόδου (method development) - επιδιωκόμενοι στόχοι & κατευθυντήριες γραμμές

Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της δραστικής ουσίας *Κιτρική Βουταμιράτη* και του συντηρητικού *Βενζοϊκό Οξύ* σε σκεύασμα σιρόπι. Το προϊόν αυτό παράγεται από στα Φαρμακευτικά Εργαστήρια του Ελληνικού Στρατού (441 ABYY) και διανέμεται αποκλειστικά στα φαρμακεία των στρατιωτικών δομών της χώρας. Ο παραπάνω στόχος προέκυψε ως ανάγκη αντικατάστασης της προηγούμενης μεθόδου ανάλυσης, η οποία είχε επίσης αναπτυχθεί και επικυρωθεί στα εργαστήρια της 441 ABYY.

Η μέθοδος αυτή στηριζόταν στον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των αναλυτών έπειτα από εκχύλιση υγρού-υγρού (liquid-liquid extraction) με διαλύτη πετρελαϊκό αιθέρα. Ωστόσο, όπως ήδη αναφέραμε πιο πάνω, η εκχύλιση είναι μια διαδικασία **επίπονη** και **χρονοβόρα**. Απαιτούνται εξαιρετικά **λεπτοί χειρισμοί** από έναν αναλυτή σε κάθε στάδιο. Ως παράδειγμα για τη συγκεκριμένη περίπτωση, αναφέρουμε ενδεικτικά τους κρίσιμους αρχικούς διαχωρισμούς της αιθερικής στοιβάδας (περιέχει τη βουταμιράτη) από την υδατική στοιβάδα (περιέχει το βενζοϊκό οξύ) με 2 ποσότητες αιθέρα. Στη συνέχεια, η πρώτη εκχυλίζεται 3 φορές με HCl 0,5 N και έτσι δημιουργείται άλλη μια υδατική στοιβάδα, η οποία απομονώνεται. Η στοιβάδα αυτή περιέχει τη κιτρική βουταμιράτη σχεδόν απαλλαγμένη από τις διάφορες λιπόφιλες ουσίες του δείγματος.

Έτσι λοιπόν, η προτεινόμενη αναλυτική μέθοδος έπρεπε να είναι **απλή, άμεση, εύχρηστη, έγκυρη** και όσο το δυνατόν **λιγότερο χρονοβόρα** σε επίπεδο ρουτίνας. Αποφασίστηκε να κινηθούμε προς την κατεύθυνση της ανάπτυξης μιας μεθόδου RP-HPLC. Επίσης, έγινε προσπάθεια να αποφευχθεί το στάδιο της παραγωγοποίησης, το οποίο είναι αρκετά **χρονοβόρο** και εισάγει **αστάθμητους** παράγοντες.

Κατ' αρχήν, συγκεντρώθηκαν και συνεκτιμήθηκαν όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες για τη **φυσικοχημική συμπεριφορά** καθενός από τους εμπλεκόμενους αναλύτες. Οι πληροφορίες αυτές αφορούν την τιμή διαφόρων

σταθερών όπως η pK_a , η $\log P$ και το σημείο ζέσεως ενός χημικού είδους καθώς και το είδος μιας **δυναμικής αλληλεπίδρασης** (π.χ. με Δ.Η.) με κάποιον διαλύτη ή/και κάποια στατική φάση (βλ. ενότητες 1.3 και 1.4).

Για το σχεδιασμό ενός αρχικού πρωτοκόλλου και τη διεξαγωγή των **προκαταρκτικών δοκιμών**, βασιστήκαμε σε προτεινόμενες οδηγίες από διεθνώς αναγνωρισμένα συγγράμματα^{59,61,63}, σε γενικές θεωρητικές γνώσεις και σε συνήθειες πρακτικές που εφαρμόζονται σε κάθε εργαστήριο. **Το θεωρητικό υπόβαθρο και το σκεπτικό πίσω από κάθε επιλογή για μια παράμετρο είναι αποτέλεσμα των όσων αναλύονται λεπτομερώς στο κεφάλαιο 3 (ενότητες 3.1 έως 3.7).** Έτσι λοιπόν, οι αναλυτικές παράμετροι που επιλέχθηκαν έχουν ως εξής:

5.2.1 Στήλη

Η επιλογή της στατικής φάσης (δηλαδή της στήλης που περιέχει τη στατική φάση) αποτελεί την πιο κρίσιμη αρχική επιλογή. Η χημική δομή των αναλυτών **υποδεικνύει** τα διαφορετικά είδη αλληλεπιδράσεων στα οποία θα στηριχτεί η συγκράτησή τους καθώς και το βαθμό συνεισφοράς κάθε δεσμού στη συνολική συγκράτηση. Πραγματοποιήθηκαν ορισμένες αρχικές δοκιμές με μια στήλη **C18** (πηκτή πυριτίας ODS) 250mm * 4,6 mm * 5μm τύπου **Pinnacle II** της εταιρείας Restek. Παρατηρήθηκε μια εξαιρετικά ασθενής συγκράτηση για τον αναλύτη Β.Α. (σχεδόν στο μέτωπο του διαλύτη), και σε κάποιες περιπτώσεις μια έντονη συγκράτηση της Β.Σ. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την υπερβολικά καθυστερημένη έκλυση της Β.Σ.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν κάποιες δοκιμές με μια στήλη πηκτής πυριτίας φαινυλιωμένων (συγκεκριμένα διφαινυλιωμένων) σιλοξανίων, τύπου **Allure Biphenyl** της εταιρείας Restek. Τώρα, η συγκράτηση καθορίστηκε κυρίως από τις π-π αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους δακτυλίους των αναλυτών και στη στατική φάση. Οι τιμές των χρόνων t_R για τους αναλύτες μειώθηκαν σημαντικά, κάτι το οποίο είναι επιθυμητό. Αυτό είναι αναμενόμενο αν λάβουμε υπόψη την ασθενή φύση των παραπάνω αλληλεπιδράσεων. Επίσης, όπως παρουσιάστηκε στο **Σχήμα 16** (εδάφιο 2.5.1.4), η εν λόγω στατική φάση θεωρείται από τις πιο πολικές εκ των στατικών φάσεων χρωματογραφίας R.P. Επομένως, η συγκράτηση της Β.Σ. (σχετικά άπολος αναλύτης) είναι λογικό να είναι μικρή. Ωστόσο, οι χρόνων t_R των αναλυτών ήταν πολύ κοντά και αυτό οδήγησε στη συνέκλυση των αναλυτών.

Πριν να γίνουν προσπάθειες βελτίωσης του διαχωρισμού με τις συνήθειες προσεγγίσεις (ποσοστό υδατικού μέρους, αλλαγή διαλύτη, μεταβολές στο pH) αποφασίστηκε να εξεταστεί η περίπτωση μιας ιδιαίτερης στατικής φάσης. Χρησιμοποιήθηκε ένα ιδιαίτερο είδος στήλης με στατική φάση νιτριλίου (**-CN**), και συγκεκριμένα κυανο-πρότυλο σιλανίου (cyanopropylsilane) δεσμευμένου (attached) επάνω σε σφαιρικά σωματίδια (support material) πυριτίας (SiO_2). Οι εν λόγω στατικές φάσεις έχουν παρουσιαστεί λεπτομερώς στο εδάφιο 2.5.1.4. Θωρούνται ως **οι πιο πολικές εκ των στατικών φάσεων RP-HPLC** και **οι λιγότερο πολικές εκ των στατικών φάσεων NP-HPLC**. Συστήνονται ως

εξαιρετικές επιλογές για αναλύσεις διαχωρισμού πρωτονιομένων βάσεων⁷⁰, όπως δηλαδή η κιτρική βουταμιράτη.

Η χρήση στήλης νιτριλίου για την ποσοτικοποίηση της κιτρικής βουταμιράτης έχει αναφερθεί μόνο σε μία περίπτωση έως τώρα στη βιβλιογραφία⁷⁷. Κατά κανόνα, οι προσδιορισμοί βασίζονται στις κατεξοχήν «άπολες» στήλες C18^{16,26,78,79} ή C8¹⁷. Παρατηρήθηκε εξ' αρχής ένας ικανοποιητικός διαχωρισμός των αναλυτών ($R_s \approx 1,94$) χωρίς κίνδυνο αλληλοεπικάλυψης των κορυφών. Ωστόσο, οι κορυφές των ενώσεων B.A και B.C. ήταν εξαιρετικά ασύμμετρες ($A_s \approx 2,69$ για το B.A. και $2,27$ για τη B.C.). Αποφασίστηκε να συνεχιστεί η διαδικασία ανάπτυξης της μεθόδου με την εν λόγω στήλη. Η συγκράτηση σε μια στήλη νιτριλίου οφείλεται κυρίως σε π-π αλληλεπιδράσεις και σε αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου (Σχήμα 32).

5.2.2 Διαλύτες

Όπως είδαμε στο κεφάλαιο 3, η εκλογή του διαλύτη είναι άλλο ένα κρίσιμο αρχικό ζήτημα λόγω της επίδρασής της στην εκλεκτικότητα ενός συστήματος. Βασίζεται σε συγκεκριμένες ιδιότητες που σχετίζονται με τη δομή του διαλύτη, ενώ ταυτόχρονα υπεισέρχονται πρακτικά ζητήματα όπως το κόστος, η τοξικότητα και η αναμιξιμότητα με άλλους διαλύτες. Οι θεμελιώδεις αυτές ιδιότητες (solvent properties) είναι το ιξώδες, το σημείο αποκοπής, το σημείο ζέσεως, η καθαρότητα, η σταθερότητα, ο δείκτης διάθλασης και η **εκλουστική ισχύς (ϵ^0)**. Ακόμη, λαμβάνονται υπόψη οι μεταβλητές οι οποίες καθορίζουν την παράμετρο πολικότητας P' και επηρεάζουν τη συγκράτηση: ο **διπολικός χαρακτήρας (π^*)**, η **οξύτητα (α)** και η **βασικότητα (β)** (βλ. ενότητα 3.2).

Οι περισσότεροι διαλύτες της RP-HPLC αποτελούν εναλλακτικές λύσεις τριών βασικών επιλογών: του THF, της MeOH και του ACN. Το THF είναι ισχυρός διαλύτης (μεγάλη εκλουστική ισχύς ϵ^0) στη χρωματογραφία RP-HPLC και μπορεί να επιδράσει με ευκολία επί της στατικής φάσης, εκλούοντας τα συστατικά που συγκρατήθηκαν (προσροφήθηκαν ή/και κατανεμήθηκαν). Ωστόσο δεν επιλέχθηκε διότι πρόκειται για μία τοξική και καρκινογόνο ουσία η οποία όταν εκτίθεται στον αέρα διασπάται πολύ εύκολα σχηματίζοντας υπεροξειδία τα οποία ίσως αντιδράσουν με τους αναλύτες. Ακόμη, το σημείο αποκοπής του είναι σχετικά υψηλό (215 nm) ενώ η εξισορρόπηση της στήλης γίνεται βραδύτερα σε σύγκριση με τους διαλύτες MeOH και ACN.

Πραγματοποιήθηκαν αρκετές δοκιμές με διαλύτη το ACN, διότι έχει μικρό ιξώδες (μικρή πίεση χρωματογραφικού συστήματος), αναμιγνύεται με το H₂O και γενικά οδηγεί σε οξείες και συμμετρικές κορυφές. Αν και ο διαχωρισμός ήταν ικανοποιητικός ($R_s > 4$), εξετάσθηκε (και εν τέλει αποφασίστηκε) η αντικατάσταση του ACN από τη MeOH. Αυτό έγινε επειδή οι π-π αλληλεπιδράσεις σε μια στήλη -CN **μειώνονται σημαντικά** όταν χρησιμοποιείται το ACN ως διαλύτης⁶³. Έτσι, παρατηρούνταν μια υπερβολικά γρήγορη έκλουση των αναλυτών και ειδικά του B.A., το οποίο είναι πολύ πιο πολικό από τη B.C. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι

στην περίπτωση της MeOH αυξανόταν η ένταση της απορρόφησης για τους αναλύτες. Τέλος, όπως είδαμε στη παράγραφο 3.3.3, η έκταση του tailing δύναται να επηρεαστεί από τη φύση του διαλύτη. Οι καλύτερες επιλογές είναι η MeOH και το THF. Ακολουθεί το ACN.

5.2.3 Ρυθμιστικό διάλυμα

Η επιλογή του άλατος για τη παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος έγινε με βάση τα κριτήρια επιλογής που σχολιάσαμε αναλυτικά στην ενότητα 3.4. Ο βασικός γνώμονας είναι η ρυθμιστική ικανότητα (buffering capacity) του άλατος. Είδαμε ότι, κατά κανόνα, **η αύξηση της συγκέντρωσης ενός άλατος βελτιώνει το διαχωρισμό και τη συμμετρία των κορυφών**. Αυτό συμβαίνει διότι αυξάνεται η ιονική ισχύς της κινητής φάσης και αυτό καταστέλλει τις ανεπιθύμητες αντιδράσεις ανταλλαγής ιόντων (ion exchange interactions) μεταξύ των ομάδων Si-OH και των βασικών αναλυτών στη μορφή BH⁺ (σχέση No 6). Ωστόσο, σε κινητές φάσεις χαμηλού pH (pH=3,0 για το υδατικό μέρος στην παρούσα εργασία) και ειδικά όταν χρησιμοποιούνται στήλες τύπου B (στήλες υψηλής καθαρότητας), το μέγεθος C_{άλατος} δε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο.

Φυσικά, απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή διότι όσο αυξάνεται η ιονική ισχύς (δηλαδή η συγκέντρωση του άλατος), τόσο αυξάνεται το φορτίο ($H_2PO_4^- \leftrightarrow HPO_4^{2-}$) και η διαλυτότητα του άλατος στη κινητή φάση μειώνεται. Επίσης, η διαλυτότητα ενδέχεται να επηρεάζεται και από το αντισταθμιστικό ιόν και γενικά αυξάνεται αν ο διαλύτης THF αντικατασταθεί με ίση ποσότητα ACN και ακόμη περισσότερο με ίση ποσότητα MeOH. Σε επίπεδα οργανικού ποσοστού (% B) κάτω του 60% συνήθως δε δημιουργούνται ζητήματα διαλυτότητας. Επιλέχθηκε η συγκέντρωση 50 mM σε ποσοστό 50%. Μετά το πέρας του ελέγχου ανθεκτικότητας (5.3.7), τέθηκε η ανοχή ± 2 mM.

5.2.4 pH

Στα ουδέτερα μόρια, η προσοχή επικεντρώνεται στο πόσα/ποια πολικά και λιπόφιλα τμήματα αυτά φέρουν. Απεναντίας, στα μόρια που φέρουν κέντρα ιοντισμού, στα παραπάνω κριτήρια προστίθεται η δυνατότητα «εκμετάλλευσης» της παραμέτρου του pH. Η ρύθμιση του pH της κινητής φάσης αποτελεί ένα **ισχυρό αναλυτικό εργαλείο** στη χρωματογραφία (κυρίως στη RP-HPLC) διότι καθορίζει εμμέσως τη χρωματογραφική συμπεριφορά (κατακράτηση) του κάθε αναλύτη.

Στην ενότητα 3.6 τονίσαμε ότι σε κάθε χρωματογραφικό διαχωρισμό καλούμαστε να επιλέξουμε ανάμεσα σε δύο **αντιθετικές προσεγγίσεις** σχετικά με τα επίπεδα του pH: Η αυξομείωση του pH **εντός** της περιοχής $pK_a \pm 1$ για τους αναλύτες ενδιαφέροντος (Σχήμα 29-περιοχή II), θα επιφέρει μια σειρά από μεγάλες αλλαγές στη συγκράτηση των μορίων και την εκλεκτικότητα του διαχωρισμού. Ωστόσο, η προκύπτουσα μέθοδος θα είναι εξαιρετικά ευαίσθητη σε τυχαίες, μη σκοπούμενες (unintended) μικρο-μεταβολές των πειραματικών παραμέτρων.

Η αυξομείωση του pH **εκτός** της περιοχής $pK_a \pm 1$ (π.χ. σε έκταση $pK_a \pm 1,5$) ([Σχήμα 29-περιοχές I & III](#)), συνήθως οδηγεί σε λιγότερο ευαίσθητες και επαναλήψιμες αναλύσεις.

Ακόμη, πρέπει να αποφασιστεί αν το pH θα κινηθεί προς το χαμηλό ή προς το υψηλό άκρο. Οι διαχωρισμοί των βασικών αναλυτών (weak bases) εΐθισται να πραγματοποιούνται σε σχετικά **χαμηλές τιμές pH** ώστε οι όποιες τυχόν ελεύθερες σιλανόλες να βρίσκονται σε μη ιοντισμένη κατάσταση ($pK_a \approx 3,5$). (Παρόλα αυτά, η έντονη μεταλλική μόλυνση (ιόντα M^+) θα οδηγεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις $[Si-O^-]$ σε όλες τις τιμές pH). Η αύξηση του pH της κινητής φάσης ώστε να κυριαρχήσει η ουδέτερη μορφή των βασικών αναλυτών (ion suppression) **δε συνηθίζεται** διότι οι στατικές φάσεις χημικά τροποποιημένης πυριτικής πηκτής χρησιμοποιούνται σε μια σχετικά περιορισμένη κλίμακα pH η οποία εκτείνεται μεταξύ 2-7,5 (pK_a βουταμιράτης = 9,41). Στη βιβλιογραφία συναντήσαμε μόνο μία μελέτη στην οποία ο προσδιορισμός της βουταμιράτης έγινε σε υψηλό pH ($9,8 \pm 0,1$)⁷⁹.

Λόγω των όσων αναφέρθηκαν παραπάνω, επιλέχθηκε η τιμή $pH=3,0$ για το ρυθμιστικό διάλυμα. Μετά το πέρας του ελέγχου ανθεκτικότητας (5.3.7), τέθηκε η ανοχή $\pm 0,1$ μονάδες. Φυσικά, με την προσθήκη του οργανικού μέρους το pH της κινητής φάσης αναμένεται να αυξηθεί ελαφρώς. Σε $pH=3,5$ οι ελεύθερες σιλανόλες βρίσκονται κατά ~50% στη μορφή Si-OH και κατά ~50% στη μορφή Si-O⁻ όπως είδαμε στο [Σχήμα 26](#). Όσο το pH μειώνεται, η επιθυμητή ουδέτερη μορφή κυριαρχεί ($\approx 100\%$ για $pH < 1,5$). Ωστόσο, δε θα πρέπει να ξεχνάμε ότι οι χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις είναι εξαιρετικά ευαίσθητες σε πολύ όξινα διαλύματα.

5.2.5 Θερμοκρασία

Στην ενότητα 3.5 αναφέρθηκε ότι το φαινόμενο **tailing** μειώνεται όταν χρησιμοποιούνται **υψηλές** θερμοκρασίες και όταν **αυξάνεται** το οργανικό ποσοστό (% B), διότι μειώνονται οι τιμές των σταθερών k. Ακόμη η αύξηση της θερμοκρασίας **μειώνει το ιξώδες των διαλυτών** και αυτό προκαλεί τη συνολική μείωση της πίεσης του χρωματογραφικού συστήματος. Φυσικά, δε θα πρέπει να ξεχνάμε τον κίνδυνο καταστροφής της στήλης και δημιουργίας φυσαλίδων στη κινητή φάση. Κατά τη διάρκεια του σταδίου ανάπτυξης της παρούσας μεθόδου παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση της ασυμμετρίας σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Επιλέχθηκε η τιμή $T=36$ °C. Μετά το πέρας του ελέγχου ανθεκτικότητας (5.3.7), τέθηκε η ανοχή ± 2 °C.

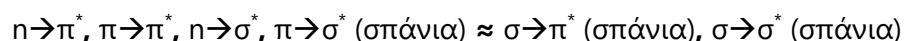
5.2.6 Απενεργοποιητές

Στο εδάφιο 2.4.2.2 διαπιστώθηκε ότι παρά τις διάφορες διαδικασίες παρασκευής επιφανειών τύπου B (πλήρης υδροξυλίωση της σίλικα πριν τη χημική κατεργασία της σιλανοποίησης, σιλανοποίηση, ακροκάλυψη), οι ανεπιθύμητες ελεύθερες σιλανόλες δεν εξαλείφονται πλήρως. Επομένως, η προσθήκη ειδικών

ενώσεων οι οποίες μπορούν να **επιδρουν** επί των ελεύθερων -OH κρίνεται απαραίτητη. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τριαιθυλαμίνη, N(Et)₃ ή αλλιώς TEA, αρχικά σε ποσοστό 0,5% και εν τέλει σε ποσοστό 1%. Παρατηρήθηκε μια αρκετά ικανοποιητική βελτίωση της ασυμμετρίας. Μετά την ολοκλήρωση του ελέγχου ανθεκτικότητας (5.3.7), τέθηκε η ανοχή $\pm 0,05\%$.

5.2.7 Μήκος κύματος

Η απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (200-900 nm) οφείλεται σε διεγέρσεις ηλεκτρονίων από τα υψηλότερης ενέργειας κατειλημμένα μοριακά τροχιακά (δεσμικά) στα χαμηλότερης ενέργειας μη κατειλημμένα μοριακά τροχιακά (αντιδεσμικά) σ^* και π^* . Οι ομάδες που είναι υπεύθυνες για την απορρόφηση του μορίου μιας χημικής ένωσης καλούνται **χρωμοφόρα**. Οι ομάδες που έχουν την ιδιότητα να αυξάνουν την απορρόφηση ενός χρωμοφόρου, χωρίς όμως οι ίδιες να απορροφούν, ονομάζονται **αυξόχρωμα**. Στη φαρμακευτική ανάλυση, η παρουσία χρωμοφόρων επάνω στα διάφορα μόρια πολύ συχνά οδηγεί στην επιλογή ενός ανιχνευτή UV-Vis. Κατά κανόνα, συναντάμε **αρωματικά** μόρια που επιπλέον φέρουν κάποια **καρβοξυλομάδα** ή **κετονική** ομάδα ή **καρβονύλιο** καθώς και κάποιο **ετεροάτομο** με ασύζευκτο ζεύγος e^- (N,O,S κλπ). Οι διεγέρσεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για την απορρόφηση στη περιοχή UV-Vis, κατά σειρά αυξανόμενης ενέργειας (άρα μειούμενου μήκους κύματος) είναι οι εξής:



Η ύπαρξη ασύζευκτων (αδεσμικών) e^- και η επέκταση της συζυγίας (conjugation) ενός συστήματος (διπλοί δεσμοί σε συζυγία, τριπλοί δεσμοί σε συζυγία, βενζολικοί δακτύλιοι), οδηγούν σε απορρόφηση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος λόγω της πολύ μικρής απαιτούμενης ενέργειας για τη διέγερση. Οι μεταβολές στη **δομή του μορίου** (π.χ. κατάσταση ιοντισμού) ή στο **είδος του διαλύτη** είναι δυνατόν να προκαλέσουν φαινόμενα βαθυχρωμίας (μετατόπιση του λαπορρόφησης σε μεγαλύτερες τιμές), υψοχρωμίας (μετατόπιση του λαπορρόφησης σε μικρότερες τιμές), υπερχρωμίας (αύξηση της σταθεράς ε) ή υποχρωμίας (μείωση της σταθεράς ε).

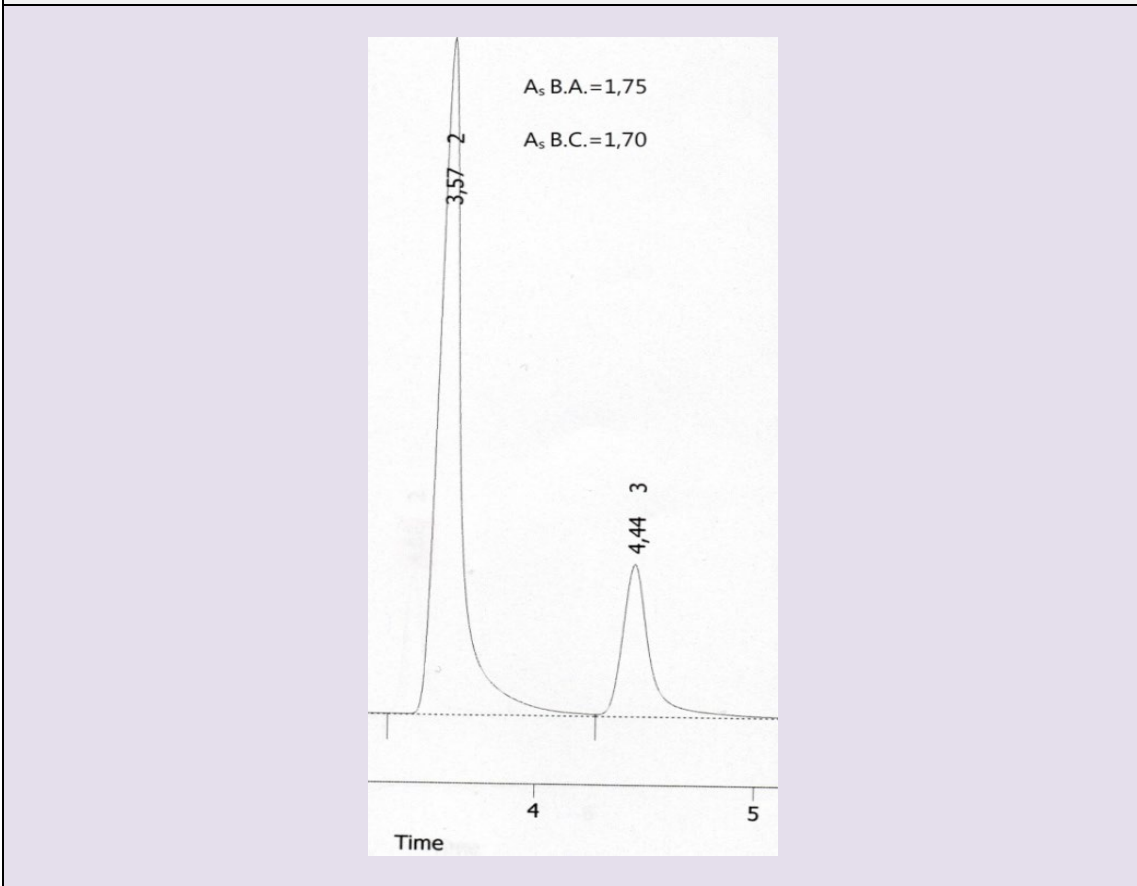
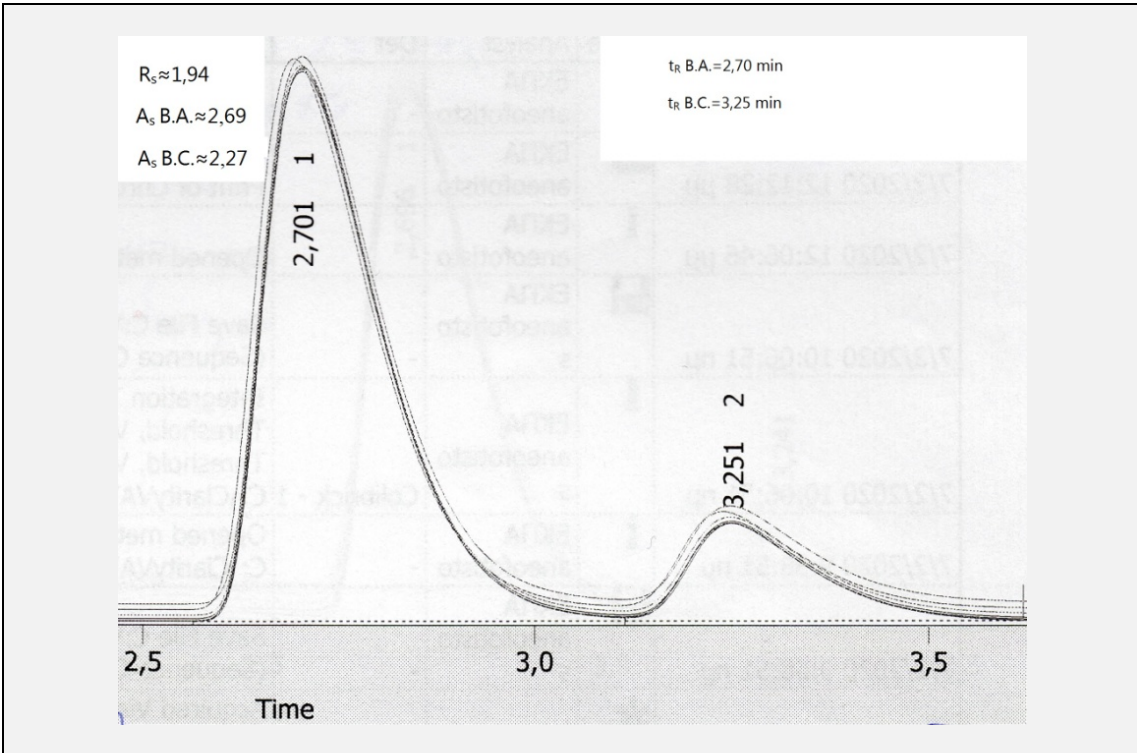
Η βουταμιράτη ανήκει στη κατηγορία των 2-[2-(διαιθυλάμινο)-αιθόξυ] αιθύλ εστέρων (2-[2-(diethylamino)-ethoxy]ethyl esters) ενώ το βενζοϊκό οξύ είναι αρωματική οργανική ένωση και ανήκει στην οικογένεια των αρωματικών καρβοξυλικών οξέων. Πρόκειται για το απλούστερο οξύ της κατηγορίας αυτής. Τα μόρια των αναλυτών αυτών απορροφούν την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σε ικανοποιητικό βαθμό και γι' αυτό το λόγο θεωρήθηκε ότι μπορεί να **αποφευχθεί** το στάδιο της **παραγωγοποίησης**. Το βήμα αυτό είναι αρκετά **χρονοβόρο** και εισάγει **αστάθμητους** παράγοντες. Επιλέχθηκε το μήκος κύματος

$\lambda=210$ nm. Μετά το πέρας του ελέγχου ανθεκτικότητας (5.3.7), τέθηκε η ανοχή ± 2 nm.

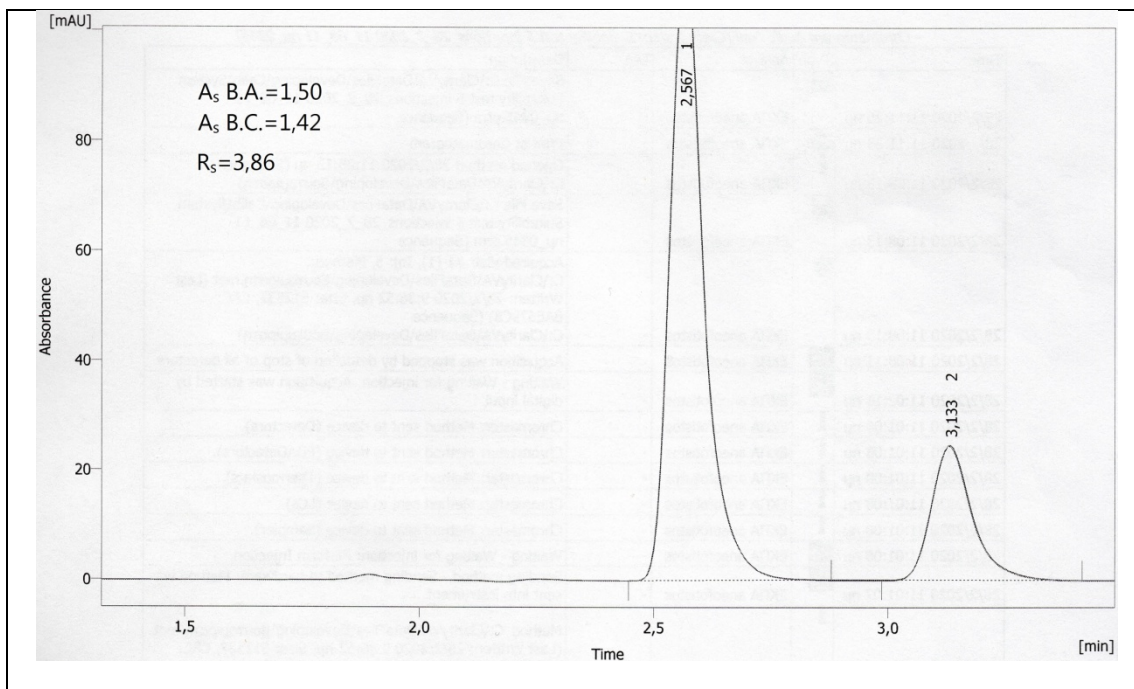
5.2.8 Τελικές δοκιμές

Αφότου πραγματοποιήθηκε ένας σημαντικός αριθμός προκαταρκτικών δοκιμών, προχωρήσαμε στο «κύριο μέρος» του σταδίου της ανάπτυξης της μεθόδου, ακολουθώντας τη στρατηγική που περιγράφεται λεπτομερώς στα εδάφια **3.7.2.1** και **3.7.2.2**. Ο **βασικός άξονας** δράσης ήταν ο βέλτιστος «συμβιβασμός» ανάμεσα σε διαχωρισμό και σε συνολικό χρόνο: επιδιώχθηκε ο ικανοποιητικός διαχωρισμός σε σύντομο χρόνο (conflicting goals). Οι πρώτες δοκιμές αφορούσαν την εκπλήρωση του **αρχικού στόχου** ο οποίος αφορούσε τον αποδεκτό διαχωρισμό, δηλαδή μέτρια (έστω και οριακή) διαχωριστική ικανότητα σε ένα λογικό χρονικό διάστημα (acceptable baseline resolution, reasonable run time). Οι επόμενες δοκιμές αφορούσαν την εκπλήρωση του **τελικού στόχου** ο οποίος αφορούσε τον επαρκή διαχωρισμό, δηλαδή τη μέγιστη δυνατή διαχωριστική ικανότητα στο ελάχιστο δυνατό χρονικό διάστημα (maximum resolution, minimum run time). Αυτό οδήγησε στην **οριστικοποίηση** των τελικών πειραματικών συνθηκών (ροή, διαλύτης, ποσοστό διαλύτη, άλας, ποσοστό άλατος pH, T, λ, απενεργοποιητής, ποσοστό απενεργοποιητή). Οι τιμές των πειραματικών παραμέτρων επιλέχθηκαν μετά από διαδοχικές δοκιμές (trial-and-error approach) **χωρίς** τη χρήση κάποιου πειραματικού σχεδιασμού βελτιστοποίησης. Ως εκ τούτου, δεν είμαστε σε θέση να τις χαρακτηρίσουμε ως βέλτιστες, ωστόσο είναι απόλυτα ικανοποιητικές σε σχετικά με την επίτευξη των στόχων της μεθόδου.

Σε γενικές γραμμές **δεν** αντιμετωπίσαμε δυσκολίες στο διαχωρισμό των αναλυτών. Οι ουσίες διαχωρίζονταν ικανοποιητικά εντός της στήλης κυανοπρότυλο σιλανίου. Ωστόσο, οι προκύπτουσες κορυφές ήταν αρκετά ασύμμετρες. Οι ασύμμετρες κορυφές δυσχεραίνουν το έργο ενός ολοκληρωτή και οδηγούν σε ατελή και ανακριβή ολοκλήρωση μιας επιφάνειας (poor integrator performance). Παρόλα αυτά, η ασυμμετρία δεν ήταν σε καμία περίπτωση τόσο μεγάλη ώστε να οδηγήσει σε επιπλέον προβλήματα, όπως π.χ. επικάλυψη. Έτσι, δεν θεωρήθηκε ιδιαίτερα επιτακτική η ανάγκη **μείωσης** της ασυμμετρίας σε εξαιρετικά χαμηλές τιμές, παρά μόνο σε μια ενδεικτική τιμή-στόχο $\leq 1,6$ ώστε να μην επηρεάζεται η ακεραιότητα της ολοκλήρωσης. Κατά κανόνα, στις συνήθεις αναλύσεις ρουτίνας επιδιώκεται μια τιμή $T_f \leq 1,5$ ($A_s \leq 1,75$) για όλες τις κορυφές⁶³. Για την αποφυγή των φαινομένων υπερφόρτωσης της στήλης (column overload, column-overload tailing, βλ. 2.5.3), αποφασίστηκε ο όγκος έγχυσης να είναι $V_s=10$ μ L. Τέλος, **επιδιώχθηκε** η αποφυγή της εξαιρετικά **καθυστερημένης έκλουσης** της βουταμιράτης και της εξαιρετικά **γρήγορης έκλουσης** (στο μέτωπο του διαλύτη) του βενζοϊκού οξέος.



Σχήμα 32: Ενδεικτικά αποτελέσματα των προκαταρκτικών δοκιμών σε μια στήλη κυανο-πρότυλο σιλανίου (υπέρθυση χρωματογραφημάτων από επαναλήψεις).



Σχήμα 32 (συνέχεια): Σταδιακή βελτίωση της ασυμμετρίας κατά τη διάρκεια του σταδίου ανάπτυξης της μεθόδου Πηγή: πειραματικά δεδομένα της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

5.3 επικύρωση μεθόδου

Την ανάπτυξη της αναλυτικής διαδικασίας (μεθόδου) ακολούθησε η επικύρωση, ώστε να αποδειχθεί η καταλληλότητά της σχετικά με το σκοπό για τον οποίο προορίζεται (**fitness for purpose**). Η επικύρωση (validation) πραγματοποιείται με την αξιολόγηση των **χαρακτηριστικών ποιότητας** της μεθόδου, μέσω πειραματικής τεκμηρίωσης, και με την εξέταση της ανταπόκρισής της ως προς συγκεκριμένες προδιαγραφές (**specifications**). Σαν χαρακτηριστικά ποιότητας ορίζονται οι παράμετροι, οι ιδιότητες και τα κριτήρια ή συμπεριφορές τις οποίες εμφανίζει μια αναλυτική μέθοδος κατά την εφαρμογή της (ειδικότητα, γραμμικότητα, ακρίβεια, πιστότητα, ανθεκτικότητα κλπ). Ουσιαστικά, όλα αυτά τα χαρακτηριστικά «ποσοτικοποιούν» την ποιότητα (καταλληλότητα) της μεθόδου.

