

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

ΓΕΝΙΚΟΤΗΤΕΣ (1)

- Λίγες οι εκλεκτικές και σπάνιες οι εξειδικευμένες αναλυτικές μέθοδοι
- Παράδειγμα εξειδικευμένων μεθόδων οι ανοσοχημικές μέθοδοι (χρήση ειδικών αντισωμάτων)
- Συνήθως οι μετρήσεις των αναλυτικών μεθόδων **παρεμποδίζονται** από τις συνυπάρχουσες ουσίες και γι' αυτό πριν από τη μέτρηση προηγείται στάδιο **διαχωρισμού**

ΓΕΝΙΚΟΤΗΤΕΣ (2)

- Δείγματα φαρμακευτικής ανάλυσης είναι μείγματα και μερικά πολύπλοκα
- Προσδιορισμός των συστατικών σε ένα μείγμα συνήθως δύσκολος ή και αδύνατος με ηλεκτροχημικές ή φασματοχημικές μεθόδους, λόγω παρεμποδιστικής δράσης ουσιών του μείγματος

Μορφές Παρεμποδιστικής Δράσης (1)

- Συμπροσδιορισμός παρεμποδίζουσας ουσίας με τη χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδο. Παραδείγματα:
 - Συμπροσδιορισμός οξικού οξέος που συνυπάρχει σε δείγμα με υδροχλωρικό οξύ κατά την ογκομέτρηση με NaOH
 - Επικάλυψη φασμάτων δύο συστατικών στη φασματοφωτομετρική ανάλυση

Μορφές Παρεμποδιστικής Δράσης (2)

- Μερική μη ποσοτική και μη επαναλήψιμη απόκριση της παρεμποδίζουσας ουσίας, οπότε δύσκολη η αντιμετώπιση προβλήματος. Παραδείγματα:
 - Μη υδατική ογκομέτρηση φαρμάκων ασθενών οξέων σε δισκία, με έκδοχα με όξινες ιδιότητες (π.χ. στεατικό οξύ)
 - Απόκριση EHI σε άλλα ιόντα. Μη δυνατότητα χρήσεως $K^{\text{pot}}_{A,B}$ για διόρθωση σφάλματος

Μορφές Παρεμποδιστικής Δράσης (3)

- Παρακώλυση της απόκρισης προσδιοριζόμενης ουσίας προς την αναλυτική μέθοδο από συνυπάρχουσα ουσία. Προκαλείται αρνητικό σφάλμα.

Παραδείγματα:

- Παρεμπόδιση από ιόντα Fe^{3+} και Al^{3+} στον προσδιορισμό F^- με εκλεκτικό ηλεκτρόδιο λόγω σχηματισμού φθοριοσυμπλόκων
- Παρεμπόδιση φωσφορικών στο φλογοφωτομετρικό προσδιορισμό ασβεστίου

Μορφές Παρεμποδιστικής Δράσης (4)

- Απόσβεση φθορισμού κινίνης από αλογονοιόνητα
- Παρεμπόδιση πρωτεΐνης στον προσδιορισμό φαρμάκων και ορμονών σε βιολογικά υγρά

Τρόποι άρσεως παρεμοδιστικής δράσεως (1)

- Δέσμευση παρεμποδιζουσών ουσιών με **καλυπτικά αντιδραστήρια**
 - Δέσμευση Fe^{3+} και Al^{3+} με EDTA
- Απελευθέρωση προσδιοριζόμενης ουσίας με **αποδεσμευτικά αντιδραστήρια**
 - Απελευθέρωση Ca^{2+} κατά το φλογοφωτομετρικό προσδιορισμό με προσθήκη SrCl_2 ή LaCl_3
 - Απελευθέρωση φαρμάκων από πρωτεΐνη με προσθήκη ANSA

Τρόποι άρσεως παρεμποδιστικής δράσεως (2)

