

# Ο ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΩΣ ΒΑΣΙΚΟ ΠΡΟΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΥΛΙΚΩΝ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Χαράλαμπος Αλεξόπουλος<sup>1</sup>, Αλεξάνδρα Γεωργοπούλου<sup>1</sup>, Παναγιώτα Γιαννικοπούλου<sup>1</sup>,  
Ηλίας Κακουλίδης<sup>1</sup>, Ευγενία Λαμπή<sup>1</sup>, Βασιλική Σχοινά<sup>1</sup>, Αγγελική Παναγιωτοπούλου<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Ε' ΧΥ Αθηνών, Γενικό Χημείο του Κράτους, Αν. Τσόχα 16, 115 21 Αθήνα  
<sup>2</sup>Εργ. Φασματοσκοπίας NMR, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, 15310-2 Αγία Παρασκευή Αττικής  
e-mail: i.kakoulidis@gcsf.gr

## Περίληψη

Ο προσδιορισμός της καθαρότητας οργανικών ενώσεων συγκαταλέγεται στις θεμελιώδεις ικανότητες μέτρησης και διακρίβωσης που επικαλούνται τα μετρολογικά ιδρύματα που δραστηριοποιούνται στον τομέα της Χημικής Μετρολογίας. Στην παρούσα εργασία συνοψίζονται οι πορείες που ακολούθησε το ΕΧΗΜ/ΓΧΚ-ΕΙΜ σε σχετικές διεργαστηριακές συγκρίσεις-κλειδιά που διοργανώνονται υπό την αιγίδα του Διεθνούς Γραφείου Μέτρων και Σταθμών. Οι προσεγγίσεις διακρίνονται σε αυτές μέσω ισοζυγίων μάζας και μέσω ποσοτικής φασματοσκοπίας NMR. Αναφέρονται οι τεχνικές που υιοθετήθηκαν σε κάθε περίπτωση, αναλύεται ο τρόπος υπολογισμού των αποτελεσμάτων και δίνονται τα αντίστοιχα ισοζύγια αβεβαιοτήτων. Εξετάζονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν οι δύο διαφορετικές προσεγγίσεις σε σχέση με την ακρίβεια, την πολυπλοκότητα και την αβεβαιότητά τους. Τέλος, καταδεικνύεται η σημασία αντίστοιχων ικανοτήτων μέτρησης και διακρίβωσης στην επίτευξη ιχνηλασιμότητας στις χημικές μετρήσεις και στην ανάπτυξη πιστοποιημένων υλικών αναφοράς

*Λέξεις-κλειδιά:* Χημική Μετρολογία, καθαρότητα χημικών ουσιών, qNMR, ισοζύγιο μάζας, ιχνηλασιμότητα.

## Summary

Among the fundamental measurement capabilities claimed by metrological institutes operating in the field of chemistry (amount of substance) is the determination of the purity of organic compounds. The present contribution summarizes the approaches adopted by EXHM/GCSL-EIM in its participation in relevant key comparisons organized by the BIPM. The analytical strategies employed are the mass balance approach (i.e. the determination of structure-related impurities, volatile content, non-volatiles and water) and quantitative <sup>1</sup>H NMR. The analytical techniques and the results for both strategies are presented and discussed. The corresponding uncertainty estimation procedures are described and applied to the two different approaches. The present study considers the advantages and disadvantages of the two approaches in relation to their complexity, their precision and their uncertainty. Evidently, purity assessment is paramount to the dissemination of the mole, the traceability of chemical measurements and the development of certified reference materials.

*Keywords:* Chemical Metrology, purity of organic compounds, qNMR, mass balance, traceability.

---

Χ. Αλεξόπουλος<sup>1</sup>, Α. Γεωργοπούλου<sup>1</sup>, Π. Γιαννικοπούλου<sup>1</sup>, Η. Κακουλίδης<sup>1</sup>, Ε. Λαμπή<sup>1</sup>, Β. Σχοινά<sup>1</sup>, Α. Παναγιωτοπούλου<sup>2</sup>, <sup>1</sup>ΕΧΗΜ/ΓΧΚ-ΕΙΜ, <sup>2</sup>Εργ. Φασματοσκοπίας NMR, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Ο προσδιορισμός της καθαρότητας οργανικών ενώσεων ως βασικό προαπαιτούμενο για την ανάπτυξη πιστοποιημένων υλικών αναφοράς.

5<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, 9-10 Μαΐου 2014

## 1. Εισαγωγή

Η επίτευξη συγκρίσιμων και αξιόπιστων μετρήσεων αποτελεί αντικείμενο ιδιαίτερου ενδιαφέροντος στην κοινότητα της Χημικής Μετρολογίας. Η ιχνηλασιμότητα των μετρήσεων στο Διεθνές Σύστημα Μονάδων (SI) αποτελεί το κεντρικό σημείο για την επίτευξη συγκρισιμότητας και αξιοπιστίας στις χημικές μετρήσεις και σε εργαστήρια δοκιμών επιτυγχάνεται μέσω της βαθμονόμησης του μετρητικού εξοπλισμού τους ή/και της επαλήθευσης των αποτελεσμάτων τους με πιστοποιημένα υλικά αναφοράς (CRMs) που είναι διαθέσιμα από αρμόδιους φορείς, δηλαδή Εθνικά Μετρολογικά Ινστιτούτα (EMI) ή διαπιστευμένους παραγωγούς CRM που ιχνηλατούν τις μετρήσεις τους σε EMI. Κατά συνέπεια, η ιχνηλασιμότητα των χημικών μετρήσεων στο SI επαφίεται στα EMI και συνιστά καταστατικό τους ρόλο, καθώς με τον τρόπο αυτό διαδίδουν το γραμμομόριο (mol), τη μονάδα μέτρησης της ποσότητας της ουσίας.