Η επικύρωση αφορά μεθόδους που σχεδιάζονται ή υιοθετούνται από το εργαστήριο (in house methods), πρότυπες μεθόδους που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν εκτός αντικειμένου, μη πρότυπες μεθόδους και ενισχυμένες (ή απλά τροποποιημένες) μεθόδους. **Η έκταση της επικύρωσης καθορίζεται με βάση τις απαιτήσεις μιας δεδομένης εφαρμογής και τεκμηριώνεται κατάλληλα.**

5.3.1 Πειραματικό πρωτόκολλο μεθόδου και έλεγχος καταλληλότητας συστήματος (SST)

Μετά το στάδιο ανάπτυξης της μεθόδου, καταλήξαμε στις **τελικές επιλογές** σχετικά με τις χρωματογραφικές συνθήκες και το ακριβές πειραματικό πρωτόκολλο.

Αντιδραστήρια:

- Νερό HPLC grade
- Μεθανόλη HPLC grade
- Φωσφορικό οξύ, H_3PO_4
- Δισόξινο φωσφορικό νάτριο στη μονοϋδρική μορφή, $(NaH_2PO_4) \cdot H_2O$
- Τριαιθυλαμίνη- $N(Et)_3$ (TEA)

Διαλύματα:

- Αν δεν υπάρχει, παρασκευάζεται ένα **πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης** (Stock Standard Solution, SST) ως εξής:
 - Ζυγίζονται 50,0 mg καθαρής ουσίας B.C. (HWS) και 100 mg καθαρής ουσίας B.A. (HWS)-βλ. 4.2, στον αναλυτικό ψηφιακό ζυγό ακρίβειας ανάγνωσης 4 δεκαδικών ψηφίων

- Διαλύονται με τη βοήθεια υπερήχων, σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL με διαλύτη MeOH/H₂O 1:1 και γίνεται συμπλήρωση (με τον ίδιο διαλύτη) στον τελικό όγκο (ως τη χαραγή). Προκύπτει συγκέντρωση **C_{B.C.} = 0,5 mg/mL** και **C_{B.A.} = 1 mg/mL**, ή **αλλιώς C_{B.C.} = 500 µg/mL** και **C_{B.A.} = 1000 µg/mL**.
- Το διάλυμα αποθηκεύεται σε σκουρόχρωμο γυάλινο περιέκτη με βιδωτό πώμα και φυλάσσεται στο ψυγείο.
- Από το παραπάνω συμπυκνωμένο διάλυμα παρασκευάζεται με αραιώση ένα **πρότυπο διάλυμα εργασίας** (Working Standard Solution, WST), το οποίο αναφέρεται και ως **διάλυμα αναφοράς**, ως εξής:
 - 2 mL αραιώνονται σε V_{τελ}=20 mL diluent*
 - *diluent=κινητή φάση=1:1 MeOH/άλας 50 mM-pH=3±0,1

Έτσι, η τελική συγκέντρωση είναι **C_{B.C.} = 50,0 µg/mL** και **C_{B.A.} = 100 µg/mL**.

- Παρασκευάζεται ένα **διάλυμα εργασίας του δείγματος** (Working Sample Solution, WS), το οποίο αναφέρεται και ως **διάλυμα ελέγχου**, ως εξής:
 - 1mL από το σκεύασμα (σιρόπι) αραιώνεται σε V_{τελ}=20 mL diluent*
 - *diluent=κινητή φάση=1:1 MeOH/άλας 50 mM-pH=3±0,1
 - Η διαλυτοποίηση γίνεται με τη βοήθεια υπερήχων, σε ογκομετρική φιάλη των 20 mL και συμπλήρωση (με τον ίδιο διαλύτη) στον τελικό όγκο (ως τη χαραγή).
 - Το διάλυμα τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως των 50 mL ώστε να είναι δυνατή η πλήρωση της σύριγγας και ακολούθως η διήθηση με φίλτρο σύριγγας 0,45 µm, πριν την εισαγωγή του δείγματος στο φιαλίδιο (vial) δειγματοληψίας (βλ. 4.1).

Η **ονομαστική** συγκέντρωση για το σκεύασμα (σιρόπι) είναι **C_{B.C.} = 1 mg/mL** και **C_{B.A.} = 2 mg/mL**, δηλαδή **C_{B.C.} = 1000 µg/mL** και **C_{B.A.} = 2000 µg/mL**. Επομένως, οι τελικές συγκεντρώσεις **θεωρητικά** είναι **C_{B.C.} = 50,0 µg/mL** και **C_{B.A.} = 100 µg/mL**.

** Για τη παρασκευή του diluent, τοποθετούνται σε μια μικρή κωνική φιάλη (π.χ. των 100 mL) ίσες ποσότητες ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και μεθανόλης HPLC grade. Αναμιγνύονται με τη βοήθεια της μαγνητικής ανάδευσης. Για τη παρασκευή των διαλυμάτων αναφοράς και ελέγχου απαιτούνται τουλάχιστον 20+20=40 mL diluent.

- Παρασκευάζεται ένα **ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών** 50 mM, pH=3±0,1, 1% Et₃N, με βάση τους εξής υπολογισμούς:
 - 1 mol NaH₂PO₄·H₂O ζυγίζει 137,98 g. Επομένως, τα 50 mmoles (0,050 moles) ζυγίζουν 6,89 g (στο 1L) ή **1,38 g** στα 200 mL διαλύματος
 - Για τη ζύγιση χρησιμοποιείται αναλυτικός ψηφιακός ζυγός ακρίβειας ανάγνωσης 2 δεκαδικών ψηφίων (βλ. ενότητα 4.1).
 - Για τη διάλυση του άλατος χρησιμοποιείται κωνική φιάλη των 300 mL ή ποτήρι ζέσεως των 200 mL. Αρχικά, προστίθενται στο σκεύος ~180 mL υπερκάθαρου H₂O (συνήθως από τη συσκευή MilliQ) και το άλας διαλύεται με τη βοήθεια της μαγνητικής ανάδευσης. Στο σημείο αυτό παρατηρείται pH≈4,56.
 - Στο διάλυμα του άλατος προστίθενται με σιφώνιο ακριβείας 2 mL Et₃N (θέλουμε περιεκτικότητα 1%). Στο σημείο αυτό παρατηρείται pH≈10,07.
 - Προστίθεται το H₃PO₄ στάγδην, με τη βοήθεια μιας πιπέτας Pasteur, έως ότου επιτευχθεί pH=3±0,1.
 - Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 200 mL και αραιώνεται με H₂O μέχρι τη χαραγή.
 - **Συναρμολογείται** η διάταξη απαέρωσης και το διάλυμα διηθείται υπό κενό με φίλτρα μεμβράνης μεγέθους 47 mm και εύρους πόρων 0,45 μm, με τη βοήθεια της ειδικής αντλίας κενού-πίεσης.

Στη συνέχεια το ρυθμιστικό διάλυμα χύνεται αργά (υπάρχει κίνδυνος ανάπτυξης φυσαλίδων) εντός ενός γυάλινου περιέκτη, μέσα στον οποίο βυθίζεται το σωληνάριο άντλησης της διάταξης HPLC. Το στόμιο καλύπτεται με parafilm. Ορισμένη ποσότητα (**~50 mL**) κρατείται για την παρασκευή του **diluent** των διαλυμάτων αναφοράς και ελέγχου.

Εναλλακτικά, μπορεί να παρασκευασθεί ένα μόνο διάλυμα κινητής φάσης με ανάμιξη ενός όγκου άλατος με ίσο όγκο MeOH και διήθηση υπό κενό. Ωστόσο, εφόσον η διάταξη διαθέτει τη δυνατότητα αυτόματης ανάμιξης των διαλυτών (on-line mixing), η τακτική αυτή αποφεύγεται.

Εάν αποφασιστεί η παρασκευή ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος μεγαλύτερης από 200 mL, πραγματοποιούνται οι αντίστοιχες αναγωγές σχετικά με τα απαιτούμενα γραμμάρια άλατος και την προστιθέμενη ποσότητα της Et₃N.

Χρωματογραφικές συνθήκες:

- **Στήλη:** Στατική φάση Νιτριλίου (κυανο-πρότυλο σιλανίου, cyanopropylsilane), (-C₃-C≡N), 250 mm * 4,6 mm * 5μm
- **Ρυθμιστικό διάλυμα:** NaH₂PO₄*H₂O, 50 mM, 1% N(Et)₃, pH=3±0,1
- **Κινητή φάση:** MeOH/ρυθμιστικό διάλυμα 1:1
- **Μέσο** διάλυσης διαλυμάτων αναφοράς και ελέγχου (diluent): MeOH/ρυθμιστικό διάλυμα 1:1
- **Ροή:** 1,5 mL/min
- **Όγκος έγχυσης:** 10 μL
- **Μήκος κύματος ανίχνευσης:** 210 nm
- **Θερμοκρασία:** 36 °C
- **Χρόνος ανάλυσης (run time):** 6 min.

Η έκλυση του B.A. αναμένεται στα 2,57 min, ενώ η έκλυση της B.C. αναμένεται στα 3,13 min.

Η συγκέντρωση εργασίας που επιλέχθηκε είναι C_{B.C.}= 50,0 μg/mL και C_{B.A.}= 100 μg/mL και αφορά τόσο το πειραματικό πρωτόκολλο της μεθόδου σε επίπεδο ρουτίνας όσο και τα διάφορα στάδια της επικύρωσης που θα ακολουθήσουν.

Ο έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος (**System Suitability Test, SST**), αποτελεί ένα αναπόσπαστο κομμάτι του πειραματικού πρωτοκόλλου κάθε μεθόδου. Επιβεβαιώνει ότι ο εξοπλισμός συμμορφώνεται με τις προδιαγεγραμμένες απαιτήσεις πριν τεθεί σε λειτουργία. Παρέχει σε έναν αναλυτή τη δυνατότητα να παρακολουθεί/αξιολογεί την απόδοση των επιμέρους τμημάτων μιας διάταξης (monitoring of instrument performance) και να επαληθεύει σε επίπεδο ρουτίνας την καταλληλότητα (suitability) και την αποδοτικότητά (effectiveness) τους^{61,80}.

Στην παράγραφο 5.3.6 θα δούμε ότι ανάλογα με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες διενεργείται ένας έλεγχος της **πιστότητας**, διακρίνουμε κάποια **υποσύνολα** του εν λόγω κριτηρίου ποιότητας. Έτσι λοιπόν συναντάμε την επαναληψιμότητα (repeatability) είτε για τη μέθοδο (method repeatability) είτε για το σύστημα/όργανο (system precision), και την αναπαραγωγιμότητα (reproducibility) η οποία δύναται να είναι είτε ενδοεργαστηριακή (ενδιάμεση πιστότητα, intermediate precision) είτε διεργαστηριακή.

Ο έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος αφορά την ακεραιότητα της πειραματικής διάταξης (όχι τη μέθοδο) και επομένως **αξιολογεί** την **επαναληψιμότητα του συστήματος (system precision)**. Διενεργείται με μια σειρά μετρήσεων (τουλάχιστον 5 μετρήσεις, 4 επαναλήψεις) στο **ίδιο** διάλυμα εργασίας **ενός** δείγματος. Συνήθως χρησιμοποιείται το διάλυμα εργασίας του **προτύπου** διαλύματος της καθαρής ουσίας (διάλυμα αναφοράς)⁶⁵.

Σημείωση: Η επαναληψιμότητα της μεθόδου αφορά τη διασπορά μιας σειράς μετρήσεων στο **ίδιο** δείγμα, αλλά σε **διαφορετικά** διαλύματα εργασίας του δείγματος αυτού. Πραγματοποιείται κατά το στάδιο της επικύρωσης. Δε θα πρέπει να συγχέεται με την επαναληψιμότητα μιας σειράς μετρήσεων στο ίδιο διάλυμα εργασίας ενός δείγματος δηλαδή την επαναληψιμότητα του αναλυτικού οργάνου (system precision).

Σε ό,τι αφορά τα **όρια** και τα **κριτήρια αποδοχής** των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από ένα έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος, αυτά καθορίζονται με βάση την εμπειρία του αναλυτή που αναπτύσσει τη μέθοδο. Αυτός αποφαινεται για το ποιες αποκρίσεις (responses) πρέπει να θεωρούνται κρίσιμες και, ως εκ τούτου, υπάρχει απαίτηση να είναι σχεδόν αμετάβλητες σε κάθε εφαρμογή της μεθόδου. Ωστόσο, είναι κρίσιμο να τονιστεί ότι τα παραπάνω κριτήρια αποδοχής πρέπει να **συν-διαμορφώνονται (ή να τροποποιούνται)** από τα αποτελέσματα του ελέγχου της ανθεκτικότητας (5.3.7)⁸⁰. Πέρα από την εμπειρία του, ένας αναλυτής θα πρέπει να στηρίζεται στην **πειραματική τεκμηρίωση** του ελέγχου ανθεκτικότητας ώστε να αποφανθεί για το ποιες αποκρίσεις πρέπει να ελέγχονται αυστηρά, και εντός ποιου εύρους (π.χ. R_s , A_s , εμβασό, t_R , N κλπ). Αυτός είναι και ο λόγος που συνιστάται η ανθεκτικότητα να ελέγχεται στο χρονικό διάστημα μεταξύ του τέλους της ανάπτυξης και πριν την επικύρωση μιας μεθόδου.

Σε αντίθετη περίπτωση, είναι πιθανόν τα τεθούν όρια SST τα οποία είναι υπερβολικά αυστηρά και παραβιάζονται εύκολα όταν η μέθοδος μεταφέρεται σε άλλο όργανο ή σε άλλο εργαστήριο γενικότερα. Αντίθετα, είναι επίσης πιθανόν να τεθούν όρια SST υπερβολικά ελαστικά. Για παράδειγμα, αν η αναμενόμενη τιμή για το διαχωρισμό σε μια επικυρωμένη μέθοδο είναι $R_s=6$ τότε μια τιμή $R_s=2$ δε θα πρέπει να γίνει αποδεκτή στα πλαίσια του SST, ακόμα και αν επιτρέπει τον έγκυρο προσδιορισμό του αναλύτη. Τα αποδεκτά επίπεδα των αποκρίσεων θα πρέπει να συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα της ανάπτυξης της μεθόδου, ενώ τα αποδεκτά **«άκρα»** για έναν πειραματικό παράγοντα είναι **έγκυρα και ασφαλή μόνο όταν εξάγονται από τον έλεγχο ανθεκτικότητας**.

Γενικά, τα κριτήρια αποδοχής είναι δυνατόν να διαφέρουν ελάχιστα ανάλογα με το επιστημονικό πεδίο (φάρμακα, τρόφιμα, φυτοφάρμακα κλπ) και τον αρμόδιο νομοθετικό οργανισμό (regulatory agency). Για παράδειγμα, το Καναδικό Τμήμα Προστασίας της Υγείας θέτει κριτήρια αποδοχής %RSD για το εμβασό (για χρωματογραφικές μεθόδους) 1% για φαρμακευτικές ουσίες και 2% για φαρμακευτικά σκευάσματα.

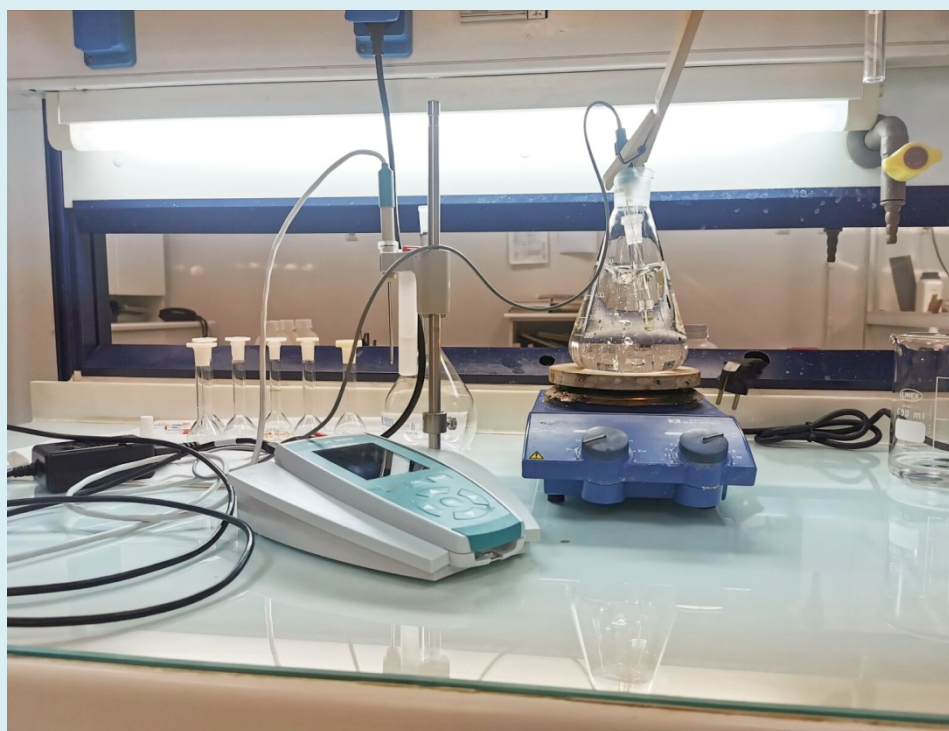
Στη συγκεκριμένη μέθοδο, πριν πραγματοποιηθεί η ανάλυση του διαλύματος εργασίας του αγνώστου δείγματος, διενεργείται ο έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος. Γίνονται 5 **διαδοχικές** ενέσεις για το διάλυμα εργασίας του **προτύπου** διαλύματος της καθαρής ουσίας (διάλυμα αναφοράς).

Κριτήρια αποδοχής:

- Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) για το **εμβαδό** της κορυφής του Βενζοϊκού Οξέος να είναι $\leq 1\%$ στο σύνολο των 5 μετρήσεων
- Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) για το **εμβαδό** της κορυφής της Κιτρικής Βουταμιράτης να είναι $\leq 1\%$ στο σύνολο των 5 μετρήσεων
- Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) για το **χρόνο συγκράτησης** του Βενζοϊκού Οξέος να είναι $\leq 1\%$ στο σύνολο των 5 μετρήσεων
- Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) για το **χρόνο συγκράτησης** της Κιτρικής Βουταμιράτης να είναι $\leq 1\%$ στο σύνολο των 5 μετρήσεων
- Ο μέσος όρος του αριθμού των **θεωρητικών πλακών** να είναι ≥ 4.000 για κάθε έναν από τους 2 αναλύτες στο σύνολο των 5 μετρήσεων
- Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) για τον αριθμό των **θεωρητικών πλακών** να είναι $\leq 1\%$ για κάθε έναν για τους 2 αναλύτες στο σύνολο των 5 μετρήσεων
- Ο μέσος όρος της **διαχωριστικής ικανότητας** (R_s) των 2 αναλυτών να είναι ≥ 3 στο σύνολο των 5 μετρήσεων
- Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) για τη **διαχωριστική ικανότητα** (R_s) των 2 αναλυτών να είναι $\leq 1\%$ στο σύνολο των 5 μετρήσεων
- Ο μέσος όρος του παράγοντα ασυμμετρίας (A_s) να είναι $\leq 1,6$ για κάθε έναν από τους 2 αναλύτες στο σύνολο των 5 μετρήσεων

Στην παράγραφο 5.3.8 παρουσιάζεται ένα παράδειγμα ποσοτικού προσδιορισμού των δύο αναλυτών σε δείγμα σιροπιού, ο οποίος πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά την ανάπτυξη και την επικύρωση της μεθόδου.

Σημείωση: Σε όλες τις δοκιμές, το κατώτερο όριο ολοκλήρωσης (*threshold*) του λογισμικού ορίστηκε στα 5 mAU. Ακόμη, σε όλες τις περιπτώσεις, για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων εφαρμόστηκε ο εξής κανόνας: Τα μεγέθη SD και %RSD παρουσιάζονται με **2 σημαντικά ψηφία**. Με βάση τα **δεκαδικά ψηφία** που προκύπτουν για το μέγεθος SD, καθορίζεται **ίσος αριθμός δεκαδικών ψηφίων** για τη μέση τιμή (*mean*) ενός μεγέθους.



Εικόνα 5: Το πειραματικό πρωτόκολλο της μεθόδου περιλαμβάνει τη παρασκευή ενός διαλύματος εργασίας του δείγματος, το οποίο αναφέρεται και ως **διάλυμα ελέγχου**, και ενός προτύπου διαλύματος εργασίας, το οποίο αναφέρεται και ως **διάλυμα αναφοράς**. Ο έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος (**SST**) εξασφαλίζει την αξιοπιστία της αναλυτικής διάταξης κατά την καθημερινή χρήση της σε επίπεδο ρουτίνας και θέτει όρια αποδοχής για κάποιες από τις πειραματικές αποκρίσεις.

5.3.2 Σταθερότητα Διαλυμάτων

5.3.2.1 Πρότυπα διαλύματα

Ο σκοπός των παρακάτω πειραμάτων ήταν η αξιολόγηση της σταθερότητας (**stability**) για το πρότυπο διάλυμα εργασίας-Working Standard Solution, WST (**διάλυμα αναφοράς**), κατά τη διάρκεια της αναλυτικής ημέρας και έως ένα χρονικό ορίζοντα 48 h (0 h, 5 h, 24 h, 48 h).

Πειραματικό πρωτόκολλο:

- Παρασκευάστηκαν 3 διαφορετικά πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης (Stock Standard Solutions, SSTs) ως εξής:
 - Ζυγίστηκαν 50,0 mg καθαρής ουσίας B.C. (HWS) και 100 mg καθαρής ουσίας B.A. (αντι-δείγμα 1^{ης} ύλης)-βλ. 4.2, στον αναλυτικό ψηφιακό ζυγό ακρίβειας ανάγνωσης 4 δεκαδικών ψηφίων
 - Διαλύθηκαν, με τη βοήθεια υπερήχων, σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL με διαλύτη MeOH/H₂O 1:1 και έγινε συμπλήρωση (με τον ίδιο διαλύτη) στον τελικό όγκο (ως τη χαραγή).
 - Η διαδικασία επαναλήφθηκε για τη παρασκευή 2 ακόμη STOCK διαλυμάτων, συγκέντρωσης **C_{B.C.} = 500 µg/mL** και **C_{B.A.} = 1000 µg/mL**.
 - Τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν σε σκουρόχρωμους γυάλινους περιέκτες με βιδωτό πώμα.

- Από τα παραπάνω συμπυκνωμένα διαλύματα, παρασκευάστηκαν με αραιώση 3 διαφορετικά πρότυπα διαλύματα εργασίας (Working Standard Solutions, WSTs), δηλαδή 3 **διαλύματα ελέγχου**, ως εξής:
 - 2 mL αραιώθηκαν σε $V_{\text{τελ}}=20$ mL diluent*
 - * *diluent=κινητή φάση=1:1 MeOH/άλας 50 mM-pH=3±0,1*
 - Έτσι, οι τελικές συγκεντρώσεις ήταν **C_{B.C.} = 50,0 µg/mL** και **C_{B.A.} = 100 µg/mL**.
 - Η μία εκ των τριών ογκομετρικών φιαλών των 20 mL αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου (~25°C) και η άλλη σε θερμοκρασία ψυγείου (~6°C), αφού πρώτα τυλίχτηκαν με φύλλο αλουμινίου.

Κριτήρια αποδοχής:

- Η σχετική τυπική απόκλιση (**%RSD**) του εμβαδού ενός WST να είναι **<1%** για κάθε περιοδική μέτρηση (0 h, 5 h, 24 h, 48 h).
- Η ολική σχετική τυπική απόκλιση (**%RSD_{ολικό}**) του εμβαδού μεταξύ των 3 WSTs να είναι **<1,5%**, για τη μέτρηση στις 0 h.

- Η ολική σχετική τυπική απόκλιση (**%RSD_{ολικό}**) του εμβαδού ενός WST στο σύνολο των 2 ημερών (0 h, 5 h, 24 h, 48 h), να είναι **<1,5%**.

Η % διαφορά για το εμβαδόν υπολογίζεται από τη σχέση

$$\% \text{ Difference} = \frac{\text{Area}(t) - \text{Area}(t_0=0 \text{ h})}{\text{Area}(t_0=0 \text{ h})} * 100\% \quad (14)$$

Πίνακας 4: Οι τιμές των εμβαδών για κάθε ένα WST (διάλυμα ελέγχου) στις 0 h. Τα WST 1 και WST 2 θα χρησιμοποιηθούν για μετρήσεις σε σύνολο 2 ημερών, στους 25°C και στους 6°C αντίστοιχα. *Τα αποτελέσματα αφορούν την Κιτρική βουταμιράτη.

Επανάληψη	WST 1	WST 2	WST 3
	132,85	131,97	134,77
1	132,61	133,28	134,75
2	132,78	133,76	135,12
3	132,01	133,15	134,87
4	131,12	134,19	135,04
Μέσος όρος	132,27	133,27	134,91
SD	0,73	0,83	0,16
%RSD	0,55	0,63	0,12
Συνολικό %RSD	0,95		

Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) του εμβαδού για κάθε WST είναι <1%. Επίσης, εφόσον % RSD_{συνολικό} = 0,95 < 1,5%, τα τρία διαλύματα εργασίας είναι μεταξύ τους **επαρκώς ομοιογενή** και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις μετέπειτα μετρήσεις που αφορούν διαφορετικές θερμοκρασίες (WST1→25°C, WST 2→6°C).

Πίνακας 5: Οι τιμές των εμβαδών για το WST 1 (διάλυμα ελέγχου) στους 25°C (επάνω) και το WST 2 (διάλυμα ελέγχου) στους 6°C (κάτω) στο χρονικό διάστημα των 2 ημερών (0 h, 5 h, 24 h και 48 h).
*Τα αποτελέσματα αφορούν την Κιτρική βουταμιράτη

25°C WST No 1	Επανάληψη	0 h	5 h	24 h	48 h
		132,85	135,01	135,05	135,7
	1	132,61	135,74	135,17	134,9
	2	132,78	135,94	134,68	134,1
	3	132,01	135,44	134,73	133,2
	4	131,12	135,66	134,59	133,3
	Μέσος όρος	132,27	135,56	134,84	134,2
	SD	0,73	0,35	0,25	1,1
	%RSD	0,55	0,26	0,19	0,80
	% Διαφορά	-	2,5	1,9	1,5
Συνολικό %RSD	1,1				
6°C WST No 2	Επανάληψη	0 h	5 h	24 h	48 h
		131,97	132,81	131,91	134,87
	1	133,28	133,20	131,37	133,71
	2	133,76	133,52	131,96	135,32
	3	133,15	133,52	132,63	134,80
	4	134,19	133,49	132,77	133,71
	Μέσος όρος	133,27	133,31	132,13	134,48
	SD	0,83	0,31	0,57	0,73
	%RSD	0,63	0,23	0,43	0,55
	% Διαφορά	-	0,028	-0,086	0,91
Συνολικό %RSD	0,78				

Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) του εμβαδού για κάθε WST σε κάθε περιοδική μέτρηση είναι <1%. Επίσης, το % RSD_{συνολικό} για ένα WST στο σύνολο των 2 ημερών είναι < 1,5% τόσο στους 25°C όσο και στους 6°C.

Κατ' αντιστοιχία με τα αποτελέσματα που αφορούν στην Κιτρική Βουταμιράτη, παρακάτω παρουσιάζονται τα πειραματικά δεδομένα (τιμές εμβαδού) που ελήφθησαν για το Βενζοϊκό Οξύ. Τα κριτήρια αποδοχής για τις τιμές %RSD και τις τιμές %RSD_{ολικό} είναι τα ίδια με αυτά που τέθηκαν για την Κιτρική Βουταμιράτη.

*Πίνακας 6: Οι τιμές των εμβαδών για κάθε ένα WST (διάλυμα ελέγχου) στις 0 h. Τα WST 1 και WST 2 θα χρησιμοποιηθούν για μετρήσεις σε σύνολο 2 ημερών, στους 25°C και στους 6°C αντίστοιχα. *Τα αποτελέσματα αφορούν το Βενζοϊκό Οξύ.*

Επανάληψη	WST 1	WST 2	WST 3
	504,2	503,5	506,63
1	503,8	505,1	505,48
2	504,5	504,9	506,80
3	502,8	505,9	506,07
4	496,9	507,6	506,04
Μέσος όρος	502,5	505,4	506,20
SD	3,1	1,5	0,52
%RSD	0,63	0,30	0,10
Συνολικό %RSD	0,50		

Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) του εμβαδού για κάθε WST είναι <1%. Επίσης, εφόσον $\% RSD_{\text{συνολικό}} = 0,50 < 1,5\%$, τα τρία διαλύματα εργασίας είναι μεταξύ τους **επαρκώς ομοιογενή** και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις μετέπειτα μετρήσεις που αφορούν διαφορετικές θερμοκρασίες (WST 1→25°C, WST 2→6°C).

Πίνακας 7: Οι τιμές των εμβαδών για το WST 1 (διάλυμα ελέγχου) στους 25°C (επάνω) και το WST 2 (διάλυμα ελέγχου) στους 6°C (κάτω) στο χρονικό διάστημα των 2 ημερών (0 h, 5 h, 24 h και 48 h).
*Τα αποτελέσματα αφορούν το Βενζοϊκό Οξύ

25°C WST No 1	Επανάληψη	0 h	5 h	24 h	48 h
		504,2	512,3	513,41	509,8
	1	503,8	514,5	513,90	507,1
	2	504,5	513,3	512,27	504,8
	3	502,8	513,8	512,70	504,3
	4	496,9	515,6	512,16	504,4
	Μέσος όρος	502,5	513,9	512,89	506,1
	SD	3,1	1,3	0,75	2,4
	%RSD	0,63	0,24	0,15	0,47
	% Difference	-	2,3	2,1	0,72
Συνολικό %RSD	1,0				
6°C WST No 2	Επανάληψη	0 h	5 h	24 h	48 h
		503,5	503,3	503,5	508,6
	1	505,1	505,9	501,7	506,1
	2	504,9	503,2	502,8	510,5
	3	505,9	503,3	504,9	510,3
	4	507,6	502,7	505,9	510,2
	Μέσος όρος	505,4	503,7	503,8	509,1
	SD	1,5	1,3	1,7	1,8
	%RSD	0,30	0,26	0,34	0,36
	% Difference	-	-0,34	-0,32	0,74
Συνολικό %RSD	0,53				

Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) του εμβαδού για κάθε WST σε κάθε περιοδική μέτρηση είναι <1%. Επίσης, το % RSD_{συνολικό} για ένα WST στο σύνολο των 2 ημερών είναι < 1,5% τόσο στους 25°C όσο και στους 6°C.

Η μαθηματική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων (data) για τη B.C. και το B.A. οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το **πρότυπο διάλυμα εργασίας /διάλυμα ελέγχου** (WST), το οποίο προκύπτει από την αραιώση ενός συμπυκνωμένου (STOCK) διαλύματος, είναι σταθερό έως και για 48 h. Η αποθήκευση στο ψυγείο φαίνεται να είναι καταλληλότερη από την αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Σημείωση: Σε κάθε περίπτωση, τα διαλύματα πρέπει να προφυλάσσονται από το φως. Τα όρια αποδοχής βασίζονται στη κρίση του αναλυτή, ωστόσο οι υψηλές τιμές SD ή πιο συχνά οι τιμές %RSD για το σύνολο των μετρήσεων μια πειραματικής παραμέτρου δε θα πρέπει να είναι αποδεκτές σε καμία μελέτη (π.χ. >5%).

Η συγκέντρωση εργασίας στις δοκιμές σταθερότητας (αλλά και γενικότερα στη μέθοδο που αναπτύχθηκε) ήταν $C_{B.C.} = 50,0 \mu\text{g/mL}$ και $C_{B.A.} = 100 \mu\text{g/mL}$.

5.3.2.2 Διαλύματα δειγμάτων

Ο σκοπός των παρακάτω πειραμάτων ήταν η αξιολόγηση της σταθερότητας του διαλύματος εργασίας του δείγματος-Working Sample Solution, WS (**διάλυμα ελέγχου**), κατά τη διάρκεια της αναλυτικής ημέρας και έως ένα χρονικό ορίζοντα 48 h (0 h, 5 h, 24 h, 48 h).

Πειραματικό πρωτόκολλο:

- Παρασκευάστηκαν 3 διαφορετικά διαλύματα εργασίας δείγματος (Working Sample Solutions, WSs) ως εξής:
 - 1 mL από το σκεύασμα (σιρόπι) αραιώθηκε σε $V_{\text{τελ}}=20 \text{ mL diluent}^*$
* *diluent*=κινητή φάση=1:1 MeOH/άλας 50 mM-pH=3±0,1
 - Η διαλυτοποίηση έγινε με τη βοήθεια υπερήχων, σε ογκομετρική φιάλη των 20 mL και συμπλήρωση (με τον ίδιο διαλύτη) στον τελικό όγκο (ως τη χαραγή).
 - Η διαδικασία επαναλήφθηκε για τη παρασκευή 2 ακόμη διαλυμάτων εργασίας δείγματος, WSs.
 - Η **ονομαστική** συγκέντρωση για το σκεύασμα (σιρόπι) είναι $C_{B.C.} = 1000 \mu\text{g/mL}$ και $C_{B.A.} = 2000 \mu\text{g/mL}$, επομένως οι τελικές συγκεντρώσεις είναι $C_{B.C.} = 50,0 \mu\text{g/mL}$ και $C_{B.A.} = 100 \mu\text{g/mL}$.
 - Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε ποτήρια ζέσεως των 50mL ώστε να είναι δυνατή η πλήρωση της σύριγγας και ακολούθως η διήθηση με φίλτρα σύριγγας 0,45 μm, πριν την εισαγωγή του δείγματος στο vial δειγματοληψίας (βλ. 4.1).
 - Το ένα εκ των τριών ποτηριών ζέσεως αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου (~25°C) και το άλλο σε θερμοκρασία ψυγείου (~6°C), αφού πρώτα ασφαλίστηκαν με parafilm και τυλίχτηκαν με φύλλο αλουμινίου.

Κριτήρια αποδοχής:

- Η σχετική τυπική απόκλιση (**%RSD**) του εμβαδού ενός WS να είναι **<1%** για κάθε περιοδική μέτρηση (0 h, 5 h, 24 h, 48 h).
- Η ολική σχετική τυπική απόκλιση (**%RSD_{ολικό}**) του εμβαδού μεταξύ των 3 WS να είναι **<1,5%**, για τη μέτρηση στις 0 h.
- Η ολική σχετική τυπική απόκλιση (**%RSD_{ολικό}**) του εμβαδού ενός WS στο σύνολο των 2 ημερών (0 h, 5 h, 24 h, 48 h), να είναι **<1,5%**.

*Πίνακας 8: Οι τιμές των εμβαδών για κάθε ένα WS (διάλυμα ελέγχου) στις 0 h. Τα WS 1 και WS 2 θα χρησιμοποιηθούν για μετρήσεις σε σύνολο 2 ημερών, στους 25°C και στους 6°C αντίστοιχα. *Τα αποτελέσματα αφορούν την Κιτρική βουταμιράτη.*

Επανάληψη	WS 1	WS 2	WS 3
	143,07	144,32	145,56
1	143,36	142,85	145,76
2	143,52	143,31	145,92
3	142,97	143,30	144,93
4	143,58	143,17	145,46
Μέσος όρος	143,30	143,39	145,53
SD	0,27	0,56	0,38
%RSD	0,19	0,39	0,26
Συνολικό %RSD	0,79		

Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) του εμβαδού για κάθε WS είναι <1%. Επίσης, εφόσον $\% RSD_{\text{συνολικό}} = 0,79 < 1,5\%$, τα τρία διαλύματα εργασίας είναι μεταξύ τους **επαρκώς ομοιογενή** και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις μετέπειτα μετρήσεις που αφορούν διαφορετικές θερμοκρασίες (WS 1→25°C, WS 2→6°C).

Πίνακας 9: Οι τιμές των εμβαδών για το WS 1 (διάλυμα ελέγχου) στους 25°C (επάνω) και για το WS 2 (διάλυμα ελέγχου) στους 6°C (κάτω) στο χρονικό διάστημα των 2 ημερών (0 h, 5 h, 24 h και 48 h).
*Τα αποτελέσματα αφορούν την Κιτρική βουταμιράτη

25°C WS No 1	Επανάληψη	0 h	5 h	24 h	48 h
		143,07	144,57	145,30	146,63
	1	143,36	144,58	145,83	145,51
	2	143,52	144,51	145,35	146,05
	3	142,97	145,24	145,40	146,15
	4	143,58	144,59	145,57	146,05
	Μέσος όρος	143,30	144,69	145,50	146,08
	SD	0,27	0,31	0,22	0,40
	%RSD	0,19	0,21	0,15	0,27
	% Διαφορά	-	1,0	1,5	1,9
Συνολικό %RSD	0,76				
6°C WS No 2	Επανάληψη	0 h	5 h	24 h	48 h
		144,32	144,76	146,24	148,15
	1	142,85	145,12	146,63	148,41
	2	143,31	145,03	146,79	148,17
	3	143,30	145,54	146,62	148,18
	4	143,17	145,35	146,30	147,99
	Μέσος όρος	143,39	145,16	146,51	148,18
	SD	0,56	0,30	0,23	0,15
	%RSD	0,39	0,21	0,16	0,10
	% Διαφορά	-	1,2	2,2	3,3
Συνολικό %RSD	1,3				

Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) του εμβαδού για κάθε WS σε κάθε περιοδική μέτρηση είναι <1%. Επίσης, το % RSD_{συνολικό} για ένα WS στο σύνολο των 2 ημερών είναι < 1,5% τόσο στους 25°C όσο και στους 6°C.

Κατ' αντιστοιχία με τα αποτελέσματα που αφορούν στην Κιτρική Βουταμιράτη, παρακάτω παρουσιάζονται τα πειραματικά δεδομένα (τιμές εμβαδού) που ελήφθησαν για το Βενζοϊκό Οξύ. Τα κριτήρια αποδοχής για τις τιμές %RSD και τις τιμές %RSD_{ολικό} είναι τα ίδια με αυτά που τέθηκαν για την Κιτρική Βουταμιράτη.