- Αλλαγή οξειδωτικής καταστάσεως παρεμποδιστών
 - Αναγωγή Fe^{3+} σε Fe^{2+}
- Εφαρμογή **τεχνικών διαχωρισμού** για μεταφορά ή απομόνωση επιθυμητών συστατικών

Διαχωρισμός (1)

- Βελτιστοποίηση πειραματικών συνθηκών με μελέτη σχετικών παραμέτρων για ποσοτική μεταφορά ή απομόνωση επιθυμητών συστατικών
- Με το διαχωρισμό είναι δυνατή η αύξηση των συγκεντρώσεων συστατικών που βρίσκονται σε ίχνη
- Εάν μη δυνατός ο άμεσος διαχωρισμός παρασκευάζεται παράγωγο που μπορεί να διαχωρισθεί

Διαχωρισμός (2)

- Πορεία διαχωρισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για
 - Καθαρισμό ουσίας
 - Ποιοτική ανίχνευση (ταυτοποίηση)
 - Ποσοτικό προσδιορισμό
- Διαχωρισμός δεν σημαίνει κατ' ανάγκη ποσοτική απομάκρυνση παρεμποδιστών
 - Αρκεί η παραμένουσα ποσότητα παρεμποδιστή να προκαλεί σφάλμα μικρότερο από σφάλμα μεθόδου

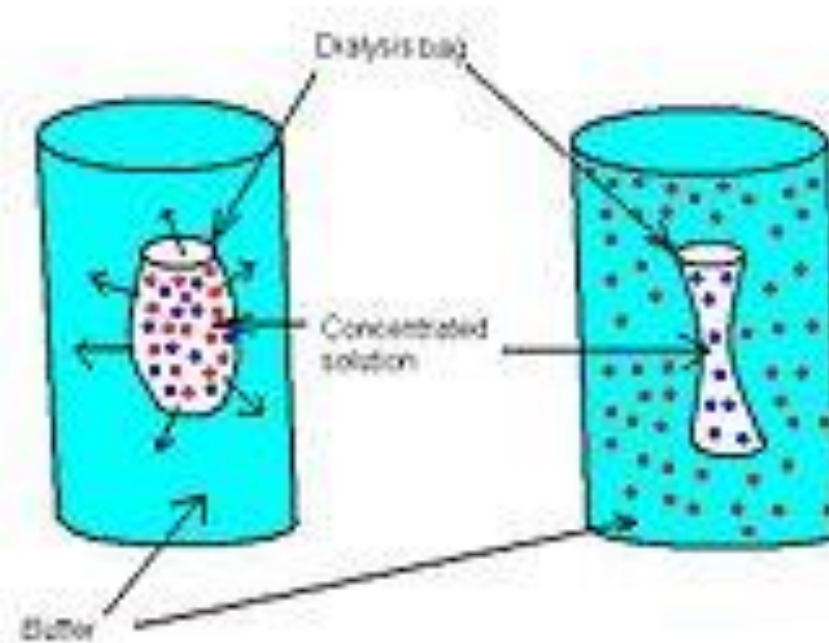
Διαχωρισμός (3)

- Εάν ενδιαφέρει η **καθαρότητα** ενός συστατικού, πρωτεύοντα ρόλο παίζει ο **συντελεστής διαχωρισμού**
- Εάν ο διαχωρισμός αποσκοπεί στον **εμπλουτισμό** ενός συστατικού, πρωτεύοντα ρόλο παίζει η **ανάκτηση**

Ταξινόμηση Τεχνικών Διαχωρισμού (1)

1. Βασίζονται σε διαφορές ιδιοτήτων των ουσιών στην αρχική **μια και μοναδική** φάση:
 - Υπερδιήθηση
 - Διαπίδυση (dialysis)
 - Ηλεκτροδιαπίδυση
2. Δημιουργείται δεύτερη φάση με διαφορετική συγκέντρωση του επιθυμητού συστατικού σε δύο στάδια