Η ικανότητα των μετρολογικών φορέων στο να προσδιορίσουν την καθαρότητα στοιχείων και ενώσεων αποτελεί συστατικό βήμα προς την ανακοίνωση ικανοτήτων διακρίβωσης και μέτρησης στην αντίστοιχη βάση δεδομένων του BIPM (KCDB). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μέσα από τη συμμετοχή των εργαστηρίων σε ανάλογες διεργαστηριακές συγκρίσεις που διοργανώνονται υπό την αιγίδα της CIPM και αποσκοπούν στην τεκμηρίωση των σχετικών δυνατοτήτων των ινστιτούτων, όπως αυτή καταγράφεται από τις σχετικές αποκλίσεις που σημειώνουν και τις αβεβαιότητες των μετρήσεών τους. Από θεωρητική άποψη, οι καθαρές ουσίες βρίσκονται στην κορυφή της πυραμίδας ιχνηλάτισης, καθώς η ποσότητα ενός αναλύτη στα CRM ή στα προς ανάλυσης δείγματα θα πρέπει να βαθμονομηθεί έναντι της ποσότητας της καθαρής ουσίας που χρησιμοποιείται ως πρωτεύων βαθμονομητής ή ενός πρότυπου διαλύματός της. Όμως, ειδικά στην περίπτωση των οργανικών ενώσεων, δεν υφίστανται ιδανικά (100%) καθαρές ουσίες. Κατά συνέπεια, ο προσδιορισμός της χημικής καθαρότητας αποτελεί κομβικό στάδιο στην ιχνηλάτηση των μετρήσεων στο SI. Για το λόγο αυτό, η Ομάδα Εργασίας στην Οργανική Ανάλυση (OAWG) της Συμβουλευτικής Επιτροπής για την Ποσότητα της Ουσίας (CCQM) που λειτουργεί υπό την ευθύνη της Διεθνούς Επιτροπής Μέτρων και Σταθμών (CIPM) θεωρεί τον προσδιορισμό της καθαρότητας οργανικών ενώσεων ως μία από τις κεντρικές ικανότητες (*core capabilities*) των EMI. Για το λόγο αυτό, διοργανώνει σε τακτική βάση διεργαστηριακές συγκρίσεις στο ανώτατο μετρολογικό επίπεδο για τον προσδιορισμό της καθαρότητας πρωτεύοντων οργανικών βαθμονομητών. Σκοπός της είναι να διερευνήσει την καταλληλότητα και τους περιορισμούς των αναλυτικών προσεγγίσεων που ακολουθούν τα EMI ώστε να αποδώσουν τιμές αναφοράς στην καθαρότητα οργανικών ουσιών. Μακροπρόθεσμο στόχο της αποτελεί η καθιέρωση μιας διαρκώς βελτιούμενης πρακτικής υπό τους εκάστοτε τεχνικούς προσδιορισμούς.

Η ιδανική προσέγγιση προς αυτή την κατεύθυνση αποτελεί η εφαρμογή μιας πρωτεύουσας μεθόδου (*primary method*) με την οποία θα ήταν δυνατός ο προσδιορισμός τους κλάσματος μάζας της ουσίας σε ένα μείγμα της (Quinn 1997, Milton and Quinn 2001). Αρκετές φυσικοχημικές τεχνικές θα μπορούσαν να εφαρμοστούν, υπόκεινται όμως σε αρκετούς περιορισμούς. Κυρίαρχη πρακτική αποτελεί ο προσδιορισμός της καθαρότητας με έμμεσο τρόπο: τον προσδιορισμό δομικά συγγενών προσμίξεων (*structure-related impurities*), ιχνών νερού, πτητικών και μη πτητικών συστατικών. Οι δομικά συγγενείς προσμίξεις προσδιορίζονται κατά κανόνα με χρωματογραφικές μεθόδους (π.χ. GC-FID, HPLC-UV), η περιεκτικότητα σε νερό με κουλομετρική τιτλοδότηση (Karl-Fisher), οι πτητικές προσμίξεις με τεχνικές αέριας χρωματογραφίας (π.χ. HS-GC-FID ή GC/MS) και τα μη πτητικά συστατικά είτε με θερμοσταθμικές μεθόδους (TGA/TG), είτε με τον

---

Χ. Αλεξόπουλος<sup>1</sup>, Α. Γεωργοπούλου<sup>1</sup>, Π. Γιαννικοπούλου<sup>1</sup>, Η. Κακουλίδης<sup>1</sup>, Ε. Λαμπή<sup>1</sup>, Β. Σχοινά<sup>1</sup>, Α. Παναγιωτοπούλου<sup>2</sup>, <sup>1</sup>ΕΧΗΜ/ΓΧΚ-ΕΙΜ, <sup>2</sup>Εργ. Φασματοσκοπίας NMR, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Ο προσδιορισμός της καθαρότητας οργανικών ενώσεων ως βασικό προαπαιτούμενο για την ανάπτυξη πιστοποιημένων υλικών αναφοράς.

5<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, 9-10 Μαΐου 2014

προσδιορισμό ανόργανων στοιχείων (IC, ICP, AAS κοκ). Η προσέγγιση αυτή καλείται προσέγγιση ισοζυγίων μάζας (*mass balance approach*, Ma et al., 2009; Ishikawa et al., 2011; Kim et al., 2013; Westwood et al., 2013).

Η φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR χρησιμοποιείται παγκοσμίως στην ποσοτική ανάλυση μειγμάτων ή στον προσδιορισμό προσμείξεων (*quantitative NMR* ή *qNMR*, Janke et al. 2005; Maltz and Janke, 2005; Saito et al., 2009; Schoenberger, 2012). Καθώς το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR δεν είναι εκλεκτικό στην προέλευση των πρωτονίων, η τεχνική qNMR επιτρέπει τον προσδιορισμό του αριθμού των πυρήνων  $^1\text{H}$  που αντιστοιχούν σε ένα σημείο του φάσματος έναντι ενός συγκεκριμένου σήματος μιας οργανικής ουσίας γνωστής καθαρότητας που επέχει ρόλο εσωτερικού προτύπου (Rundlöf et al., 2010; 2013).

Στην παρούσα επικοινωνία παρουσιάζονται οι προσεγγίσεις που ακολούθησε το EXHM στις συγκρίσεις-κλειδιά CCQM-K.55c (προσδιορισμός της καθαρότητας της βαλίνης), CCQM-K.104 (προσδιορισμός της καθαρότητας της αβερμεκτίνης B1a), APMP-QM.S6, όπου απαιτήθηκε ο προσδιορισμός της καθαρότητας της κλενβουτερόλης και CCQM-P150, που αφορά αποκλειστικά στην τεχνική qNMR. Πραγματοποιείται αναφορά στις αναλυτικές προσεγγίσεις που υιοθετήθηκαν σε κάθε περίπτωση, αναλύεται ο τρόπος υπολογισμού των αποτελεσμάτων και δίνονται τα αντίστοιχα ισοζύγια αβεβαιότητων.

