

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΒΟΗΘΗΤΙΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ
ΕΝΟΡΤΙΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



Επιμέλεια: *Βασιλεία Ι. Σινάνογλου – Ph.D. Χημικός, Επίκουρος
Καθηγήτρια ΤΕΙ Αθήνας*

2013

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Χημική Ανάλυση

Ως στόχο έχει:

1. Την ποιοτική ανάλυση (identification)
2. Την ποσοτική ανάλυση (assay)
3. Τον έλεγχο ορίων (limit test)
4. Τη διάκριση συστατικών μίγματος (discrimination)
5. Το διαχωρισμό συστατικών μίγματος (separation)
6. Την ταυτοποίηση και το χημικό χαρακτηρισμό ουσιών (chemical characterization)

Ταξινόμηση τεχνικών αναλύσεως

Οι αναλυτικές τεχνικές συσχετίζουν μια χαρακτηριστική φυσικοχημική ιδιότητα ουσίας με τη συγκέντρωση ή την ποσότητα της ουσίας. Διακρίνονται σε:

- Κλασσικές μεθόδους (ογκομέτρηση, σταθμικός προσδιορισμός, χρωστικές αντιδράσεις, κλπ.)
- Ενόργανες μεθόδους

Ταξινόμηση ενόργανων τεχνικών αναλύσεως

- Ηλεκτροχημικές τεχνικές: βασίζονται στην μέτρηση ηλεκτρικών ιδιοτήτων ουσιών (φορτίο, δυναμικό, ένταση ρεύματος, κλπ.) (π.χ. ποτενσιομετρία, αμπερομετρία, κουλομετρία, πολαρογραφία, αγωγιμομετρία, κλπ.)
- Οπτικές μέθοδοι: βασίζονται στην αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (ΗΜ) με την ύλη (π.χ. φασματοφωτομετρία, φθορισμομετρία, πολωσιμετρία, κλπ.)
- Ειδικές μέθοδοι: όλες οι μέθοδοι που δεν ανήκουν στις παραπάνω κατηγορίες αλλά συνδυάζονται με αυτές. Παραδείγματα είναι οι ενζυμικές μέθοδοι, οι ραδιοχημικές, οι μικροβιολογικές, οι χρωματογραφικές, οι ανοσολογικές, η φασματοσκοπία μαζών, κλπ.

Οπτικές Μέθοδοι Ενόργανης Ανάλυσης

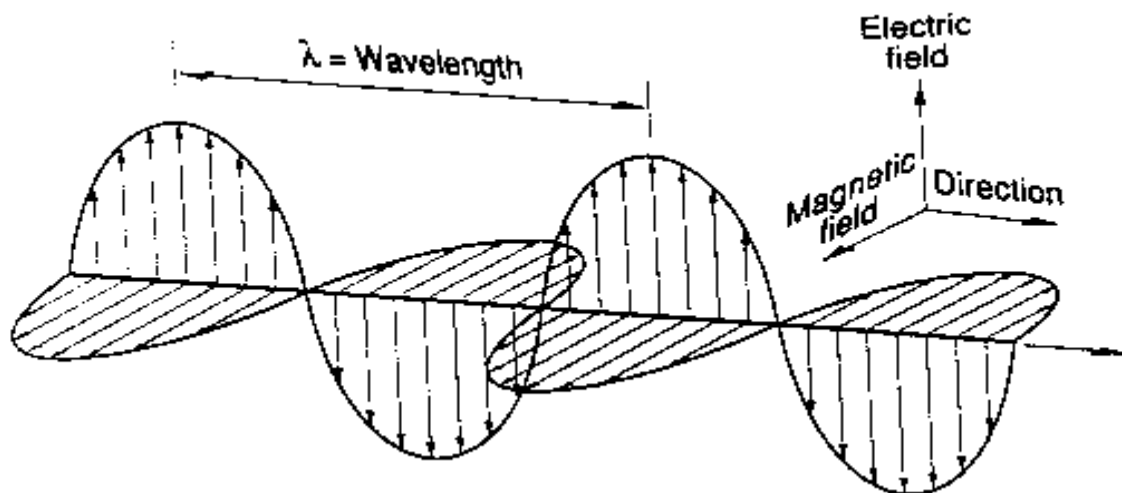
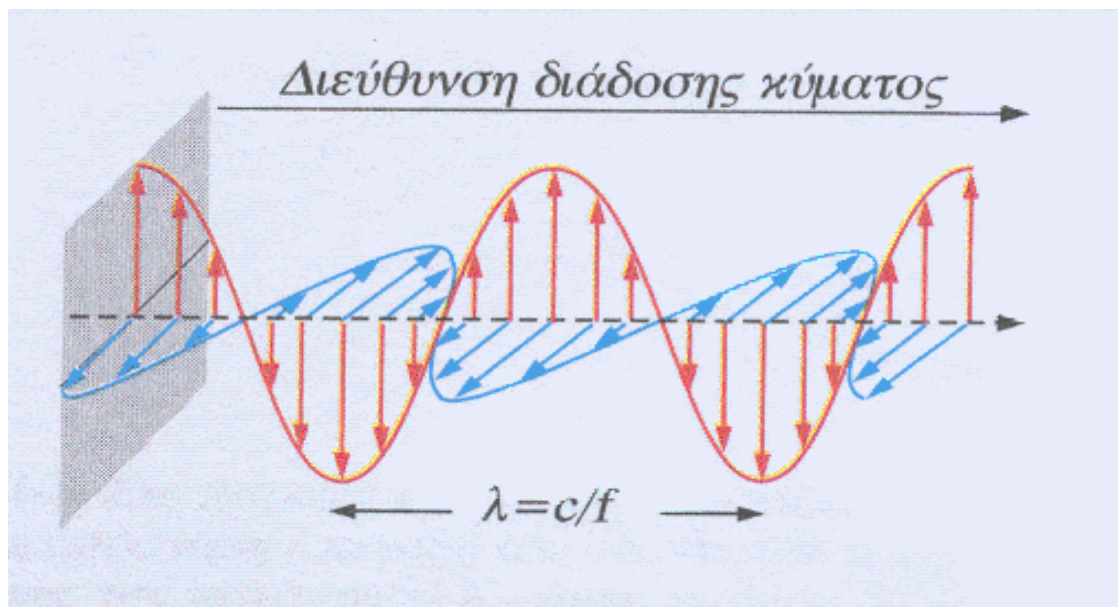
Οι οπτικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τις τεχνικές όπου μετρείται η ΗΜ, η οποία αλληλεπιδρά με την ύλη ή πηγάζει από αυτή. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

- Φασματοσκοπικές ή φασματοχημικές τεχνικές οι οποίες βασίζονται στην ικανότητα ουσιών να απορροφούν ή να εκπέμπουν ακτινοβολία (φωταύγεια) και στην μελέτη των φασμάτων τους.
- Μη φασματοσκοπικές τεχνικές οι οποίες βασίζονται στην αλληλεπίδραση ΗΜ ακτινοβολίας και ύλης, που συνεπάγεται μεταβολή κάποιας φυσικής ιδιότητας της ακτινοβολίας.

Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

- **Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (ΗΜΑ):** Οι διάφορες μορφές ακτινοβολούμενης ενέργειας, όπως οι κοσμικές ακτίνες, το ορατό φως, το υπεριώδες φως, τα ραδιοκύματα, κ.λπ.,
- Η επίδραση της ΗΜΑ πάνω στην ύλη έχει ως αποτέλεσμα την απορρόφηση ενέργειας στις διάφορες περιοχές του **ηλεκτρομαγνητικού φάσματος**.

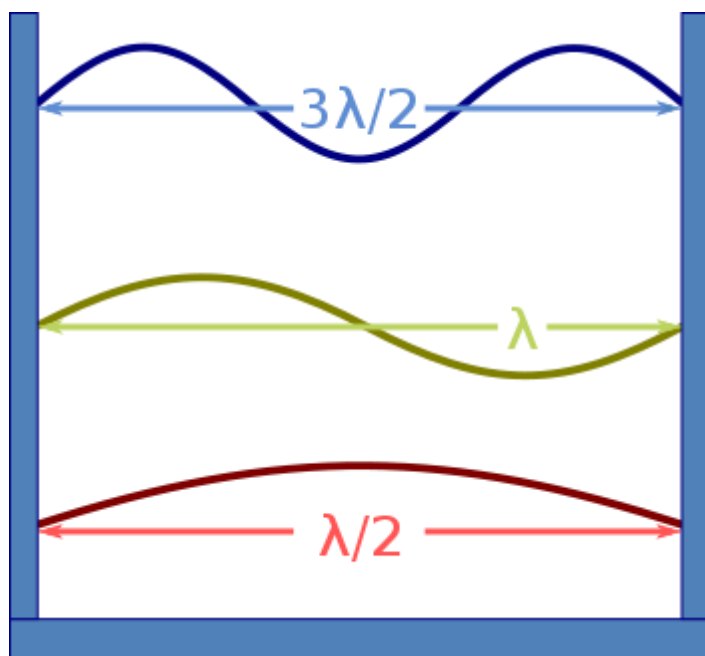
- Όταν πέσει ΗΜΑ πάνω στην επιφάνεια υλικού σώματος, ένα μέρος ανακλάται, ένα μέρος απορροφάται και ένα μέρος διαπερνά το υλικό σώμα.
- Το κβάντα της ΗΜΑ είναι το φωτόνιο, ενώ το κβάντα της ενέργειας, είναι το σωματιδιακό μέσον.
- Η ΗΜ ακτινοβολία είναι μορφή ενέργειας με κυματικές και σωματιδιακές ιδιότητες.
- Αποτελείται από κύματα ενέργειας που είναι συνδυασμός ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων. Τα πεδία αυτά διαδίδονται στο χώρο με την ταχύτητα του φωτός σχηματίζοντας μεταξύ τους γωνία 90° μοιρών.
- Η ΗΜ ακτινοβολία μεταδίδεται σε ευθεία γραμμή ως ένα απλό αρμονικό κύμα
- Χαρακτηριστικά μεγέθη της ακτινοβολίας είναι το μήκος κύματος, η συχνότητα, η ισχύς και η ενέργειά της.
- Η συχνότητα είναι ανεξάρτητη του μέσου διαδόσεως της ακτινοβολίας ενώ το μήκος κύματος εξαρτάται από το δείκτη διαθλάσεως του υλικού μέσω του οποίου διαδίδεται.



Σχήμα 1: Μετάδοση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στο χώρο ως συνδυασμός δύο εναλλασσόμενων πεδίων, ενός ηλεκτρικού και ενός μαγνητικού, που διαδίδεται σε ευθεία γραμμή κατά μήκος του άξονα x.

Χαρακτηριστικά μεγέθη ΗΜ ακτινοβολίας

- λ (μήκος κύματος): απόσταση ομολόγων σημείων διαδοχικών κυμάτων (μέτρηση σε mm, μm , nm, κλπ.)
- ν (συχνότητα): αριθμός κυμάτων διερχόμενων από σημείο ανά μονάδα χρόνου (μέτρηση σε s^{-1} ή Hz)
- $1/\lambda$ (κυματαριθμός): αριθμός διερχόμενων κυμάτων ανά μονάδα μήκους (μέτρηση σε cm^{-1})
- $c = \lambda \cdot \nu$ (ταχύτητα διαδόσεως ακτινοβολίας): ανάλογη του μέσου διαδόσεως όπου για το κενό ισούται με $3 \cdot 10^8$ m/s
- $E = h \cdot \nu$ (ενέργεια φωτονίου)
- $P = E/t$ (ισχύς ακτινοβολίας): ενέργεια δέσμης ακτινοβολίας η οποία προσπίπτει σε δεδομένη επιφάνεια ανά μονάδα χρόνου.

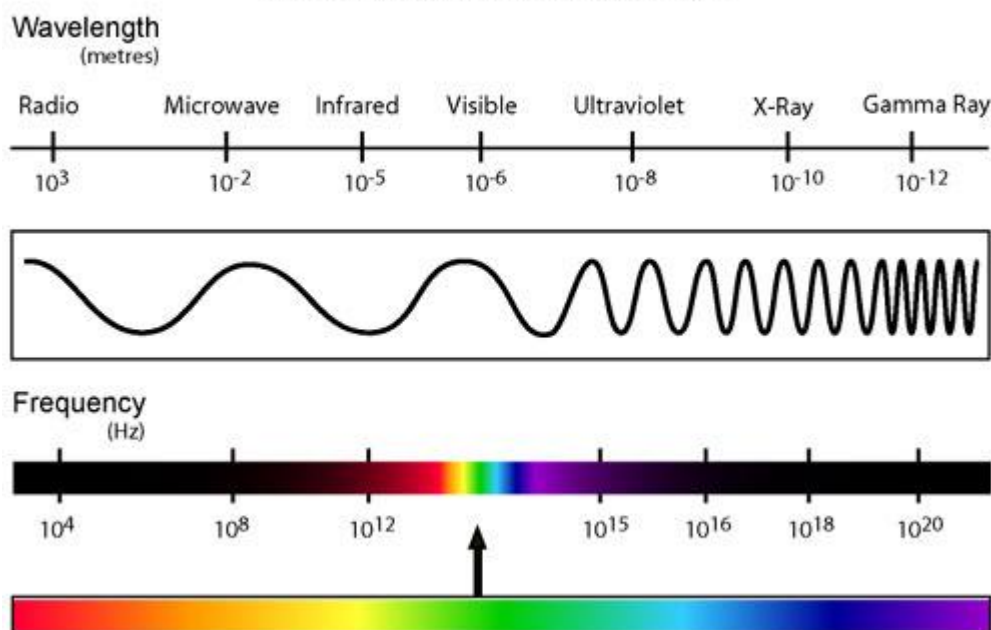


Σχήμα 2: Μήκος κύματος

Παρατηρήσεις

- 1) Όσο αυξάνεται το μήκος κύματος της ΗΜΑ ελαττώνεται η συχνότητα και κατ' επέκταση η ενέργεια της ακτινοβολίας (σχήμα 3).
- 2) Όταν ΗΜΑ προσπέσει σε υλικό μέρος αυτής ανακλάται, πιθανόν κάποιο μέρος απορροφάται και κατά τα άλλα διέρχεται από το υλικό.

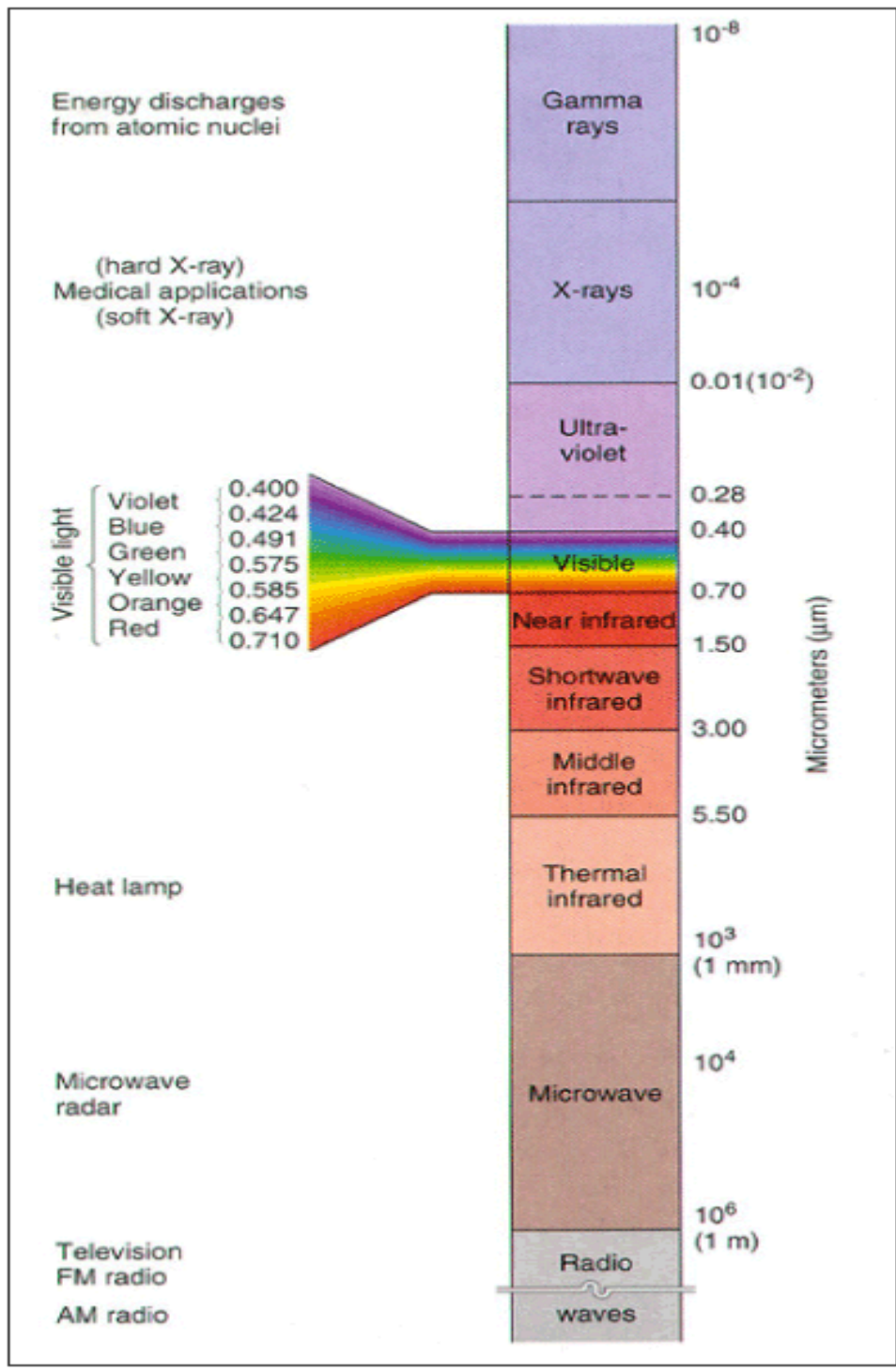
THE ELECTRO MAGNETIC SPECTRUM

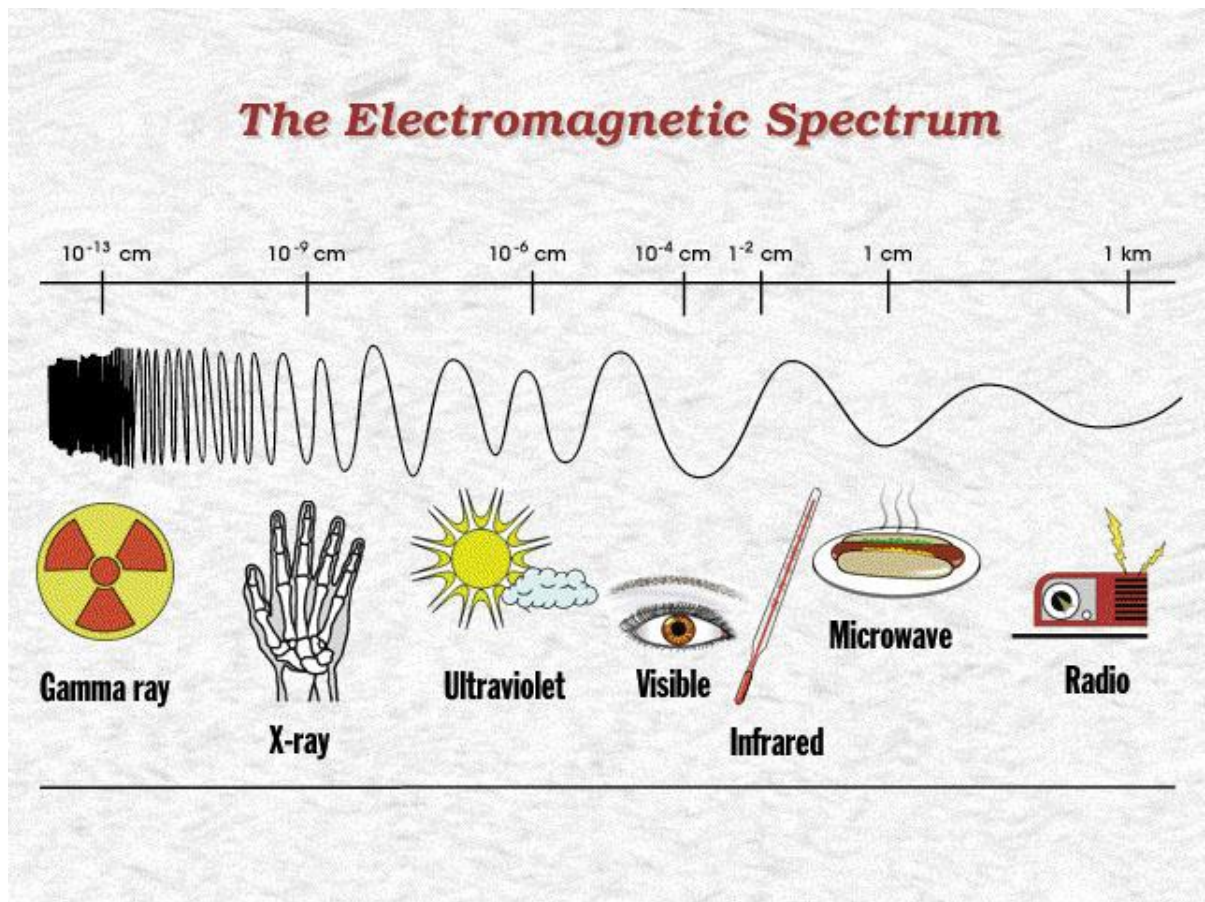
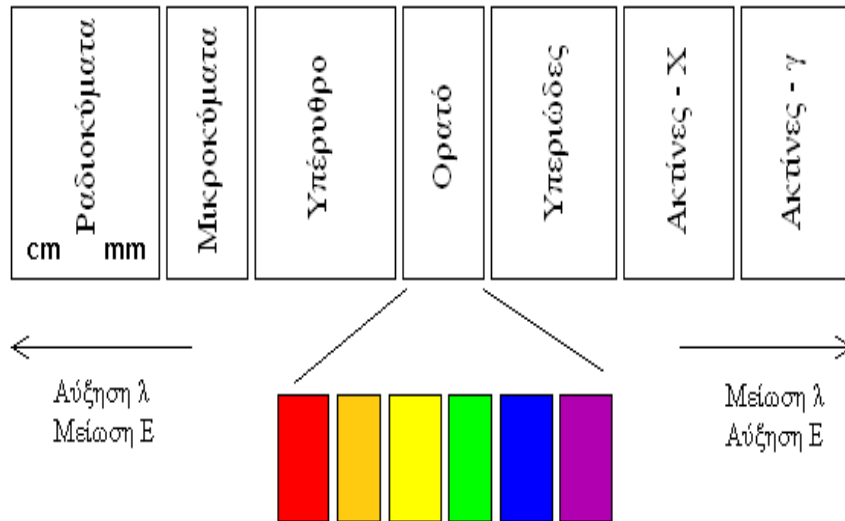


Σχήμα 3 : Φάσμα μηκών κύματος και συχνοτήτων ΗΜΑ

Φάσμα ΗΜ ακτινοβολίας

- Κοσμικές Ακτίνες (cosmic rays): $\sim 10^{22}$ Hz, 0.01pm.
- Ακτίνες- γ (γ -ray): 3×10^{18} - 3×10^{20} Hz, 100pm – 1pm. Προκαλούν ανακατατάξεις των πυρηνικών σωματιδίων.
- Ακτίνες-x (x-ray): 3×10^{16} - 3×10^{18} Hz, 10nm – 100pm. Προκαλούν ενεργειακές μεταβολές εσωτερικών ηλεκτρονίων του ατόμου ή του μορίου.
- Ορατό και Υπεριώδες (Visible, Ultra Violet): 3×10^{14} - 3×10^{16} Hz, $1 \mu\text{m}$ – 10nm. Προκαλεί μεταπτώσεις ηλεκτρονίων σθένους. Συμβαίνει μεταβολή της ηλεκτρικής διπολικής ροπής του μορίου που αλληλεπιδρά με το ηλεκτρικό πεδίο της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.
- Υπερύθρου (Infrared): 3×10^{12} - 3×10^{14} Hz, 100 μm – 1m. Παρατηρούνται δονήσεις ή στρεβλώσεις της δομής των μορίων.
- Μικροκύματα (Microwave): 3×10^{10} - 3×10^{12} Hz, 1cm – 100 μm . Συμβαίνει απορρόφηση ή εκπομπή ακτινοβολίας λόγω της περιστροφής των μορίων.
- Ραδιοσυχνότητα (Radiofrequency): συχνότητα 3×10^6 - 3×10^{10} Hz, 10m – 10cm. Η ενεργειακή μεταβολή αφορά το spin (περιστροφή γύρω από τον εαυτό του) πυρήνα ή ηλεκτρονίου.