*Πίνακας 10: Οι τιμές των εμβαδών για κάθε ένα WS (διάλυμα ελέγχου) στις 0 h. Τα WS 1 και WS 2 θα χρησιμοποιηθούν για μετρήσεις σε σύνολο 2 ημερών, στους 25°C και στους 6°C αντίστοιχα. *Τα αποτελέσματα αφορούν το Βενζοϊκό Οξύ.*

Επανάληψη	WS 1	WS 2	WS 3
	541,89	542,56	548,9
1	543,51	541,78	549,1
2	542,97	540,92	548,8
3	541,65	540,95	547,0
4	542,46	542,25	546,9
Μέσος όρος	542,50	541,69	548,1
SD	0,76	0,74	1,1
%RSD	0,14	0,14	0,20
Συνολικό %RSD	0,57		

Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) του εμβαδού για κάθε WST είναι <1%. Επίσης, εφόσον % RSD_{συνολικό} = 0,57 < 1,5%, τα τρία διαλύματα εργασίας είναι μεταξύ τους **επαρκώς ομοιογενή** και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις μετέπειτα μετρήσεις που αφορούν διαφορετικές θερμοκρασίες (WS 1→25°C, WS 2→6°C).

Πίνακας 11: Οι τιμές των εμβαδών για το WS 1 (διάλυμα ελέγχου) στους 25°C (επάνω) και για το WS 2 (διάλυμα ελέγχου) στους 6°C (κάτω) στο χρονικό διάστημα των 2 ημερών (0 h, 5 h, 24 h και 48 h).
*Τα αποτελέσματα αφορούν το Βενζοϊκό Οξύ

25°C WS No 1	Επανάληψη	0 h	5 h	24 h	48 h
		541,89	545,11	542,7	545,38
	1	543,51	545,08	545,8	545,17
	2	542,97	543,57	544,3	544,07
	3	541,65	544,66	546,0	545,05
	4	542,46	543,98	546,1	544,63
	Μέσος όρος	542,50	544,48	545,0	544,86
	SD	0,76	0,68	1,5	0,52
	%RSD	0,14	0,13	0,27	0,095
	% Διαφορά	-	0,37	0,46	0,44
Συνολικό %RSD	0,25				
6°C WS No 2	Επανάληψη	0 h	5 h	24 h	48 h
		542,56	542,8	547,06	551,97
	1	541,78	543,7	546,60	552,70
	2	540,92	541,9	548,55	551,89
	3	540,95	544,6	546,44	552,36
	4	542,25	542,9	547,47	552,47
	Μέσος όρος	541,69	543,2	547,22	552,28
	SD	0,74	1,0	0,84	0,34
	%RSD	0,14	0,18	0,15	0,062
	% Διαφορά	-	-0,28	1,0	1,9
Συνολικό %RSD	0,78				

Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) του εμβαδού για κάθε WS σε κάθε περιοδική μέτρηση είναι <1%. Επίσης, το % RSD_{συνολικό} για ένα WS στο σύνολο των 2 ημερών είναι < 1,5% τόσο στους 25°C όσο και στους 6°C.

Η μαθηματική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων (data) για τη Β.Σ. και το Β.Α. οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το **διάλυμα εργασίας του δείγματος /διάλυμα ελέγχου** (WS), το οποίο προκύπτει από την αραιώση δείγματος (σιρόπι) με διαλύτη την κινητή φάση, είναι σταθερό έως και για 48 h. Η αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος φαίνεται να είναι καταλληλότερη από την αποθήκευση στο ψυγείο.

Σημείωση: Σε κάθε περίπτωση, τα διαλύματα πρέπει να προφυλάσσονται από το φως. Τα όρια αποδοχής βασίζονται στη κρίση του αναλυτή, ωστόσο οι υψηλές τιμές SD ή πιο συχνά οι τιμές %RSD για το σύνολο των μετρήσεων μια πειραματικής παραμέτρου δε θα πρέπει να είναι αποδεκτές σε καμία μελέτη (π.χ. >5%).

Η συγκέντρωση εργασίας στις δοκιμές σταθερότητας (αλλά και γενικότερα στη μέθοδο που αναπτύχθηκε) ήταν $C_{B.C.} = 50,0 \mu\text{g/mL}$ και $C_{B.A.} = 100 \mu\text{g/mL}$.

5.3.3 Ειδικότητα-εκλεκτικότητα⁶⁵

Η ειδικότητα (**specificity**) εκφράζει τη παρεμπόδιση στον προσδιορισμό ενός συστατικού σε ένα δείγμα, από τα άλλα συστατικά του μείγματος αυτού. Έτσι λοιπόν, μια μέθοδος είναι πλήρως ειδική (specific) για έναν αναλύτη εάν η συγκέντρωσή του μπορεί να προσδιορισθεί με ακρίβεια χωρίς επίδραση από τα άλλα συστατικά του δείγματος, τα οποία δε πρέπει να παράγουν κάποιο αναλυτικό σήμα. Όταν η μέθοδος παρέχει ορθά αναλυτικά αποτελέσματα για πολλά συστατικά ενός δείγματος τα οποία συνυπάρχουν χωρίς αλληλεπίδραση μεταξύ τους (συμπροσδιορισμός), τότε μιλάμε για εκλεκτικότητα (**selectivity**) και η μέθοδος καλείται πλήρως εκλεκτική (selective). Πολλές φορές (π.χ. όταν υπάρχει μόνο ένας αναλύτης ενδιαφέροντος) δε γίνεται διάκριση των δύο παραπάνω όρων και χρησιμοποιούνται ισοδύναμα.

Σημείωση: Η πορεία για την απόδειξη της ειδικότητας εξαρτάται από το σκοπό της μεθόδου και βασίζεται στη λογική επιστημονική κρίση του αναλυτή. Γενικά, ο βασικός άξονας κάθε πειραματικού πρωτοκόλλου είναι η επιβεβαίωση της ικανότητας διάκρισης ενός αναλύτη με λήψη θετικών δειγμάτων από δείγματα που τον περιέχουν (π.χ. γνωστά υλικά αναφοράς), σε συνδυασμό με αρνητικά αποτελέσματα από δείγματα που δεν περιέχουν τον αναλύτη.

Σε περιπτώσεις εφαρμογής μιας μη ειδικής μεθόδου απαιτούνται επιπλέον αναλυτικές μέθοδοι (υποστηρικτικές) για να αποδειχθεί η ολική ειδικότητα (overall specificity). **Στις χρωματογραφικές μεθόδους, η ανάγκη για παροχή αντικειμενικών αποδείξεων (έγγραφα τεκμηρίωσης και σχόλια) για την ειδικότητα, εκπληρώνεται με την εξαγωγή διαφόρων αντιπροσωπευτικών χρωματογραφημάτων στα οποία το κάθε ένα συστατικό ενδιαφέροντος επισημαίνεται κατάλληλα.** Επίσης, τα μαθηματικά δεδομένα (data) των χρωματογραφημάτων αυτών (t_R , R_s) θα πρέπει να αποδεικνύουν μια αποδεκτή διαχωριστική ικανότητα. Για τις γειτονικές κορυφές απαιτείται επαρκής διαχωρισμός, ο οποίος όπως είδαμε στο εδάφιο 3.7.2.2 εκφράζεται συνήθως με μια γενική απαίτηση για $R_s \geq 2$. Η απαίτηση αυτή λαμβάνει υπόψη το ελάχιστο tailing που φυσιολογικά μπορεί να συνοδεύει μια κορυφή. Αν $R_s \leq 1,5$, τότε ελέγχεται ο λόγος «ύψος κορυφής προς κοιλάδα» (peak to valley ratio).

Στη παρούσα μέθοδο, η ειδικότητα της μεθόδου εξετάστηκε μέσα από τη **σύγκριση** των εξής χρωματογραφημάτων:

- του διαλύματος του **μέσου διαλυτοποίησης** (diluent) το οποίο χρησιμοποιείται για τις τελικές αραιώσεις των διαλυμάτων εργασίας (WSs και WSTs) και το οποίο στη συγκεκριμένη μέθοδο είναι και ο διαλύτης (κινητή φάση)
- του διαλύματος εργασίας (ελέγχου) του **δείγματος** (WS)
- του διαλύματος εργασίας (αναφοράς) των **καθαρών (πρότυπων) ουσιών** (WST)
- του διαλύματος εργασίας (ελέγχου) ενός **placebo δείγματος**, το οποίο περιείχε όλα τα συστατικά (έκδοχα) του σκευάσματος (σιρόπι), **στα κατάλληλα επίπεδα συγκεντρώσεων**, εκτός των αναλυτών ενδιαφέροντος (B.C και B.A.)
- του διαλύματος εργασίας (ελέγχου) ενός **placebo δείγματος**, το οποίο ήταν εμβολιασμένο /ενισχυμένο (**spiked**) με καθαρή ουσία δραστικής (B.C.)
- του διαλύματος εργασίας (ελέγχου) ενός **placebo δείγματος**, το οποίο ήταν εμβολιασμένο /ενισχυμένο (**spiked**) με καθαρή ουσία συντηρητικού (B.A.)

Πειραματικό πρωτόκολλο:

- Ένα από τα 3 διαφορετικά πρότυπα (συμπυκνωμένα) διαλύματα παρακαταθήκης (Stock Standard Solutions, SSTs) τα οποία παρασκευάστηκαν στη μελέτη σταθερότητας (βλ. εδάφιο 5.3.2.1), χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή, με αραιώση, ενός **πρότυπου διαλύματος εργασίας** (Working Standard Solution, WST), ως εξής:

- 2 mL αραιώθηκαν σε $V_{\text{τελ}}=20$ mL diluent*

*diluent=κινητή φάση=1:1 MeOH/άλας 50 mM-pH=3±0,1

Οι τελικές συγκεντρώσεις ήταν **C_{B.C.} = 50,0 μg/mL** και **C_{B.A.} = 100 μg/mL**.

- Το **διάλυμα εργασίας του δείγματος** (Working Solution, WS) παρασκευάστηκε ως εξής:

- 1 mL από το σκεύασμα (σιρόπι) αραιώθηκε σε $V_{\text{τελ}}=20$ mL diluent*

*diluent=κινητή φάση=1:1 MeOH/άλας 50 mM-pH=3±0,1

- Η διαλυτοποίηση έγινε με τη βοήθεια υπερήχων, σε ογκομετρική φιάλη των 20 mL και συμπλήρωση (με τον ίδιο διαλύτη) στον τελικό όγκο (ως τη χαραγή).

Η ονομαστική συγκέντρωση για το σιρόπι είναι $C_{B.C.} = 1000 \mu\text{g/mL}$ και $C_{B.A.} = 2000 \mu\text{g/mL}$, επομένως οι τελικές συγκεντρώσεις είναι $C_{B.C.} = 50,0 \mu\text{g/mL}$ και $C_{B.A.} = 100 \mu\text{g/mL}$.

- Το συνθετικό μείγμα (διάλυμα) των συστατικών ενός **placebo δείγματος** παρασκευάστηκε από τα έκδοχα και τους διαλύτες οι οποίοι αναφέρονται λεπτομερώς στην ενότητα 4.2 με βάση τη συνταγή (**δελτίο παραγωγής**) του αρμόδιου τμήματος του εργαστηρίου (τμήμα παραγωγής). Έγινε αναγωγή της ποσότητας κάθε συστατικού στον τελικό όγκο του διαλύματος placebo που παρασκευάστηκε (200 mL σιρόπι στερούμενο B.C. και B.A.).

Με βάση την Π.Χ.Π, σε ένα φιαλίδιο σιροπιού (100 mL) αντιστοιχούν:

- 55,0 g σακχαρόζης
- 11 mL αιθυλικής αλκοόλης
- 0,0015 mL αιθέριου ελαίου (αρώματος) κερασιού (χυμός κερασιού)
- 0,0075 mL αιθέριου ελαίου (αρώματος) πορτοκαλιού (orange oil)
- 2,50 mg σκόνης Sunset Yellow
- ~100 mL ύδωρ απεσταγμένο

Στα 200 mL placebo οι παραπάνω ποσότητες ανάγονται σε 110 g, 22 mL, 3 mL, 15 mL, 5 mg και ~200 mL αντίστοιχα.

Με τη βοήθεια μιας κωνική φιάλης των 250 mL, διαλύθηκε πλήρως όλη η ποσότητα σακχαρόζης σε ~100 mL ζέοντος απεσταγμένου ύδατος, με μαγνητική ανάδευση. Το διάλυμα αφέθηκε να κρυώσει και στη συνέχεια προστέθηκαν τα υπόλοιπα συστατικά. Τα αιθέρια έλαια προστέθηκαν με πιπέτα ακριβείας μεταβλητού όγκου 2-20 mL (Ser. No 90025553). Ακολούθησε συμπλήρωση με την υπόλοιπη ποσότητα ύδατος και ανάδευση για ~30 λεπτά. Το διάλυμα διηθήθηκε μέσω χάρτινων ηθμών και συλλέχθηκε το διήθημα.

Για την παρασκευή του **τελικού διαλύματος εργασίας**, 1 mL placebo αραιώθηκε σε $V_{\text{TEL}} = 20$ mL diluent*, όπως έγινε και με το κανονικό σκεύασμα. Ως εκ τούτου, **ελήφθη μέριμνα για τη διασφάλιση των σωστών επιπέδων των συγκεντρώσεων για τα έκδοχα, δηλαδή των επιπέδων εκείνων που αναμένονται και στις αναλύσεις ρουτίνας**. Επομένως, σύγκριση των διαφόρων κορυφών στα διάφορα χρωματογραφήματα (κορυφή δραστικής, κορυφές εκδόχων κλπ) θα είναι αντιπροσωπευτική.

* diluent=κινητή φάση= 1:1 MeOH/άλας 50 mM-pH=3±0,1

- Για τη παρασκευή του **διαλύματος εργασίας ενός διαλύματος placebo ενισχυμένου (spiked) με καθαρή ουσία** δραστικής (B.C.), πρώτα παρασκευάστηκε ένα STOCK διάλυμα 10 mg B.C. σε 20 mL MeOH/H₂O 1:1 ($C_{B.C.} = 500 \mu\text{g/mL}$). Στη συνέχεια 2 mL από το STOCK και 1 mL από το placebo

αραιώθηκαν σε $V_{\text{τελ}}=20$ mL diluent (MeOH/άλας). Επομένως, η τελική συγκέντρωση ήταν $C_{\text{B.C.}}= 50,0$ $\mu\text{g/mL}$.

- Για τη παρασκευή του **διαλύματος εργασίας ενός διαλύματος placebo ενισχυμένου (spiked) με καθαρή ουσία** συντηρητικού (B.A.), πρώτα παρασκευάστηκε ένα STOCK διάλυμα 20 mg B.A. σε 20 mL MeOH/H₂O 1:1 ($C_{\text{B.A.}} = 1000$ $\mu\text{g/mL}$). Στη συνέχεια 2 mL από το STOCK και 1 mL από το placebo αραιώθηκαν σε $V_{\text{τελ}}=20$ mL diluent (MeOH/άλας). Επομένως, η τελική συγκέντρωση ήταν $C_{\text{B.A.}}= 100$ $\mu\text{g/mL}$.

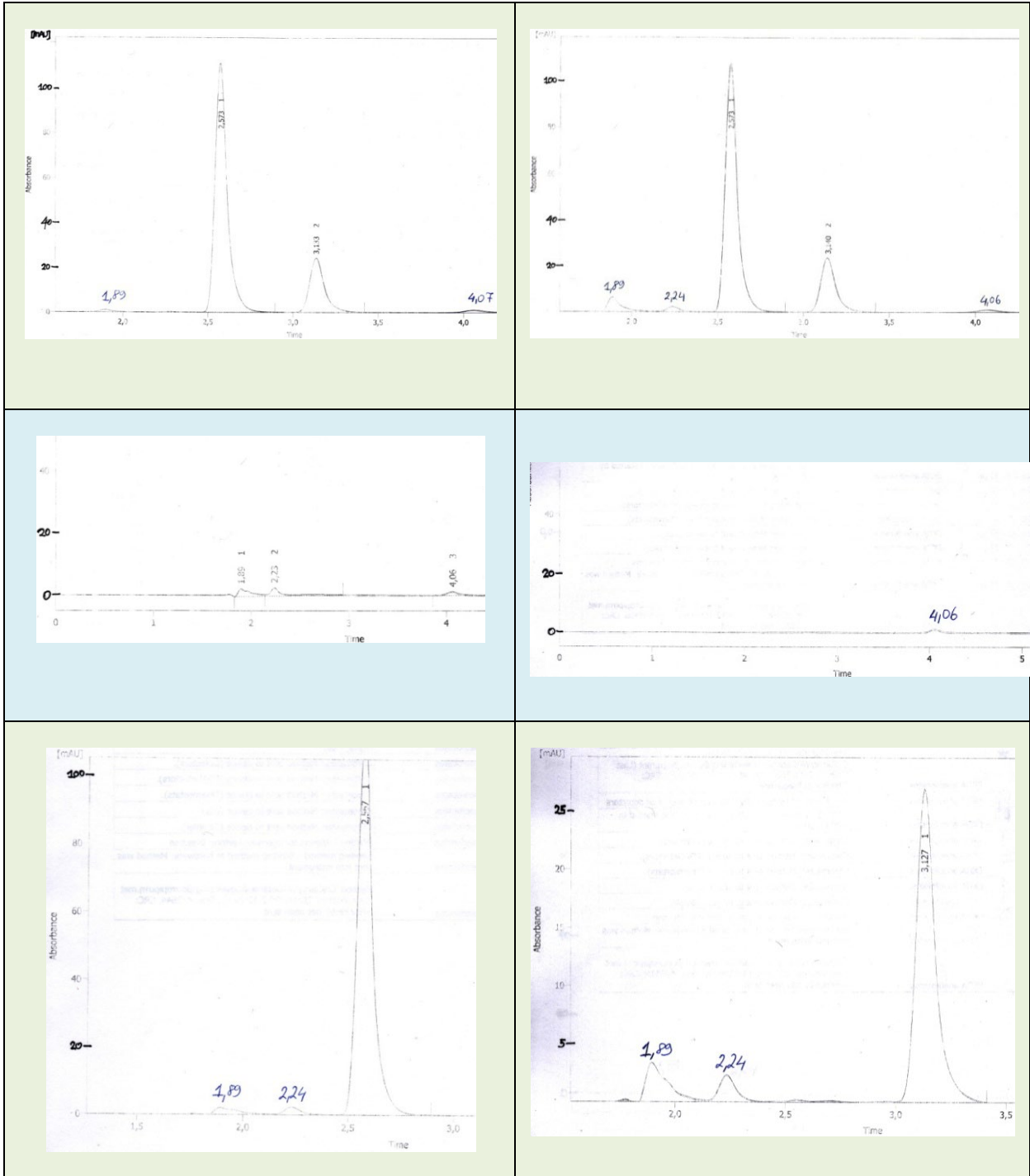
Κριτήρια αποδοχής:

- Η χρωματογραφική κορυφή της B.C. και του B.A. θα πρέπει να διαχωρίζονται επαρκώς τόσο **μεταξύ τους** όσο και από **οποιαδήποτε άλλη κορυφή** η οποία οφείλεται στο διαλύτη ή στο placebo (έκδοχα). Θα πρέπει να ισχύει ότι $R_s \geq 1,5$, ενώ στην περίπτωση όπου $R_s < 1,5$ θα ελεγχθεί ο λόγος «ύψος κορυφής προς κοιλάδα» (peak to valley ratio) και θα αποφασιστεί ο ικανοποιητικός (ή μη) διαχωρισμός.

Από την εξέταση των χρωματογραφημάτων των διαλυμάτων placebo_{spiked B.C.} και placebo_{spiked B.A.}, συμπεραίνουμε ότι είναι $t_{\text{R(B.C.)}} = 3,14$ min και $t_{\text{R(B.A.)}} = 2,57$ min. Τόσο από αυτά τα διαλύματα όσο και από το placebo_{unspiked} διάλυμα, διαπιστώνουμε ότι **δεν** υπάρχει κάποια «παρεμποδίζουσα» κορυφή στη περιοχή έκλουσης των δύο αυτών αναλυτών ενδιαφέροντος. Στα διαλύματα που περιέχουν και τους δύο αναλύτες, η διαχωριστική ικανότητα (Resolution) ήταν $R_s=3,72$ και $R_s=3,84$ για τα διαλύματα WST και WS αντίστοιχα.

Επίσης, παρατηρούμε μια πολύ μικρή κορυφή (~2,5 mAU) σε $t_{\text{R}} = 2,24$ min την οποία το λογισμικό δεν ολοκληρώνει (κατώφλι ολοκλήρωσης 5 mAU) και η οποία είναι κοινή στα διαλύματα του δείγματος (WS) και των τριών placebo (unspiked, spiked B.C., spiked B.A.). Προφανώς σχετίζεται με κάποιο έκδοχο(α), ωστόσο η περιοχή αυτή δεν επηρεάζει καθόλου τον συγκεκριμένο ποσοτικό προσδιορισμό. Παρόμοια, παρατηρούμε μια πολύ μικρή κορυφή (~1,5 mAU) σε $t_{\text{R}} = 4,06$ min την οποία το λογισμικό επίσης δεν ολοκληρώνει και η οποία είναι κοινή σε **όλα** τα διαλύματα, συμπεριλαμβανομένων των διαλυμάτων Working Standard και diluent. Επομένως, πιθανότατα δεν πρόκειται για κάποιο έκδοχο(α) αλλά για κάποιο θόρυβο ή απορρόφηση των συστατικών του diluent (MeOH/NaH₂PO₄). Και εδώ, η περιοχή αυτή δεν επηρεάζει καθόλου τον συγκεκριμένο ποσοτικό προσδιορισμό.

Τέλος, η πρώτη κορυφή ($t_{\text{R}} = 1,89$ min, ~2 mAU) που παρατηρείται σε όλα τα διαλύματα, θεωρούμε ότι αφορά τον νεκρό χρόνο (t_0). Το γεγονός ότι η κορυφή αυτή είναι σχεδόν ανύπαρκτη στο χρωματογράφημα του διαλύματος diluent, θεωρούμε ότι οφείλεται στο ότι αυτό ταυτίζεται με την κινητή φάση του πειραματικού πρωτοκόλλου (MeOH/NaH₂PO₄).



Σχήμα 33: Αντιπροσωπευτικά Χρωματογραφήματα* για την απόδειξη της ειδικότητας. **Επάνω:** Πρότυπο διάλυμα (WST) (αριστερά) & διάλυμα του δείγματος (WS) (δεξιά). **Μέση:** Διάλυμα placebo (αριστερά) & μέσο διαλυτοποίησης (diluent) (δεξιά). **Κάτω:** Διάλυμα placebo_{spiked} B.A. (αριστερά) & διάλυμα placebo_{spiked} B.C. (δεξιά). Η έλλειψη οποιασδήποτε παρεμπόδισης των κορυφών ενδιαφέροντος και ο επαρκής διαχωρισμός των αναλυτών (προκύπτει $R_s > 3$), αποτελούν **τεκμήρια** της ειδικότητας της μεθόδου. *Για κάθε διάλυμα εργασίας πραγματοποιήθηκαν 3 μετρήσεις (2 επαναλήψεις για κάθε run) και το συνολικό χρωματογράφημα ελήφθη με **υπέρθωση** των επί μέρους χρωματογραφημάτων. Η κλίμακα (scale) κάθε γραφήματος καθορίστηκε με βάση την υψηλότερη κορυφή. Οι τιμές για τις πειραματικές αποκρίσεις (t_R , R_s , εμβαδό κλπ) αποτελούν τις **μέσες τιμές** από το σύνολο των 3 μετρήσεων ανά περίπτωση.

Σημείωση: Η τιμή του νεκρού όγκου προκύπτει συνήθως από την οπτική εξέταση του αρχικού τμήματος ενός χρωματογραφήματος και είναι η πρώτη «**διατάραξη**» της γραμμής βάσης (*baseline disturbance*), η οποία εμφανίζεται με μια μικρή χαρακτηριστική κορυφή.

Η εικόνα, η ερμηνεία (σχόλια) και τα μαθηματικά δεδομένα (data) των παραπάνω χρωματογραφημάτων (t_R , R_s) αποδεικνύουν ότι το αποτέλεσμα του εν λόγω προσδιορισμού **δεν επηρεάζεται** από την παρουσία των εκδόχων του σκευάσματος. Η έλλειψη της οποιασδήποτε τυχόν παρεμπόδισης για τις χρωματογραφικές κορυφές ενδιαφέροντος και ο επαρκής διαχωρισμός των αναλυτών (προκύπτει $R_s > 3$), αποτελούν **τεκμήρια** της ειδικότητας της εξεταζόμενης μεθόδου.

5.3.4 Γραμμικότητα⁶⁵

Μια αναλυτική μέθοδος πρέπει να παρουσιάζει γραμμικότητα (**linearity**) μέσα σε ένα δεδομένο αλλά ικανοποιητικό εύρος. Το εύρος αυτό εντός του οποίου εξετάζεται η γραμμικότητα, πρέπει να περιλαμβάνει όλες τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις των αναλυτών εκείνων που θα προσδιορίσει η μέθοδος. Ένα πειραματικό πρωτόκολλο μπορεί να αφορά είτε μετρήσεις **απευθείας** στην καθαρή προσδιοριζόμενη ουσία είτε εφαρμογή της ελεγχόμενης αναλυτικής μεθόδου σε **συνθετικά μείγματα** των συστατικών ενός προϊόντος (ξεχωριστές ζυγίσεις για τα διάφορα συστατικά, παρασκευή διαλύματος placebo και εμβολιασμός με τη δραστική ουσία στο επιθυμητό επίπεδο συγκέντρωσης). Στη παρούσα διαδικασία επικύρωσης εφαρμόστηκε η πρώτη εκδοχή: ένα πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης (STOCK solution), αραιώθηκε κατάλληλα με σκοπό την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης ανά περίπτωση.

5.3.4.1 Χρήσιμα διαγράμματα

Αρχικά, η πρώτη αξιολόγηση της γραμμικότητας γίνεται με οπτική εξέταση του διαγράμματος του **αναλυτικού σήματος** (εμβασμό, ύψος) ως προς τη **συγκέντρωση** (ή περιεκτικότητα) του αναλύτη (**διάγραμμα απόκρισης-συγκέντρωσης**). Εν συνεχεία, η εφαρμογή ειδικών στατιστικών μεθόδων αποδεικνύει τη γραμμικότητα της μεθόδου. Ο αλγόριθμος της ανάλυσης παλινδρόμησης (least squares regression analysis) υπολογίζει την **ευθεία** παλινδρόμησης, η οποία χαρακτηρίζεται από την τομή (intercept), την κλίση (slope) και την τυπική απόκλιση των υπολοίπων ($S_{y/x}$). Τα μεγέθη αυτά περιλαμβάνονται στο φάκελο της μεθόδου (**έγγραφα τεκμηρίωσης**). Τα κριτήρια αποδοχής συνήθως αφορούν τον συντελεστή συσχέτισης (r) και τον συντελεστή προσδιορισμού (r^2).

Για κάθε μέτρηση σε ένα επίπεδο συγκέντρωσης, υπάρχει ένα υπόλοιπο (residual) $e_i = (y_i - \hat{y}_i)$, δηλαδή μια διαφορά μεταξύ της θεωρητικής (\hat{y}_i) και της

πειραματικής τιμής (y_i). Η τυπική απόκλιση όλων των υπολοίπων ($S_{y/x}$) είναι το τυπικό σφάλμα (standard error) και αποτελεί μέτρο του τυχαίου σφάλματος της καμπύλης αναφοράς. Από το διάγραμμα των υπολοίπων (**residual plot**), $e_i - x_i$, ελέγχεται η ύπαρξη έκτροπων τιμών (outliers). Αν ο αναλυτής αποφανθεί την ύπαρξη τέτοιων τιμών, αυτές απορρίπτονται και η καμπύλη αναφοράς χαράσσεται εκ νέου.

Ένα ακόμη χρήσιμο διάγραμμα το οποίο συχνά εξετάζεται, είναι αυτό του λόγου «απόκριση /συγκέντρωση», y_i/x_i (response ratio) ως προς τη συγκέντρωση, x_i (**διάγραμμα λόγων απόκρισης**). Και εδώ, οι τιμές πρέπει να βρίσκονται εντός μιας στενής οριζόντιας ζώνης, διαφορετικά είναι μη αποδεκτές (outliers) για μια κανονική περιοχή εργασίας. Ακόμη στο διάγραμμα αυτό εξετάζεται η συμφωνία της τομής της προκύπτουσας ευθείας (y) με την κλίση (b) της ευθείας παλινδρόμησης.

5.3.4.2 Αποτελέσματα

Τα **πειραματικά πρωτόκολλα** της γραμμικότητας περιλαμβάνουν την παρασκευή μιας σειράς προτύπων διαλυμάτων εργασίας του αναλύτη σε **τουλάχιστον 5** διαφορετικές συγκεντρώσεις. Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέγονται ώστε να κατανέμονται ομοιόμορφα και να καλύπτουν προσεγγιστικά το 50-150% της **αναμενόμενης** περιοχής εργασίας στις αναλύσεις ρουτίνας (αναλύσεις δειγμάτων). Για προϊόντα ακριβώς γνωστής σύστασης (π.χ. φαρμακευτικά σκευάσματα), το απαιτούμενο εύρος δύναται να είναι πιο στενό (π.χ. 75-125%). Τα πρότυπα αναλύονται με την αξιολογούμενη μέθοδο. Για κάθε πρότυπο εκτελούνται επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (συνήθως 2 έως 5 επαναλήψεις, συνολικά 3 έως 6 μετρήσεις).

Στον συγκεκριμένο προσδιορισμό, παρασκευάστηκε μια σειρά από 5 πρότυπα διαλύματα εργασίας των αναλυτών (WSTs) τα οποία κάλυπταν το εύρος 50-150% της συγκέντρωσης εργασίας. Η **συγκέντρωση εργασίας** που επιλέχθηκε (**επίπεδο 100%**) είναι $C_{B,C} = 50,0 \mu\text{g/mL}$ και $C_{B,A} = 100 \mu\text{g/mL}$ (όμοια με το πειραματικό πρωτόκολλο της μεθόδου σε επίπεδο ρουτίνας, βλ. παράγραφο 5.3.1). Για κάθε πρότυπο εργασίας πραγματοποιήθηκαν **3** μετρήσεις (3 runs). Για κάθε συγκέντρωση υπολογίστηκε ο μέσος όρος (mean), η τυπική απόκλιση (SD) και η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) της αναλυτικής παραμέτρου (εμβαδό χρωματογραφικής επιφάνειας). Κατασκευάστηκε το διάγραμμα της μέσης απόκρισης ως προς τη συγκέντρωση.

Σημείωση: Όλοι οι υπολογισμοί και τα αποτελέσματα αναγράφονται στο φύλλο επεξεργασίας και τεκμηρίωσης των δεδομένων. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το λογισμικό Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA).

Πειραματικό πρωτόκολλο:

- Παρασκευάστηκε ένα **νέο** πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης (Stock Standard Solution, SST), συγκέντρωσης $C_{B.C.} = 250 \mu\text{g/mL}$ και $C_{B.A.} = 500 \mu\text{g/mL}$, ως εξής:
 - Ζυγίστηκαν 25,0 mg καθαρής ουσίας B.C. (HWS) και 50,0 mg καθαρής ουσίας B.A. (αντι-δείγμα 1^{ης} ύλης)-βλ. 4.2, στον αναλυτικό ψηφιακό ζυγό ακρίβειας ανάγνωσης 4 δεκαδικών ψηφίων
 - Διαλύθηκαν, με τη βοήθεια υπερήχων, σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL με διαλύτη MeOH/H₂O 1:1 και έγινε συμπλήρωση (με τον ίδιο διαλύτη) στον τελικό όγκο (ως τη χαραγή)
 - Το διάλυμα αποθηκεύτηκε σε σκουρόχρωμο γυάλινο περιέκτη με βιδωτό πώμα

- Από το παραπάνω συμπυκνωμένο διάλυμα, παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις 5 διαφορετικά πρότυπα διαλύματα εργασίας (Working Standard Solutions, WSTs), δηλαδή 5 **διαλύματα ελέγχου**, ως εξής:
 - 2, 3, 4, 5 και 6 mL αραιώθηκαν σε $V_{\text{τελ}}=20 \text{ mL diluent}^*$
**diluent=κινητή φάση=1:1 MeOH/άλας 50 mM-pH=3±0,1*
 - Έτσι, οι τελικές συγκεντρώσεις ήταν **$C_{B.C.} = 25,0-37,5-50,0-62,5$**
 $-75,0 \mu\text{g/mL}$ και **$C_{B.A.} = 50,0-75,0-100-125-150 \mu\text{g/mL}$** .

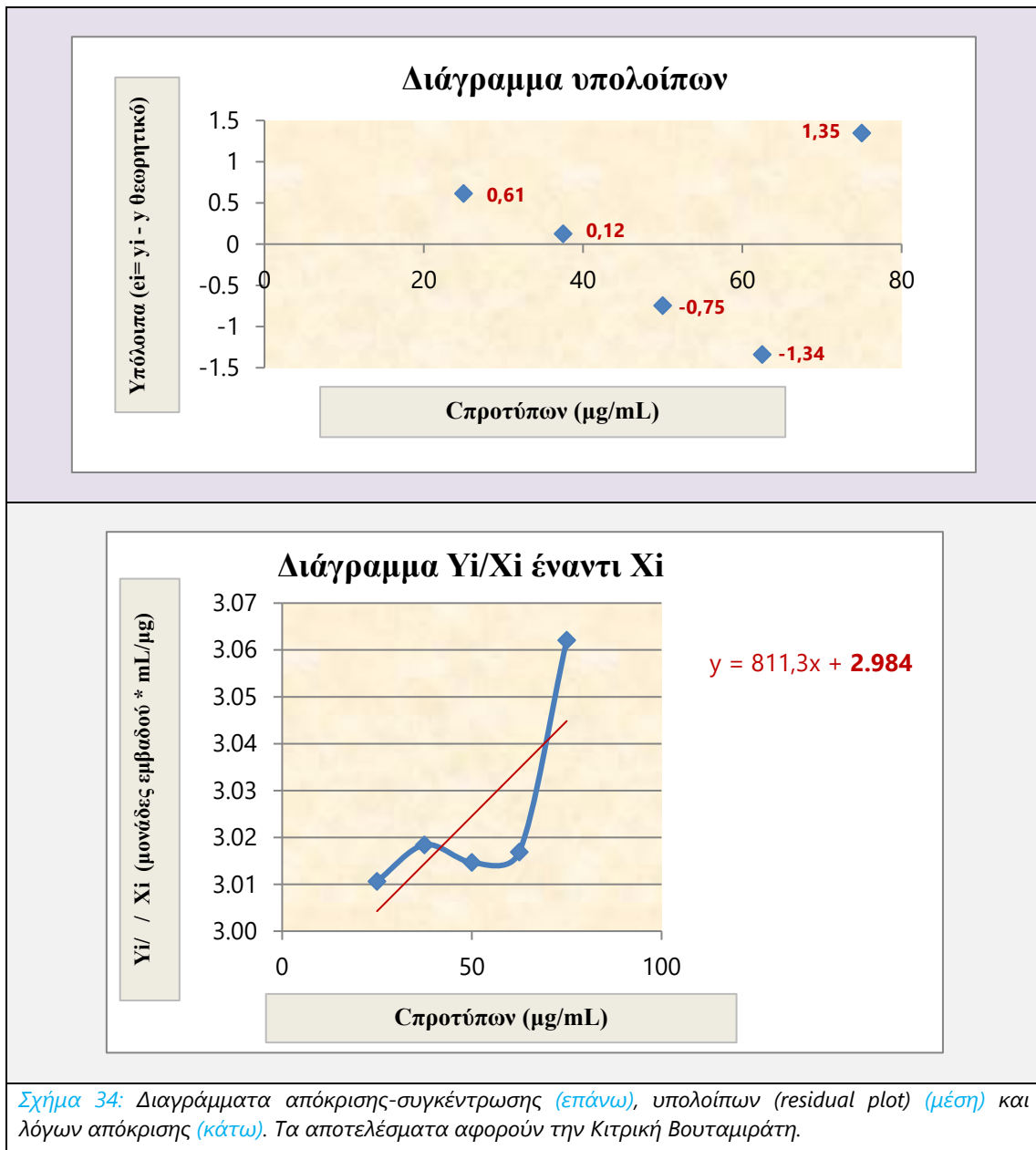
Σημείωση: Δε χρησιμοποιήθηκε κάποιο από τα 3 συμπυκνωμένα διαλύματα παρακαταθήκης (SSTs) τα οποία παρασκευάστηκαν στη μελέτη σταθερότητας (βλ. 5.3.2.1), διότι λόγω συγκέντρωσης δεν εξυπηρετούσαν στην επίτευξη των επιθυμητών αραιώσεων. Για πρακτικούς λόγους και για λόγους ακρίβειας, επιδιώκεται ο τελικός όγκος αραιώσης να είναι ο ίδιος για κάθε πρότυπο εργασίας (π.χ. $V_{\text{τελ}}=20 \text{ mL}$) και οι αρχικές ποσότητες να είναι ακέραιες τιμές (π.χ. 2, 3, 4 mL).

Πίνακας 12: Οι απαιτούμενες αραιώσεις για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων εργασίας (WSTs) για τη δοκιμασία της γραμμικότητας (επάνω). Μαθηματικά δεδομένα* για τη κατασκευή του διαγράμματος (plot) της μέσης αναλυτικής απόκρισης έναντι της συγκέντρωσης των προτύπων καθώς και για τη κατασκευή των υπόλοιπων διαγραμμάτων (κάτω). *Τα αποτελέσματα αφορούν την Κιτρική βουταμιράτη.