## 2. Μεθοδολογία

### 2.1 Ισοζύγιο μάζας

Προσδιορισμός συγγενών προσμείξεων: Για τον προσδιορισμό τους στο δείγμα της βαλίνης υιοθετήθηκε η μέθοδος της σταθερής προσθήκης. Χρησιμοποιήθηκε το CRM NIST 2389a (μείγμα 21 αμινοξέων) ώστε να καταστρωθεί και να βελτιστοποιηθεί μια μέθοδος προσδιορισμού αμινοξέων (Alexopoulos et al., 2013). Στη συνέχεια αναλύθηκε ένα αραιό διάλυμα του δείγματος χρησιμοποιώντας τις μεταπτώσεις που προσδιορίστηκαν και διαπιστώθηκε ότι περιείχε αλανίνη, λευκίνη και ισολευκίνη. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής τους υιοθετήθηκε η μέθοδος της σταθερής προσθήκης. Παρασκευάστηκαν διαλύματα 10 mg/g βαλίνης σε μείγμα ακετονιτριλίου/νερού/τριφθοροξικού οξέος σε αναλογία 30/70/0.45, τα οποία εμβολιάστηκαν σε επίπεδα μεταξύ 0.5 και 2 φορές στο εκτιμώμενο επίπεδο συγκέντρωσης με το υλικό αναφοράς NIST 2389a SRM εις τριπλούν. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε στήλη υγρής χρωματογραφίας μικτής φάσης (SIELC Primesep 100, 2.1 x 250 mm, 5 μm) χρησιμοποιώντας ένα πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης ακετονιτριλίου/νερού/τριφθοροξικού οξέος. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε σε διάταξη LC-MS/MS της Thermo Finnigan (αντλία Surveyor MS Pump Plus, αυτόματος δειγματολήπτης Surveyor Autosampler Plus Lite και φασματόμετρο TSQ Quantum Ultra AM) που λειτουργούσε σε φάση MRM παρακολουθώντας τις εξής μεταπτώσεις: αλανίνη (90.2 → 44), λευκίνη (130.2 → 41 & 86), ισολευκίνη (130.2 → 41 & 86)

Στην περίπτωση της αβερμεκτίνης B<sub>1a</sub> υπολογίστηκε η κανονικοποιημένη εκατοστιαία σύσταση των δομικά συγγενών προσμείξεων. Δώδεκα διαφορετικά δείγματα βάρους 2,5 mg διαλύθηκαν σε 1 mL ακετονιτριλίου και στη συνέχεια αραιώθηκαν 1:20 στην κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε. Τα δείγματα αναλύθηκαν τόσο με HPLC-UV (σε διάταξη Agilent 1200) και LC-MS/MS χρησιμοποιώντας την ίδια χρωματογραφική στήλη (Spherisorb ODS2, 250 x 4.6 mm, 5 μm) και το ίδιο σύστημα έκλουσης (H<sub>2</sub>O:MeOH:MeCN 12:35:53, ροή 0,3 mL/min, T = 40 °C), με μόνη διαφορά ότι στη δεύτερη περίπτωση το σύστημα έκλουσης ρυθμίστηκε σε pH 6.2 με διάλυμα οξικού αμμωνίου συγκέντρωσης 2.5 mM για να προαχθεί ο σχηματισμός ιόντων. Το φασματόμετρο μάζας λειτουργούσε σε πλήρη

Χ. Αλεξόπουλος<sup>1</sup>, Α. Γεωργοπούλου<sup>1</sup>, Π. Γιαννικοπούλου<sup>1</sup>, Η. Κακουλίδης<sup>1</sup>, Ε. Λαμπή<sup>1</sup>, Β. Σχοινά<sup>1</sup>, Α. Παναγιωτοπούλου<sup>2</sup>, <sup>1</sup>EXHM/ΓΧΚ-EIM, <sup>2</sup>Εργ. Φασματοσκοπίας NMR, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Ο προσδιορισμός της καθαρότητας οργανικών ενώσεων ως βασικό προαπαιτούμενο για την ανάπτυξη πιστοποιημένων υλικών αναφοράς.

5<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, 9-10 Μαΐου 2014

σάρωση στο εύρος 700 – 950 amu και στη συνέχεια εξάγονται τα χρωματογραφήματα που περιέχουν χαρακτηριστικά θραύσματα των επιμέρους προσμίξεων (Awasthi et al., 2012).

Προσδιορισμός υγρασίας: 20 mg της προς ανάλυση ουσίας διοχετεύεται σε κατάλληλο δειγματοφιαλίδιο που σφραγίζεται και τοποθετείται στους 140 °C στο φούρνο (Metrohm ThermoPrep KF 832) της διάταξης κουλομετρικής τιτλοδότησης (Metrohm KF831) που λειτουργεί με διαβίβαση ξηρού αέρα μέσω του δειγματοφιαλιδίου στο κελί τιτλοδότησης. Η μέτρηση πραγματοποιείται εις τριπλούν.

Προσδιορισμός πτητικών συστατικών: 50 mg της προς ανάλυση ένωσης διαλύονται ή εκχυλίζονται από διαλύτες διαφορετικής πολικότητας (εξάνιο και ακετονιτρίλιο) και στη συνέχεια αναλύονται σε διάταξη GC-MS/MS της Thermo Finnigan (αυτόματος δειγματολήπτης Cetac ASX-520, αέριος χρωματογράφος Trace GC Ultra και φασματόμετρο μάζας παγίδας ιόντων Polaris Q) που λειτουργεί σε πλήρη σάρωση.

Προσδιορισμός ανόργανων προσμείξεων: 50 mg του δείγματος χωνεύονται σε διάταξη μικροκυμάτων (CEM Mars 6) με 3 mL υπερκαθαρού νιτρικού οξέος και 1 mL υπερκαθαρού υπεροξειδίου του υδρογόνου. Το προϊόν της χώνευσης αραιώνεται σε τελικό όγκο 10 mL με υπερκαθαρό νερό και προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις των Na, K, Mg, Ca, Al, Si, P, S, Cl, B, Fe, Zn, Cu, Ba, Mn, Cr, Ni, Co, Cd, As, Se, Sn, Sb.