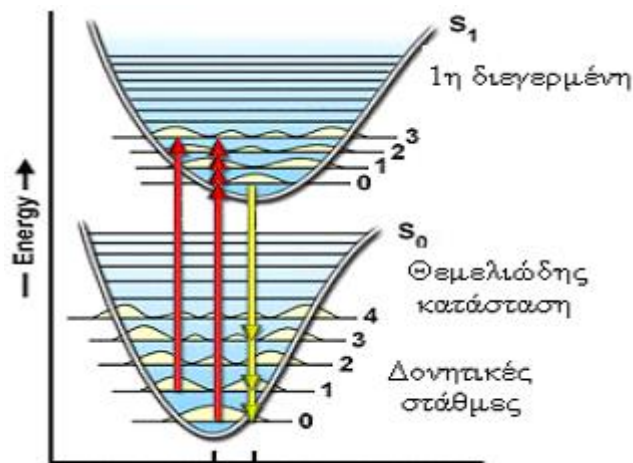
Σχήμα 4α, 4β και 4γ: Φάσμα ΗΜ ακτινοβολίας σχηματικά

Αλληλεπίδραση ΗΜ ακτινοβολίας και ύλης

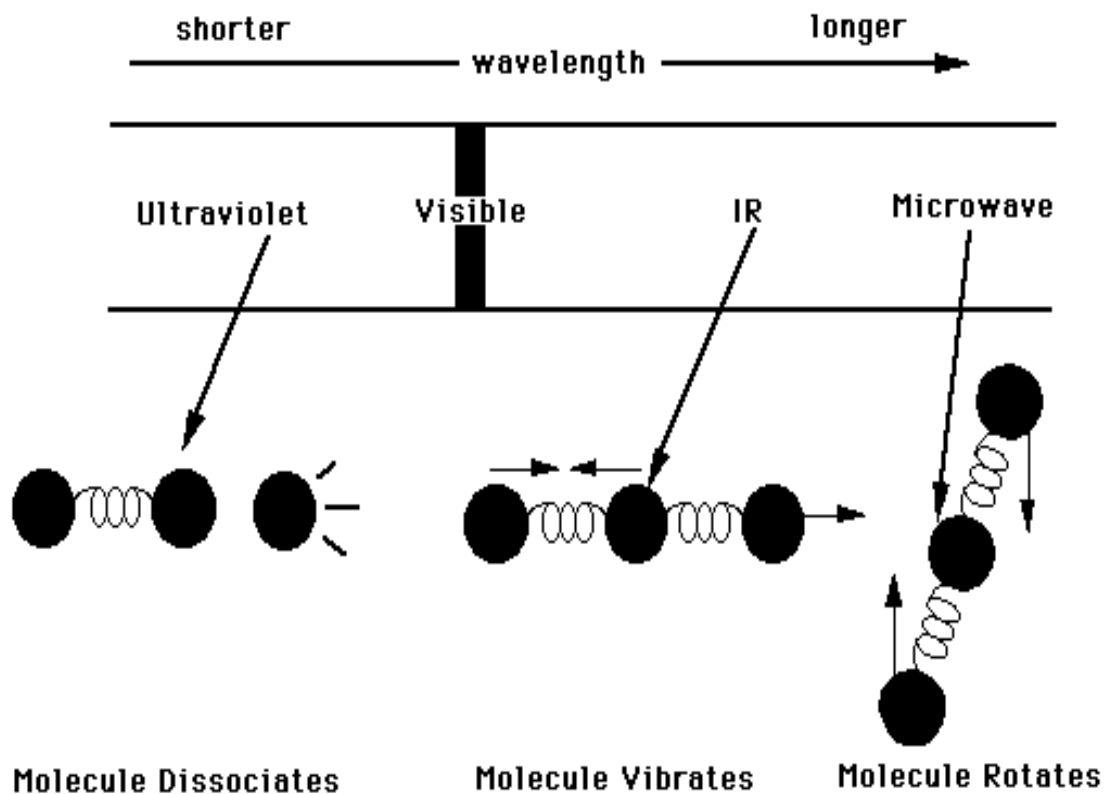
Για να υπάρξει μηχανισμός αλληλεπίδρασης της ΗΜΑ και του χημικού μορίου πρέπει οι πυρηνικές και ηλεκτρονικές μεταβολές του να προκαλέσουν κάποιο ηλεκτρικό ή μαγνητικό αποτέλεσμα, που με τη σειρά του θα επιδράσει στα ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία της ακτινοβολίας.

Απορρόφηση σε UV ή Vis και IR

- Η εσωτερική ενέργεια (Εεσ) μορίου ισούται με το άθροισμα τριών κβαντισμένων ενεργειών της ηλεκτρονικής (Εηλ), της δονητικής (Εδ) και της περιστροφικής (Επ).
- Η απορρόφηση ακτινοβολίας καταλλήλου λ σε UV ή Vis προκαλεί μεταπτώσεις ηλεκτρονίων σθένους ενώ στο IR δονητικές και περιστροφικές μεταπτώσεις.
- Κάθε στάθμη Εηλ περιέχει πολλές στάθμες Εδ και κάθε μία από αυτές πολλές στάθμες Επ, οπότε είναι δυνατό να συμβούν συγχρόνως πολλές ηλεκτρονικές μεταπτώσεις που διαφέρουν ελάχιστα ενεργειακά.
- Προκύπτει ταινιωτό φάσμα απορροφήσεως σε UV ή Vis.



Σχήμα 5: Απορρόφηση σε UV ή Vis



Σχήμα 6: Επίδραση HMA σε διατομικό μόριο

Φωταύγεια

- Η προσλαμβανόμενη ενέργεια μετά την απορρόφηση φωτονίου από σωματίδιο (μόριο, άτομο ή ιόν) οδηγεί σε φωτοδιέγερση του σωματιδίου.
- Το διεγερμένο σωματίδιο αποδιεγείρεται αποβάλλοντας την ενέργεια αυτή ποικιλοτρόπως.
- Μπορεί η αποδιέγερση να συνοδεύεται από έκλυση θερμότητας
- Μπορεί να γίνει εκπομπή δευτερογενούς ακτινοβολίας, η οποία λέγεται φωταύγεια, σε χαρακτηριστικό μήκος κύματος για το σωματίδιο.

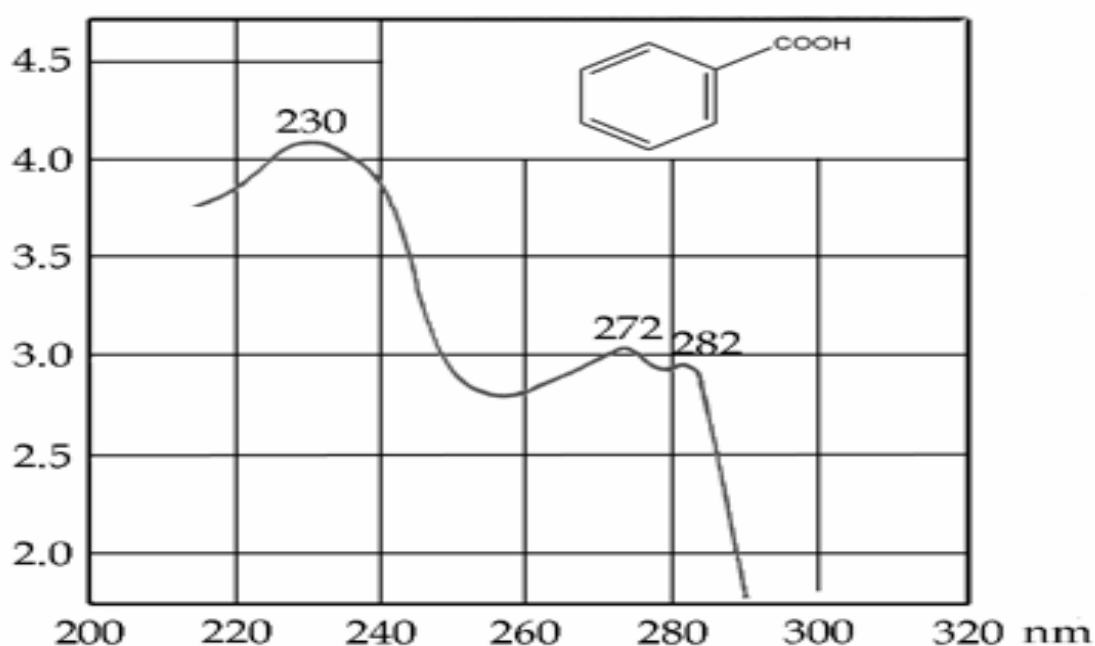
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΟΡΑΤΟΥ - ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ

Η φασματοφωτομετρία ορατού – υπεριώδους (UV-Vis) εφαρμόζεται κυρίως για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών συσχετίζοντας την απορροφημένη ΗΜ ακτινοβολία με τη συγκέντρωση της ουσίας.

Το τμήμα του μορίου που απορροφά την ΗΜ ακτινοβολία καλείται χρωμοφόρο.

Τα φάσματα που προκύπτουν, με την εμφάνιση χαρακτηριστικών ταινιών απορροφήσεως των διαφόρων χρωμοφόρων ομάδων, μας παρέχουν χρήσιμο πληροφοριακό υλικό για την πιστοποίηση της δομής και για τον ποιοτικό προσδιορισμό των ουσιών.



Σχήμα 1: Φάσμα UV του βενζοϊκού οξέος σε κυκλοεξάνιο

Αρχές ποσοτικής φασματοφωτομετρίας

Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία διέρχεται από διάλυμα ουσίας A η ισχύς της ακτινοβολίας μειώνεται προοδευτικά κατά μήκος της διαδρομής λόγω απορροφήσεως από την A.

Η ελάττωση της ισχύος $\Delta P = P_0 - P$ εξαρτάται από τη συγκέντρωση του διαλύματος της ουσίας και την απόσταση που διάνυσε η ακτινοβολία στο διάλυμα.

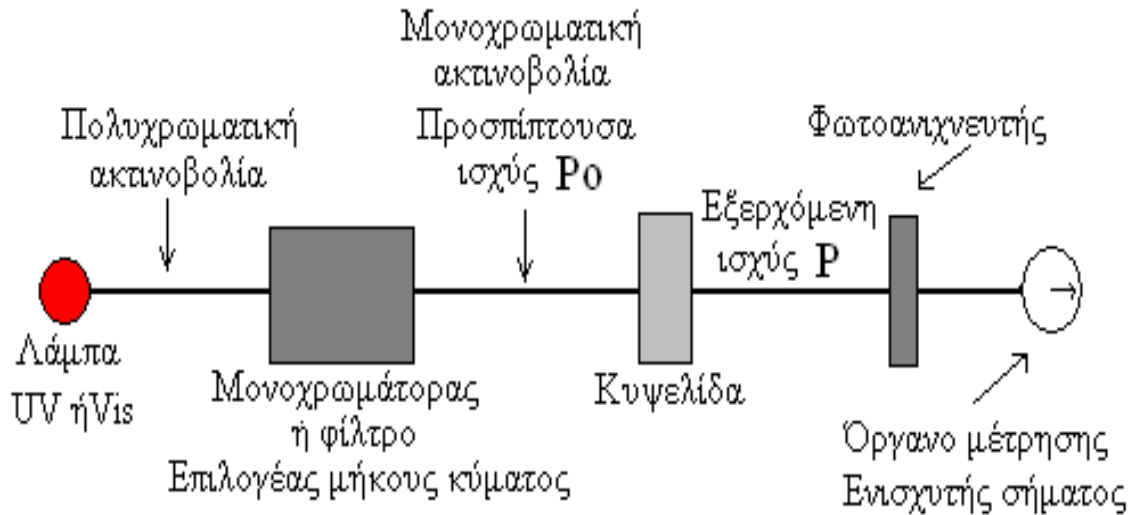
Ως απορρόφηση (A) ορίζεται ο λογάριθμος του κλάσματος ελαττώσεως της ισχύος.

$$A = \log(P_0/P) = -\log T = \log(1/T) = \log(100/\%T) = 2 - \log \%T$$

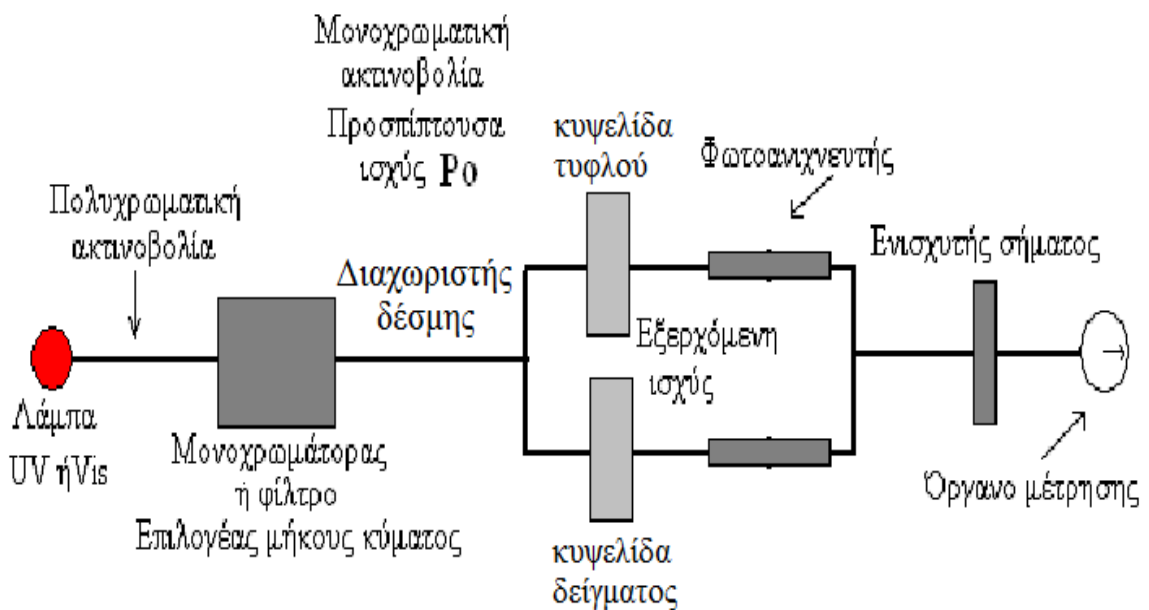
όπου P_0 = ισχύς προσπίπτουσας ακτινοβολίας,

P = ισχύς εξερχόμενης ακτινοβολίας,

T = διαπερατότητα



Σχήμα 2. Σχηματική παράσταση φασματοφωτομέτρου απλής δέσμης



Σχήμα 3. Σχηματική παράσταση φασματοφωτομέτρου διπλής δέσμης

Νόμος Beer: $A \approx c$ (g/L ή mol/L) (συγκέντρωση διαλύματος)

Νόμος Lambert: $A \approx b$ (cm) (εσωτερικό πάχος κυψελίδας) (η γραμμική σχέση A και b αποτελεί κανόνα χωρίς εξαίρεση).

Από τον συνδυασμό των παραπάνω πειραματικών νόμων προκύπτει η ποσοτική σχέση της φασματοφωτομετρίας:

Νόμος Beer -Lambert: $A = a b c$ ή $A = \epsilon b c$

όπου a = ειδική απορροφητικότητα (g L cm^{-1})

και ϵ = μοριακή απορροφητικότητα (mol L cm^{-1})

Οι σταθερές αναλογίας a και ϵ εξαρτώνται από τη φύση της ουσίας, τη φύση του διαλύτη, το μήκος κύματος της μονοχρωματικής ακτινοβολίας και τη θερμοκρασία και εκφράζουν την ικανότητα ουσίας να απορροφά ακτινοβολία σε ορισμένο λ σε UV-Vis.

Προϋποθέσεις νόμου Beer

Ο νόμος Beer προϋποθέτει τα εξής:

1. Ο μόνος μηχανισμός αλληλεπιδράσεως ΗΜ ακτινοβολίας και ύλης είναι η απορρόφηση
2. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία είναι μονοχρωματική
3. Η απορρόφηση γίνεται από όγκο διαλύματος ουσίας ομοιόμορφης διατομής
4. Τα σωματίδια που απορροφούν δρουν ανεξαρτήτως το ένα από το άλλο και ασχέτως με το είδος τους και το πλήθος τους.

Αποκλίσεις νόμου Beer

Πραγματικές:

1. Ο νόμος Beer δεν ισχύει για πυκνά διαλύματα ($c > 0,01\text{M}$) διότι μειώνονται οι αποστάσεις των σωματιδίων που απορροφούν και αλληλοεπηρεάζονται ως προς την κατανομή του φορτίου τους και κατ' επέκταση ως προς την ικανότητά τους να απορροφούν ακτινοβολία.
2. Σε πυκνά διαλύματα δεν παραμένει σταθερή η σταθερά αναλογίας ϵ οπότε στην ποσοτική σχέση της φασματοφωτομετρίας αντί για την ϵ εισάγεται η σχέση $[\epsilon n / (n^2 + 2)^2]$, όπου n ο δείκτης διαθλάσεως του κάθε διαλύματος.

Φαινομενικές:

1. Η απαιτούμενη μονοχρωματική ακτινοβολία δεν επιτυγχάνεται διότι ο μονοχρωμάτορας μπορεί να διακρίνει ορισμένο εύρος ταινίας από το συνεχές φάσμα της πηγής αντί του ενός μόνο μήκους κύματος (αρνητική απόκλιση).
2. Παράσιτη ακτινοβολία που αφορά το σύνολο ανεπιθύμητων ακτινοβολιών που φθάνουν στον ανιχνευτή χωρίς να ανήκουν στην επιλεγμένη από το μονοχρωμάτορα δέσμη.
3. Χημικές αποκλίσεις οι οποίες συμβαίνουν όταν τα σωματίδια που απορροφούν συμμετέχουν σε χημικές ισορροπίες οπότε μεταβάλλεται η συγκέντρωσή τους, λόγω πιθανών μετατοπίσεων της θέσης ισορροπίας.

Οργανολογία φασματοφωτομετρίας ορατού - υπεριώδους

Βασικές μονάδες φασματοφωτομέτρου:

1. Πηγή ακτινοβολίας σταθερής ισχύος
2. Επιλογέας επιθυμητού μήκους κύματος (φίλτρο ή μονοχρωμάτορας)
3. Κυψελίδα όπου τοποθετείται το διάλυμα του δείγματος
4. Ανιχνευτής ακτινοβολίας ο οποίος μετατρέπει το οπτικό σήμα σε ηλεκτρικό
5. Σύστημα μετρήσεως το οποίο περιλαμβάνει έναν ενισχυτή σήματος και ένα όργανο αναγνώσεως ή καταγραφικό.



Σχήμα 4. Φασματοφωτόμετρο Vis απλής δέσμης

Πηγές ακτινοβολίας UV - Vis

Για την υπεριώδη περιοχή χρησιμοποιείται λυχνία εκκενώσεως υδρογόνου (ή δευτερίου) ή λυχνία ξένου υψηλής πίεσεως (η οποία χρησιμοποιείται και στην ορατή περιοχή).

Για την ορατή περιοχή χρησιμοποιείται λυχνία εκκενώσεως βολφραμίου ή λυχνία ξένου υψηλής πίεσεως.

Επιλογείς μήκους κύματος – Μονοχρωμάτορες

Ο μονοχρωμάτορας (πρίσμα, ή παραθλαστικό φράγμα), αναλύει τα λευκό φως στις διάφορες μονοχρωματικές περιοχές του και επιλέγει τα επιθυμητό μήκος κύματος, όπου η προσδιοριζόμενη ουσία δίνει τη μέγιστη απορρόφηση. Τα κύρια μέρη ενός μονοχρωμάτορα είναι:

1. Σχισμή εισόδου πολυχρωματικής ακτινοβολίας που καθορίζει την ισχύ της.
2. Κατευθυντήριο κάτοπτρο για δημιουργία παράλληλης δέσμης.
3. Περιστρεφόμενο πρίσμα επιλογής μήκους κύματος.
4. Συγκεντρωτικός φακός.
5. Σχισμή εξόδου που επιτρέπει την έξοδο της ταινίας της δέσμης που επιλέχθηκε.

Χαρακτηριστικά ποιότητας μονοχρωμάτορα

- Διαχωριστικότητα $\Delta\lambda$ (nm): εκφράζει τη διαφορά δύο μηκών κύματος που μόλις διαχωρίζονται πλήρως.
- Διαχωριστική ικανότητα $R = \lambda/\Delta\lambda$: ικανότητα διακρίσεως δύο σχεδόν πανομοιότυπων μηκών κύματος μέσου όρου λ .
- Ονομαστικό ή ενεργό εύρος ταινίας: για διαπερατότητα (T) ίση προς το μισό της μέγιστης T.
- Ισχύς παράσιτης ακτινοβολίας η οποία ελαττώνεται αυξανόμενης της διαχωριστικότητας.

Κυψελίδες

- Το υλικό της κυψελίδας επιλέγεται έτσι ώστε να επιτρέπει τη διόδο της ακτινοβολίας. Στο υπεριώδες χρησιμοποιείται χαλαζίας και στο ορατό ύαλος.

- Οι κυψελίδες έχουν συνήθως ορθογώνιο σχήμα και πάχος εσωτερικής διατομής 1,000 cm.
- Γεμίζονται τόσο ώστε ο μηνίσκος του διαλύματος να είναι υψηλότερα από το σημείο που διέρχεται η ακτινοβολία.
- Τοποθετούνται κάθετα ώστε να αποφεύγεται η ανάκλαση της ακτινοβολίας.
- Ο χειρισμός των κυψελίδων γίνεται από τις ημιδιαφανείς επιφάνειες αυτών.



Σχήμα 5. Κυψελίδες

Ανιχνευτές

Τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας ανιχνευτή είναι:

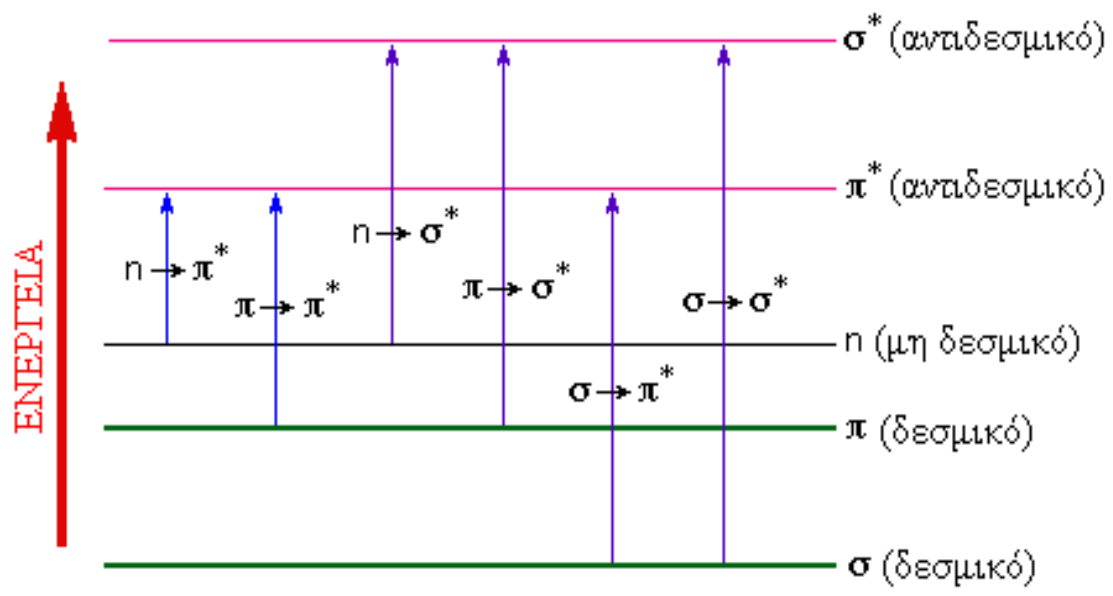
1. Απόκριση σε ευρεία περιοχή του ΗΜ φάσματος
2. Υψηλή ευαισθησία ώστε να ανιχνεύονται και ασθενείς ακτινοβολίες.
3. Μικρός χρόνος αποκρίσεως
4. Παραγωγή ηλεκτρικού σήματος που να ενισχύεται εύκολα.
5. Μικρό και σταθερό σήμα θορύβου
6. Μεγάλη περιοχή γραμμικότητας μεταξύ παραγομένου σήματος και προσπίπτουσας ισχύος της ακτινοβολίας.