% της Cεργασίας	V _{STOCK} (mL)	V _{τελ.} (mL)	C _{WST} (μg/mL)
50	2	20	25,0
75	3	20	37,5
100	4	20	50,0
125	5	20	62,5
150	6	20	75,0
Y _i (μέσο εμβαδό από 3 runs)		X _i (C _{μg/mL})	
75,27		25,0	
113,19		37,5	
150,73		50,0	
188,56		62,5	
229,66		75,0	
Y _i (μέσο εμβαδό από 3 runs)/X _i		X _i (C _{μg/mL})	
3,01		25,0	
3,02		37,5	
3,01		50,0	
3,02		62,5	
3,06		75,0	

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα κατασκευάζονται τα αντίστοιχα διαγράμματα.





Κριτήρια αποδοχής:

- Η εξίσωση παλινδρόμησης (regression equation) $Y = a(\pm S_a) + b(\pm S_b) * X$ πρέπει να περιγράφει μια ευθεία η οποία διέρχεται από την αρχή των αξόνων. Αυτό αποδεικνύεται με τεκμηρίωση ότι η τομή (a) είναι **στατιστικά** ίση με το μηδέν (πρακτικά είναι διάφορη του μηδενός).
- Για τον συντελεστή συσχέτισης (r) πρέπει να ισχύει ότι **$r \geq 0,998$** .
- Για τον συντελεστή προσδιορισμού (r^2) πρέπει να ισχύει ότι **$r^2 \geq 0,98$** (προτιμάται η τιμή 0,99, ωστόσο η τιμή 0,98 είναι επίσης αποδεκτή ανάλογα με τις ανάγκες της μεθόδου).
- Αν η σχέση μεταξύ εμβαδού και συγκέντρωσης δεν είναι γραμμική, **περιορίζεται** η περιοχή (αποκόπτονται σημεία) έως ότου αυτό επιτευχθεί. Τα **εναπομείναντα** σημεία δεν πρέπει να είναι λιγότερα από 4. Οι αποκλίσεις των σημείων μακριά από το μηδέν επηρεάζουν περισσότερο από ό,τι οι αποκλίσεις των σημείων κοντά στο μηδέν.

Σημείωση: Τα κριτήρια αποδοχής είναι δυνατόν να διαφέρουν ελάχιστα ανάλογα με το επιστημονικό πεδίο (φάρμακα, τρόφιμα, φυτοφάρμακα κλπ) και τον αρμόδιο νομοθετικό οργανισμό (regulatory body). Για παράδειγμα, το Καναδικό Τμήμα Προστασίας της Υγείας θέτει κριτήρια $r^2 \geq 0,997$ για τη δραστική ουσία και $r^2 \geq 0,98$ για τις προσμίξεις.

Ο συντελεστής συσχέτισης (r) αναγράφεται πάντοτε με όλα τα πρώτα ψηφία του 9 συν το 1^ο ψηφίο $\neq 9$. Η παράμετρος αυτή αποτελεί κριτήριο αξιολόγησης της **προσαρμογής** των σημείων σε ένα **μαθηματικό μοντέλο**, δηλαδή της **συσχέτισής** τους με αυτό. Στη περίπτωση γραμμικών μοντέλων, η παράμετρος r αναφέρεται και ως κριτήριο γραμμικότητας.

Από την ανάλυση των ελαχίστων τετραγώνων (least squares regression analysis) εξάγεται η παρακάτω εξίσωση, με **εξαρτημένη μεταβλητή** το εμβαδό των κορυφών (άξονας y) και **ανεξάρτητη μεταβλητή** τη συγκέντρωση των προτύπων (άξονας x):

$$Y = -2,2(\pm 1,7) + 3.073 (\pm 31) * X, r=0,9998, r^2=0,9996, S_{y/x}=1,2 \quad (15)$$

Από τα μαθηματικά δεδομένα (data) που προκύπτουν και αναγράφονται στο αντίστοιχο φύλλο επεξεργασίας του λογισμικού Microsoft Office Excel (φάκελος μεθόδου), αποδεικνύεται ότι:

- $P = \text{probability για την τομή (intercept)} = 0,28 > 0,05$
- $\frac{|a|}{s_a} = \frac{|-2,2|}{1,7} = 1,3 = t_{\text{πειρ.}} < t_{\text{θεωρ. (critical)}} = 3,182$ το οποίο προκύπτει από τον πίνακα κατανομής των τιμών t (t-test table) για Διάστημα Εμπιστοσύνης 95% και $\nu = n - 2 = 5 - 2 = 3$ βαθμούς ελευθερίας.
- Το μηδέν δε συγκαταλέγεται στο Διάστημα Εμπιστοσύνης (Confidence Interval) $[a - S_a, a + S_a]$, ωστόσο συγκαταλέγεται στο ανώτερο 95%-κατώτερο 95%

Κάθε ένα από τα παραπάνω κριτήρια **τεκμηριώνει** ότι η ευθεία παλινδρόμησης διέρχεται από την αρχή των αξόνων $0(0,0)$.

Το **διάγραμμα υπολοίπων** δεν έδειξε κάποια έκτροπη τιμή (outlier) και τα σημεία βρίσκονταν εντός μιας στενής οριζόντιας (νοητής) ζώνης (μικρό τυπικό σφάλμα, standard error, → ένδειξη μικρού τυχαίου σφάλματος).

Έτσι, προχωρήσαμε στη κατασκευή του **διαγράμματος λόγων απόκρισης**. Θεωρητικά, θα πρέπει η τομή της ευθείας του διαγράμματος αυτού ($\alpha = 2.984$) να ισούται με τη κλίση (b) της ευθείας παλινδρόμησης ($b = 3.073$). Υπολογίστηκε σφάλμα συμφωνίας 2,9%.

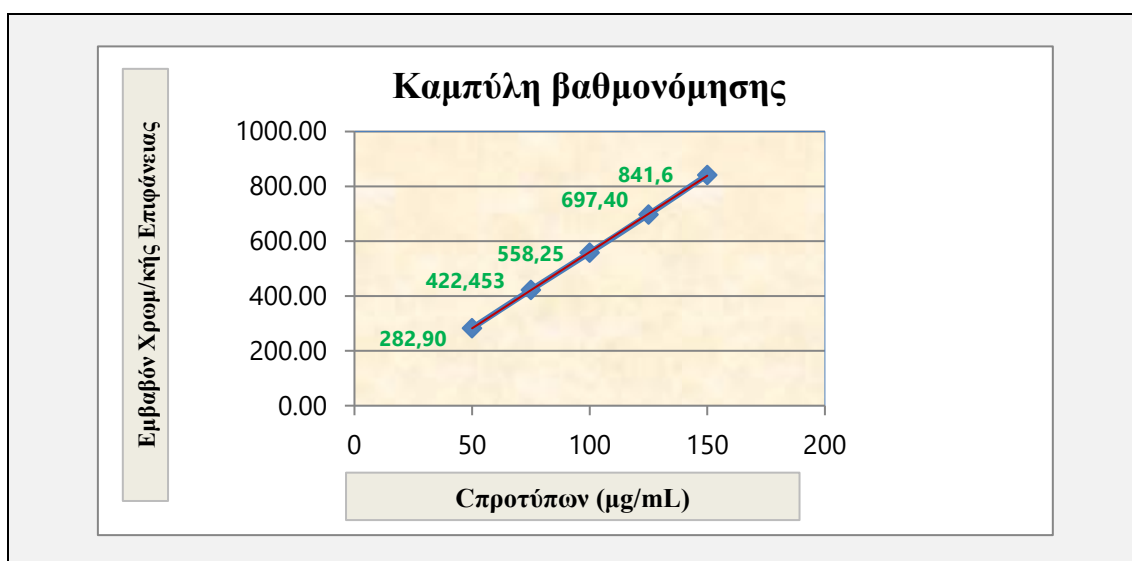
Κατ' αντιστοιχία με τα αποτελέσματα που αφορούν στην Κιτρική Βουταμιράτη, παρακάτω παρουσιάζονται τα πειραματικά δεδομένα και τα διαγράμματα που ελήφθησαν για το Βενζοϊκό Οξύ. Τα κριτήρια αποδοχής για τον συντελεστή συσχέτισης (r) και τον συντελεστή προσδιορισμού (r^2) είναι τα ίδια με αυτά που τέθηκαν για την Κιτρική Βουταμιράτη.

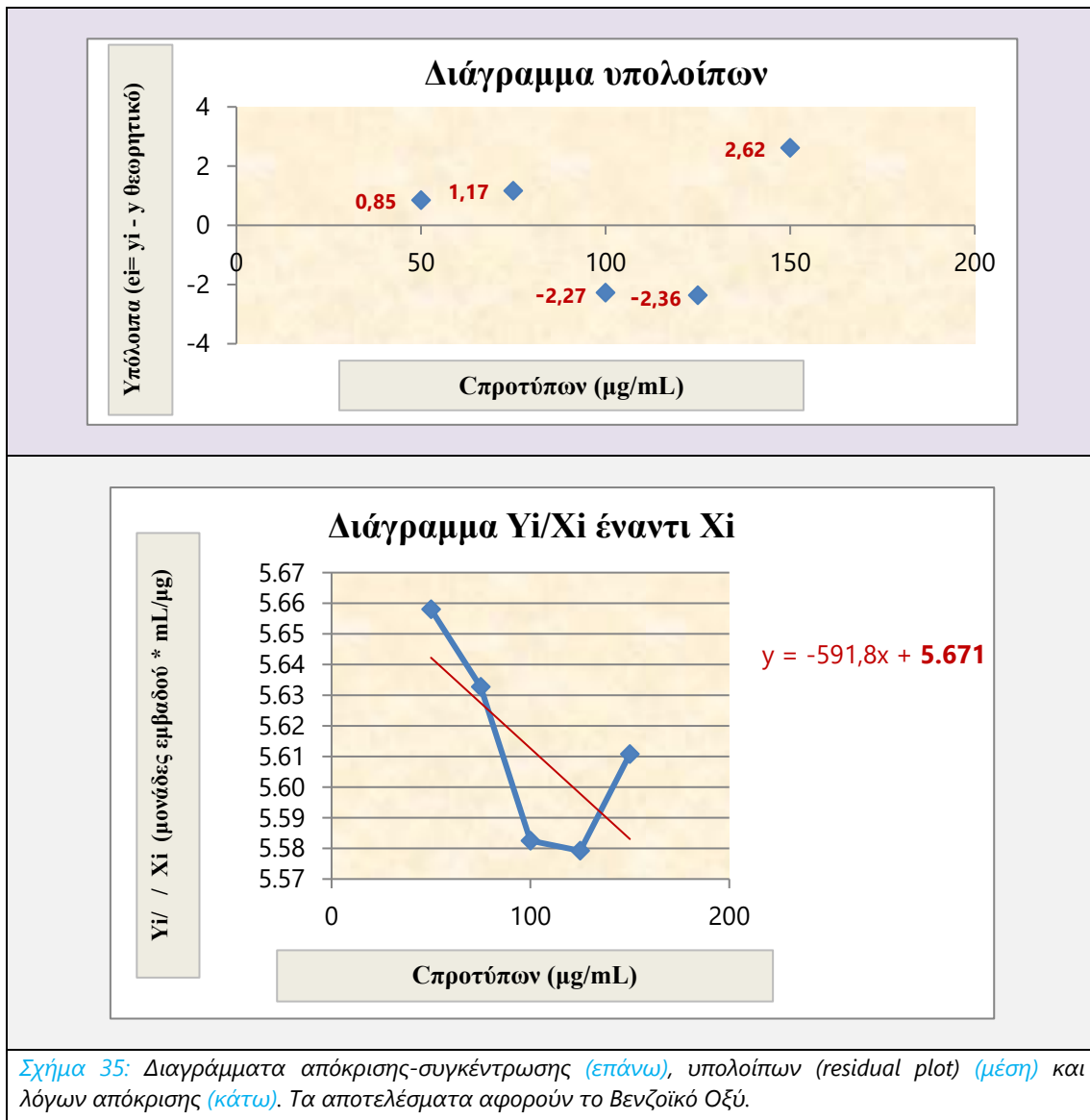
Πίνακας 13: Οι απαιτούμενες αραιώσεις για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων εργασίας (WSTs) για τη δοκιμασία της γραμμικότητας (επάνω). Μαθηματικά δεδομένα* για τη κατασκευή του διαγράμματος (plot) της μέσης αναλυτικής απόκρισης έναντι της συγκέντρωσης των προτύπων καθώς και για τη κατασκευή των υπόλοιπων διαγραμμάτων (κάτω).

*Τα αποτελέσματα αφορούν το Βενζοϊκό Οξύ

% της C _{εργασίας}	V _{STOCK} (mL)	V _{τελ.} (mL)	C _{WST} (μg/mL)
50	2	20	50,0
75	3	20	75,0
100	4	20	100
125	5	20	125
150	6	20	150
Y _i (μέσο εμβαδό από 3 runs)		X _i (C _{μg/mL})	
282,90		50,0	
422,453		75,0	
558,25		100	
697,40		125	
841,6		150	
Y _i (μέσο εμβαδό από 3 runs)/X _i		X _i (C _{μg/mL})	
5,66		50,0	
5,63		75,0	
5,58		100	
5,58		125	
5,61		150	

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα κατασκευάζονται τα αντίστοιχα διαγράμματα.





Από την ανάλυση των ελαχίστων τετραγώνων (least squares regression analysis) εξάγεται η παρακάτω εξίσωση, με **εξαρτημένη μεταβλητή** το εμβαδό των κορυφών (άξονας y) και **ανεξάρτητη μεταβλητή** τη συγκέντρωση των προτύπων (άξονας x):

$$Y = 3,6(\pm 3,4) + 5.570 (\pm 32) * X, r=0,99995, r^2=0,9999, S_{y/x}=2,6 \quad (16)$$

Από τα μαθηματικά δεδομένα (data) που προκύπτουν και αναγράφονται στο αντίστοιχο φύλλο επεξεργασίας του λογισμικού Microsoft Office Excel (φάκελος μεθόδου), αποδεικνύεται ότι:

- $P = \text{probability για την τομή (intercept)} = 0,37 > 0,05$
- $\frac{|a|}{s_a} = \frac{|3,6|}{3,4} = 1,06 = t_{\text{πειρ.}} < t_{\text{θεωρ. (critical)}} = 3,182$ το οποίο προκύπτει από τον πίνακα κατανομής των τιμών t (t -test table) για Διάστημα Εμπιστοσύνης 95% και $\nu = n - 2 = 5 - 2 = 3$ βαθμούς ελευθερίας.
- Το μηδέν δε συγκαταλέγεται στο Διάστημα Εμπιστοσύνης (Confidence Interval) $[a - S_a, a + S_a]$, ωστόσο συγκαταλέγεται στο ανώτερο 95%-κατώτερο 95%

Κάθε ένα από τα παραπάνω κριτήρια **τεκμηριώνει** ότι η ευθεία παλινδρόμησης διέρχεται από την αρχή των αξόνων $0(0,0)$.

Το **διάγραμμα υπολοίπων** δεν έδειξε κάποια έκτροπη τιμή (outlier) και τα σημεία βρίσκονταν εντός μιας στενής οριζόντιας (νοητής) ζώνης (μικρό τυπικό σφάλμα, standard error, → ένδειξη μικρού τυχαίου σφάλματος).

Έτσι, προχωρήσαμε στη κατασκευή του **διαγράμματος λόγων απόκρισης**. Θεωρητικά, θα πρέπει η τομή της ευθείας του διαγράμματος αυτού ($a = 5.671$) να ισούται με τη κλίση (b) της ευθείας παλινδρόμησης ($b = 5.570$). Υπολογίστηκε σφάλμα συμφωνίας 1,8%.

Τα παραπάνω μαθηματικά και γραφικά δεδομένα για τους αναλύτες ενδιαφέροντος (B.C, B.A.), **αποδεικνύουν** ότι η εξεταζόμενη μέθοδος πληροί τα κριτήρια αποδοχής και **πιστοποιούν** τη γραμμική σχέση μεταξύ των εμβαδών των κορυφών των αναλυτών (σήμα) και της εκάστοτε συγκέντρωσης αυτών.

5.3.5 Ακρίβεια-Ορθότητα⁶⁵

Η ακρίβεια (**accuracy**) αναφέρεται στη διαφορά ανάμεσα σε μια πειραματική τιμή (x_i) μιας μέτρησης και στη θεωρητική τιμή μ (accepted true value), η οποία γίνεται αποδεκτή ως η αληθής (true) ή η ορθή (correct) τιμή της μετρούμενης ποσότητας (δηλαδή η πραγματική τιμή του αγνώστου δείγματος). Ουσιαστικά, η ακρίβεια αξιολογεί το **βαθμό συμφωνίας** μεταξύ της μετρούμενης παραμέτρου (π.χ. συγκέντρωση) και της αληθούς τιμής (true value). Η διαφορά του μέσου όρου (mean) μιας **σειράς ανεξάρτητων πειραματικών μετρήσεων** και της τιμής μ , δηλαδή $X_{\text{mean}} - \mu$, εκφράζει την ορθότητα (trueness) της μεθόδου και λέγεται συστηματικό σφάλμα (bias). Επίσης αναφέρεται και ως απόλυτη ακρίβεια. Επομένως, η ορθότητα αποτελεί ένα υποσύνολο της ακρίβειας. Μια μέτρηση θεωρείται ακριβής (accurate) όταν στερείται συστηματικού σφάλματος και είναι επαναλήψιμη (precise, βλ. ενότητα 5.3.6).

Σημείωση: Οι περιορισμοί στην ακρίβεια προέρχονται και από τα τυχαία σφάλματα (random errors), εκτός από τα συστηματικά σφάλματα (bias) μιας αναλυτικής μεθόδου. Τα τελευταία αφορούν τη θετική ή αρνητική απόκλιση του μέσου αναλυτικού αποτελέσματος, X_{mean} , από τη γνωστή (ή θεωρούμενη) αληθή τιμή. Στην πράξη, η αληθής τιμή (μ) δε μπορεί ποτέ να ταυτιστεί με τη **πραγματική** τιμή για ένα δείγμα (διότι αυτή παραμένει πάντα άγνωστη), ωστόσο μπορεί να βρίσκεται εξαιρετικά κοντά σε αυτή (π.χ. όταν προκύπτει από ένα διεργαστηριακό σχήμα πολλών συμμετεχόντων ή όταν αναγράφεται στο πιστοποιητικό ενός CRM).

5.3.5.1 Τρόποι ελέγχου της ακρίβειας σε ποσοτικούς προσδιορισμούς σκευασμάτων

Ο έλεγχος της ακρίβειας μιας μεθόδου μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους. Για παράδειγμα, μπορεί να γίνει εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου σε συνθετικά μείγματα των λοιπών συστατικών του προϊόντος (**διαλύματα placebo**) στα οποία έχουν προστεθεί (spiking) γνωστές ποσότητες της προς προσδιορισμό ουσίας (γνωστή τιμή αναφοράς μ για κάθε spiked διάλυμα). Για κάθε διάλυμα υπολογίζεται η % ανάκτηση και το σφάλμα μέτρησης. Εάν η περιοχή είναι ευρεία μπορεί να κατασκευαστεί το διάγραμμα x_i προς μ_i . Η τομή της ευθείας (a) είναι μέτρο του συστηματικού σταθερού σφάλματος, η ποσότητα $(b - 1) * 100$ είναι μέτρο του συστηματικού αναλογικού σφάλματος και το μέγεθος $S_{y/x}$, όπως έχουμε αναφέρει ξανά (βλ. εδάφιο 5.3.4.1), είναι μέτρο του τυχαίου σφάλματος.

Εναλλακτικά, μπορεί να αναλυθεί (αν υπάρχει) ένα Υλικό Αναφοράς (RM) ή ακόμη καλύτερα ένα Πρότυπο Υλικό Αναφοράς (CRM) με αναγραφόμενη τιμή αναφοράς (μ) και αβεβαιότητας (π.χ. $x \pm y$ ng/g), και να γίνει έλεγχος με t-test για ύπαρξη ή όχι **στατιστικά σημαντικής διαφοράς** μεταξύ της τιμής μ του CRM και της X_{mean} από μια σειρά πειραματικών μετρήσεων. Η απόδειξη της **στατιστικής ισοδυναμίας** θα αφορά ένα συγκεκριμένο διάστημα εμπιστοσύνης (συνήθως 95%). Εκτιμάται η ακρίβεια ($X_i - \mu$) και η ορθότητα ($X_{\text{mean}} - \mu$).

Αν είναι αδύνατη η παρασκευή placebo διαλυμάτων ή η αγορά ενός CRM, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί **προσθήκη γνωστών ποσοτήτων** (ΔC) του αναλύτη **σε προϊόν** (πραγματικό δείγμα) γνωστής και μικρής συγκέντρωσης (C_0) και να γίνουν πειράματα % ανάκτησης. Ο τύπος υπολογισμού της ανάκτησης διαφέρει από τον παραπάνω και εμπεριέχει τους όρους και C_0 , ΔC και C_{spiked} . Οι εμβολιασμοί συνήθως γίνονται σε διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης και η % ανάκτηση υπολογίζεται για κάθε ένα από αυτά. Η ποσότητα ΔC επιλέγεται προσεκτικά ώστε να μην είναι υπερβολικά υψηλή ή χαμηλή. Κατά προσέγγιση, θα πρέπει το σήμα της μεθόδου να διπλασιαστεί και η προκύπτουσα C_{spiked} να εμπίπτει εντός της γραμμικής περιοχής η οποία καθορίστηκε στον έλεγχο γραμμικότητας.

Τέλος, μπορεί να γίνει **σύγκριση** των αποτελεσμάτων (t-test) της αξιολογούμενης μεθόδου με αυτά που λαμβάνονται από μια δεύτερη, αξιόπιστη ή/και καλώς χαρακτηρισμένη (επικυρωμένη) ανεξάρτητη μέθοδο. Η ακρίβεια της μεθόδου αυτής πρέπει να είναι καθορισμένη και να αναφέρεται. Η απόδειξη της **στατιστικής ισοδυναμίας** για τη μέση τιμή των μετρήσεων από κάθε μέθοδο (X_{mean}), θα αφορά ένα συγκεκριμένο διάστημα εμπιστοσύνης (συνήθως 95%). Για παράδειγμα, η μέθοδος Kjeldahl για τον προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης (ολικού αζώτου) αποτελεί μια παγκόσμια μέθοδο αναφοράς.

5.3.5.2 Αποτελέσματα

Η διαδικασία της επικύρωσης για τη μέθοδο της εργασίας αυτής βασίστηκε στην 1^η επιλογή, η οποία παρουσιάστηκε μεταξύ των διαφόρων άλλων επιλογών στο παραπάνω εδάφιο 5.3.5.1. Γενικά, στη φαρμακευτική ανάλυση συχνά προτιμάται η παρασκευή συνθετικών μειγμάτων των συστατικών ενός προϊόντος (διαλύματα placebo). Αυτό συμβαίνει διότι η σύσταση του μητρικού υλικού (matrix) είναι καθορισμένη με μεγάλη ακρίβεια (έκδοχα, χρωστικές κλπ) σε σύγκριση με άλλα αναλυτικά πεδία. Ακολούθως, ο εμβολιασμός (spiking) με αυστηρά υπολογισμένες ποσότητες της καθαρής ουσίας ενδιαφέροντος θα οδηγήσει στη παρασκευή μιας σειράς από ενισχυμένα (spiked) διαλύματα στα επιθυμητά επίπεδα συγκεντρώσεων.

Ένας **γενικός κανόνας** για τα πειραματικά πρωτόκολλα της ακρίβειας είναι ότι αυτή πρέπει να ελέγχεται σε τουλάχιστον **3 επίπεδα** συγκεντρώσεων, τα οποία φυσικά θα καλύπτουν την αναμενόμενη περιοχή εργασίας. Για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης παρασκευάζονται συνήθως **3 ανεξάρτητα** διαλύματα εργασίας και πραγματοποιείται μία πλήρης εφαρμογή της μεθόδου (1 προσδιορισμός) σε κάθε διάλυμα, δηλαδή συνολικά $3 * 3 = 9$ προσδιορισμοί. Κάποια άλλα πρωτόκολλα υποδεικνύουν μια σειρά περισσότερων επιπέδων συγκεντρώσεων του αναλύτη, π.χ. 5 διαφορετικά επίπεδα τα οποία είναι κατανομημένα περίπου ομοιόμορφα και καλύπτουν προσεγγιστικά το 50-150% της αναμενόμενης περιοχής εργασίας στις αναλύσεις ρουτίνας (αναλύσεις δειγμάτων). Θυμίζουμε ότι ο τελευταίος σχεδιασμός υιοθετήθηκε κατά τη μελέτη γραμμικότητας (παράγραφος 5.3.4) με χρήση προτύπων διαλυμάτων καθαρής ουσίας. Ωστόσο, στη μελέτη της ακρίβειας, είναι

απαραίτητη η χρήση εμβολιασμένων διαλυμάτων placebo ή η χρήση εμβολιασμένων πραγματικών δειγμάτων ή η χρήση υλικών αναφοράς (RM ή CRM) γνωστής ή γενικά αποδεκτής σύνθεσης.

Σημείωση: Αν ο έλεγχος της ακρίβειας γίνει παράλληλα με τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου (βλ. εδάφιο 5.3.6.1), τότε πρέπει να πραγματοποιηθούν τουλάχιστον 6 προσδιορισμοί (6 ανεξάρτητα διαλύματα → 6 αναλύσεις) ανά επίπεδο συγκέντρωσης. Ανάλογα με το πειραματικό πρωτόκολλο που έχει επιλεγεί, η **παρουσίαση της ακρίβειας** γίνεται με συγκεκριμένο τρόπο. Συνήθως αναφέρεται ως % ανάκτηση (Recovery) της γνωστής ποσότητας του αναλύτη που προστέθηκε στο δείγμα. Επίσης, μπορεί να παρουσιαστεί με τη διαφορά (X_{mean} πειραματικό - μ) ή τη διαφορά (X_{mean} πειραματικό - X_{mean} από μια άλλη μέθοδο αναφοράς).

Αν βασιζόμαστε σε *spiked* διαλύματα, τότε, σε ό,τι αφορά τη φαρμακευτική ανάλυση, είθιστε ο έλεγχος να σχεδιάζεται σε ένα εύρος 50-150% της αναγραφόμενης τιμής για μια δραστική και σε ένα εύρος LOQ-3 *νομοθετικό όριο για μια πρόσμιξη.

Στον συγκεκριμένο προσδιορισμό, παρασκευάστηκε μια σειρά από 9 ανεξάρτητα εμβολιασμένα διαλύματα εργασίας placebo τα οποία κάλυπταν **ανά 3** το εύρος 75-125% της συγκέντρωσης εργασίας και ένα πρότυπο διάλυμα εργασίας το οποίο αντιστοιχούσε στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας. Η **συγκέντρωση εργασίας** που επιλέχθηκε (**επίπεδο 100%**) είναι $C_{B,C} = 50,0$ $\mu\text{g/mL}$ και $C_{B,A} = 100$ $\mu\text{g/mL}$ (όμοια με το πειραματικό πρωτόκολλο της μεθόδου σε επίπεδο ρουτίνας, παράγραφο 5.3.1). Σε κάθε διάλυμα placebo, πραγματοποιήθηκε μία πλήρης εφαρμογή της μεθόδου (1 προσδιορισμός), δηλαδή συνολικά 3 επίπεδα * 3 προσδιορισμοί = 9 προσδιορισμοί. Στο πρότυπο διάλυμα εργασίας (WST), πραγματοποιήθηκαν 6 μετρήσεις (6 runs, δηλαδή 5 επαναλήψεις). Για κάθε δείγμα υπολογίστηκε ο μέσος όρος (mean), η τυπική απόκλιση (SD) και η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) της αναλυτικής παραμέτρου (εμβαστό, %R). Η περιοχή εργασίας δεν είναι ευρεία, ως εκ τούτου δεν μπορεί να κατασκευαστεί το διάγραμμα x_i προς μ_i . Η % ανάκτηση υπολογίζεται από τη σχέση

$$\% \text{ ανάκτηση} = \frac{A_{\text{spiked}}}{A_{\text{std}}} * \frac{C_{\text{std}}}{C_{\text{spiked}}} * 100\% \quad (17)$$

, όπου A_{spiked} είναι το εμβαστό της κορυφής του αναλύτη από τη μέτρηση του **εκάστοτε** placebo διαλύματος εργασίας εμβολιασμένου (spiked) με καθαρή ουσία placebo

A_{std} είναι ο **μέσος όρος** για το εμβαστό της κορυφής του αναλύτη από τις 6 μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο πρότυπο διάλυμα εργασίας (WST)

C_{std} είναι η συγκέντρωση σε $\mu\text{g}/\text{mL}$ του προτύπου διαλύματος εργασίας (WST)
 C_{spiked} είναι η **θεωρητική** συγκέντρωση σε $\mu\text{g}/\text{mL}$ του εκάστοτε διαλύματος εργασίας του δείγματος

Σημείωση: Όλοι οι υπολογισμοί και τα αποτελέσματα αναγράφονται στο φύλλο επεξεργασίας και τεκμηρίωσης των δεδομένων. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το λογισμικό Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA).

Πειραματικό πρωτόκολλο:

- Παρασκευάστηκε ένα **πρότυπο διάλυμα εργασίας** με αραιώση του προτύπου διαλύματος παρακαταθήκης (Stock Standard Solution, SST), συγκέντρωσης $C_{B.C.} = 250 \mu\text{g}/\text{mL}$ και $C_{B.A.} = 500 \mu\text{g}/\text{mL}$, το οποίο είχε παρασκευαστεί για τις ανάγκες της μελέτης της γραμμικότητας (5.3.4.2):
 - 4 mL αραιώθηκαν σε $V_{\text{τελ}} = 20 \text{ mL diluent}^*$
* *diluent* = κινητή φάση = 1:1 MeOH/άλας 50 mM-pH=3±0,1
 - Έτσι, η τελική συγκέντρωση ήταν $C_{B.C.} = 50,0 \mu\text{g}/\text{mL}$ και $C_{B.A.} = 100 \mu\text{g}/\text{mL}$.

- Από το παραπάνω συμπυκνωμένο πρότυπο διάλυμα (SST) και από το συνθετικό μείγμα (διάλυμα) των συστατικών (placebo διάλυμα) το οποίο παρασκευάστηκε για τη μελέτη της ειδικότητας (ενότητα 4.2), παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις **9 διαλύματα εργασίας του δείγματος**, δηλαδή **9 placebo ενισχυμένα (spiked) με καθαρές ουσίες** (B.C., B.A.). Τα διαλύματα αυτά κάλυπταν ανά 3 το εύρος 75-125% της συγκέντρωσης εργασίας:
 - 3 mL STOCK και 1 mL placebo αραιώθηκαν σε $V_{\text{τελ}} = 20 \text{ mL diluent}^*$ (επίπεδο 75%)
 - Παρασκευή 2 ακόμη όμοιων διαλυμάτων

 - 4 mL STOCK και 1 mL placebo αραιώθηκαν σε $V_{\text{τελ}} = 20 \text{ mL diluent}^*$ (επ. 100%)
 - Παρασκευή 2 ακόμη όμοιων διαλυμάτων

 - 5 mL STOCK και 1 mL placebo αραιώθηκαν σε $V_{\text{τελ}} = 20 \text{ mL diluent}^*$ (επ. 125%)
 - Παρασκευή 2 ακόμη όμοιων διαλυμάτων

- Έτσι, οι τελικές συγκεντρώσεις ήταν $C_{B.C.} = 37,5-50,0-62,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ και $C_{B.A.} = 75,0-100-125 \mu\text{g}/\text{mL}$.
* *diluent* = κινητή φάση = 1:1 MeOH/άλας 50 mM-pH=3±0,1

Σημείωση: Όπως και στη μελέτη της γραμμικότητας (5.3.4.2), έτσι και εδώ, δε χρησιμοποιήθηκε κάποιο από τα 3 συμπυκνωμένα διαλύματα παρακαταθήκης (SSTs) τα οποία παρασκευάστηκαν στη μελέτη σταθερότητας (5.3.2.1). Ο λόγος είναι ότι η συγκέντρωσή τους δεν εξυπηρετούσε στην επίτευξη των επιθυμητών αραιώσεων. Για πρακτικούς λόγους και για λόγους ακρίβειας, επιδιώκεται ο τελικός όγκος αραιώσης να είναι ο ίδιος για κάθε πρότυπο εργασίας (π.χ. $V_{\text{τελ}}=20 \text{ mL}$) και οι αρχικές ποσότητες που θα αραιωθούν να είναι ακέραιες τιμές (π.χ. 3, 4, 5 mL).

Κριτήρια αποδοχής:

- Συνίσταται η απαίτηση για **% μέση ανάκτηση** εντός του εύρους 98-102%, σε **κάθε** επίπεδο συγκέντρωσης
- Συνίσταται η απαίτηση για **% συνολική μέση ανάκτηση** εντός του εύρους 98-102% **μεταξύ** των τριών επιπέδων συγκέντρωσης
- Συνίσταται η απαίτηση για **% RSD** <1%, για την ανάκτηση σε **κάθε** επίπεδο συγκέντρωσης
- Συνίσταται η απαίτηση για **% συνολικό RSD** <1% για την ανάκτηση **μεταξύ** των τριών επιπέδων συγκέντρωσης

Τα παραπάνω κριτήρια αποδοχής αφορούν και τους δύο αναλύτες ενδιαφέροντος (B.C., B.A.).

Σημείωση: Τόσο η Αμερικανική όσο και η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία θέτουν όρια ανάκτησης 98-102% για τις μελέτες της ακρίβειας των ποσοτικών προσδιορισμών σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Για προϊόντα άνευ κανονισμών ελέγχου, είθισται να γίνεται αποδεκτή η ανάκτηση εντός του εύρους 90-110%. Από κάποιες πηγές προτείνεται ανεκτό σφάλμα ίσο με 4 φορές την τυπική απόκλιση. Σε κάθε περίπτωση, το εργαστήριο (ο αναλυτής) πρέπει να ενημερώνεται από έγκυρες πηγές (διεθνή βιβλιογραφία, εθνικοί φορείς, παγκόσμιοι φορείς, φαρμακοποιίες) για την αντίστοιχη νομοθεσία, τους κανονισμούς και τα καθορισμένα (ή τα συνιστώμενα) κριτήρια αποδοχής ανά επιστημονικό πεδίο (φάρμακα, τρόφιμα, φυτοφάρμακα κλπ).

Μετά την εφαρμογή του πειραματικού πρωτοκόλλου το οποίο σχεδιάστηκε και παρουσιάστηκε παραπάνω, λαμβάνονται τα αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα και καταρτίζονται οι σχετικοί πίνακες για τους δύο αναλύτες.

Τα παρακάτω μαθηματικά και γραφικά δεδομένα για τους αναλύτες ενδιαφέροντος (B.C, B.A.), **αποδεικνύουν** ότι η εξεταζόμενη μέθοδος πληροί τα κριτήρια αποδοχής και **τεκμηριώνουν** ικανοποιητική ακρίβεια.