## 2.2. qNMR

Η προς ανάλυση ουσία και το εσωτερικό πρότυπο ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 μg σε αναλυτικό ζυγό (UMX 5 Comparator, Mettler Toledo) σε αναλογία τέτοια που ο λόγος των σημάτων των πρωτονίων που θα προσδιοριστούν να είναι 1:1, εφόσον υπάρχει ανάλογη δυνατότητα. Ανάλογα με την πολικότητά τους, τα στερεά διαλύονται σε 0,75 mL κατάλληλου δευτεριωμένου διαλύτη και τα σήματα των πρωτονίων τους που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένους υποκαταστάτες των ενώσεων ποσοτικοποιούνται μέσω φασματόμετρου NMR (Bruker Avance DRX, 500 MHz με ανιχνευτή  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  inverse BBI). Για τη λήψη των φασμάτων ακολουθείται το πρωτόκολλο των Maltz και Janke (2005) και για την επεξεργασία τους χρησιμοποιείται το λογισμικό MestReNova (MestreLab Research SL, Ισπανία).

## 3. Αποτελέσματα - Αξιολόγηση

Στον πίνακα που ακολουθεί συνοψίζονται τα αποτελέσματα προσδιορισμών καθαρότητας στις οποίες έχει προβεί το EXHM στα πλαίσια της συμμετοχής του σε διεργαστηριακές συγκρίσεις.

Πίνακας 1: Προσδιορισμοί καθαρότητας στα πλαίσια διεργαστηριακών συγκρίσεων

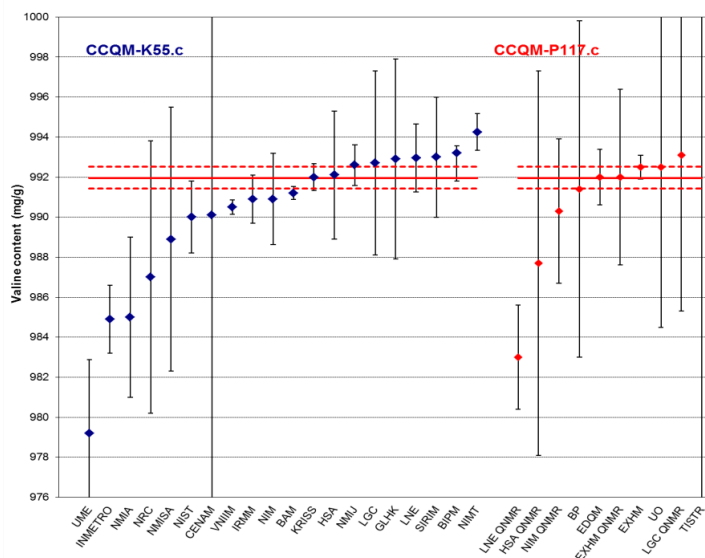
σύγκριση	ουσία	μέθοδος	καθαρότητα	SRI	H <sub>2</sub> O	πτητικά	ανόργανα
CCQM-K55c	βαλίνη	ισοζύγιο	992,50	6,3	1,2	< 0,1	< 0,1
		qNMR	992,00				
APMP QM S6	κλενβουτερόλη	qNMR	995,61				
CCQM-K104	αβερμεκτίνη B <sub>1α</sub>	ισοζύγιο	930,25	47,08	20,58	0,09	2,00
CCQM-P150	διμεθυλοσουλφόνη	qNMR	999,64				

Χ. Αλεξόπουλος<sup>1</sup>, Α. Γεωργοπούλου<sup>1</sup>, Π. Γιαννικοπούλου<sup>1</sup>, Η. Κακουλίδης<sup>1</sup>, Ε. Λαμπή<sup>1</sup>, Β. Σχοινά<sup>1</sup>, Α. Παναγιωτοπούλου<sup>2</sup>, <sup>1</sup>EXHM/ΓΧΚ-ΕΙΜ, <sup>2</sup>Εργ. Φασματοσκοπίας NMR, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Ο προσδιορισμός της καθαρότητας οργανικών ενώσεων ως βασικό προαπαιτούμενο για την ανάπτυξη πιστοποιημένων υλικών αναφοράς.

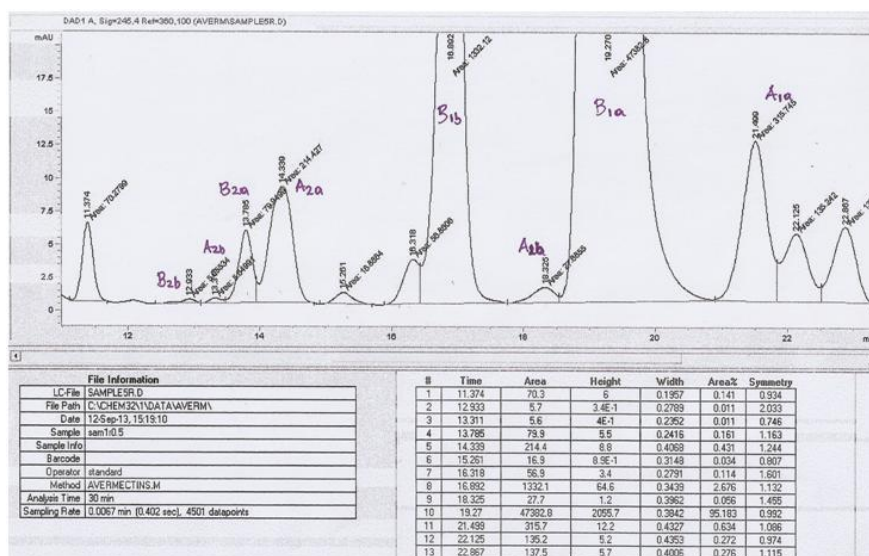
5<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, 9-10 Μαΐου 2014

Στο Σχήμα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σύγκρισης-κλειδί CCQM-K55c και της πιλοτικής σύγκρισης CCQM-P117c, η οποία αφορούσε στον προσδιορισμό της καθαρότητας της βαλίνης, στην οποία συμμετείχε το EXHM. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, οι δύο διαφορετικές προσεγγίσεις που ακολούθησε το EXHM έδωσαν συγκρίσιμα αποτελέσματα και τιμές καθαρότητας που βρίσκονται σε συμφωνία με την τιμή αναφοράς της διεργαστηριακής δοκιμής. Ο τρόπος που αντιμετωπίστηκε η περίπτωση αποτέλεσε αντικείμενο παλαιότερης επικοινωνίας (Alexoroulos et al., 2013).



Σχήμα 1: CCQM-K55c/CCQM-P117c: καθαρότητα της βαλίνης

Στην περίπτωση της βαλίνης ήταν δυνατή η εφαρμογή και των δύο τεχνικών. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις όπου είναι πρακτικά αδύνατη η απομόνωση ενός καθαρού σήματος προς ολοκλήρωση με την τεχνική qNMR, η εφαρμογή ισοζυγίων μάζας αποτελεί μονόδρομο ως έγκυρη αναλυτική επιλογή. Ανάλογη είναι η περίπτωση της αβερμεκτίνης (CCQM-K104), το NMR φάσμα της οποίας είναι εξαιρετικά σύνθετο και ο προσδιορισμός της καθαρότητας αντιμετωπίστηκε αναλυτικά με τη χρήση χρωματογραφικών τεχνικών.