Προσδιορισμός δομής ένωσης με τη φασματοφωτομετρία ορατού – υπεριώδους

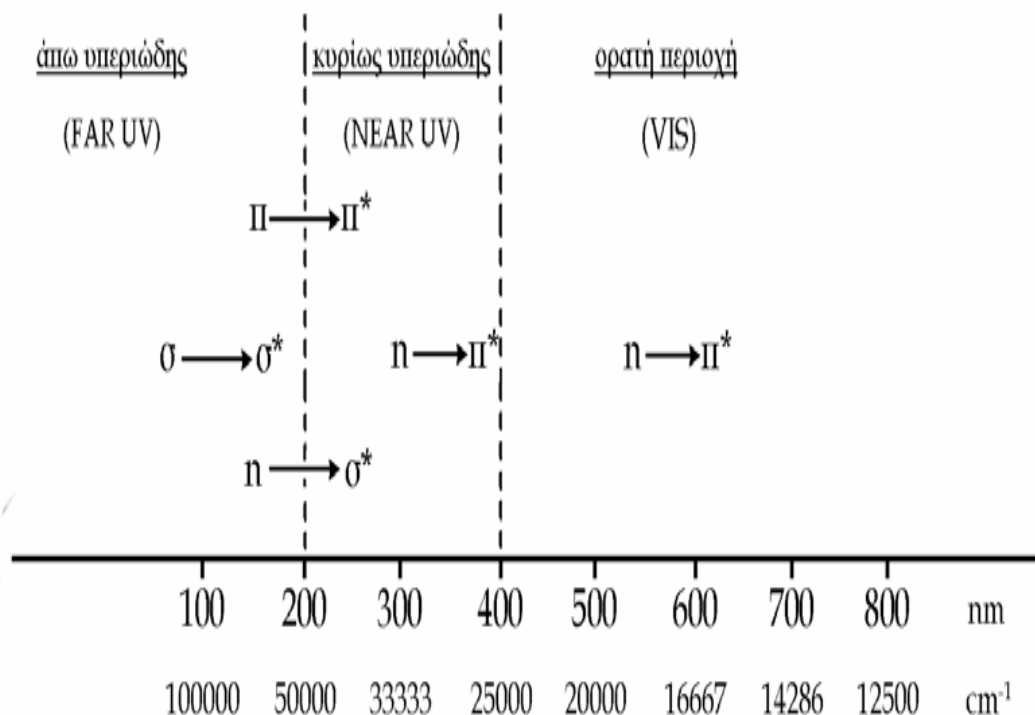
Στα περισσότερα μόρια ουσιών μπορούμε να διακρίνουμε τρεις κατηγορίες e^- , τα σ -δεσμικά, τα π -δεσμικά και τα n μη δεσμικά ηλεκτρόνια. Τα μη δεσμικά ηλεκτρόνια είναι συζευγμένα e^- , τα οποία δε συμμετέχουν σε μοριακούς δεσμούς.

- Η ποσότητα ενέργειας για τη διέγερση των ηλεκτρονίων ανταποκρίνεται στην εμφάνιση απορροφήσεων στο UV [άπω υπεριώδες (far UV) κάτω των 200 nm και κυρίως υπεριώδες (near UV) μεταξύ 200 και 400 nm] ή Vis (ορατό) μεταξύ 400 και 800 nm.

- Η μετάπτωση $\sigma \rightarrow \sigma^*$ (δεσμικό $\sigma-e^-$ σε αντιδεσμικό $\sigma-e^-$) απαιτεί ενέργεια μήκους κύματος εντός του άπω UV. Τα σ -δεσμικά απαιτούν υψηλή ενέργεια για να διεγερθούν και μεγαλύτερη από τα π - και n - ηλεκτρόνια, διότι η ηλεκτρονική τους πυκνότητα κατανέμεται με μέγιστη πιθανότητα στον άξονα μεταξύ των πυρήνων των ατόμων που συνδέονται, γεγονός που τους προσδίδει μέγιστη σταθερότητα.
- Οι μεταπτώσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ (δεσμικό $\pi-e^-$ σε αντιδεσμικό $\pi-e^-$) και $n \rightarrow \sigma^*$ (μη δεσμικό $n-e^-$ σε αντιδεσμικό $\sigma-e^-$) εμφανίζονται στο όριο άπω UV και κυρίως UV.
- Η μετάπτωση $n \rightarrow \pi^*$ (μη δεσμικό $n-e^-$ σε αντιδεσμικό $\pi-e^-$) στο κυρίως UV και Vis. Γενικώς τα n - ηλεκτρόνια απαιτούν τη χαμηλότερη ενέργεια για να διεγερθούν.



Σχήμα 6. Ηλεκτρονικές μεταπτώσεις

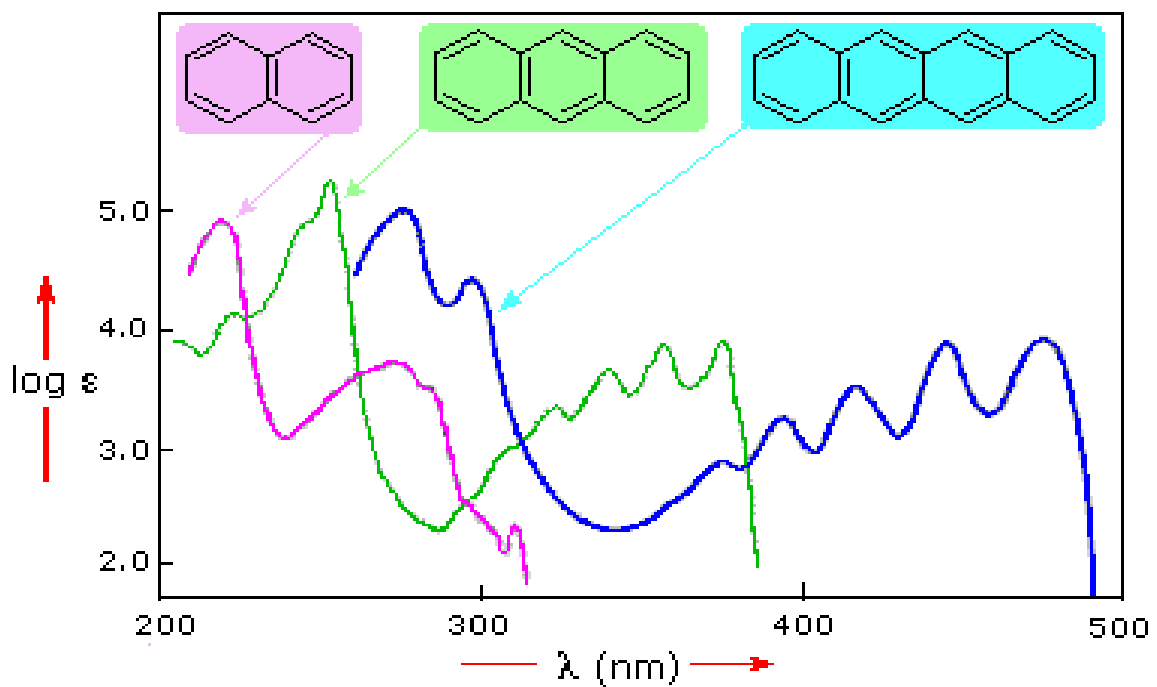


Σχήμα 7: Ηλεκτρονικές μεταβάσεις στην UV-VIS φασματοσκοπία

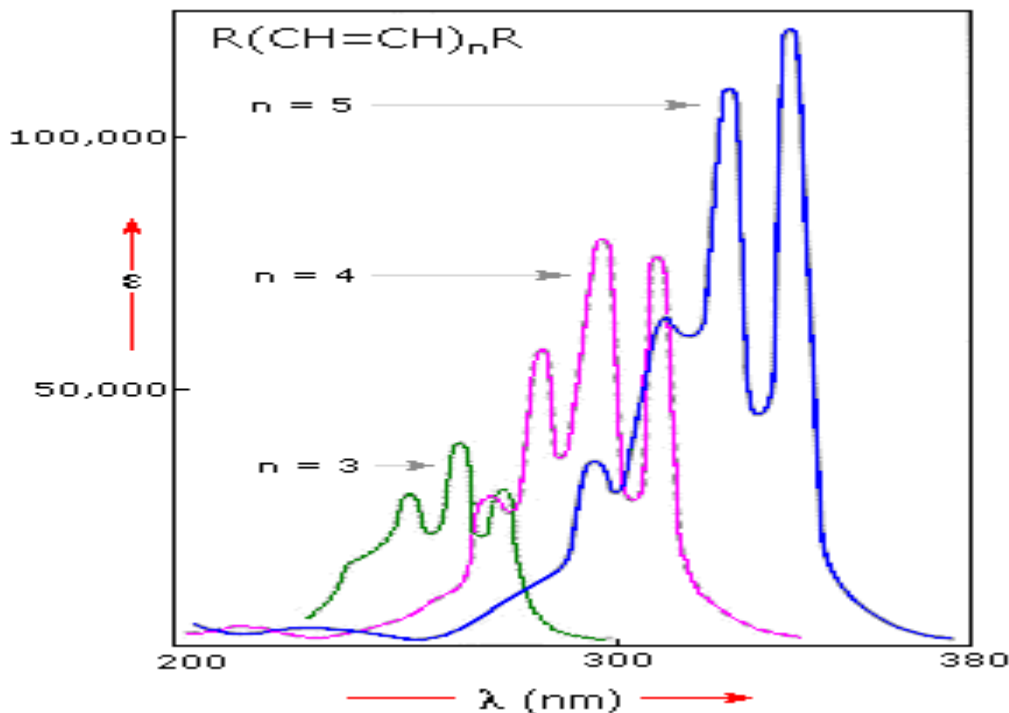
- Οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες, που έχουν μόνο $\sigma \rightarrow \sigma^*$ μεταβάσεις, δίνουν απορροφήσεις στο άπω UV, που είναι μικρής πρακτικής σημασίας από αναλυτικής πλευράς.
- Για μεμονωμένους διπλούς ή τριπλούς δεσμούς σε ένα οργανικό μόριο οι $\pi \rightarrow \pi^*$ μεταβάσεις εμφανίζονται στο άπω UV χωρίς μεγάλες διακυμάνσεις.
- Οι μεταβάσεις $n \rightarrow \pi^*$ ποικίλουν σημαντικά σε μήκος κύματος, εμφανίζονται στο κυρίως UV, με καθοριστικό παράγοντα τη φύση των ατόμων στους δεσμούς.
- Η ύπαρξη συζυγιακών διπλών δεσμών σε μια οργανική ένωση έχει ως αποτέλεσμα μία ισχυρή μετάβαση $\pi \rightarrow \pi^*$, που μετακινεί την απορρόφηση στην κυρίως UV περιοχή.
- Η ομάδα ατόμων που συμβάλλει στην απορρόφηση ακτινοβολίας καλείται χρωμοφόρος ομάδα (chromophore). Παραδείγματα χρωμοφόρων ομάδων είναι οι C=C, C=O, C=N, C≡C, C≡N, κλπ.
- Οι χρωμοφόρες ομάδες με διπλούς και τριπλούς δεσμούς, υπόκεινται σε ενεργειακές μεταβάσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ που απορροφούν σε μικρά μήκη κύματος της UV περιοχής.
- Αλλαγές στη δομή των ατόμων της χρωμοφόρου ομάδας προκαλεί μεταβολή της απορροφούμενης ενέργειας, του μήκους κύματος και της απορροφούμενης ισχύος.
- Αυξόχρωμες (auxochromes) ομάδες είναι ομάδες που διαθέτουν ελεύθερα ζεύγη ηλεκτρονίων (π.χ. -OH, -OR, -NH₂, -SH, -Cl, Br, κλπ.) και με την παρουσία τους στις οργανικές ενώσεις επιδρούν στην απορρόφηση της κυρίας χρωμοφόρου ομάδας, αυξάνοντας την ισχύ και το μήκος κύματος της απορρόφησης.
- Βαθυχρωμία ή ερυθρή μετατόπιση είναι η μετατόπιση του μέγιστου της ταινίας απορροφήσεως σε μεγαλύτερα μήκη κύματος.
- Υψιχρωμία ή μπλε μετατόπιση είναι η μετατόπιση του μέγιστου της ταινίας απορροφήσεως σε μικρότερα μήκη κύματος.
- Υπερχρωμία είναι η αύξηση της απορροφούμενης ισχύος λόγω αύξησεως του ϵ .
- Υποχρωμία είναι η μείωση της απορροφούμενης ισχύος λόγω μειώσεως του ϵ .

- Βαθυχρωμία μπορεί να συμβεί με εισαγωγή νέας χρωμοφόρου ομάδας στο μόριο, είτε με εισαγωγή αυξόχρωμης ομάδας σε συζυγή θέση με χρωμοφόρο ομάδα ή εξαιτίας του διαλύτη.
- Υπερχρωμία μπορεί να συμβεί με εισαγωγή αυξόχρωμης ομάδας σε συζυγή θέση με χρωμοφόρο ομάδα
- Σημαντικές αλλαγές στα φάσματα UV-VIS προκαλούνται με την παρουσία δύο ή περισσότερων διπλών δεσμών ιδιαίτερος συζυγών στα οργανικά μόρια.
- Οι μεταβάσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ και $n \rightarrow \pi^*$ ενισχύονται σε μεγάλο βαθμό και οι απορροφήσεις τους παρουσιάζονται σε μεγαλύτερο μήκος κύματος.

$-\text{C}=\text{C}-$	$\lambda_{\text{max}} \text{ (nm)} \pi \rightarrow \pi^* = 170$
$-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-$	$\lambda_{\text{max}} \text{ (nm)} \pi \rightarrow \pi^* = 220$
$-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-$	$\lambda_{\text{max}} \text{ (nm)} \pi \rightarrow \pi^* = 260$
$-\text{C}=\text{O}$	$\lambda_{\text{max}} \text{ (nm)} \pi \rightarrow \pi^* = 166$
	$\lambda_{\text{max}} \text{ (nm)} n \rightarrow \pi^* = 280$
$-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$	$\lambda_{\text{max}} \text{ (nm)} \pi \rightarrow \pi^* = 240$
	$\lambda_{\text{max}} \text{ (nm)} n \rightarrow \pi^* = 320$



Σχήμα 8. Φαινόμενο βαθυχρωμίας λόγω αύξησης των αρωματικών δακτυλίων



Σχήμα 9: Φαινόμενο βαθυχρωμίας και υπερχρωμίας λόγω αύξησης των διπλών δεσμών

- Η ύπαρξη συζυγιακών διπλών δεσμών σε οργανική ένωση προκαλεί ισχυρή μετάβαση $\pi \rightarrow \pi^*$, που μετακινεί την απορρόφηση στην κυρίως UV περιοχή.
- Η υπεριώδης φασματοσκοπία είναι εξαιρετικά χρήσιμη στη μελέτη τέτοιων συστημάτων.
- Το χρώμα στις οργανικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους οφείλεται συνήθως στην ύπαρξη συζυγιακών διπλών δεσμών που απορροφούν στην ορατή περιοχή.
- Τα φάσματα των συζυγών πολυενίων στο υπεριώδες παρουσιάζουν μία ισχυρή απορρόφηση με αρκετές κορυφές, τη μία κοντά στην άλλη.
- Το φάσμα της ένωσης *trans*- $\text{CH}_3\text{---}(\text{CH}=\text{CH}\text{---})_5\text{---CH}_3$ έχει κορυφές στα 298, 315, 330 και 340 nm.
- Καθώς αυξάνεται ο αριθμός των συζυγιακών διπλών δεσμών, η μετατόπιση της θέσης του λ_{max} μεταβάλλεται κατά +30 nm και μετά από 6 συζυγιακούς διπλούς δεσμούς το μόριο απορροφά στο ορατό φως και τελικά φθάνει σε ένα οριακό σημείο χωρίς παραπέρα αύξηση.
- Η κίτρινη χρωστική β -καροτένιο με 11 συζυγιακούς διπλούς δεσμούς εμφανίζει λ_{max} στα 452 nm.

Πορεία φασματοφωτομετρικής ποσοτικής ανάλυσης

Τα σπουδαιότερα στάδια της φασματοφωτομετρικής ποσοτικής ανάλυσης είναι:

1. Επιλογή απορροφούσας ουσίας και λήψη φάσματος απορροφήσεως της ουσίας.
2. Επιλογή βέλτιστου λ μέγιστης απορροφήσεως, όπου απορροφά μόνο η προσδιοριζόμενη ουσία.
3. Προετοιμασία διαλυμάτων προτύπων, δειγμάτων και τυφλού.
4. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς από ανάλυση προτύπων διαλυμάτων που επαληθεύει τη γραμμική συνάρτηση $A=f(c)$.

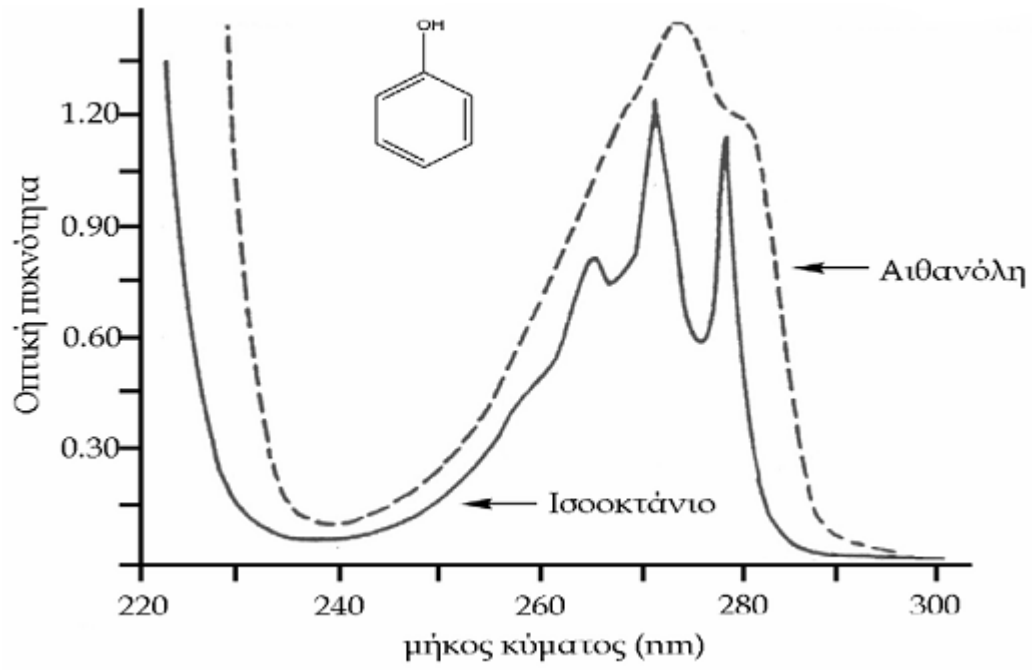
5. Υπολογισμός συγκεντρώσεως αγνώστου διαλύματος δείγματος από την καμπύλη αναφοράς.

Επιλογή κατάλληλων φυσικοχημικών συνθηκών

1. Μια ουσία προσδιορίζεται ως έχει ή μετά από χημική της μετατροπή με επίδραση κατάλληλων αντιδραστηρίων
2. Το σχηματιζόμενο παράγωγο της ουσίας πρέπει να είναι σταθερό και να παράγεται ποσοτικά και εκλεκτικά.
3. Επιλογή καταλλήλου pH ώστε να αποφεύγονται ανεπιθύμητες αντιδράσεις.
4. Επιλέγονται συγκεντρώσεις εντός της δυναμικής περιοχής συγκεντρώσεων της μεθόδου [γραμμική συνάρτηση $A=f(c)$].
5. Ο διαλύτης επηρεάζει το φάσμα απορροφήσεως, την απορροφητικότητα της ουσίας και τη διαλυτότητα όλων των αντιδραστηρίων.
6. Η προσθήκη των αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται με καθορισμένη σειρά ώστε να αποφεύγονται παράπλευρες αντιδράσεις.
7. Η θερμοκρασία ρυθμίζεται καταλλήλως και πρέπει να είναι σταθερή κατά τη μέτρηση απορροφήσεως για όλα τα διαλύματα.
8. Όσο μεγαλύτερη είναι η μοριακή απορροφητικότητα ϵ της ουσίας τόσο μεγαλύτερη η ευαισθησία της μεθόδου. Η ελάχιστη τιμή της ϵ καθορίζεται από την μικρότερη A που μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια, το πάχος της κυψελίδας και την ελάχιστη συγκέντρωση της απορροφούσας ουσίας.

Διαλύτες για Φασματοσκοπία UV-VIS

- Βασικό κριτήριο καλού διαλύτη για φάσματα UV-VIS είναι να μην απορροφά στο ίδιο λ με τη διαλυμένη ουσία. Οι διαλύτες που δεν έχουν συζυγικούς διπλούς δεσμούς είναι οι πιο κατάλληλοι.
- Οι πολικοί διαλύτες δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τη διαλυμένη ουσία και εξασθενίζουν την λεπτή υφή του φάσματος.
- Οι πιο κοινοί διαλύτες είναι: νερό, 95% αιθανόλη και κανονικό -εξάνιο που δεν απορροφούν στην περιοχή του υπεριώδους των περισσότερων οργανικών ενώσεων.
- Άλλοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι: το ακετονιτρίλιο (190 nm), το χλωροφόρμιο (240 nm), το κυκλοεξάνιο (195 nm, κύρια απορρόφηση), η μεθανόλη (205 nm), το ισοοκτάνιο (195 nm) κλπ.



Σχήμα 10: Φάσμα UV της φαινόλης σε ένα πολικό και ένα μη πολικό διαλύτη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ

Εισαγωγή στη φασματοφωτομετρία υπέρυθρου

- Όλες σχεδόν οι μοριακές ενώσεις απορροφούν στο IR.
- Υπάρχουν ελάχιστες εξαιρέσεις όπως N₂ και O₂
- Το φάσμα IR είναι μοναδικό για συγκεκριμένη ένωση.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση της μοριακής δομής ένωσης.
- Επίσης για την επιβεβαίωση παρουσίας μορίων των οποίων το IR φάσμα είναι γνωστό.

Ορισμός Υπέρυθρου φάσματος

- Η υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος εκτείνεται από το ορατό μέχρι τα μικροκύματα (14.000 cm⁻¹ έως 10 cm⁻¹).
- Υποδιαιρείται στις περιοχές:
 1. Εγγύς Υπέρυθρο (Near IR) (14.000 έως 4.000 cm⁻¹).
 2. Μέσο Υπέρυθρο (Mid-IR) (4.000 έως 400 cm⁻¹).
 3. Άπω Υπέρυθρο (Far IR) (400 έως 10 cm⁻¹).
- Το πλέον ενδιαφέρον για τη χημική ανάλυση παρουσιάζει το Mid-IR όπου συμβαίνουν μεταβολές της δονητικής ενέργειας των μορίων ενώ αυτά παραμένουν στη θεμελιώδη ηλεκτρονική τους κατάσταση.

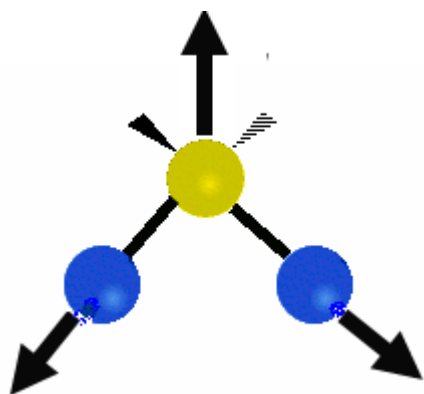
Προϋπόθεση απορροφήσεως στο Mid-IR

- Ένα μόριο απορροφά στο Mid-IR εφ' όσον η διπολική του ροπή μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δόνησεως, διαφορετικά η δόνηση θεωρείται ανενεργή στο IR.
- Όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολικής ροπής τόσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση. Η διπολική ροπή μοριακού δεσμού εξαρτάται από την διαφορά ηλεκτραρνητικότητας των ατόμων που συνδέονται.
- Τα λαμβανόμενα φάσματα υπέρυθρου χαρακτηρίζονται από πολλές ταινίες απορροφήσεως μικρού εύρους.
- Η υπέρυθη ακτινοβολία προκαλεί μεταπτώσεις από την χαμηλότερη ενεργειακά δονητική στάθμη σε διεγερμένες στάθμες της θεμελιώδους ηλεκτρονικής κατάστασης.