Τεχνική Διαχωρισμού Διαπίδυση (Dialysis)



Ταξινόμηση Τεχνικών Διαχωρισμού (2)

- Σχηματισμός συστήματος δύο φάσεων με καθίζηση, εκχύλιση, απόσταξη
- Μηχανικός διαχωρισμός δύο φάσεων (διήθηση, φυγοκέντρωση, διαχωριστική χοάνη)
- Καθεμιά από δύο φάσεις μπορεί να είναι αέρια, υγρή ή στερεή

Ταξινόμηση Τεχνικών Διαχωρισμού (3)

3. Χρωματογραφικές τεχνικές: πετυχαίνεται με **κατανομή** των συστατικών μείγματος μεταξύ δύο φάσεων, μιας **στατικής** (στερεής ή υγρής) και μιας **κινητής** (υγρής ή αέριας)
- Η κινητή φάση διερχόμενη δια μέσου της στατικής προκαλεί διαφορετική μετατόπιση των συστατικών του μείγματος επάνω στη στατιστική φάση

Ταξινόμηση Τεχνικών Διαχωρισμού (4)

- Οι χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού συνδυάζονται με κατάλληλο σύστημα ανίχνευσης – μέτρησης και αποτελούν **χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης** για ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό συστατικών μείγματος

Τεχνικές Διαχωρισμού

Τεχνική	Αρχή τεχνικής	Παραδείγματα εφαρμογής
Καθίζηση	Διαφορές στη διαλυτότητα	Απομάκρυνση ασβεστίου με φωσφορικά
Εκχύλιση	Διαφορές στη διαλυτότητα σε δύο μη μειγνυόμενους διαλύτες	Απομάκρυνση λιπαρών εκδόχων από υδατικό εναιώρημα σκευάσματος με αιθέρα
Απόσταξη	Διαφορές στην πτητικότητα	Απομόνωση αιθερίων ελαίων από δρόγη, πριν από τον προσδιορισμό τους
Εξάχνωση	Διαφορές στην τάση ατμών	Καθαρισμός ιωδίου, θείου
Κρυστάλλωση	Απόθεση κρυστάλλων σε χαμηλότερη θερμοκρασία	Καθαρισμός φαρμακευτικών πρώτων υλών
Τήξη κατά ζώνες	Κρυστάλλωση σε υψηλές θερμοκρασίες	Καθαρισμός οργανικών ενώσεων
Επίπλευση	Διαφορές πυκνότητας μεταξύ μίας ουσίας και ενός υγρού	Διαχωρισμός αιθερίων ελαίων από το ύδωρ κατά την απόσταξη με υδρατμούς
Υπερδιήθηση	Διαφορές στο μέγεθος των ουσιών σε σύγκριση προς τους πόρους του ηθμού	Καθαρισμός κολλοειδών συστημάτων
Διαπίδυση	Διαφορές στην ταχύτητα διαχύσεως μέσα από μεμβράνη	Ανάκτηση φαρμάκων από διαλύματα πρωτεϊνών
Ηλεκτροδιαπίδυση	Διαχωρισμός με μεμβράνη και με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου	Καθαρισμός κολλοειδών από ίχνη ηλεκτρολυτών
Ηλεκτροεναπόθεση	Ηλεκτρόλυση σε αδρανές ηλεκτρόδιο	Απόθεση Cu σε ηλεκτρόδιο Pt
Προσρόφηση	Προσρόφηση μικρομορίων σε στερεή φάση	Απομόνωση φαρμάκων από πρωτεϊνη