Πίνακας 14: Μαθηματικά δεδομένα* από τις δοκιμές ορθότητας. Ο έλεγχος έγινε σε 3 επίπεδα συγκέντρωσης και παρασκευάστηκαν 3 διαλύματα ελέγχου για κάθε επίπεδο. Κάθε μέτρηση έδωσε μια τιμή για το εμβαδό μιας κορυφής και έτσι υπολογίστηκε η αντίστοιχη % ανάκτηση.
*Τα αποτελέσματα αφορούν την Κιτρική Βουταμιράτη

Επίπεδο 75% της C _{εργασίας} – Διαλύματα Spiked					
No Spiked	V _{STOCK} (mL)	V _{PLACEBO} (mL)	V _{τελ.} (mL)	Πρωτογενή δεδομένα (Εμβαδό)	Δευτερογενή δεδομένα (% Ανάκτηση)
1	3	1	20	112,96	100,09
2	3	1	20	114,23	101,21
3	3	1	20	113,66	100,71
Μέσος Όρος				113,62	100,67
SD				0,64	0,56
%RSD				0,56	0,56
Επίπεδο 100% της C _{εργασίας} – Διαλύματα Spiked					
1	4	1	20	149,89	99,61
2	4	1	20	150,46	99,98
3	4	1	20	151,45	100,64
Μέσος Όρος				150,60	100,08
SD				0,79	0,52
%RSD				0,52	0,52
Επίπεδο 125% της C _{εργασίας} – Διαλύματα Spiked					
1	5	1	20	187,99	99,94
2	5	1	20	187,27	99,56
3	5	1	20	187,81	99,85
Μέσος Όρος				187,69	99,78
SD				0,38	0,20
%RSD				0,20	0,20
Επίπεδο 100% της C _{εργασίας} – Πρότυπο διάλυμα					
Παρασκευή ενός (1) προτύπου	4	-	20	Εμβαδό	
				150,29	
Επανάληψη 1				150,53	
Επανάληψη 2				151,18	
Επανάληψη 3				150,30	
Επανάληψη 4				150,42	
Επανάληψη 5				150,19	
Μέσος Όρος				150,48	
SD				0,36	
%RSD				0,24	

Πίνακας 15: Η μέση ανάκτηση* από τα 3 διαλύματα εργασίας για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης και η συνολική μέση ανάκτηση από το σύνολο των 9 διαλυμάτων εργασίας για τα 3 επίπεδα συγκεντρώσεων. *Τα αποτελέσματα αφορούν την Κιτρική Βουταμράτη

Διαλύματα Spiked – Επίπεδο 75% της $C_{εργασίας}$ (37,5 $\mu\text{g/mL}$)		
No Spiked	% Ανάκτηση	% Μέση Ανάκτηση
1	100,09	100,67
2	101,21	
3	100,71	
Διαλύματα Spiked – Επίπεδο 100% της $C_{εργασίας}$ (50,0 $\mu\text{g/mL}$)		
1	99,61	100,08
2	99,98	
3	100,64	
Διαλύματα Spiked – Επίπεδο 125% της $C_{εργασίας}$ (62,5 $\mu\text{g/mL}$)		
1	99,94	99,78
2	99,56	
3	99,85	
% Συνολική Μέση Ανάκτηση		100,18
SD		0,56
%Συνολικό RSD		0,56

Πίνακας 16: Μαθηματικά δεδομένα* από τις δοκιμές ορθότητας. Ο έλεγχος έγινε σε 3 επίπεδα συγκέντρωσης και παρασκευάστηκαν 3 διαλύματα ελέγχου για κάθε επίπεδο. Κάθε μέτρηση έδωσε μια τιμή για το εμβαδό μιας κορυφής και έτσι υπολογίστηκε η αντίστοιχη % ανάκτηση.
*Τα αποτελέσματα αφορούν το Βενζοϊκό Οξύ

Επίπεδο 75% της C _{εργασίας} – Διαλύματα Spiked					
No Spiked	V _{STOCK} (mL)	V _{PLACEBO} (mL)	V _{τελ.} (mL)	Πρωτογενή δεδομένα (Εμβαδό)	Δευτερογενή δεδομένα (% Ανάκτηση)
1	3	1	20	426,4	100,71
2	3	1	20	431,1	101,82
3	3	1	20	429,3	101,41
Μέσος Όρος				428,9	101,31
SD				2,4	0,56
%RSD				0,56	0,56
Επίπεδο 100% της C _{εργασίας} – Διαλύματα Spiked					
1	4	1	20	565,7	100,21
2	4	1	20	565,7	100,21
3	4	1	20	568,5	100,71
Μέσος Όρος				566,6	100,38
SD				1,6	0,29
%RSD				0,29	0,29
Επίπεδο 125% της C _{εργασίας} – Διαλύματα Spiked					
1	5	1	20	705,7	100,00
2	5	1	20	703,8	99,74
3	5	1	20	702,9	99,63
Μέσος Όρος				704,2	99,79
SD				1,4	0,19
%RSD				0,19	0,19
Επίπεδο 100% της C _{εργασίας} – Πρότυπο διάλυμα					
Παρασκευή ενός (1) προτύπου	4	-	20	Εμβαδό	
Επανάληψη 1				563,61	
Επανάληψη 2				565,31	
Επανάληψη 3				564,68	
Επανάληψη 4				564,98	
Επανάληψη 5				564,21	
Μέσος Όρος				564,50	
SD				0,61	
%RSD				0,11	

Πίνακας 17: : Η μέση ανάκτηση* από τα 3 διαλύματα εργασίας για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης και η συνολική μέση ανάκτηση από το σύνολο των 9 διαλυμάτων εργασίας για τα 3 επίπεδα συγκεντρώσεων. *Τα αποτελέσματα αφορούν το Βενζοϊκό Οξύ

Διαλύματα Spiked – Επίπεδο 75% της C _{εργασίας} (75,0 µg/mL)		
No Spiked	% Ανάκτηση	% Μέση Ανάκτηση
1	100,71	101,31
2	101,82	
3	101,41	
Διαλύματα Spiked – Επίπεδο 100% της C _{εργασίας} (100 µg/mL)		
1	100,21	100,38
2	100,21	
3	100,71	
Διαλύματα Spiked – Επίπεδο 125% της C _{εργασίας} (125 µg/mL)		
1	100,00	99,79
2	99,74	
3	99,63	
% Συνολική Μέση Ανάκτηση		100,49
SD		0,74
%Συνολικό RSD		0,74

5.3.6 Πιστότητα⁶⁵

Η πιστότητα (**precision**) είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο χαρακτηριστικό ποιότητας (κριτήριο) μιας αναλυτικής μεθόδου. Πολλές φορές μάλιστα παρουσιάζεται ως το μοναδικό κριτήριο ποιότητας, κάτι το οποίο δεν είναι σωστό διότι θα πρέπει πάντοτε να συνοδεύεται από τα δεδομένα της ακρίβειας για μια δεδομένη μέθοδο. Όπως είδαμε αμέσως πιο πριν, η ακρίβεια (accuracy) αξιολογεί το **βαθμό συμφωνίας** μεταξύ της μετρούμενης παραμέτρου (π.χ. συγκέντρωση) και της αληθούς τιμής (true value). Η πιστότητα εκφράζει την **εγγύτητα της συμφωνίας** μεταξύ των **επαναλαμβανόμενων** αποτελεσμάτων της μεθόδου. Εναλλακτικά, η πιστότητα μπορεί να περιγραφεί ως η ποσότητα που μετρά (ποσοτικοποιεί) τη **διασπορά (dispersion)** των αποτελεσμάτων όταν το αναλυτικό πρωτόκολλο επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα.

Η διασπορά των αποτελεσμάτων προκαλείται από διάφορες **τυχαίες** πηγές και φυσιολογικά αναμένεται να εκτείνεται γύρω από την αναμενόμενη (και θεωρούμενη ως αληθή) τιμή (μ) του αποτελέσματος, εκτός αν υπάρχει κάποιο συστηματικό σφάλμα στη μέτρηση. Στην ανάλυση θεωρείται ότι η διασπορά είναι τέτοια ώστε να περιγράφεται ως μια τυχαία κατανομή κατά Gauss. Η κατανομή αυτού του είδους χρησιμοποιείται επίσης για τη περιγραφή των χρωματογραφικών ζωνών και τον αντίκτυπό τους στο σχήμα μιας κορυφής. Στην πράξη γίνονται περιορισμένες μετρήσεις και υπολογίζεται ο μέσος όρος (mean), η τυπική απόκλιση (SD) και η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) της αναλυτικής παραμέτρου.

Ανάλογα με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες διενεργείται ο έλεγχος της πιστότητας, διακρίνουμε κάποια **υποσύνολα** του εν λόγω κριτηρίου ποιότητας. Κάθε υποσύνολο περιγράφει μια ξεχωριστή διεργασία, ωστόσο συχνά δημιουργείται μια σύγχυση στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τις ισχύουσες ορολογίες. Έτσι λοιπόν συναντάμε την επαναληψιμότητα (**repeatability**) είτε για τη μέθοδο (method repeatability) είτε για το σύστημα/όργανο (system precision), και την αναπαραγωγιμότητα (**reproducibility**) η οποία δύναται να είναι είτε ενδοεργαστηριακή (ενδιάμεση πιστότητα, intermediate precision) είτε διεργαστηριακή.

5.3.6.1 Επαναληψιμότητα μεθόδου (method repeatability)

Ως επαναληψιμότητα ορίζεται το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων από **διαδοχικούς ελέγχους** στο **ίδιο δείγμα**, οι οποίοι εκτελούνται κάτω από αυστηρά **ίδιες συνθήκες** (ίδια μέθοδος, ίδιος αναλυτής, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο, βραχύ χρονικό διάστημα, ίδια στήλη, ίδια batch numbers αντιδραστηρίων). Η απαίτηση για βραχύ χρονικό διάστημα ουσιαστικά αφορά το χρονικό διάστημα μίας (1) εργαστηριακής ημέρας.

Σημείωση: Η επαναληψιμότητα της μεθόδου αφορά τη διασπορά μιας σειράς μετρήσεων στο **ίδιο** δείγμα, αλλά σε **διαφορετικά** διαλύματα εργασίας του δείγματος αυτού. Δε θα πρέπει να συγχέεται με την επαναληψιμότητα μιας σειράς μετρήσεων στο **ίδιο** διάλυμα εργασίας ενός δείγματος, η οποία είναι η επαναληψιμότητα του συστήματος, δηλαδή του αναλυτικού οργάνου (*system precision*). Αναφέρεται (πλέον σπάνια) και ως *within run precision*.

Ένας **γενικός κανόνας** για τα **πειραματικά πρωτόκολλα** της επαναληψιμότητας της μεθόδου είναι ότι αυτή πρέπει να ελέγχεται σε τουλάχιστον **3 επίπεδα συγκεντρώσεων**, τα οποία φυσικά θα καλύπτουν την αναμενόμενη περιοχή εργασίας. Για κάθε επίπεδο ετοιμάζονται συνήθως **3 διαλύματα** (σύνολο 9 προσδιορισμοί). Εναλλακτικά, αντί ο έλεγχος να γίνει σε πολλά επίπεδα συγκεντρώσεων, μπορούν να πραγματοποιηθούν τουλάχιστον **6 προσδιορισμοί** στο 100% της συγκέντρωσης ελέγχου (η συγκέντρωση εργασίας που έχει επιλεγεί).

Η τακτική αυτή εφαρμόστηκε και στο συγκεκριμένο προσδιορισμό. Παρασκευάστηκε μια σειρά από 6 ανεξάρτητα εμβολιασμένα (spiked) διαλύματα εργασίας placebo στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας και ένα πρότυπο διάλυμα εργασίας το οποίο αντιστοιχούσε επίσης στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας. Η **συγκέντρωση εργασίας** που επιλέχθηκε (**επίπεδο 100%**) είναι $C_{B.C.} = 50,0$ $\mu\text{g/mL}$ και $C_{B.A.} = 100$ $\mu\text{g/mL}$ (όμοια με το πειραματικό πρωτόκολλο της μεθόδου σε επίπεδο ρουτίνας, βλ. παράγραφο 5.3.1).

Σε κάθε διάλυμα εργασίας του δείγματος (εμβολιασμένο placebo), πραγματοποιήθηκε μία πλήρης εφαρμογή της μεθόδου (1 προσδιορισμός), δηλαδή συνολικά 1 επίπεδο * 6 προσδιορισμοί = 6 προσδιορισμοί. Στο πρότυπο διάλυμα εργασίας (WST), πραγματοποιήθηκαν 6 μετρήσεις (6 runs, δηλαδή 5 επαναλήψεις). Για κάθε δείγμα υπολογίστηκε ο μέσος όρος (mean), η τυπική απόκλιση (SD) και η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) της αναλυτικής παραμέτρου (εμβασμό, %R).

Σημείωση: Όλοι οι υπολογισμοί και τα αποτελέσματα αναγράφονται στο φύλλο επεξεργασίας και τεκμηρίωσης των δεδομένων. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το λογισμικό Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA).

Γενικότερα, στις μελέτες επαναληψιμότητας μια μεθόδου παρασκευάζονται αντιπροσωπευτικά συνθετικά διαλύματα εργασίας, χρησιμοποιώντας το **μητρικό υλικό** στο οποίο θα εφαρμοστεί η μέθοδος. Τα διαλύματα αυτά εμβολιάζονται με τους αναλύτες σε καθορισμένες συγκεντρώσεις. Αν επιλεγεί ένα (1) επίπεδο συγκέντρωσης, τότε χρησιμοποιείται η μεσαία συγκέντρωση της περιοχής εργασίας. Τα **κριτήρια αποδοχής** πρέπει να αφορούν ρεαλιστικές τιμές $\%RSD_r$ βασισμένες στις ανάγκες της μεθόδου ή/και σε κανονισμούς ή/και σε ειδικούς πίνακες ανάλογα με τη περιοχή συγκεντρώσεων. Κατά κανόνα, για ένα σκεύασμα με όρια ανάκτησης 105-95% από τη Φαρμακοποιία, προτείνεται μέγιστη $\%RSD_r = (105-95)/6 * SD$. Συνήθως απαιτείται $\%RSD_r < 2\%$.

Πειραματικό πρωτόκολλο:

- Ένα από τα 3 διαφορετικά πρότυπα (συμπυκνωμένα) διαλύματα παρακαταθήκης (Stock Standard Solutions, SSTs) τα οποία παρασκευάστηκαν στη μελέτη σταθερότητας (βλ. 5.3.2.1), χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή, με αραιώση, ενός **πρότυπου διαλύματος εργασίας** (Working Standard Solution, WST), ως εξής:

- 2 mL αραιώθηκαν σε $V_{\text{τελ}}=20$ mL diluent*
*diluent=κινητή φάση=1:1 MeOH/άλας 50 mM-pH=3±0,1

Οι τελικές συγκεντρώσεις ήταν **C_{B.C.} = 50,0 µg/mL** και **C_{B.A.} = 100 µg/mL**.

- Από το παραπάνω συμπυκνωμένο πρότυπο διάλυμα (SST) και από το συνθετικό μείγμα (διάλυμα) των συστατικών (placebo διάλυμα) το οποίο παρασκευάστηκε για τη μελέτη της ειδικότητας (ενότητα 4.2), παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις **6 διαλύματα εργασίας του δείγματος**, δηλαδή **6 placebo ενισχυμένα (spiked) με καθαρές ουσίες** (B.C., B.A.). Τα διαλύματα αυτά αντιστοιχούσαν στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας:

- 2 mL STOCK και 1 mL placebo αραιώθηκαν σε $V_{\text{τελ}}=20$ mL diluent*
Παρασκευάστηκαν 5 ακόμη όμοια διαλύματα
*diluent=κινητή φάση=1:1 MeOH/άλας 50 mM-pH=3±0,1

Κριτήρια αποδοχής:

- Συνίσταται η απαίτηση για **% RSD_r <2 %**, για τις τιμές της ανάκτησης στο σύνολο των 6 διαφορετικών διαλυμάτων εργασίας κάθε εργαστηριακής ημέρας
* RSD_r = RSD σε συνθήκες επαναληψιμότητας

Τα παραπάνω κριτήρια αποδοχής αφορούν και τους δύο αναλύτες ενδιαφέροντος (B.C., B.A.). Σχετίζονται μόνο με την %RSD και όχι με το εύρος της % μέσης ανάκτησης, όπως στον της έλεγχο της ακρίβειας. Ωστόσο, είναι δυνατόν οι έλεγχοι ακρίβειας και επαναληψιμότητας να διενεργηθούν ταυτόχρονα. Στη περίπτωση αυτή, πρέπει να γίνουν τουλάχιστον 6 προσδιορισμοί ανά επίπεδο συγκέντρωσης για το πρωτόκολλο της ακρίβειας.

Οι επόμενοι 6 πίνακες αφορούν ανά 2 (B.C και B.A.) τις μελέτες επαναληψιμότητας της μεθόδου κατά τη **1^η**, τη **2^η** και τη **3^η εργαστηριακή ημέρα**, αντίστοιχα. Τα δεδομένα όλων των ημερών συλλέγονται και εξετάζονται για την εκτίμηση της **ενδιάμεσης πιστότητας**, I.P. (βλ. εδάφιο 5.3.6.3).

Πίνακας 18: Μαθηματικά δεδομένα* από τις μελέτες επαναληψιμότητας της μεθόδου** (method repeatability). Ο έλεγχος έγινε σε 1 επίπεδο συγκέντρωσης που αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας που έχει επιλεχθεί. Παρασκευάστηκε μια σειρά από 6 ανεξάρτητα διαλύματα εργασίας του δείγματος, δηλαδή 6 placebo ενισχυμένα (spiked) με καθαρές ουσίες (B.C., B.A.) και ένα πρότυπο διάλυμα εργασίας. Κάθε μέτρηση έδωσε μια τιμή για το εμβαδό*** μιας κορυφής και έτσι υπολογίστηκε η αντίστοιχη % ανάκτηση.

*Τα αποτελέσματα αφορούν την Κιτρική Βουταμιράτη ** 1^η Εργαστηριακή ημέρα *** mAU

Επίπεδο 100% της C _{εργασίας} – Διαλύματα Spiked					
No Spiked	V _{STOCK} (mL)	V _{PLACEBO} (mL)	V _{τελ.} (mL)	Πρωτογενή δεδομένα (Εμβαδό)	Δευτερογενή δεδομένα (% Ανάκτηση)
1	2	1	20	149,29	99,69
2	2	1	20	148,29	99,03
3	2	1	20	148,52	99,18
4	2	1	20	148,73	99,32
5	2	1	20	147,02	98,17
6	2	1	20	147,94	98,79
Μέσος Όρος				148,30	99,03
SD _r				0,77	0,52
%RSD_r				0,52	0,52
Επίπεδο 100% της C _{εργασίας} – Πρότυπο διάλυμα					
Παρασκευή ενός (1) προτύπου	2	-	20	Εμβαδό	
				149,81	
Επανάληψη 1				149,65	
Επανάληψη 2				149,72	
Επανάληψη 3				149,74	
Επανάληψη 4				149,60	
Επανάληψη 5				149,96	
Μέσος Όρος				149,75	
SD				0,13	
%RSD				0,085	

Σημειώνεται ότι μετά τη συλλογή των **πρωτογενών δεδομένων** (εμβαδά) και πριν από τον υπολογισμό της % ανάκτησης ανά περίπτωση, έγινε έλεγχος της δυνατότητας απόρριψης των ακραίων τιμών (**κριτήριο Q**). Η δοκιμασία αυτή δεν κατέδειξε κάποια έκτροπη τιμή (outlier) και έτσι η %RSD_r υπολογίστηκε από το σύνολο των τιμών της % ανάκτησης.

Παρατηρούμε ότι ικανοποιείται η απαίτηση για %RSD_r < 2 %, για τις τιμές της ανάκτησης στο σύνολο των 6 διαλυμάτων εργασίας.

Πίνακας 19: Μαθηματικά δεδομένα* από τις μελέτες επαναληψιμότητας της μεθόδου** (method repeatability). Ο έλεγχος έγινε σε 1 επίπεδο συγκέντρωσης που αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας που έχει επιλεγεί. Παρασκευάστηκε μια σειρά από 6 ανεξάρτητα διαλύματα εργασίας του δείγματος, δηλαδή 6 placebo ενισχυμένα (spiked) με καθαρές ουσίες (B.C., B.A.) και ένα πρότυπο διάλυμα εργασίας. Κάθε μέτρηση έδωσε μια τιμή για το εμβαδό*** μιας κορυφής και έτσι υπολογίστηκε η αντίστοιχη % ανάκτηση.

*Τα αποτελέσματα αφορούν το Βενζοϊκό Οξύ ** 1^η Εργαστηριακή ημέρα *** mAU

Επίπεδο 100% της C _{εργασίας} – Διαλύματα Spiked					
No Spiked	V _{STOCK} (mL)	V _{PLACEBO} (mL)	V _{τελ.} (mL)	Πρωτογενή δεδομένα (Εμβαδό)	Δευτερογενή δεδομένα (% Ανάκτηση)
1	2	1	20	569,4	99,67
2	2	1	20	568,1	99,46
3	2	1	20	567,5	99,35
4	2	1	20	569,5	99,70
5	2	1	20	565,9	99,07
6	2	1	20	566,9	99,24
Μέσος Όρος				567,9	99,42
SD _r				1,4	0,25
%RSD_r				0,25	0,25
Επίπεδο 100% της C _{εργασίας} – Πρότυπο διάλυμα					
Παρασκευή ενός (1) προτύπου	2	-	20	Εμβαδό	
				571,48	
Επανάληψη 1				571,98	
Επανάληψη 2				570,26	
Επανάληψη 3				571,82	
Επανάληψη 4				571,68	
Επανάληψη 5				570,29	
Μέσος Όρος				571,25	
SD				0,77	
%RSD				0,14	

Σημειώνεται ότι μετά τη συλλογή των **πρωτογενών δεδομένων** (εμβαδά) και πριν από τον υπολογισμό της % ανάκτησης ανά περίπτωση, έγινε έλεγχος της δυνατότητας απόρριψης των ακραίων τιμών (**κριτήριο Q**). Η δοκιμασία αυτή δεν κατέδειξε κάποια έκτροπη τιμή (outlier) και έτσι η %RSD_r υπολογίστηκε από το σύνολο των τιμών της % ανάκτησης.

Παρατηρούμε ότι ικανοποιείται η απαίτηση για %RSD_r < 2 %, για τις τιμές της ανάκτησης στο σύνολο των 6 διαλυμάτων εργασίας.

Πίνακας 20 Μαθηματικά δεδομένα* από τις μελέτες επαναληψιμότητας της μεθόδου** (method repeatability). Ο έλεγχος έγινε σε 1 επίπεδο συγκέντρωσης που αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας που έχει επιλεχθεί. Παρασκευάστηκε μια σειρά από 6 ανεξάρτητα διαλύματα εργασίας του δείγματος, δηλαδή 6 placebo ενισχυμένα (spiked) με καθαρές ουσίες (B.C., B.A.) και ένα πρότυπο διάλυμα εργασίας. Κάθε μέτρηση έδωσε μια τιμή για το εμβαδό*** μιας κορυφής και έτσι υπολογίστηκε η αντίστοιχη % ανάκτηση.

*Τα αποτελέσματα αφορούν την Κιτρική Βουταμιράτη ** 2^η Εργαστηριακή ημέρα *** mV

Επίπεδο 100% της C _{εργασίας} – Διαλύματα Spiked					
No Spiked	V _{STOCK} (mL)	V _{PLACEBO} (mL)	V _{τελ.} (mL)	Πρωτογενή δεδομένα (Εμβαδό)	Δευτερογενή δεδομένα (% Ανάκτηση)
1	2	1	20	116,76	101,62
2	2	1	20	116,90	101,75
3	2	1	20	116,09	101,05
4	2	1	20	116,17	101,11
5	2	1	20	116,13	101,08
6	2	1	20	116,57	101,46
Μέσος Όρος				116,44	101,35
SD _r				0,35	0,30
%RSD_r				0,30	0,30
Επίπεδο 100% της C _{εργασίας} – Πρότυπο διάλυμα					
Παρασκευή ενός (1) προτύπου	2	-	20	Εμβαδό	
				115,61	
Επανάληψη 1				114,73	
Επανάληψη 2				114,93	
Επανάληψη 3				114,97	
Επανάληψη 4				114,51	
Επανάληψη 5				114,61	
Μέσος Όρος				114,89	
SD				0,39	
%RSD				0,34	

Σημειώνεται ότι μετά τη συλλογή των **πρωτογενών δεδομένων** (εμβαδά) και πριν από τον υπολογισμό της % ανάκτησης ανά περίπτωση, έγινε έλεγχος της δυνατότητας απόρριψης των ακραίων τιμών (**κριτήριο Q**). Η δοκιμασία αυτή δεν κατέδειξε κάποια έκτροπη τιμή (outlier) και έτσι η %RSD_r υπολογίστηκε από το σύνολο των τιμών της % ανάκτησης.

Παρατηρούμε ότι ικανοποιείται η απαίτηση για %RSD_r < 2 %, για τις τιμές της ανάκτησης στο σύνολο των 6 διαλυμάτων εργασίας.

Πίνακας 21: Μαθηματικά δεδομένα* από τις μελέτες επαναληψιμότητας της μεθόδου** (method repeatability). Ο έλεγχος έγινε σε 1 επίπεδο συγκέντρωσης που αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας που έχει επιλεχθεί. Παρασκευάστηκε μια σειρά από 6 ανεξάρτητα διαλύματα εργασίας του δείγματος, δηλαδή 6 placebo ενισχυμένα (spiked) με καθαρές ουσίες (B.C., B.A.) και ένα πρότυπο διάλυμα εργασίας. Κάθε μέτρηση έδωσε μια τιμή για το εμβαδό*** μιας κορυφής και έτσι υπολογίστηκε η αντίστοιχη % ανάκτηση.

*Τα αποτελέσματα αφορούν το Βενζοϊκό Οξύ ** 2^η Εργαστηριακή ημέρα *** mV

Επίπεδο 100% της C _{εργασίας} – Διαλύματα Spiked					
No Spiked	V _{STOCK} (mL)	V _{PLACEBO} (mL)	V _{τελ.} (mL)	Πρωτογενή δεδομένα (Εμβαδό)	Δευτερογενή δεδομένα (% Ανάκτηση)
1	2	1	20	636,0	100,32
2	2	1	20	635,8	100,28
3	2	1	20	633,7	99,95
4	2	1	20	632,8	99,81
5	2	1	20	634,3	100,04
6	2	1	20	638,2	100,66
Μέσος Όρος				635,1	100,18
SD _r				1,9	0,30
%RSD_r				0,30	0,30
Επίπεδο 100% της C _{εργασίας} – Πρότυπο διάλυμα					
Παρασκευή ενός (1) προτύπου	2	-	20	Εμβαδό	
				635,9	
Επανάληψη 1				632,8	
Επανάληψη 2				634,5	
Επανάληψη 3				634,0	
Επανάληψη 4				632,9	
Επανάληψη 5				633,9	
Μέσος Όρος				634,0	
SD				1,1	
%RSD				0,18	

Σημειώνεται ότι μετά τη συλλογή των **πρωτογενών δεδομένων** (εμβαδά) και πριν από τον υπολογισμό της % ανάκτησης ανά περίπτωση, έγινε έλεγχος της δυνατότητας απόρριψης των ακραίων τιμών (**κριτήριο Q**). Η δοκιμασία αυτή δεν κατέδειξε κάποια έκτροπη τιμή (outlier) και έτσι η %RSD_r υπολογίστηκε από το σύνολο των τιμών της % ανάκτησης.

Παρατηρούμε ότι ικανοποιείται η απαίτηση για %RSD_r < 2 %, για τις τιμές της ανάκτησης στο σύνολο των 6 διαλυμάτων εργασίας.

Πίνακας 22: Μαθηματικά δεδομένα* από τις μελέτες επαναληψιμότητας της μεθόδου** (method repeatability). Ο έλεγχος έγινε σε 1 επίπεδο συγκέντρωσης που αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας που έχει επιλεγθεί. Παρασκευάστηκε μια σειρά από 6 ανεξάρτητα διαλύματα εργασίας του δείγματος, δηλαδή 6 placebo ενισχυμένα (spiked) με καθαρές ουσίες (B.C., B.A.) και ένα πρότυπο διάλυμα εργασίας. Κάθε μέτρηση έδωσε μια τιμή για το εμβαδό*** μιας κορυφής και έτσι υπολογίστηκε η αντίστοιχη % ανάκτηση.

*Τα αποτελέσματα αφορούν την Κιτρική Βουταμιράτη ** 3^η Εργαστηριακή ημέρα *** mAU

Επίπεδο 100% της C _{εργασίας} – Διαλύματα Spiked					
No Spiked	V _{STOCK} (mL)	V _{PLACEBO} (mL)	V _{τελ.} (mL)	Πρωτογενή δεδομένα (Εμβαδό)	Δευτερογενή δεδομένα (% Ανάκτηση)
1	2	1	20	149,03	100,17
2	2	1	20	149,51	100,49
3	2	1	20	149,84	100,72
4	2	1	20	149,96	100,79
5	2	1	20	149,47	100,46
6	2	1	20	149,50	100,48
Μέσος Όρος				149,55	100,52
SD _r				0,33	0,22
%RSD_r				0,22	0,22
Επίπεδο 100% της C _{εργασίας} – Πρότυπο διάλυμα					
Παρασκευή ενός (1) προτύπου	2	-	20	Εμβαδό	
				148,83	
Επανάληψη 1				148,62	
Επανάληψη 2				148,85	
Επανάληψη 3				148,79	
Επανάληψη 4				148,67	
Επανάληψη 5				148,92	
Μέσος Όρος				148,78	
SD				0,11	
%RSD				0,076	

Σημειώνεται ότι μετά τη συλλογή των **πρωτογενών δεδομένων** (εμβαδά) και πριν από τον υπολογισμό της % ανάκτησης ανά περίπτωση, έγινε έλεγχος της δυνατότητας απόρριψης των ακραίων τιμών (**κριτήριο Q**). Η δοκιμασία αυτή δεν κατέδειξε κάποια έκτροπη τιμή (outlier) και έτσι η %RSD_r υπολογίστηκε από το σύνολο των τιμών της % ανάκτησης.

Παρατηρούμε ότι ικανοποιείται η απαίτηση για %RSD_r < 2 %, για τις τιμές της ανάκτησης στο σύνολο των 6 διαλυμάτων εργασίας.

Πίνακας 23: Μαθηματικά δεδομένα* από τις μελέτες επαναληψιμότητας της μεθόδου** (method repeatability). Ο έλεγχος έγινε σε 1 επίπεδο συγκέντρωσης που αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας που έχει επιλεγθεί. Παρασκευάστηκε μια σειρά από 6 ανεξάρτητα διαλύματα εργασίας του δείγματος, δηλαδή 6 placebo ενισχυμένα (spiked) με καθαρές ουσίες (B.C., B.A.) και ένα πρότυπο διάλυμα εργασίας. Κάθε μέτρηση έδωσε μια τιμή για το εμβαδό*** μιας κορυφής και έτσι υπολογίστηκε η αντίστοιχη % ανάκτηση.

*Τα αποτελέσματα αφορούν το Βενζοϊκό οξύ ** 3^η Εργαστηριακή ημέρα *** mAU

Επίπεδο 100% της C _{εργασίας} – Διαλύματα Spiked					
No Spiked	V _{STOCK} (mL)	V _{PLACEBO} (mL)	V _{τελ.} (mL)	Πρωτογενή δεδομένα (Εμβαδό)	Δευτερογενή δεδομένα (% Ανάκτηση)
1	2	1	20	569,4	100,35
2	2	1	20	569,8	100,43
3	2	1	20	572,8	100,95
4	2	1	20	573,0	100,99
5	2	1	20	570,2	100,50
6	2	1	20	571,4	100,71
Μέσος Όρος				571,1	100,65
SD _r				1,5	0,27
%RSD_r				0,27	0,27
Επίπεδο 100% της C _{εργασίας} – Πρότυπο διάλυμα					
Παρασκευή ενός (1) προτύπου	2	-	20	Εμβαδό	
				567,71	
Επανάληψη 1				566,75	
Επανάληψη 2				567,80	
Επανάληψη 3				566,84	
Επανάληψη 4				568,11	
Επανάληψη 5				567,17	
Μέσος Όρος				567,40	
SD				0,56	
%RSD				0,10	

Σημειώνεται ότι μετά τη συλλογή των **πρωτογενών δεδομένων** (εμβαδά) και πριν από τον υπολογισμό της % ανάκτησης ανά περίπτωση, έγινε έλεγχος της δυνατότητας απόρριψης των ακραίων τιμών (**κριτήριο Q**). Η δοκιμασία αυτή δεν κατέδειξε κάποια έκτροπη τιμή (outlier) και έτσι η %RSD_r υπολογίστηκε από το σύνολο των τιμών της % ανάκτησης.

Παρατηρούμε ότι ικανοποιείται η απαίτηση για %RSD_r < 2 %, για τις τιμές της ανάκτησης στο σύνολο των 6 διαλυμάτων εργασίας.

5.3.6.2 Επαναληψιμότητα συστήματος (system precision)

Η επαναληψιμότητα του συστήματος (system precision) αφορά μια σειρά μετρήσεων (τουλάχιστον 6 μετρήσεις, 5 επαναλήψεις) στο **ίδιο** διάλυμα εργασίας. Δεν αφορά τη μέθοδο αλλά την ακεραιότητα της πειραματικής διάταξης και γι' αυτό αναφέρεται και ως επαναληψιμότητα του οργάνου. Πολύ σπάνια αναφέρεται ως εντός προσδιορισμού επαναληψιμότητα (within run precision). Χρησιμοποιείται το διάλυμα εργασίας του **προτύπου** διαλύματος της καθαρής ουσίας (διάλυμα αναφοράς) στη συγκέντρωση εργασίας της μεθόδου ή το διάλυμα εργασίας του μεσαίου **δείγματος** (επίπεδο 100%) το οποίο χρησιμοποιήθηκε στον έλεγχο επαναληψιμότητας της μεθόδου. Αυτός ο τύπος πιστότητας **διενεργείται** με τις δοκιμές καταλληλότητας του συστήματος, System Suitability Tests (βλ. παράγραφο 5.3.1).

5.3.6.3 Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (interlaboratory reproducibility)

Ως αναπαραγωγιμότητα ορίζεται το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων τα οποία λαμβάνονται με την **ίδια** μέθοδο, στο **ίδιο** δείγμα, κάτω από όσο γίνεται **διαφορετικές** συνθήκες (άλλος αναλυτής, άλλη συσκευή, άλλες ημέρες, άλλες στήλες, άλλα batch numbers αντιδραστηρίων/αναλωσίμων). Ανάλογα με το αν οι παραπάνω αλλαγές εφαρμοστούν στο ίδιο ή σε διαφορετικά εργαστήρια, χωρίζεται σε ενδοεργαστηριακή και διεργαστηριακή. Η πρώτη αναφέρεται στις Φαρμακοποιίες ως ενδιάμεση πιστότητα (**intermediate precision, IP**).

Στο συγκεκριμένο προσδιορισμό, το πρωτόκολλο της επαναληψιμότητας της μεθόδου επαναλήφθηκε με τη χρήση μιας διαφορετικής πειραματικής διάταξης HPLC (2^η εργαστηριακή ημέρα). Χρησιμοποιήθηκε ένα δεύτερο χρωματογραφικό σύστημα το οποίο φέρει ανιχνευτή απορρόφησης UV-Vis μεταβλητού μήκους κύματος, 190-600nm (βλ. ενότητα 4.1). Επίσης, τα χρωματογραφικά αναλώσιμα (σκόνη άλατος, νερό HPLC, MeOH) αντιστοιχούσαν σε διαφορετικά batch numbers (άλας) ή διαφορετικούς προμηθευτές (H₂O, MeOH). Τέλος, το πρωτόκολλο επαναλήφθηκε ακόμη μία φορά (3^η εργαστηριακή ημέρα) από διαφορετικό αναλυτή του ίδιου εργαστηρίου.

Τα δεδομένα όλων των εργαστηριακών ημερών συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν συγκεντρωτικά με σκοπό την εκτίμηση της ενδιάμεσης πιστότητας, I.P. **Αυτός ο τύπος πιστότητας ελέγχει την επίδραση τυχαίων γεγονότων επάνω στην πιστότητα της μεθόδου μέσα σε ένα εργαστήριο, και σχετίζεται με την αντοχή της (robustness) σε τυχαίες, μη σκοπούμενες (unintended) μικρομεταβολές των πειραματικών παραμέτρων.** Αντίθετα, η ανθεκτικότητα αφορά προσχεδιασμένες και σκοπούμενες μεταβολές (βλ. παράγραφο 5.3.7).

Στο εδάφιο 5.3.6.1 υπολογίστηκε η %RSD = %RSD_r για την % ανάκτηση των 6 διαφορετικών διαλυμάτων εργασίας εντός κάθε μίας από τις 3 εργαστηριακές ημέρες. Τώρα, θα υπολογιστεί η συνολική (grand) %RSD = %RSD_R = %RSD_{I.P.} για την

% ανάκτηση των 18 διαφορετικών διαλυμάτων εργασίας στο σύνολο των 3 εργαστηριακών ημερών.

Κριτήρια αποδοχής:

- Συνίσταται η απαίτηση για **grand %RSD** = $\%RSD_R = \%RSD_{I.P.} < 3\%$, για τις τιμές της ανάκτησης των 18 διαφορετικών διαλυμάτων εργασίας στο σύνολο των 3 εργαστηριακών ημερών.

* $RSD_R = RSD$ σε συνθήκες ενδιάμεσης πιστότητας

Όπως είναι λογικό, τα όρια αποδοχής στο σύνολο των 3 ημερών συνίσταται να είναι πιο ελαστικά σε σχέση με τα όρια αποδοχής για μια δεδομένη εργαστηριακή ημέρα (2%). Οι παρακάτω πίνακες εμπεριέχουν τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα.

Πίνακας 24: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για την % ανάκτηση στις μελέτες επαναληψιμότητας (method repeatability) και ενδιάμεσης πιστότητας της μεθόδου (intermediate precision). Οι έλεγχοι έγιναν σε 1 επίπεδο συγκέντρωσης που αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας, σε χρονική έκταση 3 ημερών.*

*Τα αποτελέσματα αφορούν την Κιτρική Βουταμιράτη

% Ανάκτηση εμβολιασμένων διαλυμάτων – Επίπεδο 100% της $C_{εργασίας}$			
No Spiked	% Ανάκτηση		
	1 ^η εργαστηριακή ημέρα	2 ^η εργαστηριακή ημέρα	3 ^η εργαστηριακή ημέρα
1	99,69	101,62	100,17
2	99,03	101,75	100,49
3	99,18	101,05	100,72
4	99,32	101,11	100,79
5	98,17	101,08	100,46
6	98,79	101,46	100,48
Μέσος Όρος	99,03	101,35	100,52
SD_r	0,52	0,30	0,22
%RSD_r	0,52 <2%	0,30 <2%	0,22 <2%
Grand M. Όρος	100,3		
Grand SD	1,0		
Grand %RSD (%$RSD_{I.P.}$)	1,0 < 3%		

Πίνακας 25: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για την % ανάκτηση* στις μελέτες επαναληψιμότητας (method repeatability) και ενδιάμεσης πιστότητας της μεθόδου (intermediate precision). Οι έλεγχοι έγιναν σε 1 επίπεδο συγκέντρωσης που αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας, σε χρονική έκταση 3 ημερών.