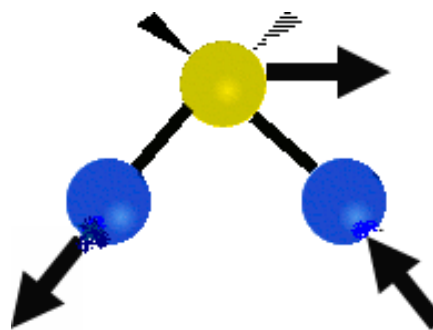
Είδη μοριακών δονήσεων

- Οι δονήσεις διακρίνονται σε:
 1. Δονήσεις τάσεως ή εκτατικές (ν) όπου η δόνηση γίνεται κατά μήκος του άξονα του δεσμού αλλάζοντας την απόσταση των συνδεδεμένων δονούμενων ατόμων. Διακρίνονται σε συμμετρικές και ασύμμετρες. Στην περίπτωση των δονήσεων αυτών μεταβάλλεται το μήκος του δεσμού αναλόγως με την κίνηση ενός αρμονικού ταλαντωτή.
 2. Δονήσεις κάμψης ή παραμορφώσεως (δ) όπου η δόνηση επιδρά στη γεωμετρία του μορίου μεταβάλλοντας τις γωνίες μεταξύ των μοριακών δεσμών. Διακρίνονται σε ψαλιδοειδείς, λικνιζόμενες, παλλόμενες και συστρεφόμενες.

Δονήσεις τάσεως (ν) ομάδας CH_2

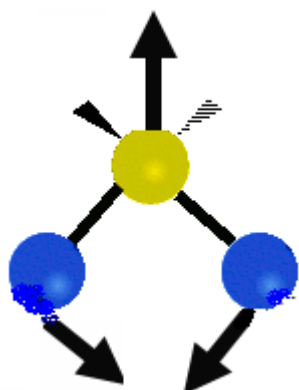


Συμμετρική δόνηση (ν) στα 2850 cm^{-1}

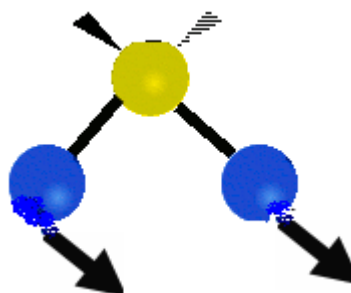


Ασύμμετρη δόνηση (ν) στα 2295 cm^{-1}

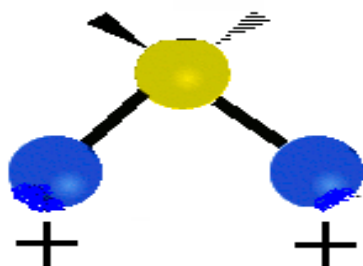
Δονήσεις κάμψης (δ) ομάδας CH_2



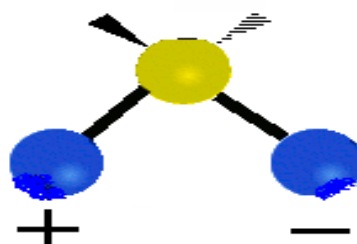
Ψαλδοειδής δόνηση (δ) στα 1450 cm^{-1}



Λικνιζόμενη δόνηση (δ) στα 720 cm^{-1}



Παλλόμενη δόνηση (δ) στα 1300 cm^{-1}



Συστρεφόμενη δόνηση (δ) στα 1300 cm^{-1}

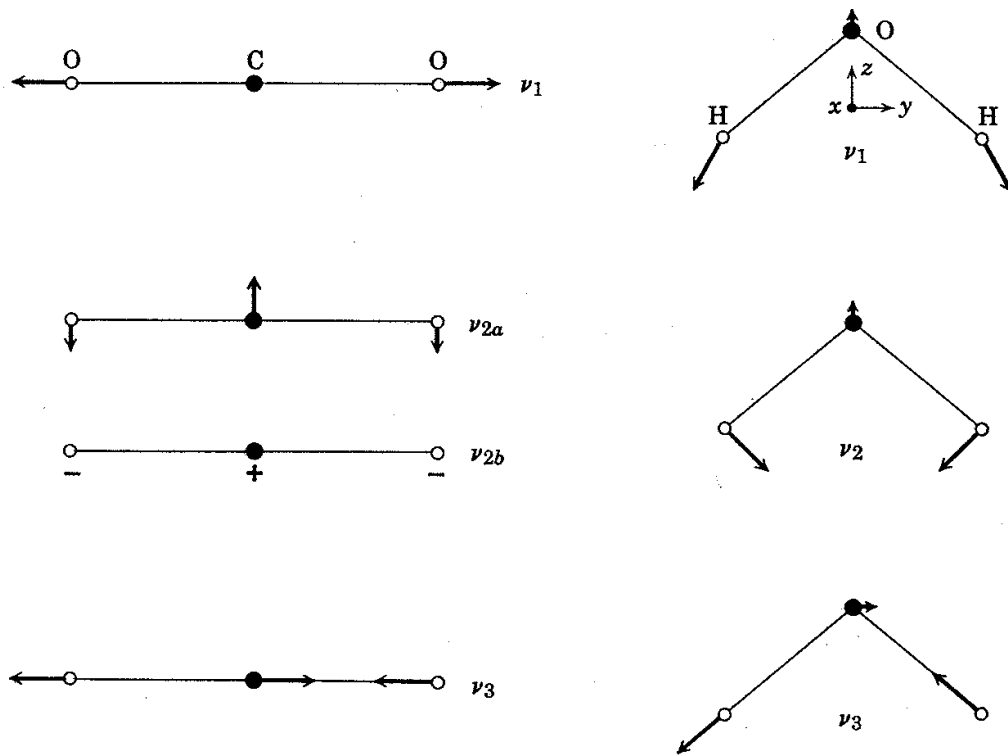
Αριθμός αναμενόμενων δονήσεων μορίου

- Ο θεωρητικός αριθμός των βασικών δονήσεων μορίου είναι συνάρτηση του αριθμού των ατόμων του και της γεωμετρίας του.
- Για μη γραμμικό μόριο με N άτομα αναμένονται $3N-6$ δονήσεις (βαθμοί ελευθερίας μείον 3 βαθμούς για κίνηση και 3 για την περιστροφή του μορίου).

- Για γραμμικό μόριο με N άτομα αναμένονται $3N-5$ δονήσεις (βαθμοί ελευθερίας μείον 3 βαθμούς για κίνηση και 2 για την περιστροφή του μορίου).

Παραδείγματα αναμενόμενων δονήσεων μορίου

- Ένα διατομικό μόριο ($N=2$) έχει βαθμούς ελευθερίας $3 \times 2 - 5 = 1$ και παρουσιάζει μία μόνο θεμελιώδη δόνηση στην υπέρυθη περιοχή (δόνηση τάσεως).
- Σε ένα τριατομικό μόριο ($N=3$), όπως το H_2O οι βαθμοί ελευθερίας είναι $3 \times 3 - 6 = 3$ και το μόριο παρουσιάζει τρία είδη δονήσεων (συμμετρική τάση, ασύμμετρη τάση και ψαλδοειδή κάμψη).
- Για τα γραμμικά τριατομικά μόρια του CO_2 και του HCN με $3N - 5 = 4$ βαθμούς ελευθερίας ($N=3$), αναμένουμε 4 είδη δονήσεων (συμμετρική τάση, ασύμμετρη τάση παλλόμενη κάμψη και συστρεφόμενη κάμψη). Οι δύο κάμψεις είναι ουσιαστικά οι ίδιες, εκτός από την κατεύθυνση στην οποία δονούνται και καλούνται εκφυλισμένες δονήσεις.



Σχήμα 1: Σχηματική παράσταση δονήσεων μορίων CO_2 και H_2O

Υπολογισμός συχνότητας δονήσεως τάσεως

- Η συχνότητα τάσεως δύο ατόμων και του μεταξύ τους δεσμού δίνεται από το νόμο του Hooke για τον αρμονικό ταλαντωτή.
- Η συχνότητα εξαρτάται από τις μάζες των δονούμενων ατόμων και την σταθερά ισχύος k και δίνεται από τη σχέση:

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{και} \quad v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{k \frac{m_1 + m_2}{m_1 \cdot m_2}}$$

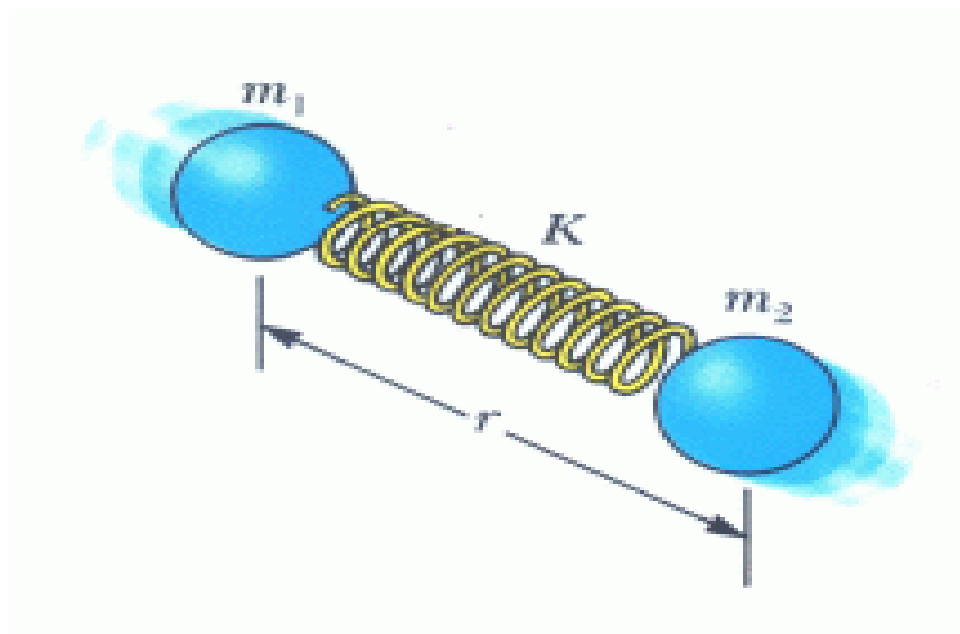
Όπου

$$\pi = 3,1416$$

K = σταθερά ισχύος του δεσμού

μ = ανηγμένη μάζα ίση προς $[m_1 \cdot m_2 / (m_1 + m_2)]$

Όσο μεγαλύτερη η διπολική ροπή ενός μοριακού δεσμού τόσο μεγαλύτερη και η σταθερά ισχύος K , οπότε τόσο μεγαλύτερη και η συχνότητα απορρόφησης ακτινοβολίας. Όσο μεγαλύτερη είναι η ατομική των ατόμων που συνδέονται, τόσο μεγαλύτερη και η ανηγμένη μάζα, οπότε τόσο μικρότερη και η συχνότητα απορρόφησης ακτινοβολίας.



Σχήμα 2: Ταλάντωση διατομικού μορίου

Υπολογισμός κυματαριθμού δονήσεως τάσεως

Από τις σχέσεις:

$$c = v \cdot \lambda \quad \text{και} \quad \lambda = 1/\bar{\nu}$$

Προκύπτει ότι:

$$c = v/\bar{\nu} \quad \text{οπότε} \quad \bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{k \frac{m_1 + m_2}{m_1 \cdot m_2}}$$

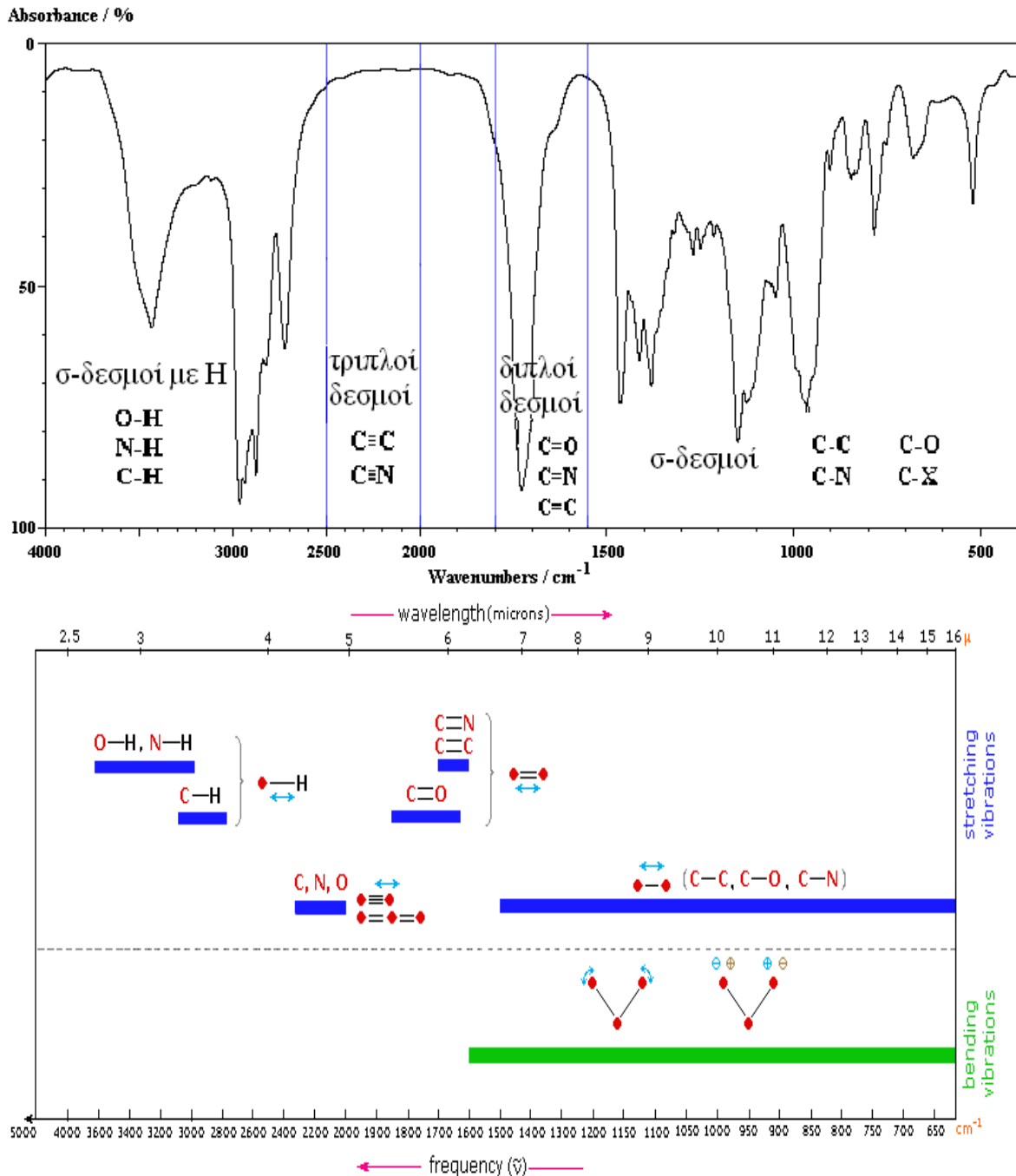
Για τον απλό δεσμό $k = 2 - 8 \cdot 10^5$ dyn/cm ενώ για τον διπλό και τριπλό δεσμό λαμβάνει διπλάσιες και τριπλάσιες τιμές αντιστοίχως.

Υποδιαίρεση Mid-IR

Οι απορροφήσεις μορίου στο Mid-IR συσχετίζονται με δύο τύπους δονήσεων, τις δονήσεις των χαρακτηριστικών ομάδων και των πολλαπλών δεσμών και τις δονήσεις του σκελετού του μορίου.

- 4.000 έως 2700 cm^{-1} : απορροφούν σ-δεσμοί βραχείς (C-H, O-H, N-H, S-H, Cl-H, κλπ.) δίνοντας δονήσεις τάσεως.

- 2.700 έως 2000 cm^{-1} : απορροφούν οι τριπλοί δεσμοί ($\text{C}\equiv\text{C}$, $\text{C}\equiv\text{N}$) ή διαδοχικοί διπλοί ($\text{C}=\text{C}=\text{C}$, $\text{N}=\text{C}=\text{O}$) δίνοντας δονήσεις τάσεως.
- 2.000 έως 1500 cm^{-1} : απορροφούν οι διπλοί δεσμοί ($\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{N}$, $\text{N}=\text{O}$, $\text{C}=\text{O}$, κλπ) δίνοντας δονήσεις τάσεως.
- 1.500 έως 400 cm^{-1} (περιοχή δακτυλικού αποτύπωματος): απορροφούν οι υπόλοιποι σ -δεσμοί ($\text{C}-\text{C}$, $\text{O}-\text{N}$, $\text{N}-\text{C}$, $\text{S}-\text{O}$, $\text{Cl}-\text{C}$, κλπ.) δίνοντας δονήσεις τάσεως. Στην περιοχή αυτή αναμένονται όλες οι δονήσεις του μοριακού σκελετού ή αλυσίδας, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές της μοριακής δομής και των αλληλεπιδράσεων στο μόριο και ως εκ τούτου παρέχουν το δακτυλικό αποτύπωμα του μορίου.



Σχήμα 3: Υποδιαίρεση Mid-IR

Κανόνες αναμενόμενων δονήσεων μορίου

- Βραχείς ισχυροί δεσμοί δονούνται σε υψηλότερο κυματαριθμό από επιμήκεις ασθενείς δεσμούς. Συγκεκριμένα οι σ-μοριακοί δεσμοί του H με άλλα άτομα απαιτούν μεγαλύτερη ενέργεια για δόνηση τάσεως οπότε απορροφούν σε υψηλότερο κυματαριθμό από πιο επιμήκεις σ-δεσμούς.
- Όσο αυξάνεται η πολλαπλότητα δεσμού και μειώνεται το μήκος του, οπότε δονείται σε υψηλότερο κυματαριθμό.
- Οι δονήσεις τάσεως μορίου συμβαίνουν σε υψηλότερο κυματαριθμό από τις δονήσεις κάμψης διότι απαιτούν μεγαλύτερη ενέργεια.
- Το φάσμα IR στην περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος είναι χαρακτηριστικό ως προς τις απορροφήσεις του για κάθε μόριο.

Μετατόπιση συχνοτήτων απορροφήσεων χαρακτηριστικών ομάδων

- Όταν χαρακτηριστικές ομάδες βρίσκονται κοντά, μπορεί να συμβεί συντονισμός των θεμελιωδών τους δονήσεων και μετατόπιση των συχνοτήτων απορρόφησης.
- Μετατοπίσεις συχνοτήτων χαρακτηριστικών ομάδων οργανικών ενώσεων αναμένονται λόγω της δημιουργίας δεσμών υδρογόνου μεταξύ δύο μορίων.
- Η φυσική κατάσταση ενός μορίου επηρεάζει τις συχνότητες των απορροφήσεων. Όσο πιο συμπυκνωμένη είναι η φυσική κατάσταση δείγματος ουσίας, μειώνεται η συχνότητα των απορροφήσεων λόγω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων.
- Το μοριακό βάρος του μορίου μετατοπίζει τη συχνότητα απορρόφησης. όσο αυξάνεται η μοριακή μάζα αυξάνεται και η ανηγμένη μάζα, οπότε μειώνεται η συχνότητα της δόνησης. Έτσι συγκρίνοντας τη συχνότητα δόνησεως των σ-δεσμών C-Cl, C-F και C-H, μεγαλύτερη συχνότητα θα έχει ο δεσμός C-H και μικρότερη ο δεσμός C-Cl.

σ – δεσμοί με H

Δεσμός	Κυματαριθμός (cm ⁻¹)	Εμφάνιση
C-H	3000 - 2850	Αλκάνια και όλες οι οργανικές ενώσεις με C-H
=C-H	3100 - 3000	Αλκένια και αρωματικά
≡C-H	3300	Αλκίνια του τύπου RC≡C-H
O=C-H	2800 και 2700	Αλδεΐδες (δύο κορυφές)
O-H	3400 – 3000	Αλκοόλες - φαινόλες
O-H (free)	~3600	
N-H	3450 - 3100	Αμίνες

Διπλοί δεσμοί

Δεσμός	Κυματαριθμός (cm ⁻¹)	Εμφάνιση
C=O	1840 - 1800 & 1780 - 1740	Ανυδρίτες
C=O	1750 – 1715	Εστέρες
C=O	1740 – 1680	Αλδεΰδες
C=O	1725 – 1665	Κετόνες
C=O	1720 – 1670	Καρβοξυλικά οξέα
C=O	1690 – 1630	Αμίδια
C=C	1675 – 1600	Αλκένια κλπ
C=N	1690 - 1630	
N=O	1560 - 1510 & 1370 - 1330	Νιτροενώσεις

Τριπλοί δεσμοί

Δεσμός	Κυματαριθμός (cm ⁻¹)	Εμφάνιση
C≡C	2260 – 2120	Αλκίνια
C≡N	2260 - 2220	Νιτρίλια

σ – δεσμοί

Δεσμός	Κυματαριθμός (cm ⁻¹)	Εμφάνιση
C-C	Κυμαινόμενο	Στο πλείστον των ενώσεων
C-O, C-N	1400 – 1000	Αιθέρες, αλκοόλες, οξέα, εστέρες
C-Cl	800 – 700	Χλωρίδια
C-Br, C-I	< 650	Βρωμίδια, ιωδίδια

Αποτίμηση φασμάτων IR

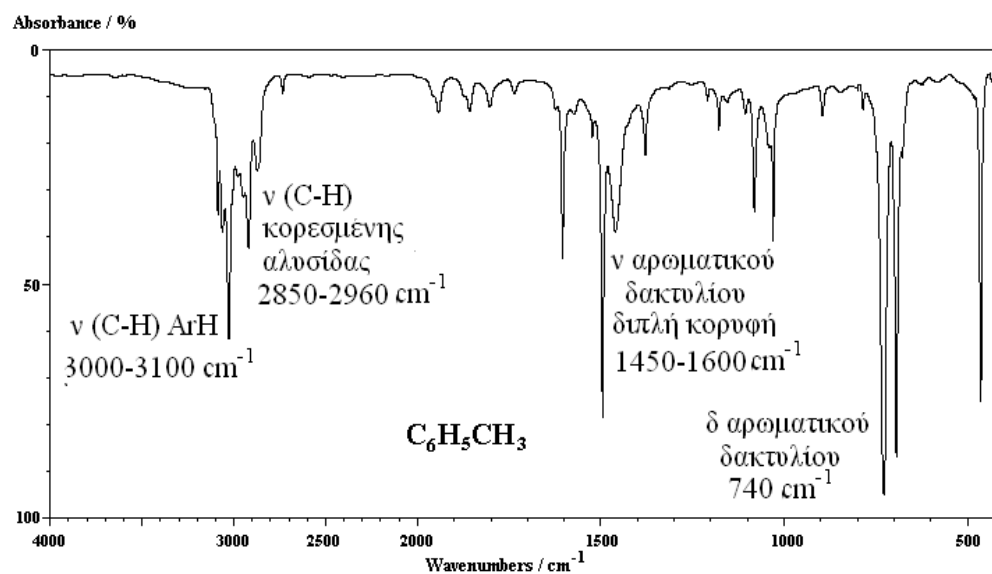
Για την ερμηνεία των φασμάτων IR ισχύουν τα εξής:

- Οι απορροφήσεις χαρακτηριστικών ή δραστικών ομάδων εμφανίζονται στην περιοχή 4000-1500 cm⁻¹.
- Οι απορροφήσεις σκελετού εμφανίζονται στην περιοχή κάτω των 1500 cm⁻¹ (περιοχή δακτυλικών αποτυπωμάτων).
- Οι χαρακτηριστικές ομάδες δίνουν απορροφήσεις, που εξαρτώνται από τη θέση τους στο μόριο.
- Οι πίνακες IR με τις χαρακτηριστικές απορροφήσεις (δραστικών ομάδων και σκελετού) οργανικών ενώσεων δίνουν τις γενικές εκτιμήσεις των περιοχών που απορροφούν από την βιβλιογραφία.
- Οι απορροφήσεις διακρίνονται ανάλογα με την έντασή τους σε ισχυρές (strong, s), μέτριες (medium, m), ασθενείς (weak, w) και πλατιές (broad, br). Η σύγκριση αυτή είναι ποιοτική και πρέπει να γίνεται κάτω από τις ίδιες συνθήκες συγκέντρωσης, χρόνου σάρωσης κ.λπ.

Αποτίμηση φασμάτων IR με δεδομένο το μοριακό τύπο

- Από το Μ.Τ. ανάλογα με τα περιεχόμενα ετεροάτομα (π.χ. O, N, S, κλπ.) και το πλήθος τους καταγράφουμε τις πιθανές χαρακτηριστικές ομάδες του μορίου όπως και κάνουμε πρόβλεψη της μορφής του ανθρακικού σκελετού.
- Στη συνέχεια καταγράφουμε τις απορροφήσεις του φάσματος και την έντασή τους.
- Συσχετίζοντας τα παραπάνω με τους πίνακες IR γίνεται η αποτίμηση.
- Τέλος από τα ευρήματα προτείνονται πιθανοί Σ.Τ. για το μόριο.