Σχήμα 2: Τυπικό χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος αβερμεκτίνης B<sub>1a</sub>

Χ. Αλεξόπουλος<sup>1</sup>, Α. Γεωργοπούλου<sup>1</sup>, Π. Γιαννικοπούλου<sup>1</sup>, Η. Κακουλίδης<sup>1</sup>, Ε. Λαμπή<sup>1</sup>, Β. Σχοινά<sup>1</sup>, Α. Παναγιωτοπούλου<sup>2</sup>, <sup>1</sup>EXHM/ΓΧΚ-ΕΙΜ, <sup>2</sup>Εργ. Φασματοσκοπίας NMR, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Ο προσδιορισμός της καθαρότητας οργανικών ενώσεων ως βασικό προαπαιτούμενο για την ανάπτυξη πιστοποιημένων υλικών αναφοράς.

5<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, 9-10 Μαΐου 2014

Το κλάσμα μάζας της αβερμεκτίνης B<sub>1α</sub> (mg/g) στο δείγμα δίνεται από την εξίσωση:

$$w_{ABA_{B_{1\alpha}}} = ABA_{B_{1\alpha},n} \left(1 - \frac{w_{H_2O} + w_{vol} + w_{in}}{1000}\right) \quad (1)$$

όπου  $w$  το κλάσμα μάζας (mg/g) και οι δείκτες H<sub>2</sub>O,  $vol$  και  $in$  δηλώνουν το νερό, τα πτητικά και τα μη πτητικά (ανόργανα) συστατικά, ενώ με ABA<sub>B<sub>1α</sub></sub> συμβολίζεται το % κανονικοποιημένο εμβαδόν της κορυφής της ουσίας στο χρωματογράφημα HPLC-UV (βλ. Σχήμα 1). Κατά τον ίδιο τρόπο δίνεται το κλάσμα μάζας κάθε δομικά συγγενούς πρόσμιξης (SRI):

$$w_{Sri} = SRI_{i,n} \left(1 - \frac{w_{H_2O} + w_{vol} + w_{in}}{1000}\right) \quad (2)$$

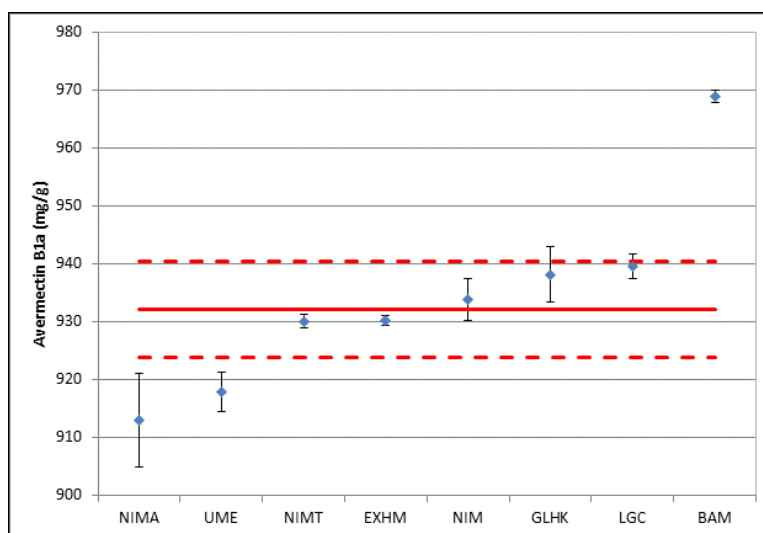
Η εξίσωση που εκφράζει το κλάσμα μάζας του νερού στο δείγμα ( $w_{H_2O}$ ) όπως προκύπτει από τον προσδιορισμό της με κουλόμετρική τιτλοδότηση είναι:

$$w_{H_2O} = \frac{Q}{z F} \frac{MW}{m_{sample}} \quad (3)$$

όπου  $Q$  η ποσότητα του φορτίου,  $z$  ο αριθμός των ανταλλασσόμενων ηλεκτρονίων,  $F$  το ηλεκτροχημικό ισοδύναμο,  $MW$  η μοριακή μάζα της ουσίας και  $m_{sample}$  η μάζα του δείγματος. Ακόμη, ο προσδιορισμός του κλάσματος μάζας των πτητικών ( $w_{vol}$ ) και μη πτητικών συστατικών ( $w_{in}$ ) με χρωματογραφικές και φασματομετρικές τεχνικές δίνεται από τον ακόλουθο γενικό τύπο:

$$w_{vol/in} = \frac{R_{soln}}{R_{std}} C_{std} \frac{m_{soln}}{m_{sample}} \quad (4)$$

όπου  $R_{soln}$  και  $R_{std}$  η απόκριση του διαλύματος και του πρότυπου,  $C_{std}$  η συγκέντρωση του προτύπου και  $m_{soln}$ ,  $m_{sample}$  οι μάζες του διαλύματος και του δείγματος αντίστοιχα.



Σχήμα 3: CCQM-K104: καθαρότητα της αβερμεκτίνης B<sub>1α</sub>

Χ. Αλεξόπουλος<sup>1</sup>, Α. Γεωργοπούλου<sup>1</sup>, Π. Γιαννικοπούλου<sup>1</sup>, Η. Κακουλίδης<sup>1</sup>, Ε. Λαμπή<sup>1</sup>, Β. Σχοινά<sup>1</sup>, Α. Παναγιωτοπούλου<sup>2</sup>, <sup>1</sup>ΕΧΗΜ/ΓΧΚ-ΕΙΜ, <sup>2</sup>Εργ. Φασματοσκοπίας NMR, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Ο προσδιορισμός της καθαρότητας οργανικών ενώσεων ως βασικό προαπαιτούμενο για την ανάπτυξη πιστοποιημένων υλικών αναφοράς.