Χρωματογραφικές Τεχνικές

Χρωματογραφία προσροφήσεως σε στήλη	Διαφορές στην προσρόφηση ουσιών σε στερεά	Διαχωρισμός μείγματος γλυκοσιδών από φύλλα δακτυλίτιδας
Χρωματογραφία κατανομής υγρών σε στήλη	Κατανομή ουσιών μεταξύ δύο σε στήλη	Διαχωρισμός μείγματος φαρμάκων (φαινοθειαζίνη, διφαινυλαμίνη, καρβαζόλη)
Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	Προσρόφηση (ή κατανομή) σε λεπτή στιβάδα	Διαχωρισμός αμινοξέων, σακχάρων, λιπαρών οξέων, προσμείξεων σε φαρμακευτικές πρώτες ύλες
Χρωματογραφία κατανομής υγρών σε φύλλο χάρτη	Κατανομή ουσιών μεταξύ δύο σε φύλλο χάρτη	Διαχωρισμός αμινοξέων, οργανικών οξέων, αλκαλοειδών
Υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως	Υγρή χρωματογραφία στήλης υπό υψηλή πίεση	Διαχωρισμός μείγματος φαρμάκων σε σκευάσματα, νουκλεοτιδίων
Χρωματογραφία ιονανταλλαγής σε στήλη	Ανταλλαγή ιόντων	Διαχωρισμός κατιόντων ή ανιόντων
Αέρια χρωματογραφία	Κατανομή αερίου μεταξύ μιάς αέριας και μιάς υγρής στερεής φάσεως	Διαχωρισμός μείγματος αλκοολών
Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού	Μέγεθος μορίων μείγματος ουσιών	Διαχωρισμός μείγματος ουσιών διαφορετικού μοριακού βάρους
Ηλεκτροφόρηση	Διαχωρισμός με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου	Διαχωρισμός πρωτεϊνών

Συντελεστής Ανάκτησης (1)

- Εκφράσει την πληρότητα της ανάκτησης (παραλαβής, recovery) του επιθυμητού συστατικού A από τα άλλα συστατικά του δείγματος.
- Εάν Q_A = ποσότητα συστατικού A που ανακτάται και $(Q_A)_o$ η αρχική ποσότητα του A στο δείγμα

$$R_A = \frac{Q_A}{(Q_A)_o}$$

Συντελεστής Ανάκτησης (2)

- Ο όρος $100R_A$ παρέχει την **εκατοστιαία ανάκτηση** του συστατικού
- Ο συντελεστής ανάκτησης μιας τεχνικής διαχωρισμού σε ένα συγκεκριμένο δείγμα προσδιορίζεται πειραματικά με διαχωρισμό γνωστού συνθετικού μείγματος ή με προσθήκη ραδιοεπισημασμένης ουσίας A

Συντελεστής Ανάκτησης (3)

- Απαιτούμενες τιμές συντελεστή ανάκτησης:
 - $R_A \approx 1$ εάν A κύριο ή δευτερεύον συστατικό ή βρίσκεται σε ίχνη ($\sim 0,01\%$)
 - $R_A \geq 0,95$ εάν το δείγμα περιέχει το A σε συγκέντρωση $< 0,001\%$

Συντελεστής Διαχωρισμού (1)

$$S_{B/A}$$

- Εκφράζει το βαθμό διαχωρισμού δύο συστατικών A και B
- Ο συντελεστής $S_{B/A}$ για το ανεπιθύμητο συστατικό B, σε σχέση προς το συστατικό A, ορίζεται ως η η σχετική μεταβολή στο λόγο της ποσότητας του B προς την ποσότητα του A, την οποία συνεπάγεται ο διαχωρισμός
- Εάν Q_A και Q_B είναι οι ποσότητες των συστατικών A και B που ανακτώνται και $(Q_A)_o$ και $(Q_B)_o$, οι αντίστοιχες αρχικές ποσότητες στο δείγμα:

$$S_{B/A} = \frac{Q_B / Q_A}{(Q_B)_o / (Q_A)_o} = \frac{R_B}{R_A}$$

Συντελεστής Διαχωρισμού (2)

$$S_{B/A}$$

- Εάν $R_A \approx 1$, που συνήθως συμβαίνει στην ποσοτική ανάλυση, η σχέση του συντελεστή διαχωρισμού απλοποιείται
- Οι τιμές συντελεστή διαχωρισμού πρέπει να είναι μικρές, της τάξεως 10^{-6} για ιχνοστοιχεία και 10^{-3} στη μακροανάλυση

$$S_{B/A} = \frac{Q_B}{(Q_A)_o} = R_B$$

Σφάλματα οφειλόμενα στο διαχωρισμό (1)