Αποτίμηση φάσματος IR τολουολίου



Οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες παρουσιάζουν μεγάλο αριθμό δονήσεων τάσης και κάμψης για τις ομάδες C=C και C-H.

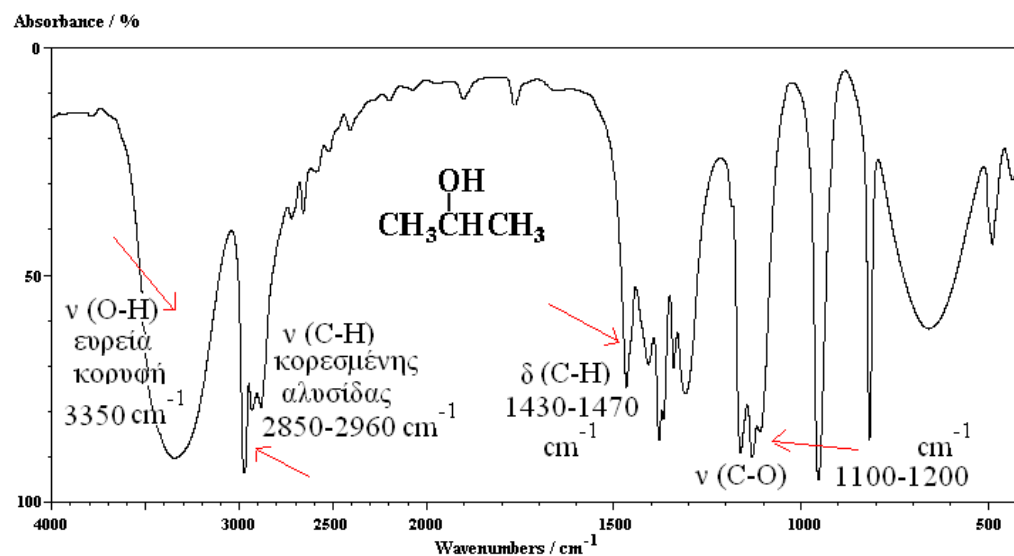
Η δόνηση τάσης της αρωματικής ταινίας εμφανίζεται στα 1600-1450 cm^{-1} (συνήθως διπλή κορυφή). Ο αρωματικός δακτύλιος διαθέτει δεσμούς των οποίων η ηλεκτρονική τους πυκνότητα είναι ενδιάμεση αυτής του απλού και του διπλού δεσμού, οπότε και το μήκος του κάθε δεσμού στο δακτύλιο είναι μεταξύ του μήκους απλού και διπλού δεσμού. Ως εκ τούτου ο αρωματικός δακτύλιος απορροφά σε κυματαριθμό μεταξύ των κυματαριθμών που απορροφούν ο απλός και ο διπλός δεσμός.

Οι συμμετρικές και ασύμμετρες τάσεις του δεσμού C-H στον αρωματικό δακτύλιο εμφανίζονται στα 3000-3100 cm^{-1} .

Οι συμμετρικές δονήσεις τάσεις του δεσμού C-H της αλειφατικής αλυσίδας εμφανίζονται στα 2960-2850 cm^{-1} .

Οι ισχυρές απορροφήσεις κάμψης για τις ομάδες C=C και C-H εμφανίζονται μεταξύ 900 και 675 cm^{-1} .

Αποτίμηση φάσματος IR ισοπροπανόλης



Η πιο χαρακτηριστική απορρόφηση των αλκοολών είναι η δόνηση τάσης του δεσμού O-H στα $3200-3600 \text{ cm}^{-1}$ η οποία αντιστοιχεί σε μία ευρεία και ισχυρή ταινία και που οφείλεται στους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των μορίων.

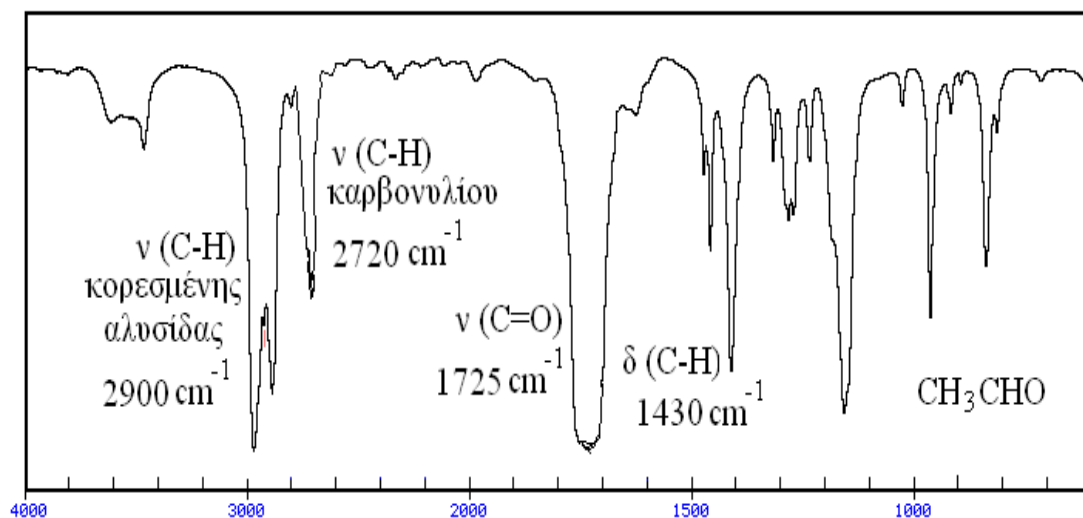
Οι συμμετρικές δονήσεις τάσεις του δεσμού C-H της αλειφατικής αλυσίδας εμφανίζονται στα $2960-2850 \text{ cm}^{-1}$.

Οι αλκοόλες παρουσιάζουν ισχυρές ταινίες απορρόφησης για τις δονήσεις τάσης δεσμού C-O, που εξαρτώνται από την υποκατάσταση:

- (α) για πρωτοταγείς αλκοόλες: $1025-1060 \text{ cm}^{-1}$.
- (β) για δευτεροταγείς αλκοόλες: $1090-1140 \text{ cm}^{-1}$.
- (γ) για τριτοταγείς αλκοόλες: $1150-1180 \text{ cm}^{-1}$.

Η δόνηση τάσης του δεσμού C-C αναμένεται σε μικρότερο κυματαριθμό από τη δόνηση τάσης του δεσμού C-O, διότι ο δεσμός C-O διαθέτει πολύ μεγαλύτερη διπολική ροπή, άρα και σταθερά ισχύος κατά την ταλάντωσή του.

Αποτίμηση φάσματος IR ακεταλδεΐδης



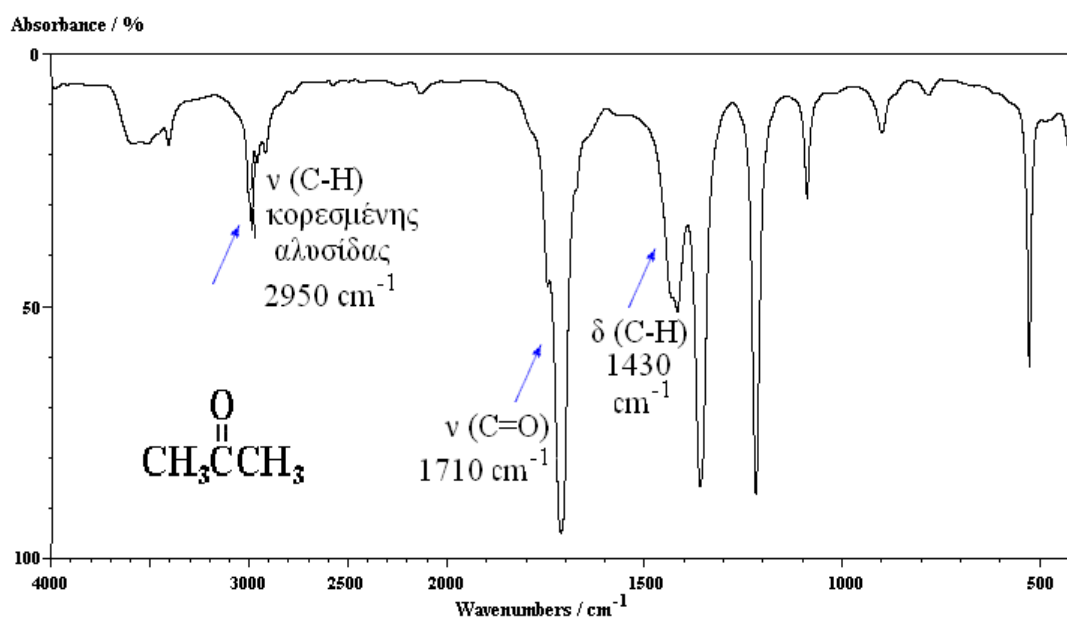
Η πιο χαρακτηριστική απορρόφηση των αλειφατικών αλδεϋδών (RCHO) είναι η δόνηση τάσης του καρβονυλίου C=O στα 1725 cm⁻¹ η οποία αντιστοιχεί σε μία ισχυρή ταινία.

Οι αλδεϋδες απορροφούν γενικά 10-15 cm⁻¹ υψηλότερα από τις αντίστοιχες κετόνες και παρουσιάζουν τα ίδια ηλεκτρονικά και συζυγικά φαινόμενα.

Οι αλδεϋδες παρουσιάζουν δύο ασθενείς δονήσεις τάσης του C-H στην περιοχή 2700-2900 cm⁻¹. Η εμφανιζόμενη ταινία στα 2720 cm⁻¹ θεωρείται χαρακτηριστική των αλδεϋδών. Η απορρόφηση καλείται Fermi doublet. Με την απορρόφηση αυτή επιτυγχάνεται διάκριση των αλδεϋδών από τις κετόνες.

Οι συμμετρικές δονήσεις τάσεις του δεσμού C-H της αλειφατικής αλυσίδας εμφανίζονται στα 2960-2850 cm⁻¹.

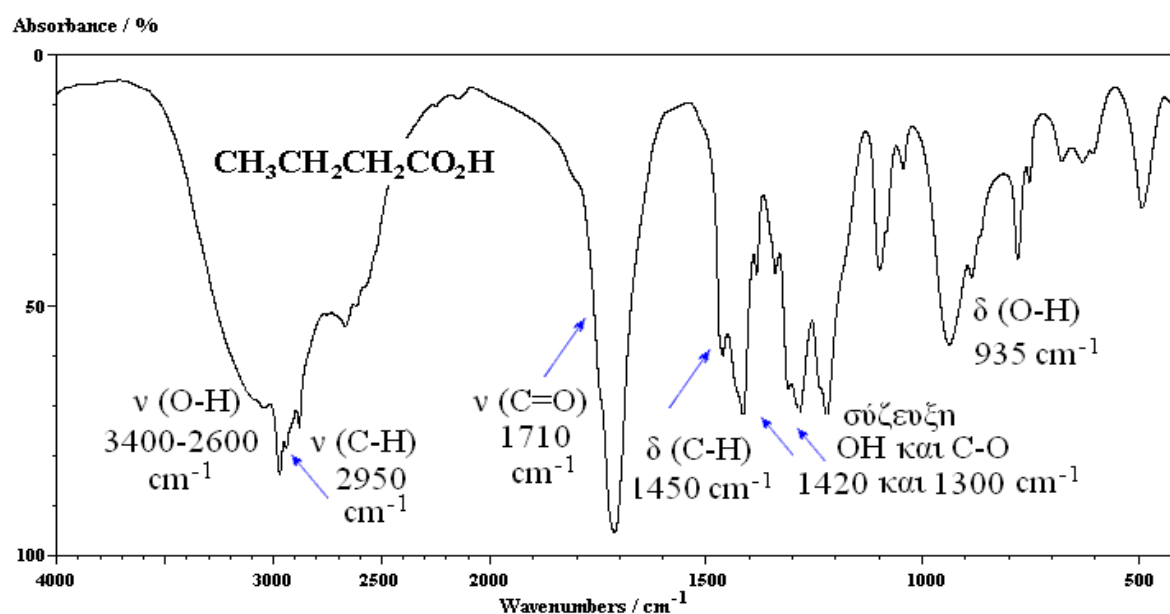
Αποτίμηση φάσματος IR ακετόνης



Η πιο χαρακτηριστική απορρόφηση των αλειφατικών κετονών (RCOR) είναι η δόνηση τάσης του καρβonyλίου C=O στα 1710 cm^{-1} η οποία αντιστοιχεί σε μία ισχυρή ταινία.

Καθώς η ηλεκτραρνητικότητα των αλκυλίων R αυξάνεται, η απορρόφηση του καρβonyλίου μετατοπίζεται σε υψηλότερες συχνότητες.

Αποτίμηση φάσματος IR βουτανικού οξέος

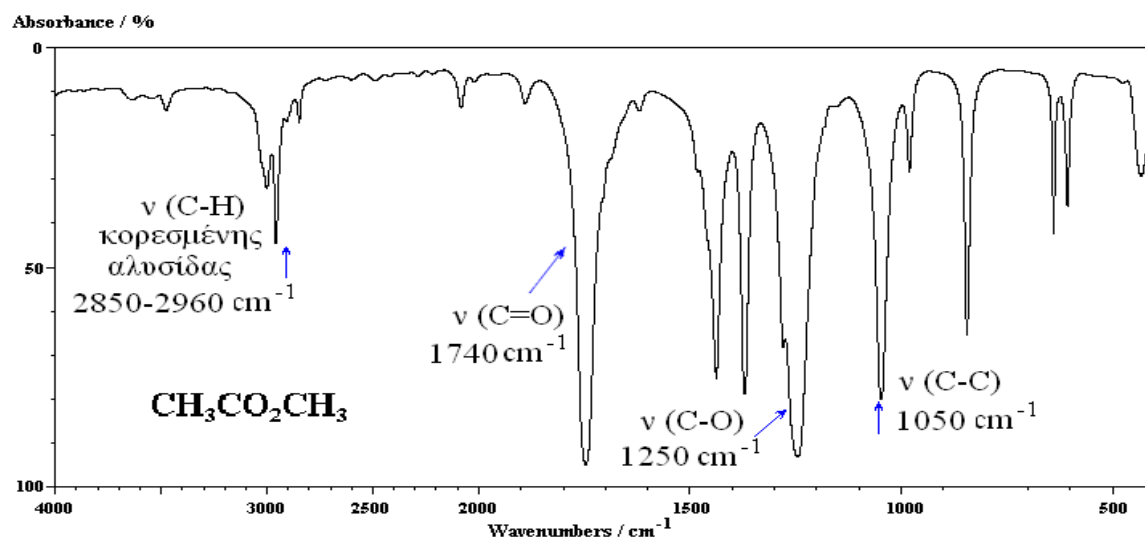


Η απορρόφηση του -OH στο διμερές λόγω σχηματισμού δεσμού υδρογόνου μετατοπίζεται στα $3000-2500 \text{ cm}^{-1}$, ενώ στο μονομερές βρίσκεται στα 3400 cm^{-1} .

Η δόνηση τάσης του καρβonyλίου C=O εμφανίζεται στα $1700-1730 \text{ cm}^{-1}$ και αντιστοιχεί σε ισχυρή ταινία.

Τα καρβονικά οξέα εμφανίζουν επίσης σύζευξη (coupling) των δονήσεων τάσης των ομάδων C-O και O-H στα 1420 και 1300 cm^{-1} και κάμψη της κύριας δομής για το -OH στα 935 cm^{-1} .

Αποτίμηση φάσματος IR οξικού μεθυλεστέρα



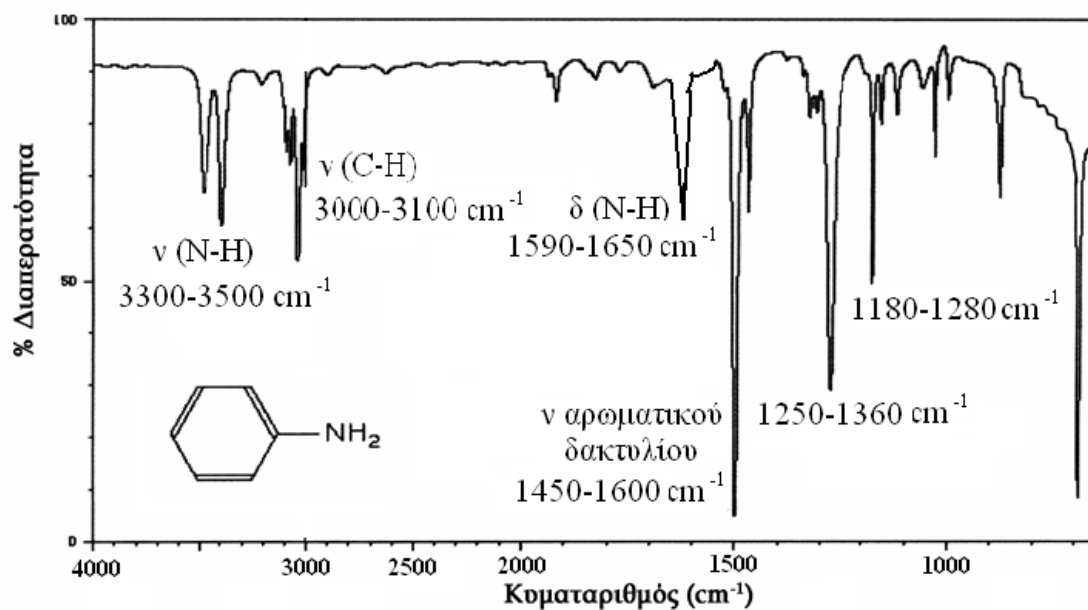
Οι εστέρες εμφανίζουν απορροφήσεις της καρβονυλικής ομάδας σε υψηλότερες συχνότητες σε σχέση με τις κετόνες γιατί η ομάδα -OR αποσταθεροποιεί τη δόνηση τάσης.

Έτσι στον μεθυλεστέρα του οξικού οξέος το καρβονύλιο απορροφά στην περιοχή 1750-1740 cm^{-1} .

Οι εστέρες εμφανίζουν μια ισχυρή ταινία απορρόφησης στα 1100-1280 cm^{-1} της δόνησης τάσεως του σ -δεσμού C-O.

Επίσης εμφανίζουν μια ταινία απορρόφησης στα 1000-1250 cm^{-1} της δόνησης τάσεως του σ -δεσμού C-C.

Αποτίμηση φάσματος IR ανιλίνης



Η πιο χαρακτηριστική απορρόφηση είναι η δόνηση τάσης του δεσμού N-H πρωτοταγούς αμίνης στα 3300-3500 cm⁻¹ (διπλή κορυφή).

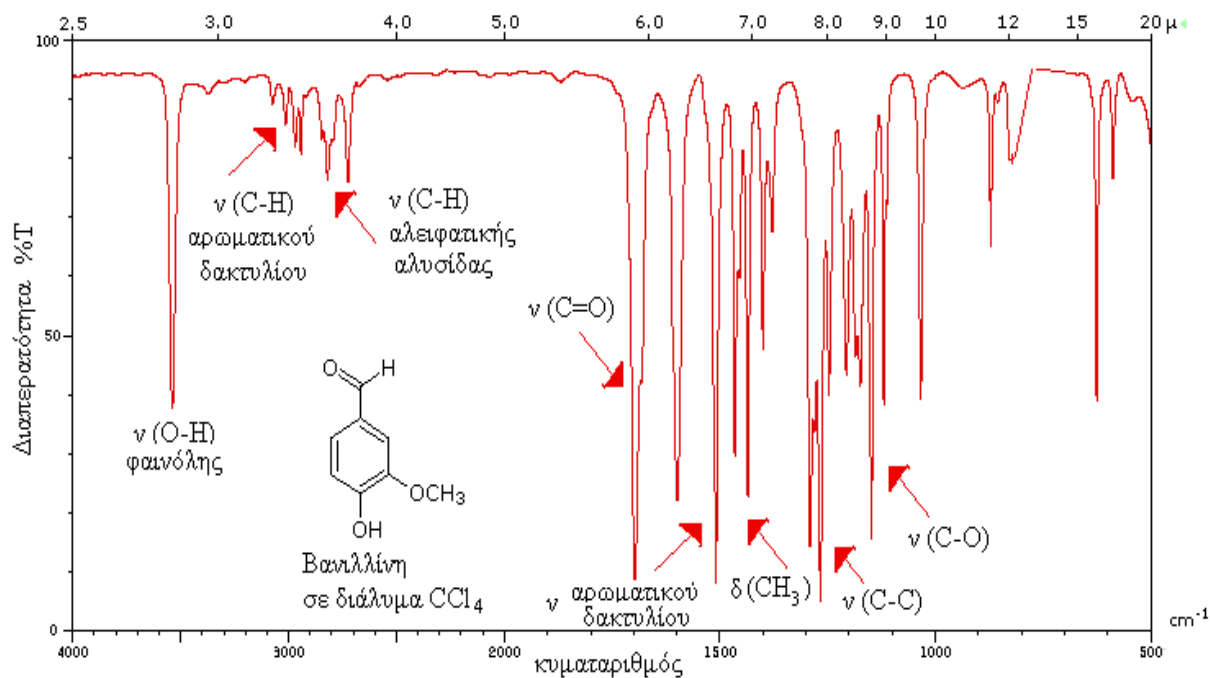
Επίσης η απορρόφηση της δόνησης παραμόρφωσης N-H πρωτοταγούς αμίνης στα 1590-1650 cm⁻¹.

Οι αρωματικές αμίνες αναγνωρίζονται από δύο ταινίες απορρόφησης στα 1250-1360 cm⁻¹ και μία ταινία στα 1180-1280 cm⁻¹.

Η αρωματική ταινία εμφανίζεται στα 1600-1450 cm⁻¹.

Οι συμμετρικές και ασύμμετρες τάσεις του δεσμού C-H του αρωματικού δακτυλίου εμφανίζονται στα 3000-3100 cm⁻¹

Αποτίμηση φάσματος IR βανιλίνης



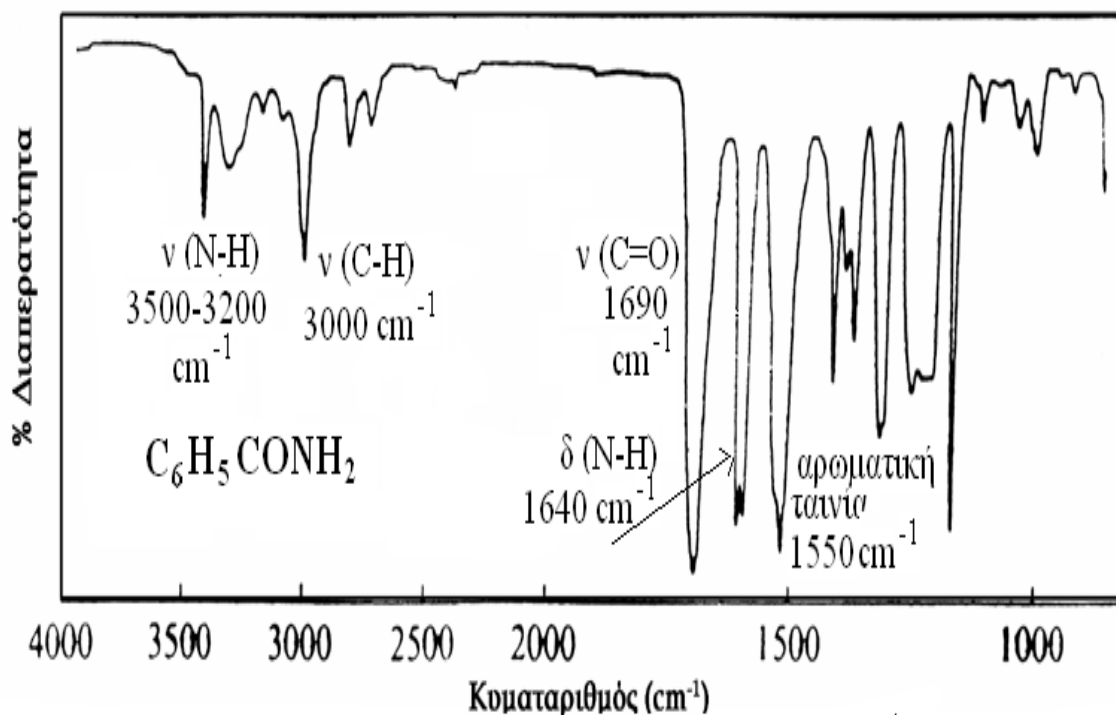
Χαρακτηριστική απορρόφηση είναι η δόνηση τάσης του δεσμού O-H της φαινολικής ένωσης στα 3640-3600 cm⁻¹.

Η αρωματική ταινία εμφανίζονται στα 1600-1450 cm⁻¹.

Οι συμμετρικές και ασύμμετρες τάσεις του δεσμού C-H του αρωματικού δακτυλίου εμφανίζονται στα 3000-3100 cm⁻¹.