*Τα αποτελέσματα αφορούν το Βενζοϊκό Οξύ

% Ανάκτηση εμβολιασμένων διαλυμάτων – Επίπεδο 100% της C _{εργασίας}			
No Spiked	% Ανάκτηση		
	1 ^η εργαστηριακή ημέρα	2 ^η εργαστηριακή ημέρα	3 ^η εργαστηριακή ημέρα
1	99,67	100,32	100,35
2	99,46	100,28	100,43
3	99,35	99,95	100,95
4	99,70	99,81	100,99
5	99,07	100,04	100,50
6	99,24	100,66	100,71
Μέσος Όρος	99,42	100,18	100,65
SD _r	0,25	0,30	0,27
%RSD_r	0,25 <2%	0,30 <2%	0,27 <2%
Grand M. Όρος	100,08		
Grand SD	0,59		
Grand %RSD (%RSD_{I.P.})	0,59 < 3%		

Με βάση τους παραπάνω πίνακες, η εξεταζόμενη μέθοδος πληροί τα συνιστώμενα κριτήρια αποδοχής για την %RSD_r και για την %RSD_{I.P.}. Ωστόσο, για την εξασφάλιση της μέγιστης εγκυρότητας των αποτελεσμάτων, η %RSD_{I.P.} θα **επαναυπολογισθεί** με εφαρμογή μιας one-way ANOVA επί των δεδομένων και θα αξιολογηθεί η διαφορά μεταξύ των δύο τιμών. Γενικότερα, αυτό το είδος στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων θεωρείται ως το πιο **αξιόπιστο** διότι υπολογίζει τη διακύμανση μέσα στις ομάδες (within) αλλά και μεταξύ αυτών (between). Ο πρώτος τρόπος υπολογισμού ο οποίος εφαρμόστηκε δε θεωρείται απόλυτα σωστός διότι βασίζεται σε ένα μεγάλο σύνολο μετρήσεων, ειδικά όταν οι μελέτες πραγματοποιούνται για πολλές εργαστηριακές ημέρες. Αυτό συχνά οδηγεί σε αρκετά μικρές τιμές για την %RSD_{I.P.}. Οι τιμές αυτές ενδέχεται να είναι **πλασματικές** και **όχι ρεαλιστικές**. Από τα φύλλα επεξεργασίας των δεδομένων προκύπτουν τα εξής στοιχεία (Σχήμα 36):

ONE WAY ANOVA						
	1η εργ. ημέρα	2η εργ. ημέρα	3η εργ. ημέρα			
	99,69	101,62	100,17			
	99,03	101,75	100,49			
	99,18	101,05	100,72			
	99,32	101,11	100,79			
	98,17	101,08	100,46			
	98,79	101,46	100,48			
Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα						
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ						
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση		
Στήλη 1	6	594,18	99,03	0,26788		
Στήλη 2	6	608,07	101,345	0,09307		
Στήλη 3	6	603,11	100,5183333	0,048296667		
ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	16,51547778	2	8,257738889	60,5337042	6,57E-08	3,6823203
Μέσα στις ομάδες	2,046233333	15	0,136415556			
Σύνολο	18,56171111	17				

ONE WAY ANOVA						
	1η εργ. ημέρα	2η εργ. ημέρα	3η εργ. ημέρα			
	99,67	100,32	100,35			
	99,46	100,28	100,43			
	99,35	99,95	100,95			
	99,70	99,81	100,99			
	99,07	100,04	100,5			
	99,24	100,66	100,71			
Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα						
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ						
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση		
Στήλη 1	6	596,49	99,415	0,06043		
Στήλη 2	6	601,06	100,1766667	0,093866667		
Στήλη 3	6	603,93	100,655	0,07399		
ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	4,693077778	2	2,346538889	30,83674036	4,85E-06	3,6823203
Μέσα στις ομάδες	1,141433333	15	0,076095556			
Σύνολο	5,834511111	17				

Σχήμα 36: Φύλλο επεξεργασίας και τεκμηρίωσης των δεδομένων: Εφαρμογή της one-way ANOVA επί των αριθμητικών δεδομένων της % ανάκτησης για την Κιτρική βουταμιράτη (επάνω) και το Βενζοϊκό οξύ (κάτω), στο σύνολο 3 εργαστηριακών ημερών. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το λογισμικό Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA). Από τα αποτελέσματα αυτά θα υπολογισθεί η %RSD_{I,P}, και θα αξιολογηθεί η ενδιάμεση πιστότητα (I.P) της εξεταζόμενης μεθόδου.

Για τον υπολογισμό της %RSD_{I,P} με one-way ANOVA πραγματοποιούνται οι εξής υπολογισμοί:

➤ Κιτρική βουταμιράτη:

- Εντός των ομάδων διασπορά = $S_r^2 = 0,14$
- Διασπορά μέσων όρων = $S_{\chi_{\text{mean}}}^2 = 8,3 / (N = 6) = 1,4$
- Μεταξύ των ομάδων διασπορά = $S_g^2 = S_{\chi_{\text{mean}}}^2 - S_r^2 / (N = 6) = 1,4 - 0,14 / 6 = 1,38$

- Ενδιάμεση πιστότητα $S_R = \sqrt{S_f^2 + S_g^2} = \sqrt{0,14 + 1,38} = 1,2$
- $\%RSD_{I.P.} = S_R / \text{mean} * 100\% = 1,2 / 100,3 * 100\% = \mathbf{1,2\%} < \mathbf{3\%}$

Παρατηρούμε ότι πράγματι προκύπτει λίγο μεγαλύτερη τιμή $\%RSD_{I.P.}$ για την ανάκτηση της B.C., σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή από τον πρώτο τρόπο υπολογισμού (1%). Ωστόσο, τα κριτήρια αποδοχής εξακολουθούν να πληρούνται.

➤ Βενζοϊκό οξύ:

- Εντός των ομάδων διασπορά $= S_r^2 = 0,076$
- Διασπορά μέσων όρων $= S_{x\text{mean}}^2 = 2,3 / (N = 6) = 0,38$
- Μεταξύ των ομάδων διασπορά $= S_g^2 = S_{x\text{mean}}^2 - S_r^2 / (N = 6) = 0,38 - 0,076 / 6 = 0,37$
- Ενδιάμεση πιστότητα $S_R = \sqrt{S_f^2 + S_g^2} = \sqrt{0,078 + 0,37} = 0,67$
- $\%RSD_{I.P.} = S_R / \text{mean} * 100\% = 0,67 / 100,08 * 100\% = \mathbf{0,67\%} < \mathbf{3\%}$

Παρατηρούμε ότι πράγματι προκύπτει **λίγο μεγαλύτερη τιμή** $\%RSD_{I.P.}$ για την ανάκτηση του B.A., σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή από τον πρώτο τρόπο υπολογισμού (0,59%). Ωστόσο, τα κριτήρια αποδοχής εξακολουθούν να πληρούνται.

Τέλος, ο λόγος του Horwitz (HorRat) αποτελεί ένα χρήσιμο **δείκτη αξιολόγησης** της ενδιάμεσης πιστότητας μιας αναλυτικής μεθόδου. Τα εργαστήρια συνήθως καταφεύγουν στο κριτήριο αυτό όταν πρόκειται για αναλύτες για τους οποίους δεν είναι διαθέσιμες σαφείς νομοθετικές οδηγίες/απαιτήσεις και όρια αποδοχής (από ISO, Φαρμακοποιίες, AOAC κλπ). Κατ' αρχήν, υπολογίζεται η **μέγιστη αποδεκτή $\%RSD_R$** . Υπάρχουν διάφορες προτεινόμενες εξισώσεις Horwitz για τη σχέση μεταξύ της μέγιστης αποδεκτής $\%RSD_R$ και της συγκέντρωσης του δείγματος. Η πιο γνωστή από αυτές είναι η εξίσωση $\%RSD_{R\text{προβλεπόμενη από Horwitz}} = 2^{1-0,5*\log(C)}$, όπου C η συγκέντρωση εκφρασμένη υπό μορφή δύναμης του 10. Για παράδειγμα, η συγκέντρωση 1 mg/g γράφεται ως 10^{-3} .

Για την αξιολόγηση της ενδιάμεσης πιστότητας της μεθόδου πραγματοποιούνται οι εξής υπολογισμοί:

➤ Κιτρική βουταμιράτη (C=Grand mean = 100,3 mg/mL)

- $\%RSD_{R\text{προβλεπόμενη από Horwitz}} = 2^{1-0,5*\log(C)} = 2,8\%$
- $\text{HorRat} = \frac{\%RSD_R \text{ παρατηρούμενη στο εργαστήριο}}{\%RSD_R \text{ προβλεπόμενη από Horwitz}} = \frac{1\%}{2,8\%} = 0,36 < \mathbf{0.5}$

➤ Βενζοϊκό οξύ (C=Grand mean = 100,08 mg/mL)

- $\%RSD_{R\text{προβλεπόμενη από Horwitz}} = 2^{1-0,5 \cdot \log(C)} = 2,8 \%$

- $\text{HorRat} = \frac{\%RSD_R \text{ παρατηρούμενη στο εργαστήριο}}{\%RSD_R \text{ προβλεπόμενη από Horwitz}} = \frac{0,59\%}{2,8\%} = 0,21 < 0.5$

Λόγος Horwitz ($\text{HorRat} \leq 0,5$) **τεκμηριώνει** εξαιρετική πιστότητα της μεθόδου στο εργαστήριο (εκπαίδευση, εμπειρία, αποτελεσματική ανάπτυξη της μεθόδου, ομοιογένεια δείγματος → ομοιογενή παραγόμενα διαλύματα εργασίας). Γενικότερα, **όλες** οι διαδικασίες υπολογισμού της %RSD οι οποίες εφαρμόστηκαν και παρουσιάστηκαν στα εδάφια 5.3.6.1 και 5.3.6.3, **αποδεικνύουν** ότι η εξεταζόμενη μέθοδος παρουσιάζει εξαιρετική επαναληψιμότητα (αξιολογείται από την %RSD_r) και ενδιάμεση πιστότητα (αξιολογείται από την %RSD_{i,p}=%RSD_R).

5.3.6.4 Αναπαραγωγιμότητα μεταξύ εργαστηρίων

Η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (intralaboratory reproducibility) είναι ένας τύπος πιστότητας ο οποίος ελέγχει την επίδραση τυχαίων γεγονότων επάνω στην πιστότητα της μεθόδου, μέσα σε διαφορετικά εργαστήρια. Σχετίζεται με την αντοχή της μεθόδου (robustness) σε τυχαίες, μη σκοπούμενες (unintended) μικρομεταβολές των πειραματικών παραμέτρων μεταξύ των εργαστηρίων. Διαφέρει από την ανθεκτικότητα, η οποία αφορά προσχεδιασμένες και σκοπούμενες μεταβολές (βλ. παράγραφο 5.3.7). Συνήθως αναφέρεται απλά ως αναπαραγωγιμότητα, διότι για ένα μόνο εργαστήριο χρησιμοποιείται πλέον ο όρος ενδιάμεση πιστότητα (και όχι ο όρος ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα).

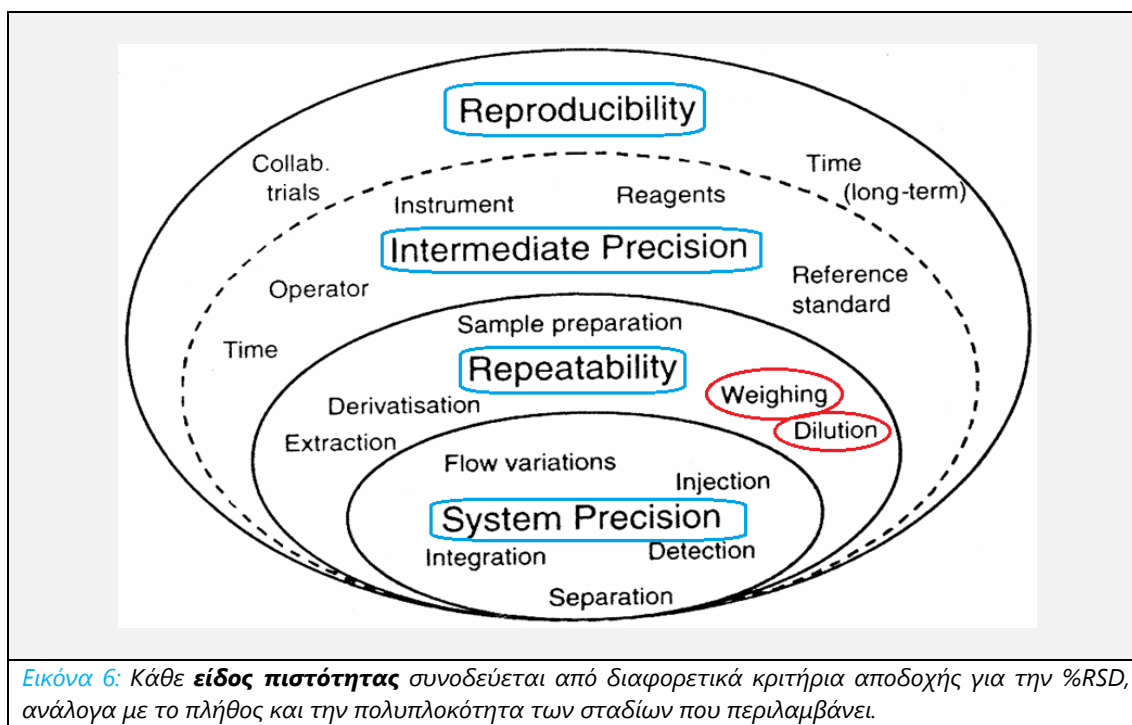
Πληροφορίες για την διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα λαμβάνονται από τη συμμετοχή ενός εργαστηρίου σε ειδικά διεργαστηριακά προγράμματα ελέγχου ικανότητας. Η συμμετοχή στα σχήματα αυτά (Proficiency Testing Schemes) είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την προτυποποίηση μιας μεθόδου (standardization) και αναφέρεται από διάφορα πρότυπα π.χ. από το ISO 17025, στα πλαίσια των απαιτήσεων για εξωτερικό έλεγχο ποιότητας. Οι έλεγχοι αυτοί σχεδιάζονται και υλοποιούνται από διεθνώς διαπιστευμένους φορείς (ISO 13528).

Σημείωση: Όπως είναι αναμενόμενο, κάθε είδος πιστότητας συνοδεύεται από διαφορετικά κριτήρια αποδοχής για την %RSD, ανάλογα με το πλήθος και την πολυπλοκότητα των σταδίων που περιλαμβάνει. Η **επαναληψιμότητα του συστήματος (system precision)** μελετάται από μια σειρά μετρήσεων στο ίδιο διάλυμα εργασίας. Αφορά την **ακεραιότητα της πειραματικής διάταξης** (όχι τη μέθοδο) και εξαρτάται από συγκεκριμένους παράγοντες όπως η αβεβαιότητα κάθε ένεσης, οι μεταβολές στη ροή της κινητής φάσης, ο διαχωρισμός,

η συνέπεια στην απόδοση του ανιχνευτή και η ολοκλήρωση των κορυφών.

Αντίθετα, η επαναληψιμότητα της μεθόδου (*method repeatability*) περιλαμβάνει **επιπλέον στάδια** όπως οι ζυγίσεις, οι αραιώσεις και γενικότερα η παρασκευή των **ανεξάρτητων διαλυμάτων εργασίας** ανά επίπεδο συγκέντρωσης (ή στο επίπεδο 100%). Για παράδειγμα, η εμπλοκή ενός ζυγού έχει μεγάλη επίδραση στην επαναληψιμότητα της μεθόδου και στην αβεβαιότητα μιας μέτρησης, ειδικά όταν οι ποσότητες είναι μικρές. Για ένα ζυγό με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων υπάρχει (αβεβαιότητα) σφάλμα 0,1 mg σε κάθε ανάγνωση. Αυτό σημαίνει ότι αν ζυγιστούν 10 mg ουσίας, το σφάλμα θα είναι $\Delta M/M=0,1/10=0,01$ (1%). Ακολούθως, η συνολική αβεβαιότητα **αυξάνεται** με την εμπλοκή των πιπετών και των διαφόρων ογκομετρικών φιαλών για τις αραιώσεις (σφάλμα $\Delta V/V$). Στο ολικό σφάλμα συνεισφέρουν επίσης οι αβεβαιότητες στην έγχυση του δείγματος ($\Delta I/I$) και στην ολοκλήρωση από το λογισμικό (σφάλμα $\Delta A/A$), οι οποίες αναφέρθηκαν πιο πριν. Λόγω της αναπόφευκτης **διάδοσης των σφαλμάτων**, τα προτεινόμενα όρια για την %RSD (%RSD_r) είναι σαφώς πιο ελαστικά.

Αντίστοιχα, τα όρια για την %RSD (%RSD_{i,p}) αυξάνονται λίγο περισσότερο στη μελέτη της **ενδιάμεσης πιστότητας** (*intermediate precision*) διότι εμπλέκονται διαφορετικοί αναλυτές, διαφορετικά όργανα, διαφορετικές παρτίδες αναλωσίμων, διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες κλπ. Τέλος, σε έναν διεργαστηριακό έλεγχο για τη μελέτη της **(διεργαστηριακής) αναπαραγωγιμότητας**, η απαιτούμενη μέγιστη %RSD για κάθε εργαστήριο αναμένεται να είναι ακόμα πιο υψηλή.



Εικόνα 6: Κάθε είδος πιστότητας συνοδεύεται από διαφορετικά κριτήρια αποδοχής για την %RSD, ανάλογα με το πλήθος και την πολυπλοκότητα των σταδίων που περιλαμβάνει.

5.3.7 Ανθεκτικότητα^{65,80}

Η ανθεκτικότητα (**ruggedness**) περιγράφει την ανθεκτικότητα της μεθόδου σε προσχεδιασμένες, σκοπούμενες (deliberate) **μικρομεταβολές** των ονομαστικών παραμέτρων της μεθόδου αυτής (π.χ. ταχύτητα ροής, pH, λανίχνευσης, θερμοκρασία κλπ). Δεν σχετίζεται με την αντοχή της μεθόδου (robustness) σε τυχαίες, μη σκοπούμενες (unintended) μικρομεταβολές των πειραματικών παραμέτρων. Ωστόσο, όπως αναφέραμε και για τα διάφορα υποσύνολα της πιστότητας, έτσι και εδώ, συχνά παρατηρείται μια σύγχυση στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τις ισχύουσες ορολογίες και τους ορισμούς οι οποίοι συχνά τροποποιούνται.

Τα προηγούμενα χρόνια υπήρχε μία ταύτιση των όρων robustness/ruggedness από το ICH και από κάποιες φαρμακοποιίες. Πλέον, πολλοί φορείς (π.χ. η USP) διακρίνουν τους δύο όρους σαν ξεχωριστές παραμέτρους επικύρωσης μιας μεθόδου. Έτσι, ο όρος robustness αφορά μη σκοπούμενες μεταβολές σε βάθος χρόνου (διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες), είτε στο ίδιο εργαστήριο (ενδιάμεση πιστότητα) είτε μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων (αναπαραγωγιμότητα).

Είναι κρίσιμο να τονιστεί ότι τα αποτελέσματα του ελέγχου της ανθεκτικότητας **συν-διαμορφώνουν (ή τροποποιούν)** το πρωτόκολλο των ελέγχων καταλληλότητας του συστήματος (System Suitability Tests, βλ. παράγραφο 5.3.1). Οι έλεγχοι αυτοί εξασφαλίζουν την αξιοπιστία μιας αναλυτικής διάταξης κατά την καθημερινή λειτουργία της σε επίπεδο ρουτίνας και θέτουν όρια αποδοχής για κάποιες από τις πειραματικές αποκρίσεις (**responses**) (π.χ. R_s , A_s , ϵ μβαστό, t_R , N κλπ). Ουσιαστικά, πρόκειται για αποκρίσεις οι οποίες έχουν κριθεί ως κρίσιμες από τον αναλυτή που ανέπτυξε τη μέθοδο και, ως εκ τούτου, υπάρχει απαίτηση να είναι σχεδόν αμετάβλητες σε κάθε εφαρμογή της. Πέρα από την εμπειρία του, ένας αναλυτής θα πρέπει να στηρίζεται στην **πειραματική τεκμηρίωση** του ελέγχου ανθεκτικότητας ώστε να αποφανθεί για το ποιοι πειραματικοί παράγοντες (**factors**) (π.χ. Cάλατος, pH, λανίχνευσης, θερμοκρασία, ταχύτητα ροής κλπ) είναι πιθανό, AN μεταβληθούν, να οδηγήσουν σε μια επακόλουθη μεταβολή των παραπάνω αποκρίσεων. Δηλαδή, ένας αναλυτής πρέπει να γνωρίζει ποιοι παράγοντες πρέπει να καθορίζονται με ιδιαίτερη προσοχή κάθε φορά που εκτελείται η μέθοδος.

Σημείωση: Πολλές πηγές θεωρούν ότι ο έλεγχος ανθεκτικότητας ανήκει στο στάδιο της ανάπτυξης (method development topic) ενώ άλλες πηγές τον κατατάσσουν στο στάδιο της επικύρωσης (method validation topic). Σε κάθε περίπτωση, συνίσταται η ανθεκτικότητα να ελέγχεται στο χρονικό διάστημα μεταξύ του τέλους της πρώτης και της αρχής της δεύτερης από τις διαδικασίες αυτές. Ο σκοπός της στρατηγικής αυτής είναι η αποφυγή μιας ενδεχόμενης εκ νέου ανάπτυξης και επικύρωσης (redevelopment, revalidation) σε περίπτωση που η μέθοδος δε κριθεί ικανοποιητικά ανθεκτική. Κάθε αναλυτική μέθοδος απαιτεί χρόνο, προσπάθεια και κόστος (αναλώσιμα, διαλύτες κλπ).

5.3.7.1 Επιλογή των παραγόντων προς μελέτη και των επιπέδων τους

Για τη διεξαγωγή μιας μελέτης ανθεκτικότητας πρέπει να επιλεχθούν με προσοχή οι ονομαστικές παράμετροι (**παραγόντες (factors)**) εκείνες για τις τιμές των οποίων **ενδέχεται** να υπάρξουν **αποκλίσεις** κατά την εκτέλεση της μεθόδου. Τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων παραγόντων είναι τα εξής:

- Το **pH** της κινητής φάσης: Οι αναλυτές ενός εργαστηρίου (ή διαφορετικών εργαστηρίων) είναι πιθανόν να παρασκευάσουν κινητές φάσεις με μικρή αλλά υπαρκτή διαφορά στο pH. Άλλωστε, όπως έχουμε ήδη αναφέρει στην ενότητα 3.6, η σταθεροποίηση του pH σε επίπεδα καλύτερα των $\pm 0,05$ έως $\pm 0,10$ μονάδων είναι εξαιρετικά επίπονη και πρακτικά ανέφικτη.
- Η **συγκέντρωση** του άλατος: Στην ενότητα 3.4 μελετήσαμε την ικανότητα ενός ρυθμιστικού διαλύματος μια δεδομένης C να διατηρεί σταθερό το pH της κινητής φάσης. Επίσης, είδαμε ότι η συγκέντρωση πρέπει να είναι ικανοποιητική (για τη καταστολή των σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων) αλλά όχι πολύ μεγάλη (κίνδυνος κατακρήμνισης ιζήματος). Για τη παρασκευή ενός διαλύματος συγκεκριμένης συγκέντρωσης (mM), μια υπολογισμένη ποσότητα άλατος ζυγίζεται και διαλύεται στο νερό και στη συνέχεια ρυθμίζεται το pH ρυθμίζεται επ' ακριβώς με την υπό ανάδευση προσθήκη του αντίστοιχου ασθενούς οξέος ή ασθενούς βάσης. Επομένως, είναι δυνατόν να υπάρξουν αποκλίσεις από αναλυτή σε αναλυτή.
- Η ακρίβεια στη **ροή** και τη **σύσταση** της κινητής φάσης: Οι διάφορες πειραματικές διατάξεις HPLC ενδέχεται να παρουσιάζουν διαφορές στην ικανότητα σταθεροποίησης της ροής (u (mL/min)) ή στην ικανότητα ανάμιξης των διαλυτών της κινητής φάσης (% σύσταση για διαλύτες και νερό).

Η δοκιμασία της ανθεκτικότητας εξετάζει το AN μια πιθανή **απόκλιση** στην επιδιωκόμενη τιμή των παραπάνω παραγόντων (π.χ. pH) θα έχει **επίδραση** (και σε ποιο βαθμό) επάνω στις αποκρίσεις (π.χ. R_s , N) οι οποίες έχουν καθοριστεί ως κρίσιμες. Όταν η επίδραση είναι σημαντική και οδηγεί σε μη αποδεκτές μεταβολές (π.χ. απώλεια διαχωρισμού), τότε ο εκάστοτε παράγοντας καλείται σημαντικός.

Σε ό,τι αφορά τα επίπεδα στα οποία θα εξεταστεί η απόκλιση ενός παράγοντα, αυτά είθισται να καθορίζονται **συμμετρικά** γύρω από μια κεντρική τιμή η οποία είναι η ονομαστική τιμή (**nominal value**) που περιγράφεται από το πρωτόκολλο της μεθόδου (**operating procedure**). Η έκταση του εύρους (**interval**) εκατέρωθεν της κεντρικής τιμής αποφασίζεται από τον αναλυτή. Είναι φανερό ότι ο έλεγχος της ανθεκτικότητας σε ένα πολύ μεγάλο εύρος θα είναι ανώφελος διότι δε θα ανταποκρίνεται στη πραγματικότητα (π.χ. ± 1 μονάδα για το pH, $\pm 10\%$ B για τη κινητή φάση). Πολλές φορές το εύρος προκύπτει από

πρακτικούς περιορισμούς, όπως για παράδειγμα η αβεβαιότητα μέτρησης η οποία υπολογίστηκε μετά τη βαθμονόμηση ενός πεχαμέτρου.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, είναι δυνατόν ο έλεγχος εντός ενός μη συμμετρικού διαστήματος (**unsymmetrical interval**) για ένα συγκεκριμένο παράγοντα να ανταποκρίνεται πολύ καλύτερα στη πραγματικότητα, συγκριτικά με ένα «συμμετρικό έλεγχο». Για παράδειγμα, αν μια μέθοδος απαιτεί την επίτευξη θερμοκρασίας **35 °C** για ένα διαχωρισμό τότε θα πρέπει να μελετηθεί η απόδοση του διαχωρισμού και σε συνθήκες δωματίου (~25 °C), σε περίπτωση που η μέθοδος εφαρμοστεί σε μια πειραματική διάταξη η οποία δε φέρει φούρνο θερμοστάτησης (column oven). Ωστόσο, η οριοθέτηση ενός ανώτερου άκρου = 45 °C δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα. Ένα πιο λογικό προτεινόμενο διάστημα θα ήταν το 25-40 °C. Με την ίδια λογική, αν η μέθοδος πρόκειται να εφαρμοστεί μόνο με χρήση θερμοστατούμενων στηλών, τότε το εξεταζόμενο διάστημα θα μπορούσε να είναι συμμετρικό αλλά πολύ πιο στενό, π.χ. 32-38 °C. Επίσης, θα μπορούσε να προταθεί η εξαίρεση του παράγοντα «θερμοκρασία στήλης» από τους ελεγχόμενους παράγοντες.

Στον πίνακα του εδαφίου 5.3.7.2 παρουσιάζονται οι πειραματικοί παράγοντες που επιλέχθηκαν για τη μελέτη της ανθεκτικότητας του εν λόγω προσδιορισμού, καθώς και το εύρος ελέγχου για καθέναν από αυτούς. Η επιλογή τους πραγματοποιήθηκε έχοντας ως βάση 2 κριτήρια: Πρώτον, την **ευκολία** (άρα και τη συχνότητα) πρόκλησης αποκλίσεων στις τιμές τους σε πρακτικό επίπεδο και δεύτερον, την **επίδρασή** τους επάνω στις κρίσιμες αποκρίσεις της μεθόδου με βάση τόσο τις θεωρητικές όσο και τις εμπειρικές μας γνώσεις. Η επίδραση αυτή θα αξιολογηθεί μετά το πέρας του ελέγχου ανθεκτικότητας.

Σημείωση: Στη συγκεκριμένη μέθοδο, η πιο κρίσιμη απόκριση ήταν ο παράγοντας ασυμμετρίας (A_f), η μείωση του οποίου αποτέλεσε βασικό στόχο κατά το στάδιο της ανάπτυξης της μεθόδου. Ο στόχος αυτός τέθηκε όχι τόσο για λόγους διαχωρισμού των αναλυτών αλλά κυρίως για λόγους σωστής ολοκλήρωσης των κορυφών. Οι πειραματικοί παράγοντες που συνεισφέρουν στην ασυμμετρία μιας κορυφής σχολιάστηκαν λεπτομερώς στην ενότητα 3.3 και ουσιαστικά αποτελούν την **πλειοψηφία** των παραγόντων του παρακάτω πίνακα (π.χ. % ποσοστό Et_3N).

Οι κεντρικές τιμές (nominal values) για τους πειραματικούς παράγοντες (ονομαστικές παράμετροι) του παρακάτω πίνακα (εδάφιο 5.3.7.2) επιλέχθηκαν κατά το στάδιο ανάπτυξης της μεθόδου, **χωρίς τη χρήση κάποιου πειραματικού σχεδιασμού βελτιστοποίησης**. Ως εκ τούτου, δεν είμαστε σε θέση να τις χαρακτηρίσουμε ως βέλτιστες, ωστόσο είναι απόλυτα ικανοποιητικές σε σχετικά με την επίτευξη των στόχων της μεθόδου.

5.3.7.2 Επιλογή των αποκρίσεων προς μελέτη

Οι αποκρίσεις μας δίνουν πληροφορίες για την έκταση των αλλαγών που έχουν προκληθεί στο σύστημα ύστερα από τις σκοπούμενες μεταβολές που επιφέραμε στους παράγοντες. Όπως αναφέρθηκε αμέσως πιο πάνω, ο παράγοντας ασυμμετρίας (A_f) κρίθηκε ως η πιο κρίσιμη απόκριση στη συγκεκριμένη μέθοδο. Η μείωσή του ήταν βασικό στόχος κατά το στάδιο της ανάπτυξης της μεθόδου, ενώ ανήκει στις αποκρίσεις που εξετάζονται και καταγράφονται κατά τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος (system suitability tests) (βλ. παράγραφο 5.3.1).

Στην ενότητα 3.3 είδαμε ότι η ασυμμετρία μιας κορυφής προκαλεί προβλήματα στην ολοκλήρωση μιας επιφάνειας και στο διαχωρισμό δύο γειτονικών κορυφών (R_s). Όταν $A_s=T_f=1$ (πλήρως συμμετρικές κορυφές), τότε ο διαχωρισμός είναι πλήρης. Κατά κανόνα⁶³, στις συνήθεις αναλύσεις ρουτίνας επιδιώκεται μια τιμή $T_f \leq 1,5$ ($A_s \leq 1,75$) για όλες τις κορυφές. Όταν παρατηρείται $T_f=2$ ή $T_f > 2$ (δηλαδή $A_f > 2,5$), τότε τόσο η ολοκλήρωση όσο και η ποσοτικοποίηση είναι σχεδόν ανέφικτες και πρέπει να λαμβάνονται αμέσως μέτρα άρσης του φαινομένου. Οι κρίσιμες αποκρίσεις της μεθόδου, πέραν του A_s , παρουσιάζονται στον επόμενο πίνακα.

Σημείωση: Στον πειραματικό προσδιορισμό της παρούσας εργασίας, οι ουσίες ενδιαφέροντος (κιτρική βουταμιράτη & βενζοϊκό οξύ) διαχωρίστηκαν εξ' αρχής ικανοποιητικά ($R_s > 3,5$). Επομένως, δεν υπήρξε κίνδυνος αλληλοεπικάλυψης των κορυφών. Έτσι, δεν θεωρήθηκε ιδιαίτερα επιτακτική η ανάγκη μείωσης της ασυμμετρίας σε εξαιρετικά χαμηλές τιμές, παρά μόνο σε μια ενδεικτική τιμή-στόχο $\leq 1,6$ ώστε να μην επηρεάζεται η ακεραιότητα της ολοκλήρωσης.

Πίνακας 26: Οι πειραματικοί παράγοντες (**factors**) και οι αποκρίσεις (**responses**) που επιλέχθηκαν για τη μελέτη της ανθεκτικότητας. Για κάθε παράγοντα, η μελέτη έγινε σε 3 επίπεδα τα οποία οριοθετούσαν ένα συμμετρικό διάστημα (symmetrical interval). Το μέγιστο επίπεδο (άκρο) συμβολίζεται ως +1, ενώ το ελάχιστο ως -1.

Πειραματικός παράγοντας (experimental factor)	Επίπεδο (level) του εύρους εξέτασης (interval)			Πειραματικές αποκρίσεις
	-1	0 (κεντρική τιμή) (nominal value)	+1	
Ροή (mL/min)	1,3	1,5	1,7	Εμβαδό κορυφής B.A. (Area B.A.) Εμβαδό κορυφής B.C. (Area B.C.) Παρ. ασυμμετρίας B.A. (A_f B.A.) Παρ. ασυμμετρίας B.C. (A_f B.C.) Διαχωρισμός των κορυφών των B.A. και B.C. (R_s) $N_{\text{θεωρητικές}}$ για το B.A. $N_{\text{θεωρητικές}}$ για τη B.C. t_R για το B.A. t_R για τη B.C.
pH	2,8	3	3,2	
% MeOH	48	50	52	
Σάτος (mM)	48	50	52	
T (°C)	34	36	38	
λ (nm)	208	210	212	
% Et ₃ N (TEA)	0,95	1	1,05	

5.3.7.3 Επιλογή κατάλληλου πειραματικού σχεδιασμού-Προτεινόμενα πειράματα

Αν και είναι δυνατόν να μελετηθεί ξεχωριστά η επίδραση που ασκεί κάθε ένας παράγοντας επάνω σε μια δεδομένη απόκριση, εντούτοις συνήθως προτείνεται η χρήση ενός κατάλληλου **πειραματικού σχεδιασμού** ώστε να γίνει μια σφαιρική προσέγγιση. Για τις μελέτες ανθεκτικότητας χρησιμοποιούνται κυρίως 2 είδη σχεδιασμών: ο παραγοντικός σχεδιασμός (**factorial design**), πλήρης (full) ή κλασματικός (fractional), και ο σχεδιασμός **Plackett-Burman** ο οποίος είναι ένας ειδικός πειραματικός σχεδιασμός τύπου σάρωσης. Η εκλογή ενός σχεδιασμού βασίζεται κυρίως στο πλήθος των εξεταζόμενων παραγόντων.

Ο κύριος στόχος μας ήταν η εξαγωγή της μέγιστης δυνατής πληροφορίας μέσα από όσο γίνεται μικρότερο αριθμό πειραμάτων. Επιλέχθηκε ο κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός, ο οποίος αποτελεί ένα υποσύνολο του αντίστοιχου πλήρους σχεδιασμού και προτιμάται όταν ο αριθμός των παραγόντων είναι σχετικά μεγάλος. Έτσι λοιπόν, ο αριθμός των προτεινόμενων πειραμάτων δεν προκύπτει από τη σχέση 2^k αλλά από τη σχέση 2^{k-n} . Η βάση αναφέρεται στα 2 άκρα (επίπεδα) τα οποία **οριοθετούν** το διάστημα ελέγχου για κάθε παράγοντα και κωδικοποιούνται ως -1 και +1. Ο εκθέτης k αναφέρεται στον αριθμό των πειραματικών παραγόντων. Στη παρούσα μελέτη είναι $k=7$.

Εφαρμόστηκε ένας πειραματικός σχεδιασμός 2^{k-3} . Με τον τρόπο αυτό μειώθηκε αισθητά ο αριθμός των απαιτούμενων πειραμάτων, με μικρές πιθανότητες απώλειας σημαντικής πληροφορίας. Άλλωστε, στον έλεγχο ανθεκτικότητας επικεντρωνόμαστε κατά βάση στις κύριες επιδράσεις και όχι στις αλληλεπιδράσεις, όπως συμβαίνει στις διαδικασίες βελτιστοποίησης των αποκρίσεων σε μια μέθοδο. Για το σχεδιασμό των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό **Design-Expert v.10 trial version (Stat-Ease-Inc., Minneapolis, MN, USA)**. Προτάθηκαν $2^{k-3}=16$ πειράματα + 3 επαναλήψεις για τις κεντρικές/ονομαστικές τιμές (nominal values) που έχουν επιλεγεί = 19 πειράματα.

Για πρακτικούς λόγους ευκολίας, τα πειράματα είθισται να ταξινομούνται (**blocking**) με βάση έναν ή και παραπάνω παράγοντες. Αν η ταξινόμηση έχει γίνει ως προς ένα παράγοντα, πραγματοποιούνται όλα τα πειράματα που αντιστοιχούν στο επίπεδο -1 και στη συνέχεια όλα τα πειράματα που αντιστοιχούν στο επίπεδο +1 για τον παράγοντα αυτόν. Εντός κάθε «ομάδας» πειραμάτων, τα πειράματα προτιμάται να γίνονται με τυχαία σειρά σε ό,τι αφορά τις τιμές των υπόλοιπων παραγόντων.

Σημείωση: Στη μελέτη αυτή η ταξινόμηση (*blocking*) έγινε **πρωτίστως** με βάση τη $C_{\text{άλατος}}$ και το % ποσοστό της Et_3N (απενεργοποιητής) που περιέχεται στο άλας. **Δευτερευόντως**, τα πειράματα ταξινομήθηκαν με βάση το pH του άλατος μιας δεδομένης C , και μάλιστα κατά φθίνουσα τιμή. Για τη μείωση του pH χρησιμοποιήθηκε διάλυμα φωσφορικού οξέος, H_3PO_4 (βλ. ενότητα 4.2).

Πίνακας 27: Τα προτεινόμενα πειράματα που προέκυψαν με τη χρήση του κατάλληλου λογισμικού (Design-Expert) για έναν κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό 2^{k-3} .

No πειράματος (run)	Πειραματικός παράγοντας (experimental factor)						
	Ροή (mL/min)	pH	% MeOH	Cάλατος (mM)	T (°C)	λ (nm)	% Et ₃ N (TEA)
1	1,3	2,8	48	52	38	212	0,95
2	1,7	2,8	52	52	34	208	0,95
3	1,3	3,2	52	52	34	212	0,95
4	1,7	3,2	48	52	38	208	0,95
5	1,3	2,8	48	48	34	208	0,95
6	1,7	2,8	48	48	38	208	1,05
7	1,3	2,8	52	52	38	208	1,05
8	1,5	3	50	50	36	210	1
9	1,7	2,8	52	48	38	212	0,95
10	1,7	2,8	48	52	34	212	1,05
11	1,7	3,2	52	52	38	212	1,05
12	1,7	3,2	52	48	34	208	1,05
13	1,5	3	50	50	36	210	1
14	1,5	3	50	50	36	210	1
15	1,3	3,2	48	48	38	212	1,05
16	1,3	3,2	48	52	34	208	1,05
17	1,3	3,2	52	48	38	208	0,95
18	1,7	3,2	48	48	34	212	0,95
19	1,3	2,8	52	48	34	212	1,05
Ταξινόμηση (blocking) των πειραμάτων με βάση τη Cάλατος, το % ποσοστό της Et ₃ N και το pH							
8	1,5	3	50	50	36	210	1
13	1,5	3	50	50	36	210	1
14	1,5	3	50	50	36	210	1
12	1,7	3,2	52	48	34	208	1,05
15	1,3	3,2	48	48	38	212	1,05
6	1,7	2,8	48	48	38	208	1,05
19	1,3	2,8	52	48	34	212	1,05
11	1,7	3,2	52	52	38	212	1,05
16	1,3	3,2	48	52	34	208	1,05
7	1,3	2,8	52	52	38	208	1,05
10	1,7	2,8	48	52	34	212	1,05
17	1,3	3,2	52	48	38	208	0,95
18	1,7	3,2	48	48	34	212	0,95
5	1,3	2,8	48	48	34	208	0,95
9	1,7	2,8	52	48	38	212	0,95
3	1,3	3,2	52	52	34	212	0,95
4	1,7	3,2	48	52	38	208	0,95
1	1,3	2,8	48	52	38	212	0,95
2	1,7	2,8	52	52	34	208	0,95

Πειραματικό πρωτόκολλο:

➤ Ένα από τα 3 διαφορετικά πρότυπα (συμπυκνωμένα) διαλύματα παρακαταθήκης (Stock Standard Solutions, SSTs) τα οποία παρασκευάστηκαν στη μελέτη σταθερότητας (βλ. 5.3.2.1), χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή, με αραιώση, ενός **πρότυπου διαλύματος εργασίας** (Working Standard Solution, WST), ως εξής:

- 2 mL αραιώθηκαν σε $V_{\text{τελ}}=20$ mL diluent*
- *diluent=κινητή φάση = 1:1 MeOH/άλας XX mM-pH=YY

Οι τελικές συγκεντρώσεις ήταν **C_{B.C.} = 50,0 µg/mL** και **C_{B.A.} = 100 µg/mL**.