- Κατά το διαχωρισμό προσδιοριζόμενου συστατικού A από ανεπιθύμητο συστατικό B:
 - Ατελής ανάκτηση A συνεπάγεται αρνητικό σφάλμα
 - Ατελής απομάκρυνση B, συνεπάγεται αρνητικό ή θετικό σφάλμα, ανάλογα εάν το B αυξάνει ή μειώνει τη μετρούμενη παράμετρο X (βάρος ιζήματος, απορρόφηση, δυναμικό, κλπ)

Σφάλματα οφειλόμενα στο διαχωρισμό (2)

- Εάν μετρούμενη παράμετρος X εξαρτάται από ποσότητες Q_A και Q_B και τις σταθερές αναλογίας k_A και k_B έχουμε: $X_A = k_A Q_A$ και $X_B = k_B Q_B$
- Ο όρος k_A είναι πάντοτε θετικός, ενώ ο k_B μπορεί να είναι θετικός ή αρνητικός
- Το σχετικό σφάλμα E_r λόγω διαχωρισμού δίνεται από τη σχέση
- Ο πρώτος όρος δίνει το σφάλμα λόγω ατελούς ανάκτησης και ο δεύτερος όρος λόγω ατελούς απομάκρυνσης του B

$$E_r = (R_A - 1) + \frac{k_B}{k_A} \frac{(Q_B)_o}{(Q_A)_o} R_B$$

Σφάλματα οφειλόμενα στο διαχωρισμό (3)

$$X = X_A + X_B = \kappa_A Q_A + \kappa_B Q_B \quad (14-6)$$

Εάν δεν υπάρχει το συστατικό B, δεν θα απαιτηθεί διαχωρισμός και η μετρούμενη τιμή της παραμέτρου X θα δίνεται από τη σχέση

$$X_o = \kappa_A (Q_A)_o \quad (14-7)$$

Το σφάλμα που προκαλείται από το διαχωρισμό είναι ίσο με $X - X_o$. Επομένως το σχετικό σφάλμα που οφείλεται στο διαχωρισμό δίνεται από τη σχέση

$$E_r = \frac{X - X_o}{X_o} \quad (14-8)$$

Συνδυάζοντας τις εξισώσεις (14-6), (14-7) και (14-8) έχουμε

$$E_r = \frac{\kappa_A Q_A + \kappa_B Q_B - \kappa_A (Q_A)_o}{\kappa_A (Q_A)_o} \quad (14-9)$$

Θέτοντας $Q_A = R_A (Q_A)_o$ και $Q_B = R_B (Q_B)_o$ στην εξίσωση (14-9) έχουμε

$$E_r = (R_A - 1) + \frac{\kappa_B}{\kappa_A} \frac{(Q_B)_o}{(Q_A)_o} R_B \quad (14-10)$$

Σφάλματα οφειλόμενα στο διαχωρισμό (4)

- Ελαχιστοποίηση του σχετικού σφάλματος E_r :
 - Η τιμή R_A να τείνει στη μονάδα (ποσοτική ανάκτηση)
 - Η τιμή R_B να τείνει στο μηδέν (πλήρης απομάκρυνση του B)
 - Ο λόγος k_B/k_A να είναι όσο το δυνατό μικρότερος (η μέθοδος να είναι ειδική για το A)
 - Ο λόγος $(Q_B)_0/(Q_A)_0$ να είναι όσο το δυνατό μικρότερος