Η δόνηση τάσης του καρβonyλίου C=O στην ArCHO εμφανίζεται στα 1700 cm⁻¹ και αντιστοιχεί σε ισχυρή ταινία.

Αποτίμηση φάσματος IR αρωματικού αμιδίου



Τα αμίδια παρουσιάζουν παρόμοια φάσματα IR με τις πρωτοταγείς αμίνες, εκτός από την χαρακτηριστική απορρόφηση του καρβονυλίου που εμφανίζεται στην περιοχή 1650-1715 cm^{-1} .

Έχουμε την απορρόφηση της δόνησης τάσης του δεσμού N-H στα 3300-3500 cm^{-1} (διπλή κορυφή).

Επίσης την απορρόφηση της δόνησης παραμόρφωσης N-H στα 1590-1650 cm^{-1} .

Η αρωματική ταινία εμφανίζεται στα 1600-1450 cm^{-1} .

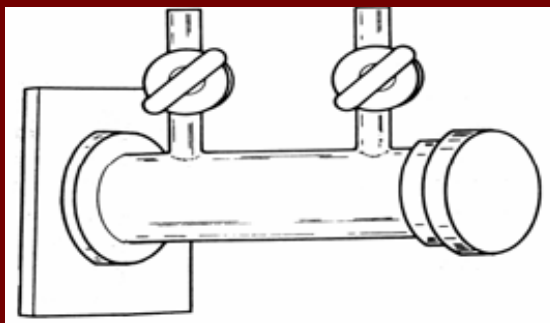
Οι τάσεις του δεσμού C-H του αρωματικού δακτυλίου εμφανίζονται στα 3000-3100 cm^{-1} .

Φασματοφωτόμετρα Υπέρυθρης Φασματοσκοπίας



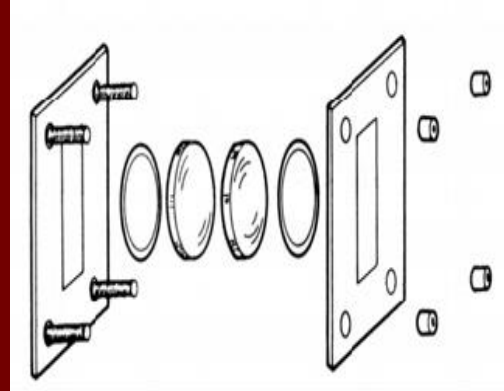
Παρασκευή δειγμάτων για φάσματα IR

- Η ποιότητα του φάσματος εξαρτάται από την ποιότητα της ουσίας (απουσία υγρασίας, καθαρότητα) και από τον τρόπο παρασκευής του δείγματος.
- Τα φάσματα αερίων είναι δυνατό να ληφθούν με τη χρήση καταλλήλων κυψελίδων (cells) κατασκευασμένες από ορυκτό NaCl.



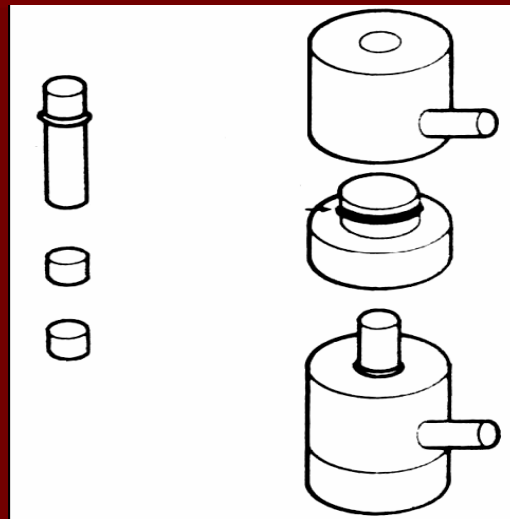
ειδική κυψελίδα
για αέρια

- Τα φάσματα υγρών ουσιών λαμβάνονται με εναπόθεση 1-2 σταγόνων υγρού (απολύτως ξηρού) σε πλακίδιο ορυκτού NaCl ή KBr που συμπιέζεται με ένα άλλο ώστε να δημιουργηθεί ένα λεπτό φιλμ του υγρού μεταξύ τους.
- Για παχύρρευστα υγρά χρησιμοποιείται διάλυμα Nujol ή άλλος διαλύτης με αφαίρεση των απορροφήσεών τους από το τελικό φάσμα.



Τεχνικές για τις στερεές ουσίες

- Παρασκευάζονται δισκία KBr αναμιγνύοντας ποσότητα ουσίας με KBr σε αναλογία 1% w/w, αναμιγνύονται καλά με τη βοήθεια γουδιού από αχάτη. Το μίγμα πιέζεται σε 10-14 tonnes με ταυτόχρονη εφαρμογή κενού για την παραλαβή ιχνών υγρασίας. Το δισκίο έχει διάμετρο ~13 mm και πάχος ~0.3 mm.



- Η ουσία διασκορπίζεται σε Nujol (υγρή παραφίνη) σε γουδί από αχάτη και σχηματίζεται μια ομογενής αλοιφή. Το παρασκεύασμα τοποθετείται μεταξύ πλακιδίων ορυκτού NaCl και συμπιέζεται σε λεπτό φιλμ. Το Nujol απορροφά σε ορισμένες γνωστές συχνότητες που αφαιρούνται από το φάσμα. Το Nujol χρησιμοποιείται γιατί διαλύει μεγάλο αριθμό οργανικών ενώσεων.
- Παρασκευάζεται λεπτό φιλμ της ουσίας με διάλυση σε διαλυτικό χαμηλού σ.ζ. και εξάτμισης του διαλύματος πάνω σε ένα πλακίδιο NaCl.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ

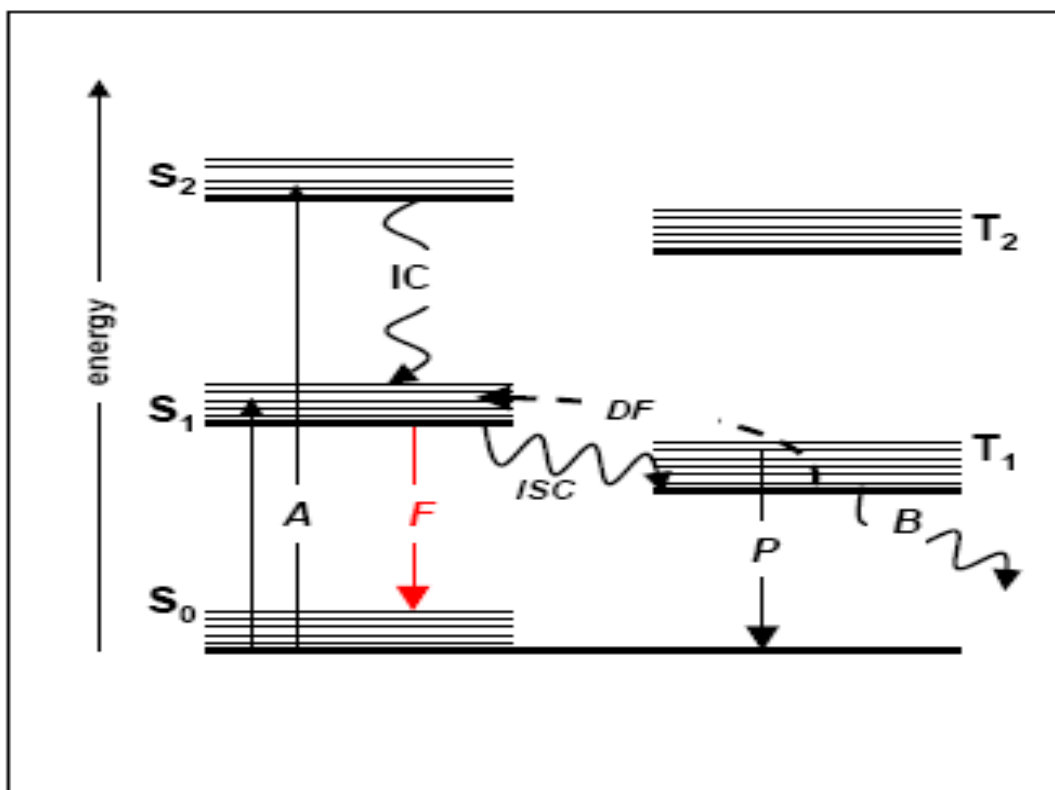


Φωτοδιέγερση μορίου

- Οι ηλεκτρονικές στάθμες χαρακτηρίζονται ως απλές S (διαμαγνητικές) ή τριπλές T (παραμαγνητικές). Οι τριπλές είναι φτωχότερες ενεργειακά.
- Απορρόφηση υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας από μόριο οδηγεί σε μετάπτωση e^- από n μη δεσμικά ή π δεσμικά τροχιακά σε π^* αντιδεσμικά.
- Έτσι το μόριο μεταβαίνει από την θεμελιώδη απλή κατάσταση S_0 στις απλές διεγερμένες S_1, S_2, \dots
- Η μετάπτωση $S_0 \rightarrow S_1$ είναι επιτρεπτή ενώ η $S_0 \rightarrow T_1$ είναι «απαγορευμένη» λόγω της μικρής πιθανότητας αναστροφής spin στο διεγερμένο e^- .

Διαδικασία αποδιέγερσης

- Αρχικώς γίνεται μετάπτωση από S_2, S_3, \dots σε S_1 με δονητική ή θερμική επαναφορά και εσωτερική μετατροπή με ταυτόχρονη έκλυση θερμότητας.
- Με τη δονητική επαναφορά γίνεται μεταφορά θερμότητας στα μόρια του διαλύτη κατά τη σύγκρουση αυτών με τα διεγερμένα μόρια.
- Η περαιτέρω αποδιέγερση από $S_1 \rightarrow S_0$ γίνεται είτε με έκλυση θερμότητας ή με εκπομπή φωταύγειας δηλαδή δευτερογενούς ακτινοβολίας.
- Υπάρχουν 3 πιθανές διεργασίες, που εξαρτώνται από τη φύση του διεγερμένου μορίου.



Σχήμα 1: Διάγραμμα Jablonski

Φαινόμενα	Χρόνος (sec)
A Απορρόφηση	10-15
IC Εσωτερική μετατροπή	10-11
F Φθορισμός	10-9
ISC Διασυστηματική διασταύρωση	10-6
P Φωσφορισμός	>10-4

Εσωτερική μετατροπή (IC)

- Μετάπτωση S₁ → S₀ με ταυτόχρονη έκλυση θερμότητας και χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας.
- Η διεργασία αυτή παρατηρείται κυρίως σε αλειφατικά μόρια και γενικώς σε μόρια με υψηλό βαθμό δονητικής ελευθερίας.
- Αναμένεται σε 10-11 sec μετά τη διέγερση.

Εκπομπή φθορισμού (F)

- Μετάπτωση S₁ → S₀ με ταυτόχρονη εκπομπή ακτινοβολίας φθορισμού ενέργειας $h \cdot \nu$.
- Η συχνότητα φθορισμού ν είναι μικρότερη από τη συχνότητα διεγέρσεως $\nu \Delta$ λόγω της απώλειας μέρους της απορροφημένης ενέργειας κατά τις διεργασίες δονητικής επαναφοράς και εσωτερικής μετατροπής.
- Φθορισμός συμβαίνει σε μόρια με περιορισμένη δονητική ελευθερία όπως αρωματικά ή μόρια με πολλαπλούς συζυγιακούς διπλούς δεσμούς κυρίως μετά από μετάπτωση e⁻ από π δεσμικά τροχιακά σε π* αντιδεσμικά.
- Αναμένεται σε 10-9 sec μετά τη διέγερση.

Διασυστηματική διασταύρωση και φωσφορισμός

- Γίνεται αρχικώς διασυστηματική διασταύρωση δηλαδή μετάπτωση $S_1 \rightarrow T_1$ με ταυτόχρονη έκλυση θερμότητας.
- Στη συνέχεια γίνεται μετάπτωση $T_1 \rightarrow S_0$ με εκπομπή ακτινοβολίας φωσφορισμού ενέργειας $h \cdot \nu_{\Phi}$.
- Η T_1 έχει μικρότερη ενέργεια από την S_1 και $\nu_{\Phi} < \nu_{\Phi}$ οπότε ο φωσφορισμός είναι πολύ ασθενής φωταύγεια.
- Φωσφορισμός συμβαίνει κυρίως μετά από μετάπτωση e^- από η μη δεσμικά τροχιακά σε π^* αντιδεσμικά.
- Αναμένεται σε $>10^{-4}$ sec μετά τη διέγερση.

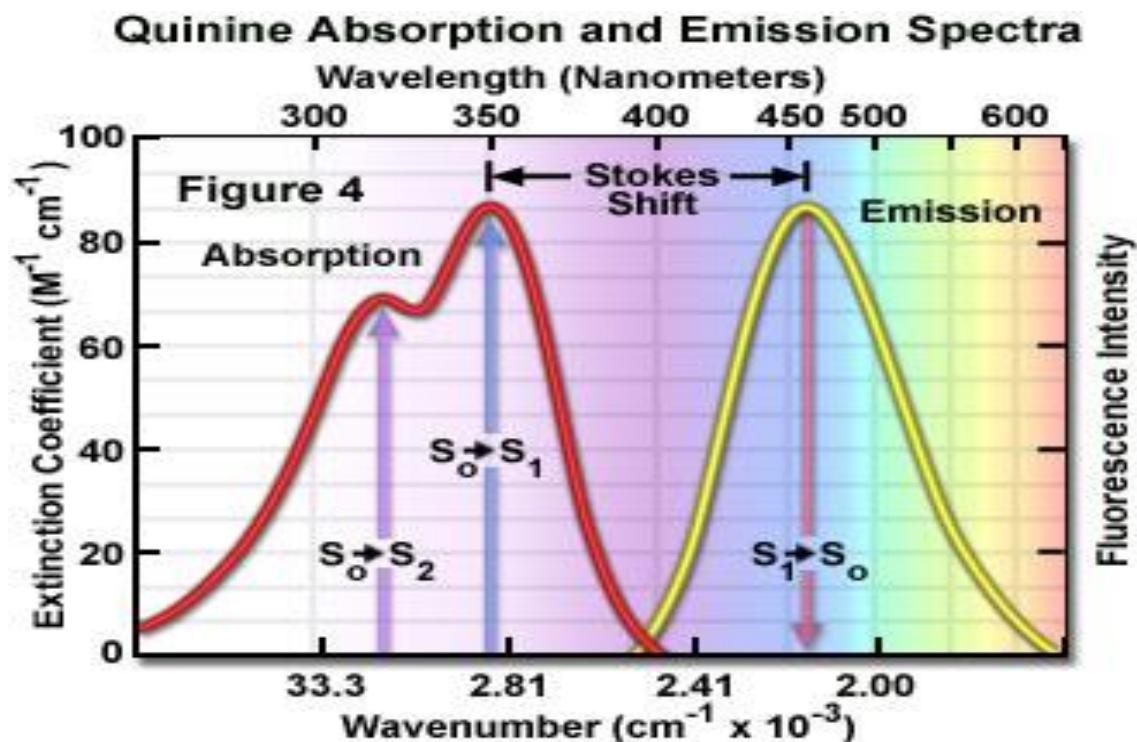
Απόσβεση

- Είναι αποτέλεσμα συγκρούσεως των διεγερμένων μορίων με μόρια άλλων ουσιών που υπάρχουν στο διάλυμα.
- Προκαλεί εξασθένιση ή πλήρη εξαφάνιση του φθορισμού.

Φάσματα διεγέρσεως και φθορισμού

Για τα φάσματα διεγέρσεως και φθορισμού ισχύει:

- Σχέση ειδώλου – αντικειμένου
- Το φάσμα φθορισμού είναι μετατοπισμένο σε υψηλότερα μήκη κύματος.
- Η εμφάνιση μόνο μία ζώνης στο φάσμα φθορισμού έναντι περισσότερων στο φάσμα διεγέρσεως.



Σχήμα 2: Φάσμα διεγέρσεως και φθορισμού της κινίνης

Προϋποθέσεις φθορισμού

- Ύπαρξη κατάλληλης μοριακής δομής ώστε να απορροφά στο UV ή Vis.
- Ακαμψία μορίου που αποτρέπει τη διαδικασία της εσωτερικής μετατροπής προς όφελος του φθορισμού.
- Ύπαρξη αρωματικού δακτυλίου στο μόριο ή πολλαπλών συζυγιακών διπλών δεσμών ώστε να γίνονται διεγέρσεις $\pi \rightarrow \pi^*$.
- Ο φθορισμός των αρωματικών ενώσεων αυξάνεται με την επιπεδότητα του μορίου που αυξάνει την ακαμψία του.
- Ύπαρξη πυρηνόφιλων υποκαταστατών ευνοούν το φθορισμό.

Παράγοντες που επιδρούν στον φθορισμό

- pH
- Διαλύτης
- Θερμοκρασία
- Παρουσία ξένων μορίων
- Παρουσία οξυγόνου
- Φωτοδιάσπαση
- Συγκέντρωση

1) pH

Σε πολλές ουσίες που ιοντίζονται φθορίζει μόνο η μία δομή μοριακή ή ιοντισμένη οπότε απαιτείται κατάλληλη ρύθμιση του pH.

Π.χ.

Η κινίνη φθορίζει σε ισχυρώς όξινα διαλύματά της

Η ανιλίνη φθορίζει σε ουδέτερα και αλκαλικά της διαλύματα.

2) Διαλύτης

Ο φθορισμός ευνοείται με την αύξηση της πολικότητας και του ιξώδους του διαλύτη.

Ο διαλύτης δεν πρέπει να απορροφά ακτινοβολία διεγέρσεως και κυρίως φθορισμού.

Πρέπει να είναι χημικά αδρανής και να μην επηρεάζει τη χημική δομή της φθορίζουσας ουσίας.

Να ευνοεί φαινόμενα ιοντισμού

3) Θερμοκρασία

Αύξηση της θερμοκρασίας ευνοεί φαινόμενα αποσβέσεως οπότε τον κίνδυνο αναστολής του φθορισμού.

Η θερμοκρασία μεταβαλλόμενη μεταβάλλει και την ισχύ του φθορισμού οπότε όλα τα διαλύματα (πρότυπα και δείγματα) πρέπει να αναλύονται στην ίδια θερμοκρασία.

4) Παρουσία ξένων μορίων

Μπορούν να αλλοιώσουν την φθορισμομετρική ανάλυση οπότε πρέπει να απομακρύνονται.

Μπορεί να απορροφούν ακτινοβολία διεγέρσεως και κυρίως φθορισμού.

Μπορεί να φθορίζουν.

Μπορεί να αλληλεπιδρούν με τη φθορίζουσα ουσία επηρεάζοντας την ικανότητά της να φθορίζει.

Μπορεί να προκαλούν φαινόμενα αποσβέσεως.

7) Παρουσία οξυγόνου

Μπορεί να οξειδώσει τη φθορίζουσα ουσία προς μη φθορίζον προϊόν

Μπορεί να προκαλέσει φαινόμενα αποσβέσεως.
Απομακρύνεται με απαέρωση των δειγμάτων πριν την ανάλυση.

8) Φωτοδιάσπαση

Αν η ακτινοβολία διεγέρσεως είναι υψηλής ισχύος υπάρχει κίνδυνος φωτοδιασπάσεως της φθορίζουσας ουσίας.

Απαιτείται επίσπευση των μετρήσεων

Εναλλακτικά ακτινοβολία διεγέρσεως όπου η ουσία δεν απορροφά ισχυρώς.

9) Συγκέντρωση – Τυπολόγιο φθορισμομετρίας

Η ισχύς F του φθορισμού εξαρτάται από τη συγκέντρωση της φθορίζουσας ουσίας.

Επειδή συνήθως μέρος της απορροφούμενης ισχύος ($P_0 - P$) χάνεται η ισχύς του φθορισμού είναι ανάλογη με το γινόμενο της ($P_0 - P$) επί τον συντελεστή κβαντικής αποδόσεως Φ που εκφράζει το κλάσμα των εκπεμπομένων φωτονίων προς τα απορροφούμενα και λαμβάνει τιμές $0 < \Phi < 1$.

Ισχύει: $F = \Phi \cdot (P_0 - P)$

Για να συσχετίσουμε ισχύ F φθορισμού συγκέντρωση φθορίζουσας ουσίας λαμβάνουμε τον νόμο Beer.

$$A = \log(P_0/P) = \epsilon bc \text{ οπότε } P/P_0 = 10^{-\epsilon bc} = e^{-2,3\epsilon bc}$$

Με χρήση ιδιοτήτων αναλογιών ισχύει:

$$1 - P/P_0 = 1 - e^{-2,3\epsilon bc} \text{ και } (P_0 - P)/P_0 = 1 - e^{-2,3\epsilon bc}$$

$$\text{οπότε } (P_0 - P) = P_0 (1 - e^{-2,3\epsilon bc})$$

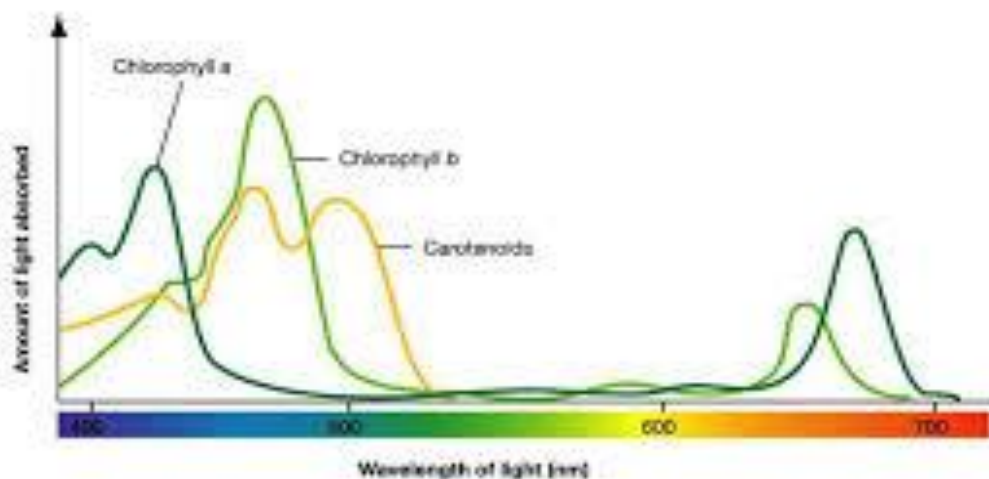
Αντικαθιστώντας στην $F = \Phi \cdot (P_0 - P)$ προκύπτει:

$$F = \Phi \cdot P_0 (1 - e^{-2,3\epsilon bc})$$

Για πολύ αραιά διαλύματα εφ' όσον $\epsilon bc < 0,05$

η εκθετική συνάρτηση γίνεται γραμμική, δηλαδή

$$F = 2,3 \cdot \Phi \cdot P_0 \cdot \epsilon bc \text{ ή τελικώς } F = \kappa \cdot c$$



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΦΛΟΓΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ – ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ

Φλογοφωτομετρία - Ατομική Απορρόφηση- Ατομική Εκπομπή

- Φλογοφωτομετρία: Μέτρηση της ακτινοβολίας που εκπέμπεται από τα άτομα όταν βρίσκονται σε διεγερμένες ενεργειακές καταστάσεις.
- Ατομική απορρόφηση: Μέτρηση της απορρόφησης της ακτινοβολίας από τα άτομα που βρίσκονται στη θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση.
- Ατομική εκπομπή: Διέγερση με τη βοήθεια ακτινοβολίας και εκπομπή ατομικού φθορισμού.