5<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, 9-10 Μαΐου 2014

Η αβεβαιότητα του κλάσματος μάζας της αβερμεκτίνης B<sub>1a</sub> και κάθε δομικά συγγενούς πρόσμιξης (SRI) δίνεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$u(w_{ABA,SRI}) = \sqrt{\frac{(SD_R)^2}{n} + (C_i u_{H_2O})^2 + (C_i u_{vol})^2 + (C_i u_{in})^2} \quad (5)$$

όπου  $SD_R$  η τυπική απόκλιση των  $n$  μετρήσεων σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας και  $C_i$  οι συντελεστές ευαισθησίας. Η αβεβαιότητα του αθροίσματος των δομικά συγγενών προσμίξεων υπολογίστηκε ως το άθροισμα των αβεβαιοτήτων της κάθε πρόσμιξης. Ομοίως, η αβεβαιότητα του κλάσματος μάζας του νερού δίνεται ως:

$$u(w_{H_2O}) = \sqrt{\frac{(SD_{R,H_2O})^2}{n} + (C_i u_{m_{sample}})^2} \quad (6)$$

ενώ εκείνη του κλάσματος μάζας των πτητικών και των μη πτητικών συστατικών:

$$u(w_{vol,in}) = \sqrt{\frac{(SD_R)^2}{n} + (C_i u_{Cstd})^2 + (C_i m_{sample})^2 + (C_i m_{soln})^2} \quad (7)$$

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζει τα αποτελέσματα και το πλήρες ισοζύγιο αβεβαιότητας για τον προσδιορισμό της καθαρότητας της αβερμεκτίνης με την προσέγγιση ισοζυγίων μάζας.

Πίνακας 2: Ισοζύγιο αβεβαιοτήτων για τον προσδιορισμό της καθαρότητας αβερμεκτίνης B<sub>1a</sub>

συνιστώσα	τιμή	μονάδες	βαθμοί ελευθερίας	τυπική αβεβαιότητα	σχετική αβεβαιότητα	C <sub>i</sub>	C <sub>ui</sub>	(C <sub>i</sub> U <sub>i</sub> ) <sup>2</sup>
αβεβαιότητας								
κανονικοποίηση σήματος	930,246	mg	12	0,6890	7,406E-04	0,9773	0,6733	4,534E-01
περιεκτικότητα σε νερό	20,579	mg	6	0,3915	1,902E-02	-0,9302	-0,3642	1,326E-01
περιεκτικότητα σε πτητικά	0,091	mg	3	0,0242	2,664E-01	-0,9302	-0,0225	5,062E-04
περιεκτικότητα σε μη πτητικά	2,007	mg	3	0,1231	6,135E-02	-0,9302	-0,0763	5,818E-03
συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα								0,76962
αποτελεσματικοί βαθμοί ελευθερίας								15,79
συντελεστής κάλυψης $k$ (επίπεδο εμπιστοσύνης 95%)								2,131
διευρυμένη αβεβαιότητα								1,640

Όπως παρατηρούμε, ο υπολογισμός της τιμής της καθαρότητας και η εκτίμηση της αβεβαιότητάς της γίνεται με έμμεσο τρόπο. Σε αντίθεση με την προσέγγιση των ισοζυγίων μάζας, ο προσδιορισμός της καθαρότητας με την τεχνική qNMR είναι άμεσος και η εξίσωση για τον υπολογισμό της είναι η εξής:

$$p_s = \frac{I_s N_{is} m w_s m_{is}}{I_{is} N_s m w_{is} m_s} p_{is} \quad (8)$$

όπου  $w$  το κλάσμα μάζας (mg/g),  $I$  η ολοκλήρωση του σήματος,  $N$  ο αριθμός των πυρήνων <sup>1</sup>H που αντιστοιχούν σε κάθε σήμα,  $MW$  η μοριακή μάζα,  $m$  η μάζα που ζυγίζεται και  $p$  η καθαρότητα. Οι δείκτες  $s$  και  $is$  δηλώνουν το δείγμα και το εσωτερικό πρότυπο, αντίστοιχα.

Χ. Αλεξόπουλος<sup>1</sup>, Α. Γεωργοπούλου<sup>1</sup>, Π. Γιαννικοπούλου<sup>1</sup>, Η. Κακουλίδης<sup>1</sup>, Ε. Λαμπή<sup>1</sup>, Β. Σχοινά<sup>1</sup>, Α. Παναγιωτοπούλου<sup>2</sup>, <sup>1</sup>ΕΧΗΜ/ΓΧΚ-ΕΙΜ, <sup>2</sup>Εργ. Φασματοσκοπίας NMR, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Ο προσδιορισμός της καθαρότητας οργανικών ενώσεων ως βασικό προαπαιτούμενο για την ανάπτυξη πιστοποιημένων υλικών αναφοράς.

5<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, 9-10 Μαΐου 2014



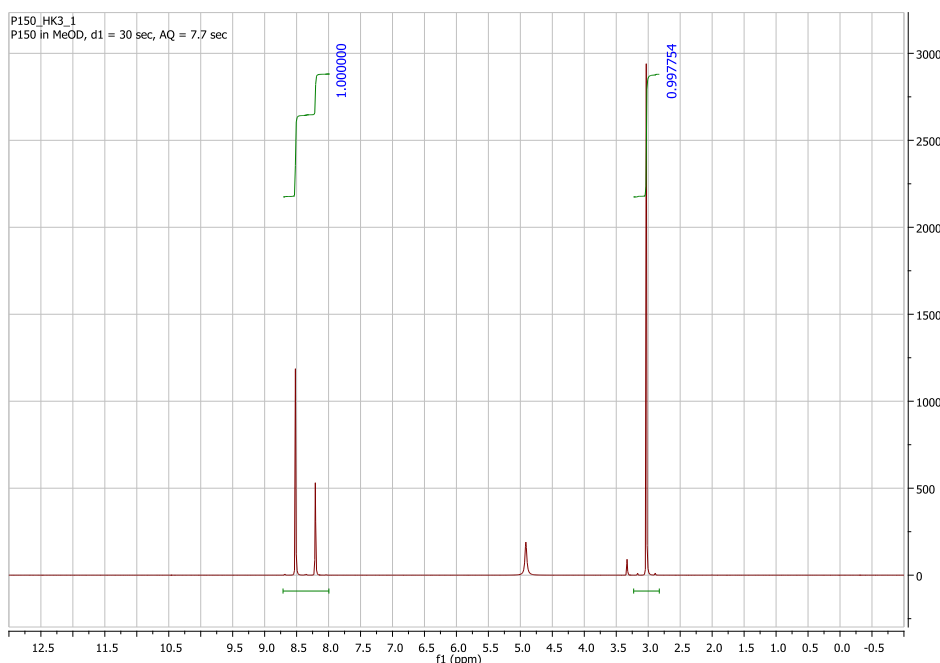
Τέλος, η εξίσωση για τον προσδιορισμό της αβεβαιότητας της τεχνικής qNMR είναι:

$$u(p_{\text{DMSO}_2}) = \sqrt{C_A^2 \sigma_A^2 + \sum (C_i u_{(x_i)})^2} \quad (9)$$

Στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθεται το ισοζύγιο αβεβαιοτήτων για τον προσδιορισμό της καθαρότητας διμεθυλοσουλφόνης με qNMR και εσωτερικό πρότυπο 3,5 δις(τριφθορομεθυλ)βενζοϊκό οξύ που αποτέλεσε αντικείμενο της σύγκρισης κλειδί CCQM-P150 που αφορά στον τρόπο προετοιμασίας δειγμάτων, λήψης και επεξεργασίας φασμάτων qNMR.