- Για κάθε «ομάδα» πειραμάτων που αφορούσε μια δεδομένη τιμή συγκέντρωσης άλατος, περιεκτικότητας σε Et₃N και pH, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο διάλυμα εργασίας.

Για τη παρασκευή του άλατος ανά «ομάδα» πειραμάτων μετά τη ταξινόμηση (blocking), πραγματοποιήθηκαν οι εξής υπολογισμοί:

- 1 mol NaH₂PO₄*H₂O ζυγίζει 137,98 g. Επομένως, τα 50 mmoles (0,050 moles) ζυγίζουν 6,89 g (στο 1L) ή **1,38 g** στα 200 mL διαλύματος (χρησιμοποιήθηκαν ογκομετρικές φιάλες των 200 mL για τη διάλυση του άλατος). Για τη ζύγιση χρησιμοποιήθηκε αναλυτικός ψηφιακός ζυγός ακρίβειας ανάγνωσης 2 δεκαδικών ψηφίων (βλ. ενότητα 4.1).
- 1 mol NaH₂PO₄*H₂O ζυγίζει 137,98 g. Επομένως, τα 48 mmoles (0,048 moles) ζυγίζουν 6,62 g (στο 1L) ή **1,32 g** στα 200 mL διαλύματος.
- 1 mol NaH₂PO₄*H₂O ζυγίζει 137,98 g. Επομένως, τα 52 mmoles (0,052 moles) ζυγίζουν 7,18 g (στο 1L) ή **1,44 g** στα 200 mL διαλύματος.
- Σε 200 mL άλατος προστέθηκαν με σιφώνιο **1,9 mL** Et₃N (0,95%), **2 mL** Et₃N (1%), **2,1 mL** Et₃N (1,05%)
- Η ρύθμιση του pH απαιτεί ελάχιστες σταγόνες H₃PO₄ και γι' αυτό χρησιμοποιούνται πιπέτες Pasteur.

5.3.7.4 Εκτέλεση των πειραμάτων

Τα πειράματα εκτελέστηκαν με τη σειρά που παρουσιάζονται στο δεύτερο μισό του Πίνακα 27, αφότου έγινε η ταξινόμηση (blocking) σε ομάδες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Όπως είναι λογικό, η μεταβολή στις ονομαστικές τιμές των παραγόντων προκάλεσε επακόλουθες διαφοροποιήσεις (είτε μεγάλες είτε μικρές) σε κάθε μια από τις εξεταζόμενες αποκρίσεις. Ακόμη, παρατηρούμε ότι στο σύνολο των 3 πειραμάτων τα οποία αφορούσαν τις κεντρικές τιμές των παραγόντων, οι αποκρίσεις μεταβλήθηκαν ελάχιστα. Αυτό είναι επίσης αναμενόμενο, και φυσικά επιθυμητό.

Πίνακας 28: Τα αποτελέσματα για τις **9 πειραματικές αποκρίσεις** μετά την εκτέλεση των πειραμάτων που προέκυψαν για έναν κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό 2^{k-3} .

No πειράματος (run)	Πειραματική απόκριση (response)								
	Area B.A. (mAU * min)	Area B.C. (mAU * min)	A _f B.A.	A _f B.C.	R _s	N _{θεωρητικές} B.A.	N _{θεωρητικές} B.C.	t _R B.A. (min)	t _R B.C. (min)
1	674,70	149,95	1,60	1,67	4,19	6.787	6.738	3,03	3,72
2	502,19	143,82	1,75	1,60	3,25	5.108	5.245	2,23	2,67
3	716,44	151,04	1,70	1,54	3,92	6.232	6.890	2,91	3,53
4	536,26	142,42	1,44	1,46	3,90	4.579	5.251	2,30	2,87
5	655,01	186,07	1,55	1,50	4,37	6.085	7.155	3,09	3,83
6	510,32	147,32	1,44	1,33	3,50	4.686	5.129	2,33	2,84
7	660,53	190,45	1,60	1,50	3,41	7.213	6.429	2,89	3,41
8	568,17	148,30	1,67	1,42	3,72	4.859	6.244	2,57	3,13
9	516,77	116,37	1,44	1,50	2,97	4.215	5.089	2,21	2,63
10	513,16	114,54	1,30	1,55	3,72	4.848	5.398	2,37	2,91
11	543,37	113,49	1,44	1,50	3,15	4.956	5.063	2,19	2,62
12	544,56	142,98	1,45	1,46	3,16	4.266	5.245	2,22	2,67
13	567,32	148,39	1,67	1,50	3,72	5.703	5.439	2,57	3,13
14	567,18	148,72	1,67	1,42	3,72	5.703	5.439	2,57	3,13
15	719,17	151,36	1,60	1,46	4,35	6.697	6.762	3,01	3,73
16	690,48	184,10	1,55	1,62	4,45	5.981	7.105	3,07	3,82
17	697,12	186,25	1,78	1,58	3,93	7.114	6.658	2,87	3,47
18	540,17	114,79	1,56	1,42	4,27	5.641	4.876	2,34	2,97
19	686,77	150,42	1,60	1,58	3,26	6.260	5.784	2,91	3,45

Σημείωση: Συνίσταται το λιγότερο ένας σύντομος έλεγχος για πιθανή ολίσθηση σε βάθος χρόνου (minimal check for drift as time effect). Για το λόγο αυτό κάθε μία από τις 16 προγραμματισμένες μετρήσεις επαναλήφθηκε μία φορά, αφότου είχε παρέλθει ένα σημαντικό χρονικό διάστημα (~1ώρα). Ελέγχθηκε η εγγύτητα των αποτελεσμάτων, ωστόσο οι μετρήσεις αυτές δεν συμπεριλήφθηκαν στους υπολογισμούς (δεν υπολογίστηκε ο μέσος όρος). Όλες οι μετρήσεις παρουσιάζονται

στο φύλλο επεξεργασίας και τεκμηρίωσης των δεδομένων, στο φάκελο της μεθόδου.

5.3.7.5 Υπολογισμός (calculation) των επιδράσεων (effects) των παραγόντων

Το πρώτο βήμα για την ταυτοποίηση των σημαντικών παραγόντων είναι ο υπολογισμός των επιδράσεων τους επάνω σε κάθε απόκριση (calculation of the effects). Οι επιδράσεις (**Ex**) υπολογίζονται από τις προκύπτουσες τιμές των αποκρίσεων. Για κάθε παράγοντα, η επίδραση **ανά απόκριση** υπολογίζεται από τη σχέση

$$E_x = \frac{\Sigma Y_{(+)} - \Sigma Y_{(-)}}{N/2} * 100\% \quad (18)$$

, όπου **X** είναι ένας πειραματικός παράγοντας ή ένας πλαστός παράγοντας (dummy factor) στην περίπτωση ενός σχεδιασμού Plackett-Burman, **Ex** είναι η επίδραση του πειραματικού παράγοντα X επάνω στην απόκριση Y, $\Sigma Y_{(+)}$, $\Sigma Y_{(-)}$ είναι το άθροισμα των τιμών μιας απόκρισης Y στα πειράματα στα οποία ο παράγοντας βρίσκεται στο ακραίο επίπεδο (+) ή (-) αντίστοιχα, **N** είναι ο συνολικός αριθμός των πειραμάτων (runs) από τα οποία προκύπτουν τα αθροίσματα $\Sigma Y_{(+)}$ και $\Sigma Y_{(-)}$.

Τα αποτελέσματα μπορούν να **κανονικοποιηθούν** ως προς το μέσο όρο (\bar{Y}) του αθροίσματος $\Sigma Y_{(0)}$, το οποίο είναι το άθροισμα των τιμών μιας απόκρισης στα πειράματα στα οποία ο παράγοντας βρίσκεται στο κεντρικό επίπεδο (ονομαστική τιμή). Έτσι, προκύπτει η σχέση

$$E_x(\%) = \frac{E_x}{\bar{Y}} * 100\% \quad (19)$$

Οι κανονικοποιημένες επιδράσεις (normalized effects), **Ex (%)**, συνήθως επιτρέπουν στον αναλυτή **να αποφανθεί σχετικά με το αν η επίδραση ενός παράγοντα είναι σημαντική ή όχι για μια απόκριση ακόμα και πριν να πραγματοποιηθεί η στατιστική ερμηνεία**. Με βάση τις παραπάνω σχέσεις κατασκευάζεται ο επόμενος πίνακας.

Σημείωση: Όλοι οι υπολογισμοί και τα αποτελέσματα αναγράφονται στο φύλλο επεξεργασίας και τεκμηρίωσης των δεδομένων. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το λογισμικό Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA).

Πίνακας 29: Οι επιδράσεις **Ex** και οι κανονικοποιημένες επιδράσεις **%Ex** για κάθε έναν από τους 7 πειραματικούς παράγοντες επάνω σε κάθε μια από τις 9 πειραματικές αποκρίσεις. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το λογισμικό Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA).

Παράγοντας του οποίου μελετάται η επίδραση Ex	Πειραματική απόκριση (response)								
	Area B.A. (mAU * min)	Area B.C. (mAU * min)	A _f B.A.	A _f B.C.	R _s	N _{θεωρητικές} B.A.	N _{θεωρητικές} B.C.	t _R B.A. (min)	t _R B.C. (min)
Ροή	-161,67	-39,24	-0,14	-0,080	-0,49	-1.758,75	-1.528,13	-0,70	-0,85
pH	33,52	-1,56	0,029	-0,025	0,31	33,00	110,38	-0,019	0,027
% MeOH	3,56	0,53	0,091	0,033	-0,71	7,50	-251,38	-0,14	-0,28
Ψάλατος	-4,10	-0,72	0,00	0,073	0,022	92,50	117,63	0,00	0,00
T	1,18	1,23	-0,011	-0,032	-0,12	228,25	-72,38	-0,039	-0,070
λ	14,26	-32,68	-0,039	0,021	-0,016	75,50	-202,13	0,00	0,00
% Et ₃ N	3,71	0,49	-0,10	-0,033	-0,23	-106,75	-123,38	0,00	-0,030
Παράγοντας του οποίου μελετάται η επίδραση %Ex									
Ροή	-28,49	-26,43	-8,53	-5,56	-13,32	-32,44	-26,77	-27,19	-27,08
pH	5,91	-1,05	1,75	-1,76	8,32	0,61	1,93	-0,73	0,88
% MeOH	0,63	0,36	5,48	2,29	-19,17	0,14	-4,40	-5,40	-8,95
Ψάλατος	-0,72	-0,48	-0,25	5,08	0,59	1,71	3,11	0,05	-0,16
T	0,21	0,83	-0,68	-2,19	-3,28	4,21	-1,27	-1,51	-2,24
λ	2,51	-22,01	-2,33	1,48	-0,44	1,39	-3,54	-0,15	-0,08
% Et ₃ N	0,65	0,33	-6,26	-2,31	-6,08	-1,97	-2,16	0,05	-0,96

Η **ερμηνεία** των εκτιμώμενων επιδράσεων (calculated effects) με σκοπό τον προσδιορισμό της σημαντικότητάς τους μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με στατιστικό (μαθηματικό) είτε με γραφικό (οπτικό) τρόπο. Συνίσταται η εφαρμογή και των δύο προσεγγίσεων, αν αυτό είναι δυνατό.

➤ Στατιστική ερμηνεία των αποτελεσμάτων (**statistical interpretation**):

Η στατιστική ερμηνεία (statistical interpretation) παρέχει μια **αριθμητική οριακή τιμή** ($E_{critical}$) η οποία μπορεί επίσης να παρουσιαστεί μέσω γραφικής απεικόνισης (π.χ. βλέπε διάγραμμα ημι-κανονικής πιθανότητας παρακάτω). Κατά κανόνα, η τιμή αυτή οδηγεί στην **εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας** μιας επίδρασης (δηλαδή τη διάκριση ενός παράγοντα σε **σημαντικό** ή όχι) με μεγαλύτερη αντικειμενικότητα και αυστηρότητα σε σύγκριση με την οπτική (visual) εξέταση, δηλαδή τη γραφική ερμηνεία (graphical interpretation). Προκύπτει από το t-test (δοκιμασία student) μέσα από τη σχέση

$$|E_x| \Leftrightarrow E_{\text{critical}} = t_{\text{critical}} * (SE)_e \quad (20)$$

ή

$$|\%E_x| \Leftrightarrow \%E_{\text{critical}} = \frac{E_{\text{critical}}}{\bar{Y}} * 100\% \quad (21)$$

, όπου **(SE)e** είναι το συστηματικό σφάλμα (standard error) μιας επίδρασης (effect), **t_{critical} (θεωρ.)** είναι η τιμή που προκύπτει από τον πίνακα κατανομής των τιμών t (t-test table) για δεδομένο Διάστημα Εμπιστοσύνης και βαθμούς ελευθερίας.

Συνήθως, η **κρίσιμη επίδραση** (E_{critical}) για μια απόκριση υπολογίζεται σε διάστημα εμπιστοσύνης $\alpha=0,05$ (95%) και περιστασιακά σε διάστημα 0,01 ή 0,1. Η επίδραση ενός παράγοντα επάνω σε μια απόκριση θεωρείται σημαντική σε επίπεδο σημαντικότητας α όταν $|E_x| > E_{\text{critical}}$. Από τους πίνακες κατανομής των τιμών t για δοκιμασία δύο άκρων (two-tailed-t test) σε Διάστημα Εμπιστοσύνης 95% με $v=n-1 = 3-1 = 2$ βαθμούς ελευθερίας (όπου 3 είναι ο αριθμός των ονομαστικών μετρήσεων), προκύπτει ότι $t_{\text{critical}} = 4,303$.

Το συστηματικό σφάλμα, (SE)e, μια επίδρασης αναπαριστά τη διακύμανση των πειραματικών αποτελεσμάτων μέσα σε ένα πειραματικό σχεδιασμό. Στους ελέγχους ανθεκτικότητας, στα πλαίσια της στατιστικής ερμηνείας των επιδράσεων, το σφάλμα αυτό μπορεί να υπολογισθεί με διαφορετικούς τρόπους⁸⁰. Στην παρούσα εργασία υπολογίστηκε από την εκτίμηση της ενδιάμεσης πιστότητας με βάση τον τύπο

$$SE = \sqrt{\frac{SD_a^2}{n_a} + \frac{SD_b^2}{n_b}} \quad (22)$$

ή αλλιώς

$$(SE)_e = \sqrt{\frac{SD_a^2}{N/2} + \frac{SD_b^2}{N/2}} = \sqrt{\frac{4 * SD^2}{N}} \quad (23)$$

, όπου **SD** είναι οι τυπικές αποκλίσεις των κεντρικών (ονομαστικών) τιμών από τις 3 μετρήσεις (2 επαναλήψεις) που πραγματοποιήθηκαν για το επίπεδο 0, **N** είναι ο συνολικός αριθμός των πειραμάτων (runs) από τα οποία προκύπτουν τα αθροίσματα $\Sigma Y_{(+)}$ και $\Sigma Y_{(-)}$. Στην παρούσα μελέτη ήταν $N=16$.

Πίνακας 30: Η κρίσιμη επίδραση ($E_{critical}$) για κάθε απόκριση υπολογίστηκε σε διάστημα εμπιστοσύνης $\alpha=0,05$ (95%). Από τους πίνακες κατανομής των τιμών t για Διάστημα Εμπιστοσύνης 95% και $\nu=n-1 = 3-1 = 2$ βαθμούς ελευθερίας (όπου 3 είναι ο αριθμός των **κεντρικών** μετρήσεων), προκύπτει ότι $t_{critical} = 4,303$. Η επίδραση ενός παράγοντα X επάνω σε μια απόκριση θεωρείται σημαντική όταν $|E_x| > E_{critical}$.

No πειράματος (run)	Πειραματική απόκριση (response)								
	Area B.A. (mAU * min)	Area B.C. (mAU * min)	A _f B.A.	A _f B.C.	R _s	N _{θεωρητικές} B.A.	N _{θεωρητικές} B.C.	t _R B.A. (min)	t _R B.C. (min)
8	568,17	148,31	1,67	1,42	3,72	4.859	6.244	2,57	3,13
13	567,32	148,39	1,67	1,5	3,72	5.703	5.439	2,57	3,13
14	567,18	148,72	1,67	1,42	3,72	5.703	5.439	2,57	3,13
Μέγεθος									
SD	0,53	0,22	0,00	0,048	0,00	487,28	464,77	0,00	0,00
SD ²	0,28	0,050	0,00	0,0023	0,00	237.445,33	216.008,33	0,00	0,00
(SE) _e	0,27	0,11	0,00	0,024	0,00	243,64	232,38	0,00	0,00
E_{critical}	1,15	0,48	0,00	0,10	0,00	1.048,39	999,95	0,00	0,00
% E_{critical}	0,20	0,32	0,00	7,14	0,00	19,34	17,52	0,00	0,00

Πίνακας 31: Τα αποτελέσματα της διάκρισης των παραγόντων σε σημαντικούς (\checkmark) και μη σημαντικούς για κάθε απόκριση, βάσει του αν η απόλυτη τιμή της εκάστοτε επίδρασης $|E_x|$ είναι μεγαλύτερη ή όχι από την κρίσιμη επίδραση ($E_{critical}$) μιας απόκρισης. Δηλαδή, η διάκριση έγινε με **στατιστική ερμηνεία** των αποτελεσμάτων της μελέτης ανθεκτικότητας.

Παράγοντες	Πειραματική απόκριση (response)								
	Area B.A. (mAU * min)	Area B.C. (mAU * min)	A _f B.A.	A _f B.C.	R _s	N _{θεωρητικές} B.A.	N _{θεωρητικές} B.C.	t _R B.A. (min)	t _R B.C. (min)
Ροή	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓
pH	✓	✓	✓		✓			✓	✓
% MeOH	✓	✓	✓		✓			✓	✓
C _{άλματος}	✓	✓			✓				
T	✓	✓	✓		✓			✓	✓
λ	✓	✓	✓		✓				
% Et ₃ N	✓	✓	✓		✓				✓

➤ Ερμηνεία μέσω διαγραμμάτων (**graphical interpretation**):

Εναλλακτικά, η ερμηνεία των εκτιμώμενων επιδράσεων (calculated effects) με σκοπό τον προσδιορισμό της σημαντικότητάς τους μπορεί να πραγματοποιηθεί με γραφικό (οπτικό) τρόπο. Κατασκευάζονται είτε χειροκίνητα είτε με τη χρήση ειδικού λογισμικού (στη συγκεκριμένη περίπτωση το Design-Expert v.10 trial version) τα διαγράμματα κανονικής ή ημι-κανονικής πιθανότητας για μια απόκριση. Σε αυτά αναπαρίστανται οι επιδράσεις των παραγόντων ως αποτέλεσμα των τιμών που προκύπτουν από μία κανονική διασπορά. Και στα δύο είδη γραφημάτων οι μη σημαντικές επιδράσεις (non-significant effects) **τείνουν** να βρίσκονται **επάνω** σε μια ευθεία που διέρχεται από το μηδέν ενώ οι σημαντικές επιδράσεις **αποκλίνουν** από αυτή.

Γενικά, τα δύο διαγράμματα οδηγούν σε **παρόμοια** συμπεράσματα. Η διαφορά τους έγκειται στο γεγονός ότι σε ένα διάγραμμα κανονικής πιθανότητας οι πειραματικοί παράγοντες που ασκούν αρνητική επίδραση βρίσκονται αριστερά της καμπύλης, ενώ αυτοί που ασκούν θετική επίδραση βρίσκονται στα δεξιά αυτής. Αντίθετα, σε ένα διάγραμμα ημι-κανονικής πιθανότητας οι στατιστικά σημαντικοί παράγοντες αποκλίνουν ευρισκόμενοι όλοι στα δεξιά της καμπύλης, λόγω του ότι για τη κατασκευή του γραφήματος χρησιμοποιήθηκαν οι απόλυτες τιμές $|E_x|$. Το αποτέλεσμα αυτής της «κατασκευαστικής» διαφοράς είναι ότι στο πρώτο είδος διαγράμματος μπορούμε να διακρίνουμε το **πρόσημο** της επίδρασης ενός παράγοντα (θετική ή αρνητική), ενώ το δεύτερο είδος διαγράμματος προσφέρεται για εύκολη και άμεση **σύγκριση** των επιδράσεων διαφορετικών παραγόντων μεταξύ τους. Αυτό σημαίνει ότι μεταξύ δύο παραγόντων, μεγαλύτερη επίδραση ασκεί εκείνος του οποίου η αντίστοιχη τιμή αποκλίνει περισσότερο από την ευθεία.

Τέλος, εξίσου αξιόλογα εργαλεία για τη γραφική ερμηνεία των επιδράσεων είναι τα διαγράμματα Pareto για μια απόκριση. Τα διαγράμματα αυτά βοηθούν τους χρήστες να κατανοήσουν βαθύτερα τις αιτίες ενός προβλήματος και να επικεντρωθούν στη βάση του και όχι σε δευτερεύοντα ζητήματα. Σε ένα διάγραμμα Pareto παρουσιάζονται **2 οριζόντιες γραμμές**. Η πρώτη γραμμή (χαμηλότερη) θέτει το όριο για ένα δεδομένο διάστημα εμπιστοσύνης (συνήθως 95%) και αναφέρεται ως t-value limit. Η δεύτερη γραμμή (υψηλότερη) θέτει το όριο Bonferoni. Οι μπάρες (κάθετες γραμμές) που εκτείνονται πέρα από τη γραμμή Bonferoni αντιστοιχούν σε παράγοντες που ασκούν στατιστικά σημαντική επίδραση στην απόκριση. Οι μπάρες που βρίσκονται κάτω από τη γραμμή t-value limit αντιστοιχούν σε μη σημαντικούς παράγοντες. Οι μπάρες που εκτείνονται **μεταξύ** των δύο γραμμών είναι **πιθανόν** να ασκούν στατιστικά σημαντική επίδραση πάνω στην απόκριση και ο χαρακτηρισμός τους υπόκειται στη διακριτική ευχέρεια του αναλυτή.

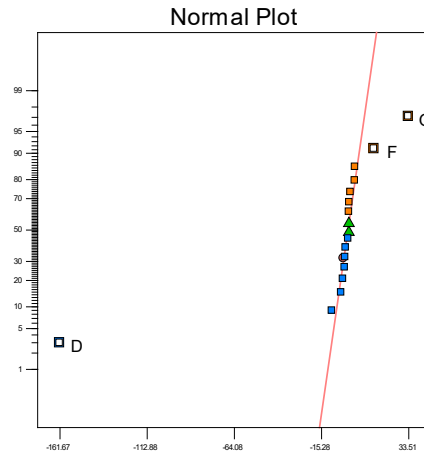
Design-Expert® Software
Areaba

▲ Error from replicates

Shapiro-Wilk test
W-value = 0.934
p-value = 0.420

- A: MeOH
- B: Salt
- C: triethylamine
- D: flow rate
- E: Temperature
- F: Wavelength
- G: pH

■ Positive Effects
■ Negative Effects



X1: Standardized Effect
X2: Normal % Probability

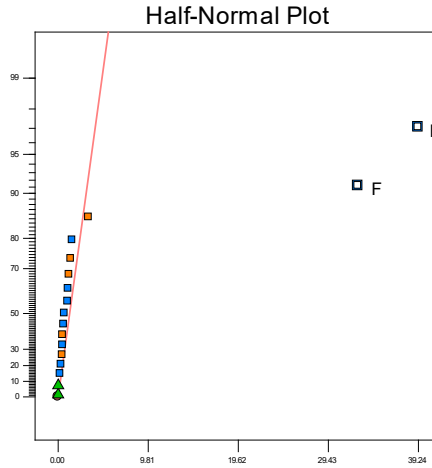
Design-Expert® Software
Areabc

▲ Error from replicates

Shapiro-Wilk test
W-value = 0.896
p-value = 0.116

- A: MeOH
- B: Salt
- C: triethylamine
- D: flow rate
- E: Temperature
- F: Wavelength
- G: pH

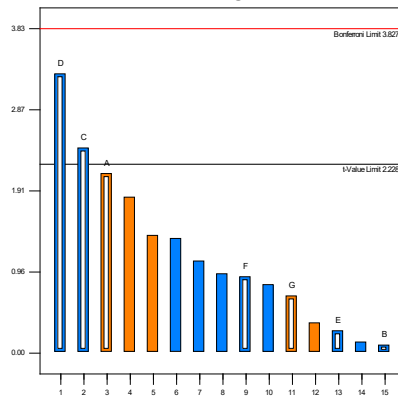
■ Positive Effects
■ Negative Effects



X1: |Standardized Effect|
X2: Half-Normal % Probability

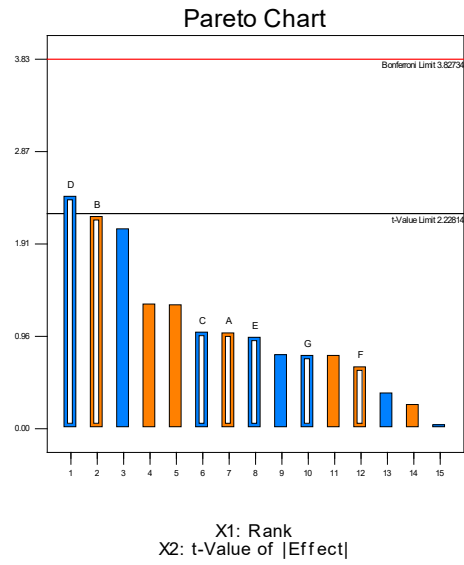
A_f B.A.

Pareto Chart

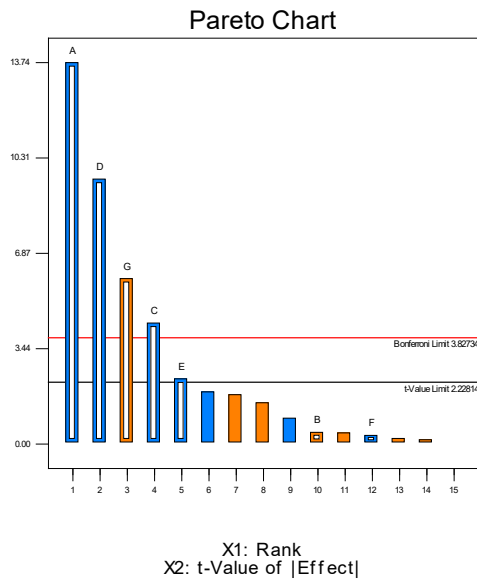


X1: Rank
X2: t-Value of |Effect|

A_f B.C.



R_s



Design-Expert® Software
Nba

▲ Error from replicates

Shapiro-Wilk test

W-value = 0.897

p-value = 0.103

A: MeOH

B: Salt

C: triethylamine

D: flow rate

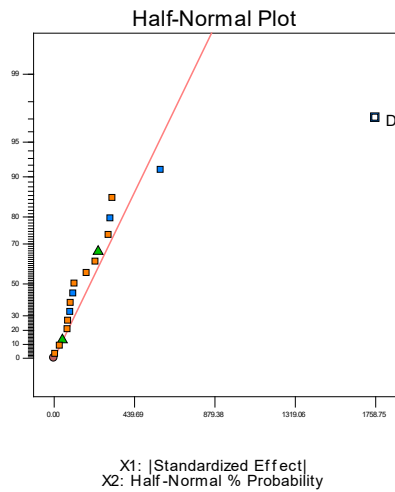
E: Temperature

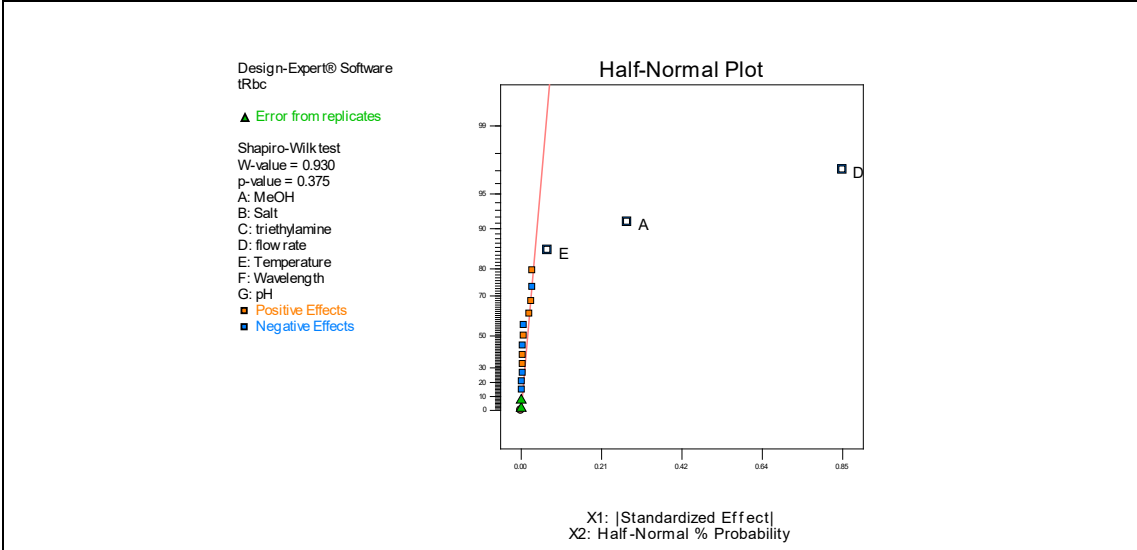
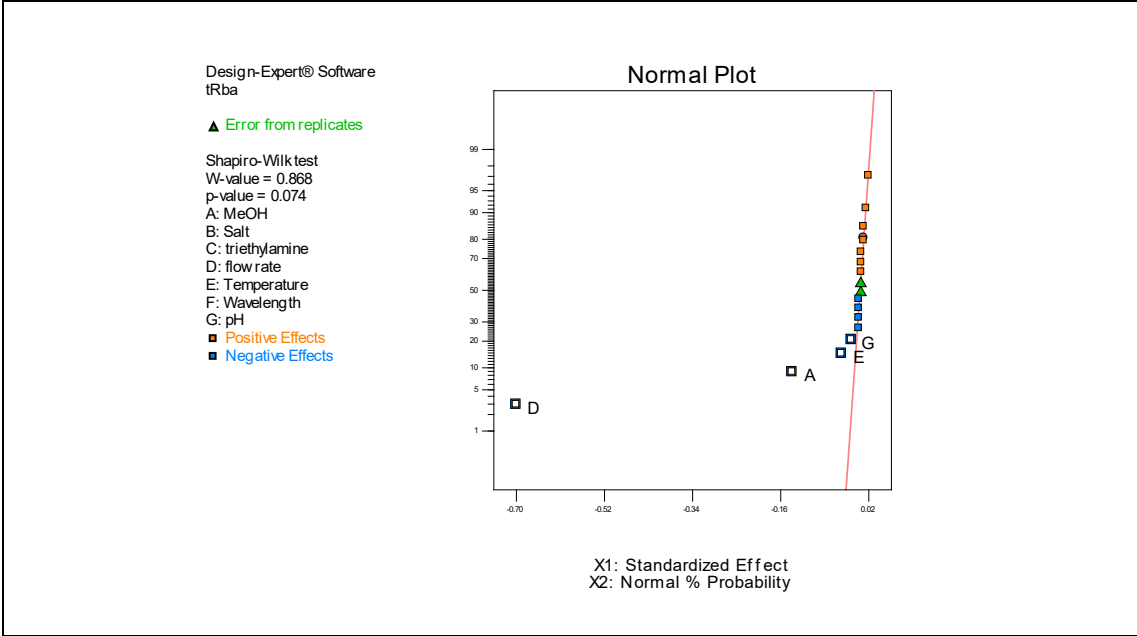
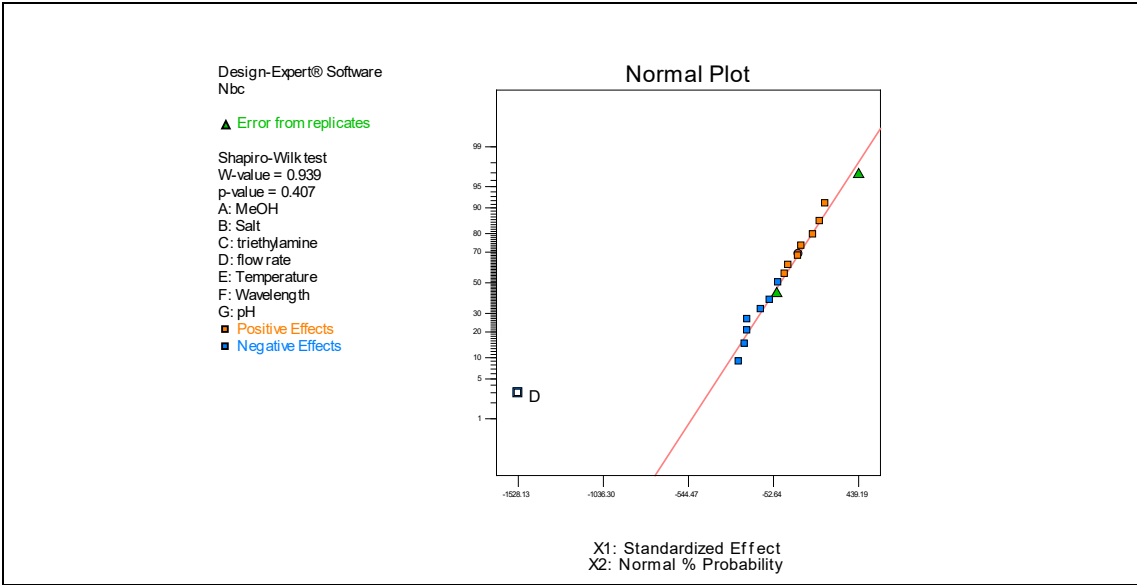
F: Wavelength

G: pH

■ Positive Effects

■ Negative Effects





Σχήμα 37: Διαγράμματα για τη γραφική (οπτική) **ερμηνεία** των εκτιμώμενων επιδράσεων (calculated effects) με σκοπό τον προσδιορισμό της σημαντικότητάς τους.

Με γνώμονα τα βασικά χαρακτηριστικά κάθε είδους διαγράμματος (κανονικής πιθανότητας, ημι-κανονικής πιθανότητας, Pareto) τα οποία σχολιάσαμε πιο πάνω, καθίσταται δυνατή η κατηγοριοποίηση των παραγόντων σε **στατιστικά σημαντικούς** και **μη**. Αυτή τη φορά η αξιολόγηση είναι γραφική και όχι στατιστική. Τα αποτελέσματα μπορούν να συγκριθούν ως προς το **βαθμό συμφωνίας** με τα αντίστοιχα αποτελέσματα από τη στατιστική αξιολόγηση.

*Πίνακας 32: Τα **συγκεντρωτικά αποτελέσματα** της διάκρισης των παραγόντων σε σημαντικούς και μη σημαντικούς για κάθε απόκριση, μετά από **στατική** (✓) και **γραφική** (✓) αξιολόγηση (ερμηνεία). Οι πιθανώς σημαντικοί παράγοντες (από τη γραφική αξιολόγηση) συμβολίζονται με (✓).*

Παράγοντες	Πειραματική απόκριση (response)								
	Area B.A. (mAU * min)	Area B.C. (mAU * min)	A _f B.A.	A _f B.C.	R _s	N _{θεωρητικές} B.A.	N _{θεωρητικές} B.C.	t _R B.A. (min)	t _R B.C. (min)
Ροή	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓	✓	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓
pH	✓ ✓	✓	✓		✓ ✓			✓ ✓	✓
% MeOH	✓	✓	✓		✓ ✓			✓ ✓	✓ ✓
C _{άλατος}	✓	✓			✓				
T	✓	✓	✓		✓ ✓			✓ ✓	✓ ✓
λ	✓ ✓	✓ ✓	✓		✓				
% Et ₃ N	✓	✓	✓ ✓		✓ ✓				✓

➤ Σχολιασμός των συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων:

Από τον παραπάνω συγκεντρωτικό πίνακα παρατηρούμε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα αποτελέσματα από τις δύο μεθόδους αξιολόγησης, με εξαίρεση τις αποκρίσεις t_R B.A. και t_R B.C. Ειδικά στη τελευταία (t_R B.C.) η μόνη «ασυμφωνία» παρατηρείται στον παράγοντα % Et₃N και στο pH. Ωστόσο, οφείλουμε να τονίσουμε ότι η τιμή |E_x| για τον παράγοντα % Et₃N (0,030) είναι ελάχιστα μεγαλύτερη από τη τιμή E_{critical} της απόκρισης t_R B.C. (0,00) και επομένως ο χαρακτηρισμός του ως **σημαντικός** είναι αρκετά «αυστηρός». Το ίδιο ισχύει για τον παράγοντα pH (0,027 έναντι 0,00).