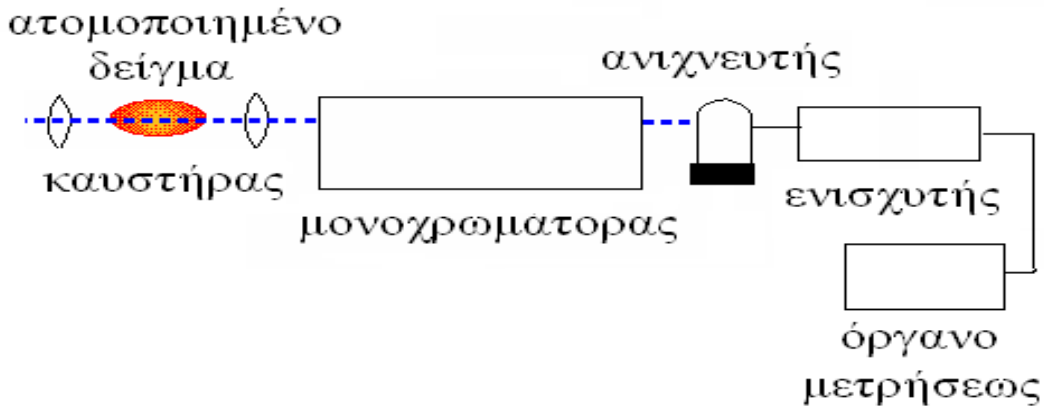
Φαινόμενα φλογοφωτομετρίας (ΦΦ)

Κατά τον ψεκασμό διαλύματος ενώσεως (συνήθως μεταλλοϊόντος) εντός φλόγας λαμβάνουν χώρα ταχύτατα τα εξής φαινόμενα:

1. Εξάτμιση του διαλύτη
2. Τήξη και εξαέρωση της ενώσεως
3. Ατομοποίηση
4. Διέγερση και ιοντισμός ορισμένων ατόμων
5. Αποδιέγερση και εκπομπή ακτινοβολίας

Παρατηρήσεις

- Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία είναι χαρακτηριστικού μήκους κύματος (χρώματος) του στοιχείου που διεγείρεται.
- Η ποιοτική ανάλυση βασίζεται στη μέτρηση του μήκους κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας.
- Η ποσοτική ανάλυση βασίζεται στη μέτρηση της ισχύος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας.
- Η ισχύς εξαρτάται από το κλάσμα των διεγερμένων ατόμων προς τα σταθερά άτομα ($N\Delta/N_0$) ο οποίος είναι ελάχιστος και εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία της φλόγας.
- Ο ιοντισμός μεταβάλλει το πλήθος των σταθερών ατόμων και επηρεάζει την ποσοτικοποίηση.
- Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες ευνοείται η ατομοποίηση ενώ σε υψηλότερες η διέγερση και ο ιοντισμός.
- Μεταβολές θερμοκρασίας μεταβάλλουν τον ρυθμό και βαθμό εξελίξεως όλων των φαινομένων.
- Η θερμοκρασία της φλόγας δεν είναι απαραίτητως κατάλληλη για να επιφέρει διέγερση ατόμων.
- Η μέθοδος εφαρμόζεται μόνο για την ανάλυση στοιχείων των οποίων τα άτομα διαθέτουν μικρή ενέργεια ιοντισμού (E_i).
- Αναλύονται αλκάλια και αλκαλικές γαίες που εκπέμπουν ορατή ακτινοβολία συγκεκριμένου χρώματος.



Σχήμα 1: Σχηματική παράσταση φλογοφωτομέτρου

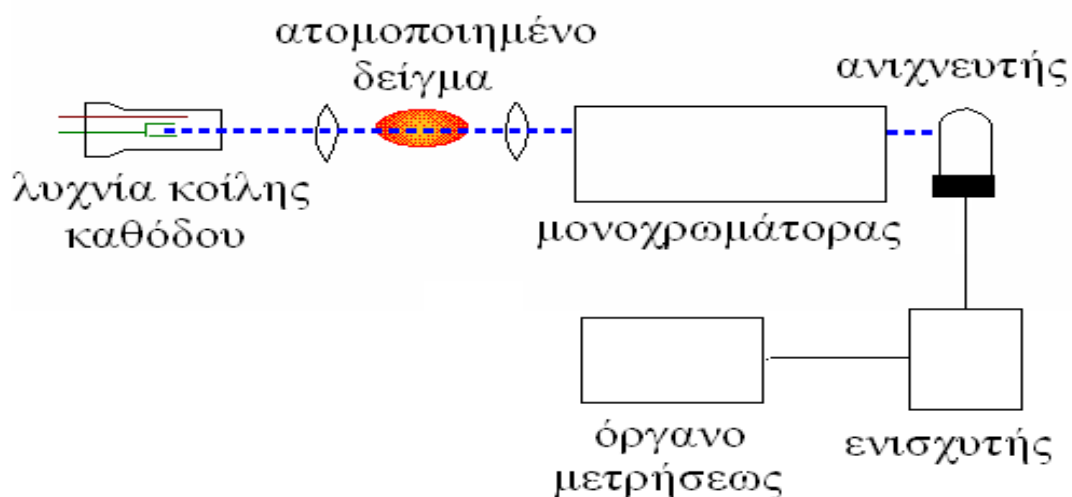
Φαινόμενα φασματοφωτομετρίας ατομικής απορρόφησης (ΦΑΑ)

Κατά τον ψεκασμό διαλύματος ενώσεως εντός φλόγας λαμβάνουν χώρα ταχύτατα τα εξής φαινόμενα:

1. Εξάτμιση του διαλύτη
2. Τήξη και εξαέρωση της ενώσεως
3. Ατομοποίηση
4. Διέγερση όλων ατόμων από την απορρόφηση ακτινοβολίας από εξωτερική πηγή (λυχνία κοίλης καθόδου).

Παρατηρήσεις

- Η ποσοτική ανάλυση βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης.
- Μεταβολές θερμοκρασίας μεταβάλλουν τον ρυθμό και βαθμό εξέλιξης όλων των φαινομένων.
- Αναλύονται όλα τα στοιχεία με κατάλληλη επιλογή της πηγής ακτινοβολίας.
- Η φλόγα χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό του δείγματος, την ατομοποίηση και την δημιουργία οπτικής επαφής μεταξύ της πηγής της ακτινοβολίας και των στοιχείων προς μέτρηση.



Σχήμα 2: Σχηματική παράσταση φασματοφωτομέτρου ατομικής απορρόφησης

Πηγές ατομοποίησης

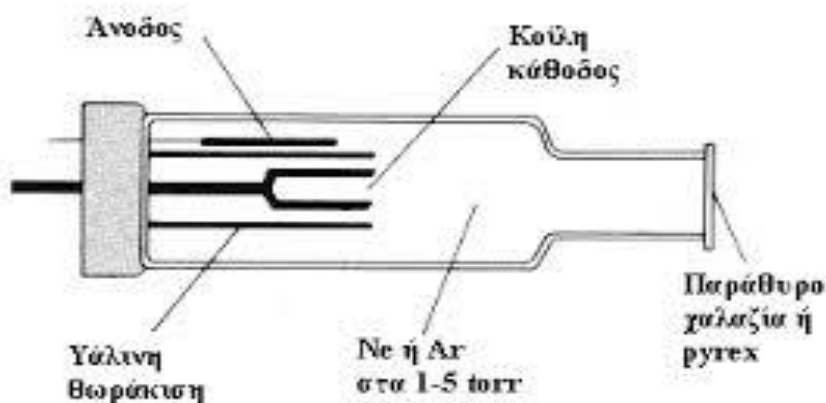
- Φλόγα
- Ηλεκτρικά θερμαινόμενος φούρνος γραφίτη
- Επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα αργού (αεριώδες ηλεκτρικά αγώγιμο μίγμα κατιόντων και e⁻)
- Ηλεκτρικό τόξο ή σπινθήρας εκκενώσεως συνεχούς ή εναλλασσόμενου ρεύματος.

Φλόγες

- Η θερμοκρασία της φλόγας εξαρτάται από:
- Το είδος του καυσίμου (H₂, C₂H₂, κλπ.) και του οξειδωτικού (αέρας, O₂, κλπ.)
- Την αναλογία του καυσίμου και του οξειδωτικού όπως και την ταχύτητα ροής τους.
- Τον τύπο του καυστήρα (ολικής καταναλώσεως ή προαναμείξεως).

Λειτουργία Λυχνίας Κοίλης καθόδου

- Αποτελείται από κάθοδο φτιαγμένη από το προς ανίχνευση μέταλλο
- Με την παροχή ηλεκτρικού ρεύματος ηλεκτρόνια επιταχύνονται από την κάθοδο (-) προς την άνοδο(+).
- Στην διαδρομή τους συγκρούονται και ιοντίζουν τα άτομα ευγενούς αερίου, που περιέχεται στη λυχνία, και που επιταχύνονται προς την κάθοδο.
- Η ενέργεια των ιοντισμένων σωματιδίων του ευγενούς αερίου αποσπά μερικά άτομα του μετάλλου από την επιφάνεια της καθόδου.
- Τα άτομα αυτά διεγείρονται από τις συγκρούσεις τους με τα άτομα του ευγενούς αερίου και εκπέμπουν ακτινοβολία χαρακτηριστική με αυτή του προς ανίχνευση μετάλλου.



Παρεμποδίσεις

- Φασματικές
- Φυσικές
- Χημικές
- Ιοντισμού

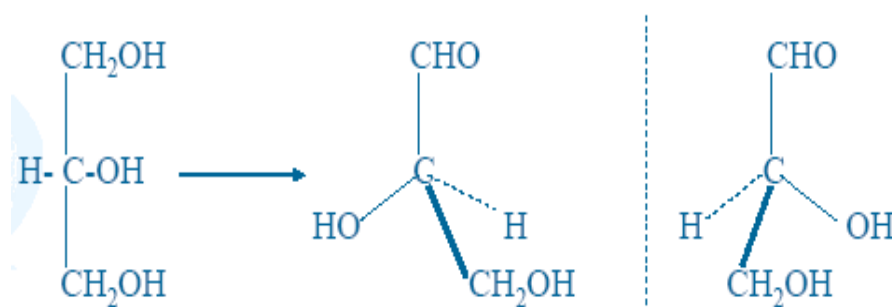


ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΠΟΛΩΣΙΜΕΤΡΙΑ

Οπτική ισομέρεια

- Ασύμμετρες ενώσεις: δε διαθέτουν κανένα στοιχείο συμμετρίας.
- Ασύμμετρο άτομο άνθρακα ή στερεογονικό κέντρο: διαθέτει 4 διαφορετικούς υποκαταστάτες
- Οι ασύμμετρες ενώσεις έχουν οπτικά ισομερή και είναι οπτικά ενεργές



Οπτικοί αντίποδες ή Οπτικά Ισομερή

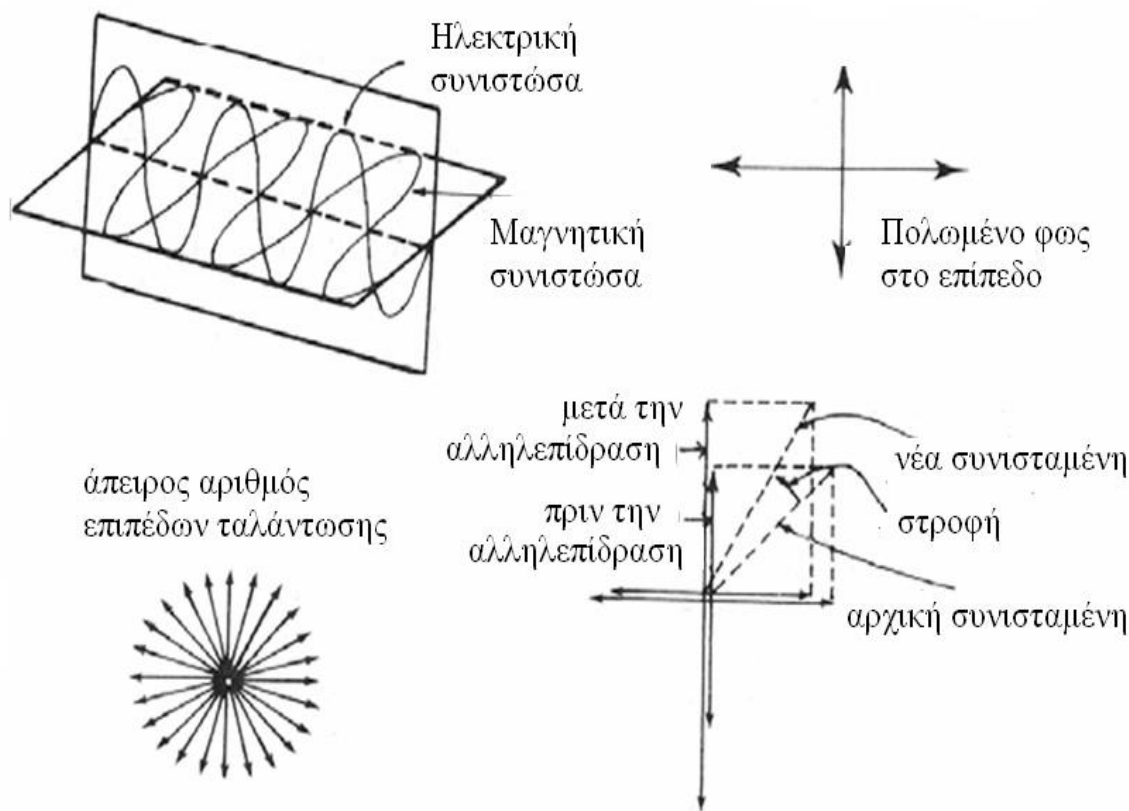
Οπτική Ενεργότητα

- Οπτικά ενεργές ονομάζονται οι ενώσεις που έχουν την ικανότητα στρέψης του επίπεδου πολωμένου φωτός κατά γωνία α
- Το ένα ισομερές δημιουργεί στρέψη κατά γωνία $+\alpha$ και το άλλο ισομερές $-\alpha$
- Ρακεμικό μείγμα: ισομοριακό μείγμα οπτικών ισομερών οπτικά ανενεργό

Πόλωση φωτός

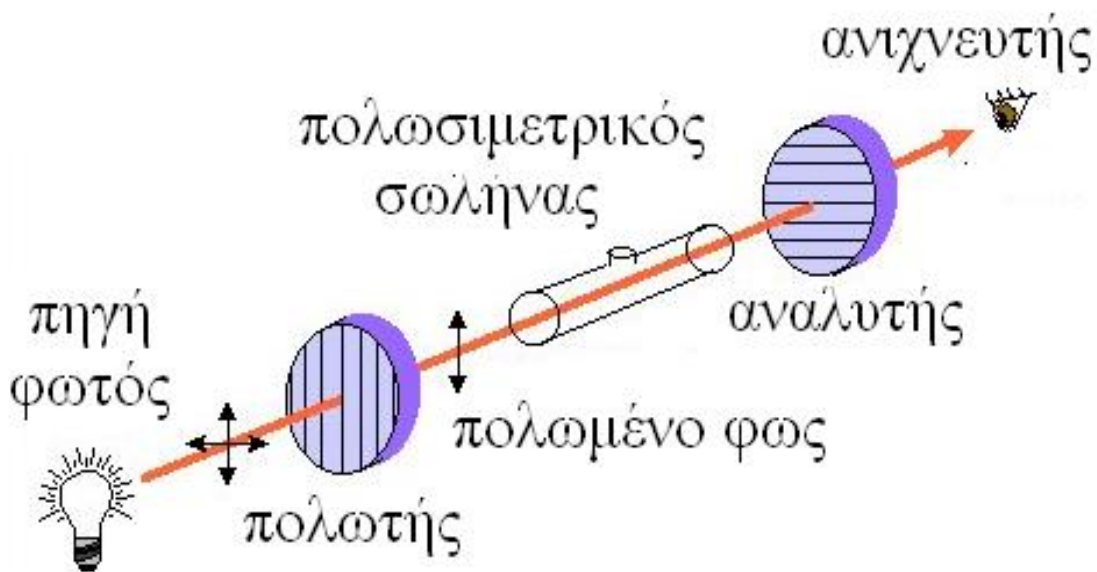
- Το φυσικό φως είναι εγκάρσια ηλεκτρομαγνητικά κύματα.
- Οι φωτεινές πηγές αποτελούνται από μεγάλο αριθμό στοιχειωδών φωτεινών πηγών που η κάθε μία απ' αυτές εκπέμπει ένα στοιχειώδες ηλεκτρομαγνητικό κύμα.
- Έτσι το φυσικό φως αντιστοιχεί σε μεγάλο πλήθος ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων που ταλαντώνονται σε άπειρο αριθμό επιπέδων.
- Κάτω από ορισμένες συνθήκες εμφανίζεται η περίπτωση στην οποία όλα τα στοιχειώδη ηλεκτρικά κύματα πάλλονται διαρκώς σε ένα επίπεδο.
- Η πόλωση μπορεί να επιτευχθεί με τον πολωτή μία συσκευή που επιτρέπει την διέλευση κυμάτων που ταλαντώνονται σε ένα και μοναδικό επίπεδο.
- Αν ένα Η/Μ πεδίο έχει μόνιμα ένα επίπεδο ταλάντωσης τότε έχουμε επίπεδη πόλωση.
- Αν φως πολωμένο στο επίπεδο διέλθει μέσα από οπτικά ενεργή ουσία τότε το μοναδικό επίπεδο ταλάντωσης του στρέφεται κατά ορισμένη γωνία α .

Σχηματική παράσταση φαινομένου



Πολωσίμετρο

- Στην απλούστερη μορφή του αποτελείται από ένα πολωτή, ένα πολωσιμετρικό σωλήνα που περιέχει το οπτικώς ενεργό υγρό, έναν αναλυτή που φέρει γωνιομετρικό κύκλο και από μία διόπτρα για την παρατήρηση.
- Ο πολωτής είναι υλικό (φίλτρο πολαρόιντ) που το διαπερνά μόνο το φως που ταλαντώνεται σε μια συγκεκριμένη διεύθυνση. Το επίπεδο που ορίζεται από τη σχισμή του πολωτή ονομάζεται χαρακτηριστικό επίπεδο του πολωτή.
- Ο αναλυτής είναι φίλτρο πολαρόιντ με άξονα πόλωσης αρχικώς παράλληλο με του πολωτή.
- Αν το πολωμένο στο επίπεδο φως αλλάξει επίπεδο ταλάντωσης για να εμφανισθεί πάλι το φως πρέπει ο αναλυτής να στραφεί κατά γωνία α .
- Αν η στροφή γίνει κατά τη φορά των δεικτών του ρολογιού, το υλικό ονομάζεται δεξιόστροφο, ενώ στην αντίθετη περίπτωση αριστερόστροφο.

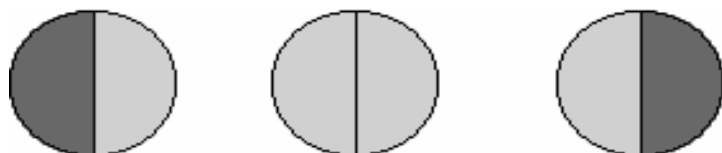


Σχήμα 10: Σχηματική παράσταση πολωσιμέτρου

Προσδιορισμός θέσης απόσβεσης

Υπάρχει μια θέση που επιτυγχάνεται ισοφωτισμός, οπότε όλο το οπτικό πεδίο παρουσιάζεται ασθενώς και ομοιομόρφως φωτισμένο.

Σ' αυτή τη θέση του αμυδρού ισοφωτισμού θεωρούμε ότι έχουμε την μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια για την περιοχή απόσβεσης.



Τυπολόγιο πολωσιμετρίας

Ως α ορίζεται η γωνία στροφής του επιπέδου και εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ουσίας

Ειδική Στροφική Ικανότητα $[\alpha]$: χαρακτηριστική σταθερά που εξαρτάται από το μήκος κύματος του φωτός, τη θερμοκρασία και τη φύση της ουσίας.

Η $[\alpha]$ ορίζεται στους 20°C, για $l = 1 \text{ dm}$ (για υγρά) και $c = \text{g/mL}$ ή g/100 mL .

$[\alpha] = \alpha/l \cdot c$ ή $[\alpha] = 100\alpha/l \cdot c$ αντιστοίχως

Μονάδες $[\alpha] = \text{μοίρες} \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{gr}^{-1}$

Εφαρμογές

Για τον πολωσιμετρικό προσδιορισμό των μονο- και ολιγο-σακχαριτών τα διαλύματα πρέπει να είναι :

1. διαυγή & άχρωα
2. απαλλαγμένα από άλλες οπτικά ενεργές ουσίες
3. σχετικά πυκνά δείγματα

Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας διαλύματος μιας οπτικά ενεργού ουσίας γίνεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης, που χαράζεται με τη βοήθεια σειράς διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Εισαγωγή στη χρωματογραφική ανάλυση

- Η χρωματογραφία περιλαμβάνει σειρά τεχνικών φυσικού διαχωρισμού και ποιοτικού – ποσοτικού προσδιορισμού των συστατικών ανοργάνων και οργανικών δειγμάτων.
- Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με κατανομή των συστατικών μεταξύ δύο φάσεων μιας στατικής και μίας κινητής.
- Ο διαχωρισμός βασίζεται σε διαφορές φυσικών ιδιοτήτων των διαχωριζομένων συστατικών (σημείο ζέσεως, πολικότητα, ηλεκτρικό φορτίο, μέγεθος μορίων, κλπ.), οι οποίες διαφοροποιούν την φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού προς τις δύο φάσεις.
- Η κινητή φάση διερχόμενη μέσω της στατικής μετατοπίζει τις διαφορετικές ουσίες με διαφορετικές ταχύτητες.

Ταξινόμηση χρωματογραφικών τεχνικών

- Ως προς τη φύση της κινητής και της στατικής φάσης
- Ως προς τη μορφή της στατικής φάσης
- Ως προς τον μηχανισμό στον οποίο βασίζεται ο διαχωρισμός
- Ως προς τον τρόπο εισαγωγής του δείγματος στη στατική φάση και κινήσεως εντός αυτής.

Ταξινόμηση με βάση τη φύση της κινητής και της στατικής φάσης

- Υγρή χρωματογραφία (LC) αν η κινητή φάση είναι υγρή.
- Αέρια χρωματογραφία (GC) αν η κινητή φάση είναι αέρια.

Οι χρωματογραφίες LC και GC υποδιαιρούνται περαιτέρω αναλόγως προς τη φύση της στερεάς φάσης, η οποία μπορεί να είναι στερεή ή υγρή προσδεμένη σε στερεό αδρανές υπόστρωμα. Έτσι διακρίνονται σε:

- Υγρή-στερεή χρωματογραφία (LSC)
- Υγρή-υγρή χρωματογραφία (LLC)
- Αέρια-στερεή χρωματογραφία (GSC)
- Αέρια-υγρή χρωματογραφία (GLC)

Ταξινόμηση με βάση τη μορφή της στατικής φάσης

Χρωματογραφία στήλης όπου η στατική φάση συγκρατείται σε μία στήλη μέσω της οποίας η κινητή φάση διαβιβάζεται με πίεση ή ρέει λόγω βαρύτητας. Υποδιαιρείται σε δύο κατηγορίες αναλόγως με τον τρόπο ακινητοποιήσεως της στατικής φάσης:

1. Χρωματογραφία πληρωμένων στηλών όπου η στατική φάση αποτελείται από μικρά στερεά σωματίδια συχνά επικαλυμμένα από λεπτό υμένα υγρού.
2. Χρωματογραφία τριχοειδών στηλών όπου η υγρή στατική φάση διερχόμενη μέσα από τριχοειδή σωλήνα επικαλύπτει τα εσωτερικά του τοιχώματα ως λεπτός υμένας που συγκρατείται με τριχοειδείς δυνάμεις ή με χημικό δεσμό.

Επίπεδη χρωματογραφία. Στην επίπεδη χρωματογραφία η κινητή φάση διέρχεται μέσω της στατικής με τη βοήθεια τριχοειδών δυνάμεων ή της βαρύτητας. Η χρωματογραφία αυτή αναλόγως με τη μορφή της στατικής φάσης υποδιαιρείται σε δύο κατηγορίες:

1. Χρωματογραφία χάρτου όπου η στατική φάση είναι μια λωρίδα χάρτου από κυτταρίνη ειδικού μεγέθους πόρων.
2. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) όπου η στατική φάση είναι στιβάδα στερεού (συνήθως διοξείδιο του πυριτίου) επιστρωμένη σε γυάλινη ή αλουμινένια πλάκα.