Πίνακας 2: Ισοζύγιο αβεβαιοτήτων για τον προσδιορισμό της καθαρότητας διμεθυλοσουλφόνης με qNMR και εσωτερικό πρότυπο 3,5 δις(τριφθορομεθυλ)βενζοϊκό οξύ

συνιστώσα αβεβαιότητας	τιμή	μονάδα	$u_i$	$u_i/x_i$	$C_i$	$C_i u_i$	$(C_i u_i)^2$
λήψη & επεξεργασία φάσματος			0,00075		1	0,00075	5,658E-07
προετοιμασία δείγματος			0,00047		1	0,00047	2,216E-07
λόγος σημάτων DMSO <sub>2</sub> /BTFMBA	0,9984		0,00089	6,790E-04	1001,23	0,88844	7,893E-01
μοριακή μάζα DMSO <sub>2</sub>	94,135	g mol <sup>-1</sup>	0,00508	5,398E-05	10,62	0,05396	2,911E-03
μοριακή μάζα BTFMBA	258,117	g mol <sup>-1</sup>	0,00522	2,024E-05	-3,87	-0,02023	4,092E-04
αριθμός <sup>1</sup> H στο μόριο DMSO <sub>2</sub>	6	nucI/mol	0,00011	1,800E-05	-166,61	-0,01799	3,238E-04
αριθμός <sup>1</sup> H στο μόριο BTFMBA	3	nucI/mol	0,00005	1,800E-05	333,21	0,01799	3,238E-04
μάζα DMSO <sub>2</sub>	7,1	mg	0,00057	8,021E-05	-140,79	-0,08018	6,428E-03
μάζα BTFMBA	39	mg	0,00067	1,717E-05	25,63	0,01716	2,946E-04
συντελεστής διόρθωσης άωσης	1,00001		0,00000	4,065E-06	999,63	0,00406	1,651E-05
καθαρότητα BTFMBA	999,59	mg g <sup>-1</sup>	0,26000	2,601E-04	1,00	0,26001	6,761E-02
<b>καθαρότητα DMSO<sub>2</sub></b>							<b>999,642</b>
<b>συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα</b>							<b>0,931</b>
διευρυμένη αβεβαιότητα (k=2,31)							2,152



Σχήμα 3: Τυπικό φάσμα <sup>1</sup>H NMR για τον προσδιορισμό της καθαρότητας διμεθυλοσουλφόνης με qNMR και εσωτερικό πρότυπο 3,5 δις(τριφθορομεθυλ)βενζοϊκό οξύ

Χ. Αλεξόπουλος<sup>1</sup>, Α. Γεωργοπούλου<sup>1</sup>, Π. Γιαννικολούλου<sup>1</sup>, Η. Κακουλίδης<sup>1</sup>, Ε. Λαμπή<sup>1</sup>, Β. Σχοινά<sup>1</sup>, Α. Παναγιωτοπούλου<sup>2</sup>, <sup>1</sup>ΕΧΗΜ/ΓΧΚ-ΕΙΜ, <sup>2</sup>Εργ. Φασματοσκοπίας NMR, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Ο προσδιορισμός της καθαρότητας οργανικών ενώσεων ως βασικό προαπαιτούμενο για την ανάπτυξη πιστοποιημένων υλικών αναφοράς.

5<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, 9-10 Μαΐου 2014



#### 4. Συμπεράσματα – προτάσεις

Ανάμεσα στα συμπεράσματα που αντλούνται από την εμπειρία του Εργαστηρίου Χημικής Μετρολογίας από τη συμμετοχή του σε διεργαστηριακές συγκρίσεις συγκαταλέγονται και τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν οι δύο διαφορετικές προσεγγίσεις σε σχέση με την ακρίβεια, την πολυπλοκότητα και την αβεβαιότητά τους. Όπως φάνηκε, η προσέγγιση των ισοζυγίων μάζας είναι αρκετά πιο σύνθετη και χρονοβόρα σε σχέση με την ποσοτική φασματοσκοπία NMR. Από την άλλη πλευρά, μπορεί η τεχνική qNMR να είναι απλούστερη και αποδοτικότερη, χαρακτηρίζεται όμως από υψηλότερες αβεβαιότητες (Liu and Hu, 2007; Quan et al., 2011; Quan 2014). Το πάγιο κόστος του εξοπλισμού που απαιτείται για την εφαρμογή των μεθόδων είναι παρόμοιο, όμως το λειτουργικό κόστος, ενώ το κόστος των αναλωσίμων μικρότερο. Πάντως και οι δύο τεχνικές παρουσιάζονται εξίσου αξιόπιστες.

Ενόψει της νέας οδηγίας ILAC-P10, η ιχνηλάτηση των αποτελεσμάτων στο SI θα είναι αποδεκτή μέσω της χρήσης μεθοδολογιών που εξασφαλίζουν πρόσβαση σε ένα EMI το οποίο θα έχει κατατεθειμένες ικανότητες βαθμονόμησης και μέτρησης στη σχετική βάση δεδομένων του BIPM. Κατά συνέπεια, η βαθμονόμηση των αναλυτικών συστημάτων θα πρέπει να πραγματοποιείται αποκλειστικά με υλικά που εξασφαλίζουν ανάλογη πρόσβαση σε EMI, ενώ το ίδιο θα πρέπει να συμβαίνει και για τις αναλυτικές διατάξεις που βαθμονομούνται με πιστοποιημένα πρότυπα αναφοράς.