Γενικότερα, φαινόμενα σαν και αυτό παρατηρούνται και σε αρκετές άλλες περιπτώσεις παραγόντων. Αυτό είναι κάτι αναμενόμενο διότι, όπως προαναφέραμε, **η μέθοδος της στατιστικής ανάλυσης είναι πιο έγκυρη και αντικειμενική αλλά σαφώς πιο απόλυτη και λιγότερο ελαστική από τη γραφική μέθοδο**. Ως άλλο ένα ενδεικτικό παράδειγμα αναφέρουμε τον παράγοντα θερμοκρασία (T) όπου η τιμή |E_x| για την απόκριση A_f B.A., (0,011) είναι ελάχιστα μεγαλύτερη από την αντίστοιχη τιμή E_{critical} (0,00). Ακριβώς το ίδιο συμβαίνει με τον παράγοντα C_{άλατος} και την απόκριση R_s (0,02 > 0,00) αλλά και με τον παράγοντα λ και τις αποκρίσεις A_f B.A., και R_s (0,039 > 0,00 και 0,016 > 0,00).

Τα παραδείγματα «οριακού χαρακτηρισμού» ενός παράγοντα ως σημαντικού ολοκληρώνονται με την απόκριση A_f B.A. ($E_{critical} = 0,00$) και τους παράγοντες % MeOH ($|E_x| = 0,09$) και pH ($|E_x| = 0,029$).

Τα οριακά φαινόμενα που περιγράψαμε παραπάνω μας οδηγούν να **προτείνουμε την εξαίρεση** αυτών των παραγόντων από τη λίστα των σημαντικών. Αφενός μεν οι τιμές $|E_x|$ είναι πολύ μικρές για αυτούς (σχεδόν αμελητέες), αφετέρου δε οι αντίστοιχες τιμές $E_{critical}$ των αποκρίσεων είναι υπερβολικά μικρές (για την ακρίβεια μηδενικές). Αυτό συμβαίνει διότι οι τιμές A_f B.A., R_s, t_R B.A. και t_R B.C. του πίνακα 32 είναι απόλυτα επαναλήψιμες και έχουν τυπική απόκλιση SD=0.

Σημείωση: Σε ανάλογες **οριακές** περιπτώσεις π.χ. pH και απόκριση t_R B.A. ($0,019 > 0,00$) ή T και αποκρίσεις t_R B.A. ($0,040 > 0,00$) t_R B.C. ($0,070 > 0,00$) στις οποίες όμως ο παράγοντας κρίθηκε ως σημαντικός **και** γραφικά, (συμφωνία των δύο μεθόδων αξιολόγησης) **δεν** θεωρούμε ότι τίθεται ζήτημα εξαίρεσης.

Συνεχίζοντας το σχολιασμό των συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων παρατηρούμε ότι η γραφική αξιολόγηση αποκαλύπτει έναν επιπλέον σημαντικό παράγοντα (ροή) για την απόκριση A_f B.C, κάτι που **δε** συμφωνεί με τη στατιστική μέθοδο. Αυτό είναι αρκετά σπάνιο, διότι η τελευταία είναι πιο **αυστηρή** και **ενδεδειγμένη** από την πρώτη. Ωστόσο, όπως φαίνεται στο διάγραμμα Pareto, η μπάρα D (=ροή) εκτείνεται **μεταξύ** των γραμμών Bonferoni και t-value limit. Αυτό σημαίνει ότι δεν είναι σίγουρο το αν πρόκειται για σημαντικό παράγοντα. Εφόσον κάτι τέτοιο δε προκύπτει από τη βασική μέθοδο (στατιστική) κρίνουμε ότι ο παράγοντας αυτός δεν είναι σημαντικός.

Με βάση τα παραπάνω, κατασκευάζουμε τον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 33: Οι **προτεινόμενοι** σημαντικοί παράγοντες για κάθε απόκριση, μετά από τη **διόρθωση** κάποιων αποτελεσμάτων που οφείλονταν σε «οριακές περιπτώσεις» (βλ. Πίνακα 32 και συζήτηση αποτελεσμάτων εντός του κειμένου).

Παράγοντες	Πειραματική απόκριση (response)								
	Area B.A. (mAU * min)	Area B.C. (mAU * min)	A _f B.A.	A _f B.C.	R _s	N _{θεωρητικές} B.A.	N _{θεωρητικές} B.C.	t _R B.A. (min)	t _R B.C. (min)
Ροή	√ √	√ √	√ √		√ √	√ √	√ √	√ √	√ √
pH	√ √	√			√ √			√ √	
% MeOH	√	√			√ √			√ √	√ √
C _{άλματος}	√	√							
T	√	√			√ √			√ √	√ √
λ	√ √	√ √							
% Et ₃ N	√	√	√ √		√ √				

Ο πίνακας που προκύπτει μετά από την εξαίρεση κάποιων παραγόντων από τη λίστα των σημαντικών, αποτελεί μια τροποποιημένη μορφή του Πίνακα 32. Είναι φανερό ότι οι «οριακά σημαντικοί παράγοντες» που εξαιρέθηκαν συνιστούσαν **ως επί το πλείστον** τα κύρια **σημεία διαφοράς** μεταξύ των δύο μεθόδων ερμηνείας των αποτελεσμάτων. Στον νέο Πίνακα (Πίνακας 33) ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των δύο διαφορετικών προσεγγίσεων είναι σαφώς μεγαλύτερος (85% έναντι 71%). Φυσικά, η στατιστική μέθοδος **εξακολουθεί** να αποκαλύπτει περισσότερους σημαντικούς παράγοντες. Αυτό, όπως έχει ήδη αναφερθεί πολλάκις, είναι **απόλυτα αναμενόμενο** και γι' αυτό η μέθοδος αυτή θεωρείται πιο έγκυρη.

Κλείνοντας, συμπεραίνουμε ότι η δοκιμασία ανθεκτικότητας υποδεικνύει κάθε έναν από τους 7 υπό εξέταση παράγοντες σημαντικό για τουλάχιστον 2 από τις 9 αποκρίσεις. Η απλούστερη περίπτωση είναι ο παράγοντας «C_{άλατος}», ο οποίος μεταξύ των σημαντικών παραγόντων φαίνεται να είναι **ο λιγότερο κρίσιμος**. Αντιθέτως, ο παράγοντας «ροή» φαίνεται να είναι **ο πιο καθοριστικός** και να επηρεάζει 6 από τις 7 αποκρίσεις, όπως προτείνεται από αμφότερες τις μεθόδους ελέγχου (στατιστική, γραφική). Επιπλέον, **εξίσου κρίσιμοι** είναι οι παράγοντες «pH της κινητής φάσης» (πρέπει να ρυθμίζεται με ιδιαίτερη ακρίβεια) και «% ποσοστό Et₃N» (πρόσθετο που χρησιμεύει ως απενεργοποιητής, βλ. παρ. 3.3.3).

Τέλος, ο ακριβής καθορισμός του μήκους κύματος (λ) στον ανιχνευτή είναι **αρκετά σημαντικός** για την ικανοποιητική και επαναλήψιμη απορρόφηση των δύο αναλυτών (προτείνεται και από τις δύο μεθόδους), ενώ οι παράγοντες «θερμοκρασία στήλης» και «% ποσοστό MeOH» φαίνεται να επηρεάζουν κυρίως την τιμή R_s. Ωστόσο, ο διαχωρισμός των αναλυτών είναι εγγενώς πολύ καλός (διαχωρίστηκαν εξ' αρχής ικανοποιητικά με R_s>3,5). Επομένως, δεν υφίσταται ιδιαίτερος κίνδυνος αλληλοεπικάλυψης για τις κορυφές. Συνίσταται, απλώς, η διατήρηση του διαχωρισμού σε ένα ενδεικτικό επίπεδο-στόχο με σκοπό την σωστή και επαναλήψιμη ολοκλήρωση κάθε κορυφής.

Σημείωση: Μετά το πέρας ενός ελέγχου ανθεκτικότητας μπορούν να υπολογιστούν εκ νέου τα **όρια ανοχής** (αναφέρονται και απλά ως **ανοχές**) για κάθε παράμετρο η οποία κρίθηκε ως σημαντική. Ο υπολογισμός των ανοχών γίνεται με μαθηματικό τρόπο, από τον παρακάτω τύπο⁸⁰.

$$\left[X_0 - \frac{|X_1 - X_{-1}| * E_{\text{critical}}}{2 * |E_x|}, X_0 + \frac{|X_1 - X_{-1}| * E_{\text{critical}}}{2 * |E_x|} \right] \quad (24)$$

, όπου X₀, X₁, X₋₁ είναι οι τιμές ενός πειραματικού παράγοντα X στα επίπεδα 0, 1 και -1 αντίστοιχα. Μετά την εκτέλεση των υπολογισμών, προκύπτουν οι ανοχές:

- Ροή: 1,5 mL/min \pm 0,3 mL/min
 - pH: 3 \pm 0,2
 - % MeOH: 50% \pm 2%
- C_{άλατος}: 50 mM \pm 2 mM
 - T: 36 °C \pm 2 °C
 - λ: 210 nm \pm 2 nm
 - % Et₃N: 1% \pm 0,05 %

5.3.8 Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού σε σκεύασμα

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα από τη χρωματογραφική ανάλυση δείγματος σιροπιού με σκοπό τον υπολογισμό της περιεκτικότητάς του σε δραστική ουσία (κιτρική βουταμιράτη) και σε συντηρητικό (βενζοϊκό οξύ). Το δείγμα προέρχεται από φαρμακευτικό σκεύασμα (σιρόπι) με τα εξής στοιχεία: LOT #191022911, AO 1030501-EXP 31/10/2024. Η **ονομαστική** συγκέντρωση του σκευάσματος είναι C_{B,C}=5mg/5 mL. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στις 28/02/2020.

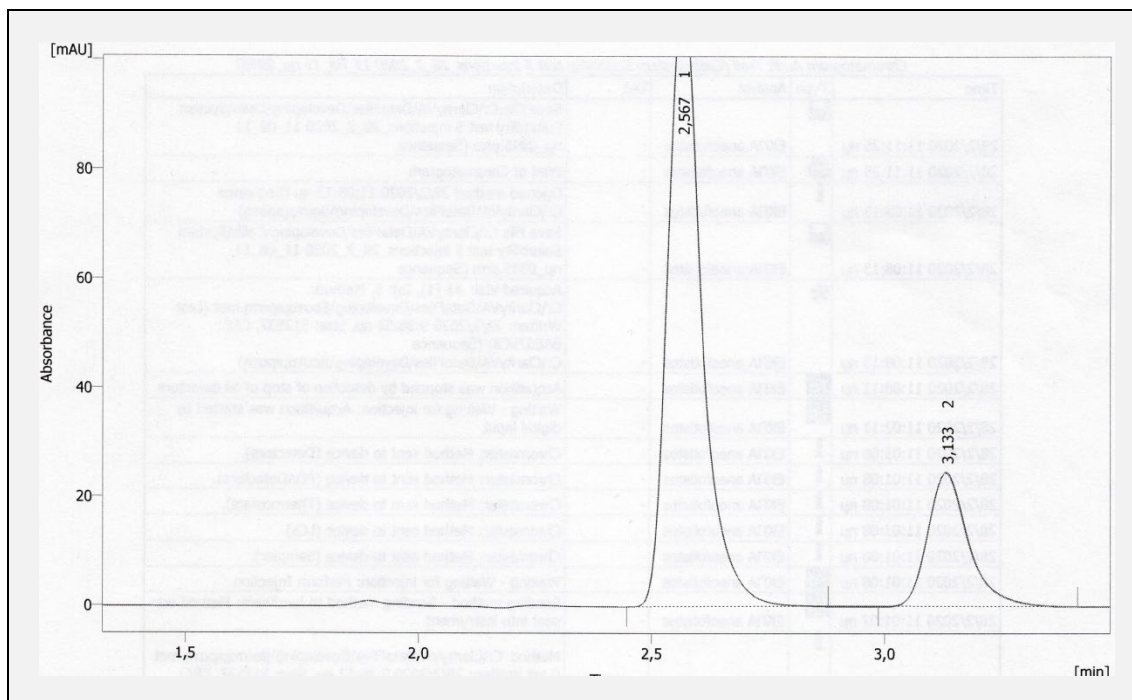
Με βάση το πειραματικό πρωτόκολλο που παρουσιάζεται λεπτομερώς στην παράγραφο 5.3.1, παρασκευάστηκαν όλα τα απαραίτητα διαλύματα και στη συνέχεια εκτελέστηκε ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Τα αποτελέσματα καταγράφονται, επεξεργάζονται και αξιολογούνται:

Πίνακας 34: Καταγραφή, επεξεργασία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων από τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος.

Έλεγχος καταλληλότητας συστήματος					
Αναλύτης: Βενζοϊκό Οξύ					
No ένεσης για το διάλυμα αναφοράς	Εμβαδόν χρωματογραφικής κορυφής (Area)	Χρόνος συγκράτησης (t _R)	Αριθμός θεωρητικών πλακών (N)	Διαχωρισμός (R _s)	Παράγοντας ασυμμετρίας της κορυφής (A _s)
1	573,64	2,57	5.703	3,86	1,40
2	572,55	2,57	5.703	3,86	1,56
3	574,61	2,57	5.703	3,86	1,67
4	574,87	2,57	5.703	3,81	1,40
5	573,85	2,57	5.703	3,86	1,40
Μέσος όρος	573,90	2,57	5.703 \geq 4.000	3,849 \geq 3	1,48 \leq 1,6
SD	0,91	0,00	0,00	0,021	
%RSD	0,16 \leq 1%	0,00 \leq 1%	0,00 \leq 1%	0,53 \leq 1%	
Αναλύτης: Κιτρική Βουταμιράτη					
1	150,87	3,13	6.244	3,86	1,42
2	150,25	3,13	6.244	3,86	1,42
3	150,85	3,13	6.244	3,86	1,42
4	150,77	3,13	6.217	3,81	1,64
5	151,06	3,13	6.244	3,86	1,42

Μέσος όρος	150,76	3,13	6.239 ≥ 4.000	3,849 ≥ 3	1,46 ≤ 1,6
SD	0,31	0,00	12	0,021	
%RSD	0,20 ≤ 1%	0,00 ≤ 1%	0,19 ≤ 1%	0,53 ≤ 1%	

Τα κριτήρια αποδοχής ικανοποιούνται, οπότε προχωράμε στους τελικούς υπολογισμούς.



Result Table (Uncal - Calib)System Suitability test 5 injections_28_2_2020 10_38_56 ημ_0301 - PDA1-210nm-at-1nm

	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	W05 [min]	Compound Name	Asymmetry [-]	Efficiency [th.pl]	Resolution [-]
1	2,567	573,637	0,08		1,400	5703	
2	3,133	150,873	0,09		1,417	6244	3,858
Total		724,509					

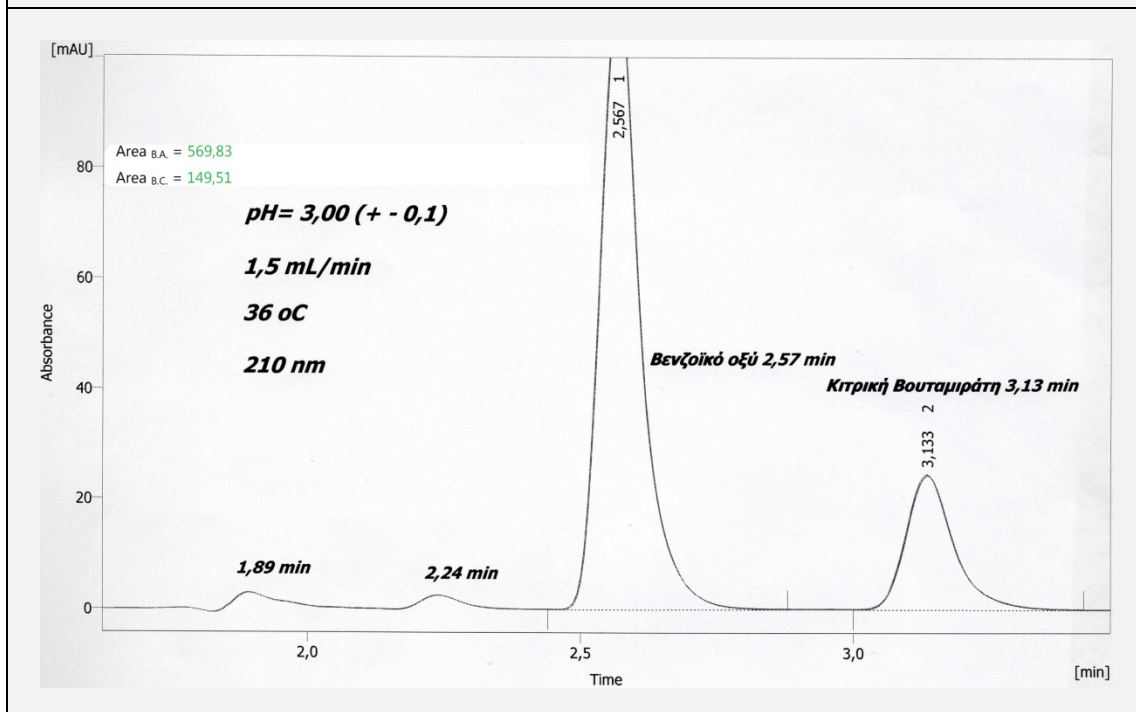
Result Table (Uncal - Calib)System Suitability test 5 injections_28_2_2020 10_46_15 ημ_0312 - PDA1-210nm-at-1nm

	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	W05 [min]	Compound Name	Asymmetry [-]	Efficiency [th.pl]	Resolution [-]
1	2,567	572,548	0,08		1,556	5703	
2	3,133	150,245	0,09		1,417	6244	3,858
Total		722,794					

Result Table (Uncal - Calib) System Suitability test 5 injections_28_2_2020 10_53_33 ημ_0323 - PDA1-210nm-at-1nm							
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	W05 [min]	Compound Name	Asymmetry [-]	Efficiency [th.pl]	Resolution [-]
1	2,567	574,608	0,08		1,667	5703	
2	3,133	150,846	0,09		1,417	6244	3,858
Total		725,455					

Result Table (Uncal - Calib) System Suitability test 5 injections_28_2_2020 11_00_52 ημ_0334 - PDA1-210nm-at-1nm							
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	W05 [min]	Compound Name	Asymmetry [-]	Efficiency [th.pl]	Resolution [-]
1	2,567	574,872	0,08		1,400	5703	
2	3,127	150,765	0,09		1,636	6217	3,812
Total		725,638					

Result Table (Uncal - Calib) System Suitability test 5 injections_28_2_2020 11_08_11 ημ_0345 - PDA1-210nm-at-1nm							
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	W05 [min]	Compound Name	Asymmetry [-]	Efficiency [th.pl]	Resolution [-]
1	2,567	573,851	0,08		1,400	5703	
2	3,133	151,057	0,09		1,417	6244	3,858
Total		724,907					



Σχήμα 38: Το πειραματικό πρωτόκολλο της μεθόδου περιλαμβάνει τη παρασκευή ενός προτύπου διαλύματος εργασίας της καθαρής ουσίας, το οποίο αναφέρεται και ως **διάλυμα αναφοράς**, και ενός διαλύματος εργασίας του δείγματος, το οποίο αναφέρεται και ως **διάλυμα ελέγχου**. Η τελική συγκέντρωση (συγκέντρωση εργασίας) ήταν $C_{B.C.} = 50,0 \mu\text{g/mL}$ και $C_{B.A.} = 100 \mu\text{g/mL}$ και για τα δύο διαλύματα. **Επάνω και μέση: Τεκμηρίωση** των αποτελεσμάτων από τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος (**SST**). Ο έλεγχος αυτός γίνεται με τη χρήση του διαλύματος αναφοράς (5 διαδοχικές ενέσεις) και εξασφαλίζει την αξιοπιστία του αναλυτικού εξοπλισμού κατά την καθημερινή χρήση του σε επίπεδο ρουτίνας. Το συνολικό χρωματογράφημα ελήφθη με **υπέρθυση** των επί μέρους χρωματογραφημάτων. **Κάτω:** Το χρωματογράφημα από την ανάλυση του διαλύματος ελέγχου.

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε έναν αναλύτη προκύπτει από τη παρακάτω σχέση:

$$\frac{\text{AREA}_{\text{ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ}}}{\text{AREA}_{(\text{MEAN}) \text{ ΠΡΟΤΥΠΟΥ}}} * \frac{\text{Συγκέντρωση ΠΡΟΤΥΠΟΥ}}{\text{Συγκέντρωση ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ}} * 100\% \quad (25)$$

, αφού πρώτα ληφθεί υπόψη η **καθαρότητα** του HWS της κιτρικής βουταμιράτης (99,0%) και του HWS του βενζοϊκού οξέος (99,7%) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη παρασκευή του προτύπου διαλύματος παρακαταθήκης (STOCK). Από το **συμπυκνωμένο** αυτό διάλυμα προκύπτει με αρραίωση το διάλυμα αναφοράς (βλ. παράγραφο 5.3.1). Η τιμή της καθαρότητας επιηρεάζει την τιμή του όρου «Συγκέντρωση ΠΡΟΤΥΠΟΥ», ο οποίος εμείς επιθυμούμε να είναι 100 µg/mL για το B.A. και 50,0 µg/mL για την B.C.

Από τον παραπάνω τύπο προκύπτει ότι η περιεκτικότητα του σκευάσματος σε κιτρική βουταμιράτη είναι ίση με 98,38 %, ενώ η περιεκτικότητα σε βενζοϊκό οξύ είναι ίση με 98,99 %.

Η αξιολόγηση των επιμέρους χαρακτηριστικών ποιότητας οδήγησε στην πειραματική τεκμηρίωση της ανταπόκρισης της μεθόδου ως προς τις ζητούμενες προδιαγραφές (specifications) και στην απόδειξη της καταλληλότητας της σχετικά με το σκοπό για τον οποίο αυτή προορίζεται (fitness for purpose). Πρόκειται για μια μέθοδο απλή, εύχρηστη, γρήγορη και ειδική (εκλεκτική), με ικανοποιητική ανθεκτικότητα και γραμμικότητα και με εξαιρετικά χαρακτηριστικά ακρίβειας, ορθότητας και πιστότητας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Πύλη για την Ελληνική γλώσσα και τη γλωσσική εκπαίδευση <http://www.greek-language.gr/greekLang/index.html> Accessed October 1st, 2020.
2. Chung, K. F. & Pavord, I. D. Prevalence, pathogenesis, and causes of chronic cough. *The Lancet* **371**, 1364–1374 (2008).
3. *Harrison's principles of internal medicine: editors, Anthony S. Fauci ... [et al.]*. (McGraw-Hill Medical, 2008).
4. Canning, B. J. *et al.* Anatomy and Neurophysiology of Cough. *Chest* **146**, 1633–1648 (2014).
5. Pavord, I. D. & Chung, K. F. Management of chronic cough. *The Lancet* **371**, 1375–1384 (2008).
6. Κουτσελίνης Α (Εθνικό και ΚΠΑ. ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ. ΑΘΗΝΑ: ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε; 2004.
7. Finkel, R., Whalen, K., Finkel, R. & Panavelli, T. A. *Pharmacology*. (Wolters Kluwer, 2015).
8. Katzung, B. G. *Basic & clinical pharmacology*. (2018).
9. Pavesi, L., Subburaj, S. & Porter-Shaw, K. Application and Validation of a Computerized Cough Acquisition System for Objective Monitoring of Acute Cough. *Chest* **120**, 1121–1128 (2001).
10. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), <https://iupac.org/>.
11. Ελληνικός Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων (ΕΟΦ), <https://www.eof.gr/> Εγκύκλιος-Απόφαση: Καθορισμός Περιλήψης Χαρακτηριστικών του Προϊόντος (SPC) και Φύλλου Οδηγιών για το Χρήστη φαρμακευτικών προϊόντων που περιέχουν το δραστικό συστατικό BUTAMIRATE CITRATE Αρ. Πρωτ.: 45964, Αθήνα 30/06/2009.
12. Wisher, D. Martindale: The Complete Drug Reference. 37th ed. *J Med Libr Assoc* **100**, 75–76 (2012).

13. Bayram, E., Karakaya, P., Topcu, Y., Yis, U. & Hiz, S. Acute Cervical Dystonia After the First Dose of Butamirate Citrate: *Pediatric Emergency Care* **29**, 80–81 (2013).
14. Charpin, J. & Weibel, M.-A. Comparative Evaluation of the Antitussive Activity of Butamirate Citrate Linctus versus Clobutinol Syrup. *Respiration* **57**, 275–279 (1990).
15. Płusa, T. [Butamirate citrate in cough controlling]. *Pol. Merkur. Lekarski* **35**, 367–369 (2013).
16. Malliou, E. T., Antoniou, C. G. & Koundourellis, J. E. Determination of Butamirate Citrate in Cough Preparations by Derivative UV Spectrophotometry and High Performance Liquid Chromatography. *Anal. Sci.* **19**, 563–568 (2003).
17. Haider, M. Development and Validation of a Stability Indicating HPLC Method for the Estimation of Butamirate Citrate and Benzoic Acid in Pharmaceutical Products. *J Chromatograph Separat Techniq* **02**, (2011).
18. Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία, Έκδοση 10η, *European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition. Applicable in Europe from 1 January 2020*. https://www.edqm.eu/en/european_pharmacopoeia_10th_edition.
19. *Pharmacopoea Bohemica MMIX (Ph. Boh / Český Lékopis) 2009 (Czech Pharmacopoeia)*. monography: *Butamirate Citrate/Butamirati dihydrogenocitras*, pages 3.782-3.785.
20. *Marvin suite by ChemAxon. Free for individual, academic and non-commercial use*. <https://chemaxon.com/products/marvin>.
21. Χρωματογραφική συμπεριφορά και προσδιορισμός αντιβηχικών-αποχρεμπτικών φαρμάκων σε σκευάσματα και βιολογικά υγρά με ΥΧΥΑ-Διδακτορική διατριβή. Ελευθερία Θ. Μάλλιου-ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη 2002.
22. Butamirate-DrugBank database / Latest release of DrugBank (version 5.1.5, released 2020-01-03): a unique bioinformatics and cheminformatics resource that combines detailed drug data with comprehensive drug target information. <https://www.drugbank.ca/> Accessed October 1st, 2020.
23. PubChem database: Butamirate citrate, Butamirate, Citric acid. Collection of freely accessible chemical information (chemical and physical properties, biological activities, safety and toxicity information, patents, literature citations). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> Accessed October 1st, 2020.
24. Płusa, T. [Butamirate citrate in control of cough in respiratory tract inflammation]. *Pol. Merkur. Lekarski* **43**, 69–74 (2017).
25. Βουταμιράτη: Δραστική ουσία: Φαρμακολογικές ιδιότητες: Φαρμακοκινητική. Γαληνός. <https://www.galinos.gr/web/drugs/main/substances/butamirate/pharmacology> Accessed Oct 1st 2020.
26. Paul, A. K. *et al.* Development and validation of a new stable HPLC method for the assay of butamirate citrate in pharmaceutical formulations. *Advances in Natural and Applied Sciences* **5**, 75–84 (2011).
27. Mikó, P. [The use and safety of butamirate containing drops, syrup and depot tablets in Hungary]. *Orv Hetil* **146**, 609–612 (2005).
28. Brayfield, A. *Martindale: the complete drug reference*. (Pharmaceutical Press, 2017).
29. Duraković, Z., Gjurasin, M., Gasparović, V., Ivanović, D. & Plavšić, F. [Simultaneous poisoning with medigoxin, verapamil, insulin, medazepam, diazepam, butamirate, triamterene and hydrochlorothiazide]. *Lijec Vjesn* **105**, 365–369 (1983).
30. Sinecod ΠΧΠ: SPC, Greece: SINECOD Σιρόπι / Διάλυμα πόσιμο, σταγόνες / Δισκία ελεγχόμενης αποδέσμευσης <https://www.galinos.gr/web/drugs/main/citations/1956> Accessed October 1st, 2020.
31. Heinänen, M. & Barbas, C. Validation of an HPLC method for the quantification of ambroxol hydrochloride and benzoic acid in a syrup as pharmaceutical form stress test for stability evaluation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **24**, 1005–1010 (2001).
32. Qualley, A. V., Widhalm, J. R., Adebesein, F., Kish, C. M. & Dudareva, N. Completion of the core - oxidative pathway of benzoic acid biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 16383–16388 (2012).
33. Reverse phase high performance liquid chromatography [RP-HPLC] determination of benzoic acid and salicylic acid in the bulk API dosage forms. https://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/110204/14/14_part%20c.pdf.
34. I. Pastrorova, C.G. de Koster, J.J. Boom, *Phytochem. Anal.* **8**: 63–73. GSFA Online Food Additive Group Details: Benzoates 2006.
35. Loginova, L. P., Kulikov, A. U., Yakovleva, E. Y. & Boichenko, A. P. MLC Determination of Preservatives in Cranberry Foodstuffs. *Chroma* **67**, 615–620 (2008).
36. Iammarino, M., Di Taranto, A., Palermo, C. & Muscarella, M. Survey of benzoic acid in cheeses: contribution to the estimation of an admissible maximum limit. *Food Additives and Contaminants: Part B* **4**, 231–237 (2011).

37. Substrate/Product. 'butyrate-CoA ligase'. BRENDA. Technische Universität Braunschweig. & Substrate/Product. 'glycine N-acyltransferase'. BRENDA. Technische Universität Braunschweig. Revised: October 1st, 2020.
38. *Οργανική Χημεία*, L.G. Wade, JR., Εκδόσεις Τζιόλα, 7η Έκδοση. ISBN: 9789604183135, ISBN 10: 960-418-313-3.
39. Validated Rp-Hplc method for the estimation of benzoic acid in bulk and pharmaceutical Formulation; *Der Chemica Sinica*, 2014, 5(5):52-60 (ISSN: 0976-8505) M. Madhu, V. Sreeram, A. V. D. Nagendrakumar and T. V. Reddy.
40. *Hawley's condensed chemical dictionary*. (John Wiley & Sons, Inc, 2016).
41. Yalkowsky, S. H., He, Y. & Jain, P. *Handbook of aqueous solubility data*. (2010).
42. *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. (Royal Society of Chemistry, 2013).
43. Benzoic Acid-DrugBank database / Latest release of DrugBank (version 5.1.5, released 2020-01-03): a unique bioinformatics and cheminformatics resource that combines detailed drug data with comprehensive drug target information. <https://www.drugbank.ca/> Accessed October 1st, 2020.
44. PubChem database: Benzoic Acid. Collection of freely accessible chemical information (chemical and physical properties, biological activities, safety and toxicity information, patents, literature citations). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> Accessed October 1st, 2020.
45. Salkowski E (1875). *Berl Klin Wochenschr* 12: 297–298.
46. Brevoxyl ΠΧΠ: SPC, Greece: BREVOXYL Cream <https://www.galinos.gr/web/drugs/main/substances/benzoyl/pharmacology> Accessed Oct. 1st, 2020.
47. Saeedan, A. RP-HPLC Determination of Benzoic Acid in Samples of Children Food Distributed in Aden-Yemen. *IRJPAC* 4, 507–519 (2014).
48. Aksu Dönmez, Ö., Dinç-Zor, Ş., Aşçı, B. & Şen, E. Simultaneous HPLC-DAD determination of pseudoephedrine HCl, sodium benzoate, sunset yellow, and methyl paraben in syrup preparation by use of partial least squares and principal component regression. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 42, 648–653 (2019).
49. T, S., Manthena, K., V R, R. & V, G. HPLC METHOD FOR THE DETERMINATION OF AMBROXOL HCL IN THE PRESENCE OF ANTIMICROBIAL PRESERVATIVES IN ORAL LIQUID FORMULATION. *J Pharm Sci Innov* 4, 134–139 (2015).
50. Pharmaceutical Society of Great Britain, Pharmaceutical Society of Great Britain & Department of Pharmaceutical Sciences. *British pharmaceutical codex*. (Pharmaceutical Press, 1994).
51. MG. El-Ziney. CG-MS analysis of benzoate and sorbate in saudi dairy and food products with estimation of daily exposure. *J Food Technol*. 2009, 7, 127-134.
52. Nambiar, A. P., Sanyal, M. & Shrivastav, P. S. Simultaneous densitometric determination of eight food colors and four sweeteners in candies, jellies, beverages and pharmaceuticals by normal-phase high performance thin-layer chromatography using a single elution protocol. *Journal of Chromatography A* 1572, 152–161 (2018).
53. Yang, J. *et al*. Simultaneous Determination of Six Parabens in Foods by Matrix Liquid-Phase Dispersion Extraction Combined with High-Performance Liquid Chromatography. *Food Anal. Methods* 7, 1693–1702 (2014).
54. Ye, N., Shi, P., Li, J. & Wang, Q. Application of Graphene as Solid Phase Extraction Absorbent for the Determination of Parabens in Cosmetic Products by Capillary Electrophoresis. *Analytical Letters* 46, 1991–2000 (2013).
55. Hashim Al Sultani, K. Kh., Mohammed Al-Rashidy, A. A. & Al-Samrrai, S. Y. Determination of tartrazine and sodium benzoate as food additives in some local juices using continuous flow injection analysis. *Engineering in Agriculture, Environment and Food* 12, 217–221 (2019).
56. The European Parliament. Regulation EC No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December on Food Additives. *Off. J. Eur. Union*. 2008, 354, 16–33.
57. Skinoren ΠΧΠ: SPC, Greece: SKINOREN Cream <https://www.galinos.gr/web/drugs/main/packages/8320/precautions> Accessed October 1st, 2020.
58. Berg, J. M. *et al*. *Viochēmeia*. (Panepistēmiakes Ekdoseis Krētēs, 2004).
59. Skoog, D. A., Holler, F. J. & Nieman, T. A. *Arches tēs enorganēs analysēs*. (Kōstarakēs, 2005).
60. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα (Κεφάλαιο 8ο Συγγραμματος). Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούτης, Χ., Παπαϊωάννου, Α., Πλαγιάς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ., Φούντζουλα, Χ. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/5388> (Σύγγραμμα: Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας (2015). Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούτης, Χ., Παπαϊωάννου, Α., Πλαγιάς, Π., Σπυρόπουλος, Β.,

- Τσότσου, Γ., Φούντζουλα, Χ. [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/5382>. in.
61. Watson, D. G. *Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. (Elsevier/Churchill Livingstone, 2005).
62. ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ, Ειρήνη Παντερή, Μαρία Παρίση-Πούλου, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, ΑΘΗΝΑ 2015.
63. Snyder, L. R., Kirkland, J. J. & Dolan, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. (John Wiley & Sons, Inc., 2009). doi:10.1002/9780470508183.
64. Martin, A. J. P. & Synge, R. L. M. A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochemical Journal* **35**, 1358–1368 (1941).
65. ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ «Στατιστική-Χημειομετρία» Μ. Κουππάρης (Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ) ΠΜΣ «Φαρμακευτική Ανάλυση-Έλεγχος Ποιότητας», Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, ΑΘΗΝΑ, 2019.
66. Katz, E., Ogan, K. L. & Scott, R. P. W. Peak dispersion and mobile phase velocity in liquid chromatography: the pertinent relationship for porous silica. *Journal of Chromatography A* **270**, 51–75 (1983).
67. Dyson, N. A. *Chromatographic integration methods*. (Royal Society of Chemistry, 1998).
68. The Theory of HPLC- CHAPTER: Reverse phase (partition) chromatography with Quick Guide! <https://www.chromacademy.com/hplc-training.html> Accessed Oct 1st, 2020. LC-GC's CHROMacademy powered by Crawford scientific; The world's largest e-Learning website for analytical scientists (<https://www.chromacademy.com/index.html>).
69. Χημεία β' Λυκείου θετικής κατεύθυνσης, Οργανισμός Εκδόσεων Διδακτικών Βιβλίων, ΑΘΗΝΑ 2007.
70. Restek Chromatography Products and Solutions <https://www.restek.com/> Accessed October 1st, 2020.
71. Μ.Δ.Ε. «Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων HPLC με χρήση ανιχνευτή δείκτη διάθλασης και συστοιχίας φωτοδιόδων, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των δραστικών ουσιών και των προσμίξεων τους σε δισκία νατριούχου αλενδρονάτης - χοληκαλσιφερόλης». Γιαννακόπουλος Σπήλιος- ΕΚΠΑ, Αθήνα 2015.
72. Snyder, L. R., Kirkland, J. J. & Glajch, J. L. *Practical HPLC method development*. (Wiley, 1997).
73. 'Application of an optical compensation method to the simultaneous determination of butamirate citrate and sodium benzoate by derivative spectrophotometry in the ultraviolet.' Dol, I., C. Altesor, and M. Knochen. *Quimica Analitica* 15.2 (1996): 148-153.
74. "Spectrophotometric determination of some anti-tussive drugs and its applications to pharmaceutical formulations," A. A. Gouda, R. El Sheikh, and A. S. Amin, *Analytical Chemistry*, vol. 7, no. 10, pp. 757–767, 2008.
75. Taşkın, D., Erensoy, G. & Sungur, S. Optimized and validated spectrophotometric determination of butamirate citrate in bulk and dosage forms using ion-pair formation with methyl orange and bromothymol blue. *Farmacia* **65**, 761–765 (2017).
76. Separation of Enantiomers of Drugs by Capillary Electrophoresis with Permethyl-gamma-Cyclodextrin as Chiral Solvating Agent B. Koppenhoefer, A. Jakob, X. Zhu and B. Lin, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 2000, 23, 413–429.
77. Mostafa, A., El-Gindy, A. & Emara, S. Development, application and validation of RP-HPLC method for the simultaneous determination of butamirate citrate and its main degradation product in pharmaceutical dosage forms. *Anal. Methods* **3**, 1643 (2011).
78. Mahmoud, A., sayed, N., Mosaad, F. & Souaya, E. Chromatographic methods for the determination of butamirate citrate in presence of its degradation product. *Chem. Pap.* **73**, 1309–1320 (2019).
79. S.T. Hassib, A.A. El-Zaher, M.A. Fouad. Development and validation of RP-HPLC stability-indicating methods for the determination of butamirate citrate and sodium cromoglycate *J. Chem. Pharmaceut. Res.*, 3 (2011), pp. 243-258.
80. Vander Heyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B. G. M. & Massart, D. L. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **24**, 723–753 (2001).