Όσο αφορά στο EXHM και στη στρατηγική που εφαρμόζει για την εκπλήρωση του ρόλου του ως συνδετικού κρίκου που προσφέρει ιχνηλασιμότητα στο SI, οι επιτυχίες συμμετοχές του στις διεργαστηριακές συγκρίσεις CCQM-P117c και CCQM-K104 συνιστούν απόδειξη για τον ορθό προσδιορισμό της καθαρότητας οργανικών ουσιών. Παράλληλα, οι επιτυχίες συμμετοχές του στον προσδιορισμό υπολειμμάτων ρυπαντών και φαρμάκων σε τρόφιμα αποτελούν τεκμήριο της ικανότητας του εργαστηρίου να βαθμονομεί σωστά τις αναλυτικές του διατάξεις και να εφαρμόζει ορθές αναλυτικές πρακτικές για το διαχωρισμό και τη μέτρηση των οργανικών ενώσεων σε διάφορα υποστρώματα. Οι δύο αυτές διακριτές ικανότητες αποτελούν θεμελιώδεις υπόβαθρο για την παραγωγή υλικών αναφοράς που θα προσφέρουν την απαιτούμενη ιχνηλασιμότητα στο διεθνές σύστημα μονάδων.

#### 5. Βιβλιογραφία

Alexopoulos C., Kakoulides E., Lampi E., Panagiotopoulou A. (2013) Determination of purity of organic compounds. IMA 8<sup>th</sup>, Thessaloniki.

Awasthi A., Razzak M., Al-Kassas R., Joanne H., Sanjay, G. (2012) An overview on chemical derivatization and stability aspects of selected avermectin derivatives. Chem. Pharm. Bull., 60, 931-944.

Burkitt W.I., Pritchard C., Arsene C., Henrion A., Bunk D., O'Connor G. (2008) Toward Systeme International d'Unite-traceable protein quantification: From amino acids to proteins Anal. Biochem. 376, 242–251.

Ishikawa K., Hanari, N., Shimizu Y., Ihara T., Nomura A, Numata M., Yarita T., Kato K., Chiba K. (2011) Mass balance method for purity assay of phthalic acid esters: development of primary reference materials as traceability sources in the Japan Calibration Service System. Accred. Qual. Assur. 16, 311–322.

---

Χ. Αλεξόπουλος<sup>1</sup>, Α. Γεωργοπούλου<sup>1</sup>, Π. Γιαννικοπούλου<sup>1</sup>, Η. Κακουλίδης<sup>1</sup>, Ε. Λαμπή<sup>1</sup>, Β. Σχοινά<sup>1</sup>, Α. Παναγιωτοπούλου<sup>2</sup>, <sup>1</sup>ΕΧΗΜ/ΓΧΚ-ΕΙΜ, <sup>2</sup>Εργ. Φασματοσκοπίας NMR, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Ο προσδιορισμός της καθαρότητας οργανικών ενώσεων ως βασικό προαπαιτούμενο για την ανάπτυξη πιστοποιημένων υλικών αναφοράς.

5<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, 9-10 Μαΐου 2014

- Jancke H., Malz F., Haesselbarth W. (2005), Structure analytical methods for quantitative reference applications, *Accred. Qual. Assur.* 10, 421–429.
- Kim S.-H., Lee J., Ahn S., Song Y.-S., Kim D.-K., Kim B. (2013) Purity Assessment of Organic Reference Materials with a Mass Balance Method: A Case Study of Endosulfan-II *Bull. Korean Chem. Soc.* 34, 531.
- King B., Westwood S. (2001) GC-FID as a primary method for establishing the purity of organic CRMs used for drugs in sport analysis. *Fresenius J Anal. Chem.*, 370:194-199.
- Liu S.-Y., Hu C.-Q. (2007) A comparative uncertainty study of the calibration of macrolide antibiotic reference standards using quantitative nuclear magnetic resonance and mass balance methods, *Anal. Chim. Acta*, 602, 114-121.
- Ma K., Wang H., Zhao M., Xing J. (2009) Purity determination and uncertainty evaluation of theophylline by mass balance method, high performance liquid chromatography and differential scanning calorimetry *Anal. Chim. Acta* 650 227-233.
- Malz F. and Jancke H. (2005) Validation of quantitative NMR, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38, 813–823.
- Milton M.J.T. and Quinn T.J. (2001) Primary methods for the measurement of amount of substance. *Metrologia*, 38(4), 289-296.
- Quan C. (2014) Establishment of the purity values of carbohydrate certified reference materials using quantitative nuclear magnetic resonance and mass balance approach. *Food Chem.*, 153, 378–386.
- Quan, C., Su, F., Wang, H., & Li, H. (2011). Development of anabolic-androgenic steroids purity certified reference materials for anti-doping. *Steroids*, 76, 1527–1534.
- Quinn. T.J. (1997) Primary methods of measurement and primary standards, *Metrologia*; 34(1), 61-65.
- Rundlöf T., Mathiasson M., Bekiroglu S., Hakkarainen, Bowden T., Arvidsson T., (2010) Survey and qualification of internal standards for quantification by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52, 645–651.
- Rundlöf T., McEwen I., Johansson M., Arvidsson T. (2013) Use and qualification of primary and secondary standards employed in quantitative  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of pharmaceuticals *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, in press.
- Saito T., Ihara T., Koike M., Kinugasa S., Fujimine Y., Nose K., Hirai T. (2009) A new traceability scheme for the development of international system-traceable persistent organic pollutant reference materials by quantitative nuclear magnetic resonance. *Accred. Qual. Assur.* 14, 79–86.
- Schoenberger T. (2012) Determination of standard sample purity using the high-precision  $^1\text{H}$ -NMR process. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 247–254.
- Westwood S., Choteau T., Daireaux A., Josephs R.D, Wielgosz R.I. (2013) Mass balance method for the SI value assignment of the purity of organic compounds. *Anal. Chem.*, 85 3118-3127.

---

Χ. Αλεξόπουλος<sup>1</sup>, Α. Γεωργοπούλου<sup>1</sup>, Π. Γιαννικοπούλου<sup>1</sup>, Η. Κακουλίδης<sup>1</sup>, Ε. Λαμπή<sup>1</sup>, Β. Σχοινά<sup>1</sup>, Α. Παναγιωτοπούλου<sup>2</sup>, <sup>1</sup>ΕΧΗΜ/ΓΧΚ-ΕΙΜ, <sup>2</sup>Εργ. Φασματοσκοπίας NMR, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Ο προσδιορισμός της καθαρότητας οργανικών ενώσεων ως βασικό προαπαιτούμενο για την ανάπτυξη πιστοποιημένων υλικών αναφοράς.

5<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, 9-10 Μαΐου 2014