Ταξινόμηση με βάση τον μηχανισμό στον οποίο βασίζεται ο διαχωρισμός

- Χρωματογραφία προσροφήσεως: Τα προς διαχωρισμό συστατικά προσροφώνται στην επιφάνεια της στατικής φάσης (συνήθως στερεάς) με δυνάμεις μοριακής φύσης. Η ισορροπία που αποκαθίσταται μεταξύ των προσροφημένων σωματιδίων και των σωματιδίων που κατανέμονται στην υγρή ή αέρια κινητή φάση επιτυγχάνει το διαχωρισμό.
- Χρωματογραφία ιονανταλλαγής: Χρησιμοποιούνται ιονανταλλακτικές ρητίνες ή πηκτές ως στερεά στατική φάση. Τα ιοντισμένα συστατικά συγκρατούνται ηλεκτροστατικά με δυνάμεις ιοντικής φύσεως, σε διαφορετικό βαθμό από τις αντίθετου φορτίου ιοντικές ομάδες της στατικής φάσης.
- Χρωματογραφία κατανομής: Τα συστατικά του μίγματος κατανέμονται μέσω ισορροπίας μεταξύ λεπτής στιβάδας υγρής στατικής φάσης που συγκρατείται στην επιφάνεια στερεού υποστρώματος και μιας υγρής κινητής φάσης με βάση τη διαφορά στη διαλυτότητα. Αν η στατική φάση είναι πολικότερη της κινητής η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται κανονικής φάσης ενώ στην αντίθετη περίπτωση αντιστρόφου φάσης.
- Χρωματογραφία συγγένειας: Ο μηχανισμός βασίζεται στην εξαιρετικώς εξειδικευμένη αλληλεπίδραση ενός μοριακού συστατικού του μίγματος με ένα μοριακό συστατικό το οποίο έχει χημικά δεσμευθεί στη στερεή στατική φάση.
- Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού ή διαπερατότητας πηκτής: Στη χρωματογραφία αυτή δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ των προς διαχωρισμό συστατικών και της στατικής φάσης. Τα συστατικά διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθός τους. Η υγρή ή αέρια κινητή φάση διέρχεται μέσα από πορώδη πηκτή, το μέγεθος των πόρων της οποίας είναι αρκετά μικρό ώστε να επιτρέπει την είσοδο από την πηκτή μόνο μορίων μικρού μεγέθους, αποκλείοντας τα μόρια μεγάλου μεγέθους. Τα μόρια μεγάλου μεγέθους διέρχονται ταχέως χωρίς να εισέρχονται στο δίκτυο της πηκτής ενώ τα μικρού μεγέθους μόρια εισαγόμενα στο δίκτυο της πηκτής καθυστερούν να εκλουσθούν απαιτώντας κατάλληλο όγκο κινητής φάσης. Άρα εκλούνται πρώτα τα μόρια μεγάλου μεγέθους.

Ταξινόμηση με βάση τον τρόπο εισαγωγής του δείγματος στη στατική φάση και κινήσεως εντός αυτής

- Χρωματογραφία εκλουσεως: Τα συστατικά του μίγματος μεταφέρονται από την κινητή φάση με διαφορετική ταχύτητα κατά μήκος της στατικής οπότε εκλούνται σε διαφορετικούς χρόνους και διαχωρίζονται.
- Χρωματογραφία εκτοπίσεως: Η κινητή φάση συγκρατείται ισχυρώς από τη στατική εκτοπίζοντας έτσι σε μεγάλο βαθμό τα συστατικά του δείγματος.
- Μετωπική χρωματογραφία: Το διάλυμα του δείγματος εισάγεται στη στήλη συνεχώς και ο διαλύτης του δρα ως κινητή φάση. Τα συστατικά του δείγματος εξέρχονται από τη χρωματογραφική στήλη με τη μορφή μετώπου. Στο πρώτο μέτωπο περιέχεται το λιγότερο συγκρατούμενο συστατικό Α, στο δεύτερο

μίγμα του A με το αμέσως λιγότερο συγκρατούμενο συστατικό B, στο τρίτο το συστατικό B, κλπ.

Χρωματογραφία εκλούσεως

- Τα συστατικά του δείγματος κατανέμονται με κάποιο μηχανισμό μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης.
- Το κλάσμα κάθε συστατικού στη κινητή φάση μετακινείται από αυτή ερχόμενο σε επαφή με νέο τμήμα της στατικής φάσης οπότε συμβαίνει νέα κατανομή.
- Παράλληλα το κλάσμα του συστατικού που παράμεινε στο αρχικό τμήμα της στατικής φάσης κατανέμεται σε νέα ποσότητα κινητής φάσης.
- Η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές με τη συνεχή διαβίβαση κινητής φάσης.
- Τα συστατικά μετακινούνται μόνο όταν βρίσκονται στη κινητή φάση.

Ορισμοί χρωματογραφίας εκλούσεως

- Υγρό ή αέριο εκλούσεως ονομάζεται η κινητή φάση
- Έκλουσμα είναι το κάθε εξερχόμενο συστατικό από τη στήλη.
- Έκλουση είναι η διαδικασία διαβίβασης της κινητής φάσης μέσω της στατικής, χαρακτηρίζεται δε ως γραμμική έκλουση αν γίνεται με σταθερή παροχή.
- Χρόνος εκλούσεως (tR) είναι ο χρόνος που απαιτείται για την έκλουση ενός συστατικού.
- Όγκος συγκρατήσεως ή ανασχέσεως (VR) ορίζεται ο όγκος που απαιτείται να διέλθει για να εκλουσθεί ένα συστατικό στο μέγιστο της ποσότητάς του.
- Χρόνος συγκρατήσεως ή ανασχέσεως (tR) ορίζεται ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της εισαγωγής του δείγματος και της στιγμής που πρακτικά το συστατικό έχει εκλουσθεί στο μέγιστο της ποσότητάς του.
- Ογκομετρική ταχύτητα ροής κινητής φάσης (F) είναι ο όγκος της κινητής φάσης που παρέχεται ανά μονάδα χρόνου.
- Ισχύει $tR = VR / F$
- Συντελεστής κατανομής K που εκφράζει τη φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού με τη στατική φάση. $K = C_{στατική} / C_{κινητή}$ όπου $C_{στατική}$ και $C_{κινητή}$ οι συγκεντρώσεις συστατικού σε στατική και κινητή φάση.
- Παράγοντας ή συντελεστής επιβραδύνσεως (Rf) ορίζεται το μέγεθος συγκρατήσεως συστατικού από τη στατική φάση. Ισούται με το κλάσμα της μέσης ταχύτητας συστατικού στη χρωματογραφική στήλη ή πλάκα προς τη μέση ταχύτητα της κινητής φάσης. Δηλαδή ισχύει:

$$Rf = (L/tR)/(L/tM) = tM/tR = VM/VR \text{ όπου}$$

L το μήκος το χρωματογραφικής στήλης ή πλάκας

tM χρόνος διευλέσεως κινητής φάσης από στήλη ή πλάκα (νεκρός χρόνος) και

VM όγκος κινητής φάσης στη στήλη

Ταξινόμηση μεθόδων χρωματογραφίας

Αέρια Χρωματογραφία

Κινητή φάση	Στατική φάση	Μηχανισμός	Μορφή στατικής φάσης	Είδος χρωματογραφίας
Αέρια	Στερεά	Προσρόφηση	Στήλη	Αέρια-στερεή χρωματογραφία (GSC)
Αέρια	Υγρή	Κατανομή	Στήλη	Αέρια-στερεή χρωματογραφία (GSC)

Υγρή Χρωματογραφία

Κινητή φάση	Στατική φάση	Μηχανισμός	Μορφή στατικής φάσης	Είδος χρωματογραφίας
Υγρή	Στερεά	Προσρόφηση	Στήλη	Χρωματογραφία προσροφήσεως επί στήλης (LSC)
Υγρή	Στερεά	Προσρόφηση	Λεπτή στιβάδα επί πλάκας	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)
Υγρή	Στερεά	Προσρόφηση	Χάρτης	Χρωματογραφία προσροφήσεως επί χάρτου
Υγρή	Στερεά	Ιονανταλλαγή	Στήλη	Χρωματογραφία ιονανταλλαγής επί στήλης
Υγρή	Στερεά	Ιονανταλλαγή	Χάρτης	Χρωματογραφία ιονανταλλαγής επί χάρτου
Υγρή	Υγρή επί στερεού φορέα	Κατανομή	Στήλη	Χρωματογραφία κατανομής επί στήλης
Υγρή	Υγρή επί στερεού φορέα	Κατανομή	Λεπτή στιβάδα επί πλάκας	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)
Υγρή	Υγρή επί στερεού φορέα	Κατανομή	Χάρτης	Χρωματογραφία κατανομής επί χάρτου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

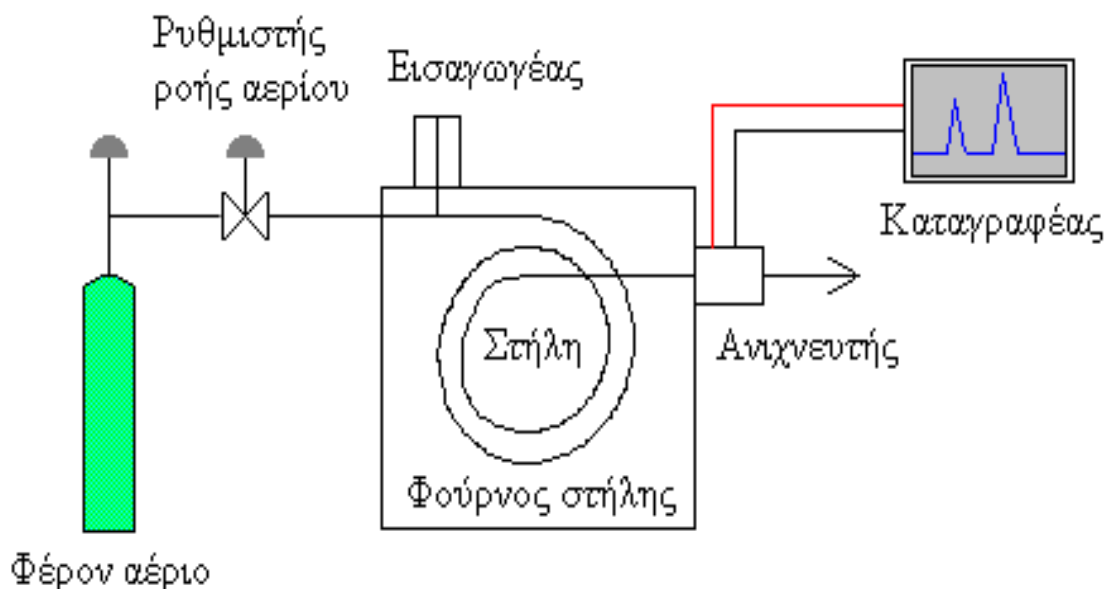
ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (ΑΕΡΙΟΥ –ΥΓΡΟΥ) GLC

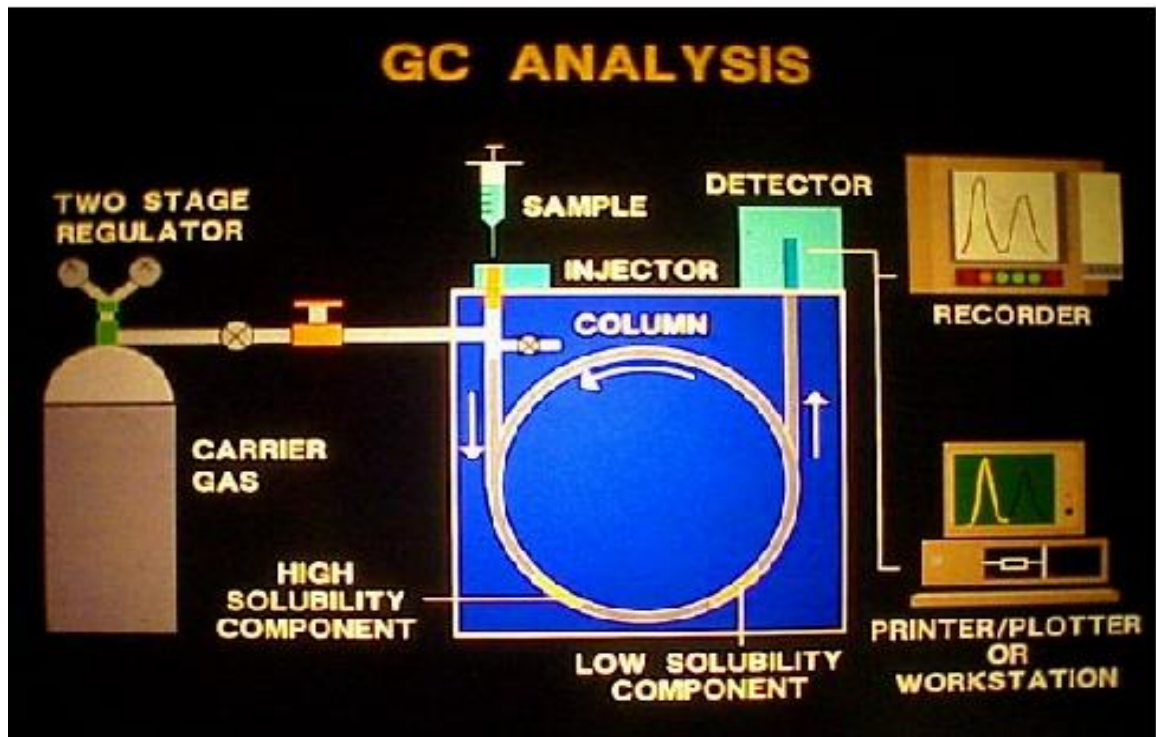
Γενικά

- Είναι τεχνική ανάλυσης μιγμάτων πτητικών οργανικών ενώσεων ή ενώσεων που καθίστανται πτητικές.
- Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό λιπαρών οξέων, στερολών, φυτοπροστατευτικών, κλπ.
- Η οργανολογία δεν είναι περίπλοκη και είναι απλή σε λειτουργία.
- Απαιτεί μικρές ποσότητες δείγματος με απλή συνήθως προκατεργασία.
- Είναι μέθοδος υψηλής ακρίβειας και μεγάλης ευαισθησίας (ppb, ppt).
- Είναι χαμηλού κόστους τεχνική.

Αρχή Μεθόδου

- Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με κατανομή του αναλύτη μεταξύ μιας αέριας κινητής φάσης (φέρων αέριο) και μιας υγρής μη πτητικής φάσης, ακινητοποιημένης σε αδρανές στερεό υπόστρωμα ή στα τοιχώματα ανοικτών τριχοειδών στηλών (χρωματογραφία αερίου-υγρού).
- Η κινητή φάση δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια του αναλύτη. Ο ρόλος της είναι η διακίνηση του αναλύτη κατά μήκος της στήλης.
- Ο διαχωρισμός οφείλεται στην κίνηση των συστατικών με διαφορετικές ταχύτητες εντός της στήλης, που εξαρτώνται από την τάση ατμών τους και την φυσικοχημική τους συγγένεια με τη στατική φάση.





Σχήμα 1: Σχηματική παράσταση αεριοχρωματογράφου

Θεωρία πλακών

Η κίνηση κάθε συστατικού στη χρωματογραφική στήλη μπορεί να θεωρηθεί ως μετακίνηση μέσω διαδοχικών θαλάμων εξισορροπήσεως οι οποίοι λέγονται θεωρητικές πλάκες.

Ως θεωρητική πλάκα ορίζεται ο απαιτούμενος όγκος της στήλης ώστε εντός αυτού να αποκαθίσταται ισορροπία μεταξύ στατικής και κινητής φάσης.

Η ισορροπία αυτή περιγράφεται από τον συντελεστή κατανομής K , όπου

$$K = C_{\text{στατική}}/C_{\text{κινητή}}$$

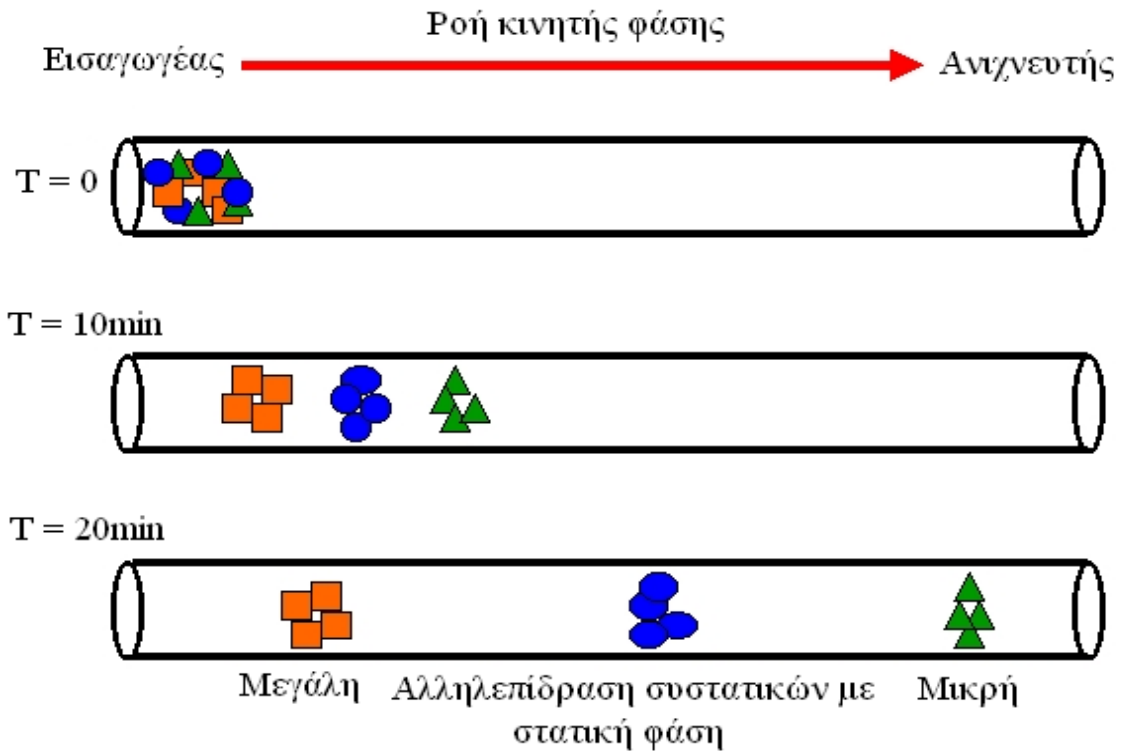
και εκφράζει τη φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού με τη στατική φάση.

Η αποτελεσματικότητα της στήλης εκφράζεται από την λεπτότητα της θεωρητικής πλάκας η οποία ορίζεται ως το ισοδύναμο ύψος προς μία θεωρητική πλάκα (ΥΙΘΠ), αντιστοιχεί δε σε ορισμένο μήκος της στήλης.

$ΥΙΘΠ = h = L/n$ όπου L το μήκος χρωματογραφικής στήλης και n ο αριθμός των θεωρητικών πλακών.

Όσο μεγαλύτερος είναι ο συντελεστής K συστατικού τόσο βραδύτερα κινείται εντός της στήλης και τόσο βραδύτερα εξέρχεται από αυτήν με αύξηση του t_R .

Άρα όσο περισσότερο διαφέρουν οι συντελεστές κατανομής των συστατικών τόσο καλύτερος διαχωρισμός επιτυγχάνεται.



Σχήμα 2: Δυνατότητα διαχωρισμού με βάση τον συντελεστή κατανομής K

Σύστημα εισαγωγής δείγματος

- Το δείγμα ενίεται, μέσω καταλλήλου στομίου εισαγωγής από θερμοανθεκτικό υλικό που δρα ως βαλβίδα, στον εισαγωγέα (injector) (γυάλινος σωλήνας) με μικροσύριγγα, όπου εξατμίζεται ταχύτατα.
- Η εισαγωγή του δείγματος πρέπει να είναι ακαριαία.
- Όσο μικρότερος είναι ο όγκος του ενεσίμου δείγματος τόσο μεγαλύτερη η διαχωριστική ικανότητα.
- Η θερμοκρασία του εισαγωγέα πρέπει να είναι υψηλότερη από τη θερμοκρασία της στήλης (και του ΣΖ των συστατικών) ώστε να επιτυγχάνεται άμεση εξαέρωση του δείγματος και παραλαβή των ατμών του από το φέρον αέριο.

Κινητή φάση – Φέρον αέριο

- Οι ατμοί του δείγματος εγχέονται στην κεφαλή της χρωματογραφικής στήλης (στατική φάση) παρασυρόμενοι από το φέρον αέριο.
- Το φέρον αέριο πρέπει να χαρακτηρίζεται από χαμηλό ιξώδες. Έτσι μπορεί να επιλέγονται στήλες μεγαλύτερου μήκους με αυξημένο το πλήθος των θεωρητικών πλακών και βελτίωση του διαχωρισμού. Επίσης επιλέγονται μεγαλύτερες ταχύτητες ροής του φέροντος αερίου επιταχύνοντας το διαχωρισμό.
- Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές ως προς τα προς διαχωρισμό συστατικά.

Ποιοτικά χαρακτηριστικά χρωματογραφικής στήλης

- Η διαχωριστική της ικανότητα (ΥΙΘΠ και αριθμός των θεωρητικών πλακών)
- Η χωρητικότητά της

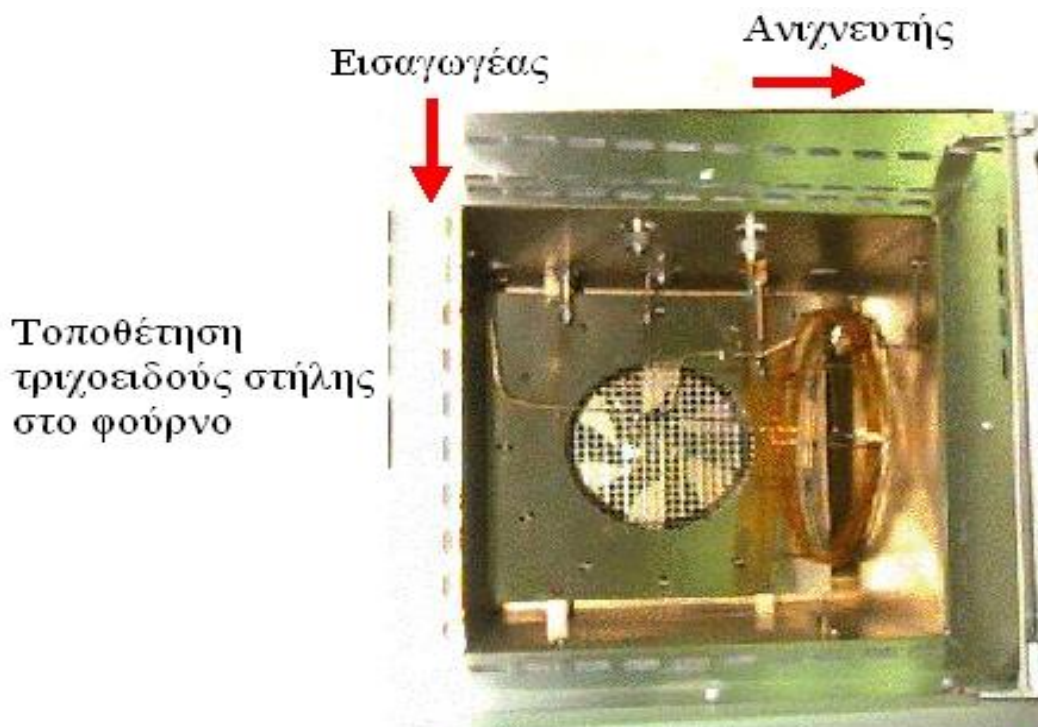
- Ο απαιτούμενος χρόνος εκλούσεως για τα διαχωριζόμενα συστατικά.
- Η μέγιστη θερμοκρασία λειτουργίας της στήλης που αποτελεί μέτρο της σταθερότητας και του χρόνου ζωής της.
- Η πολικότητα της στήλης η οποία επιλέγεται με βάση το είδος των δειγμάτων που αναλύονται.
- Τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στήλης (μήκος, εσωτερική διάμετρος, πάχος στιβάδας στατικής φάσης).

Κατασκευαστικά χαρακτηριστικά χρωματογραφικών στηλών

- Οι χρωματογραφικές στήλες αποτελούνται από έναν επιμήκη σωλήνα σε μορφή σπειράματος ή πετάλου ώστε να καταλαμβάνει το μικρότερο δυνατό χώρο.
- Ο σωλήνας είναι κατασκευασμένος από ανοξείδωτο χάλυβα, ή χαλκό, ή αργίλιο, ή ύαλο, ή πλαστικό.
- Η στατική φάση μπορεί να είναι ή στερεό υπόστρωμα, ή υγρή ουσία, ή πορώδες πολυμερές, ή κάποιο άλλο υλικό με κατάλληλη προσροφητική ικανότητα.
- Οι χρωματογραφικές στήλες διακρίνονται σε πακεταρισμένες και σε τριχοειδείς.

Τριχοειδείς στήλες

- Έχουν μήκος από 10 έως 100m και εσωτερική διάμετρο 0,10 έως 0,50mm.
- Το πάχος της στατικής φάσης η οποία τοποθετείται ως λεπτή στιβάδα στα εσωτερικά τοιχώματα της στήλης κυμαίνεται από 0,2 έως 1,0 μ m.
- Η στατική φάση μπορεί να είναι υγρή ή στερεά ουσία η οποία συγκρατείται απευθείας από τα εσωτερικά τοιχώματα της στήλης ή υγρή ουσία που προσδένεται σε στερεό υπόστρωμα το οποίο καλύπτει τα εσωτερικά τοιχώματα της στήλης.
- Οι τριχοειδείς στήλες επιτυγχάνουν πολύ καλούς διαχωρισμούς και είναι οι πλέον διαδεδομένες.



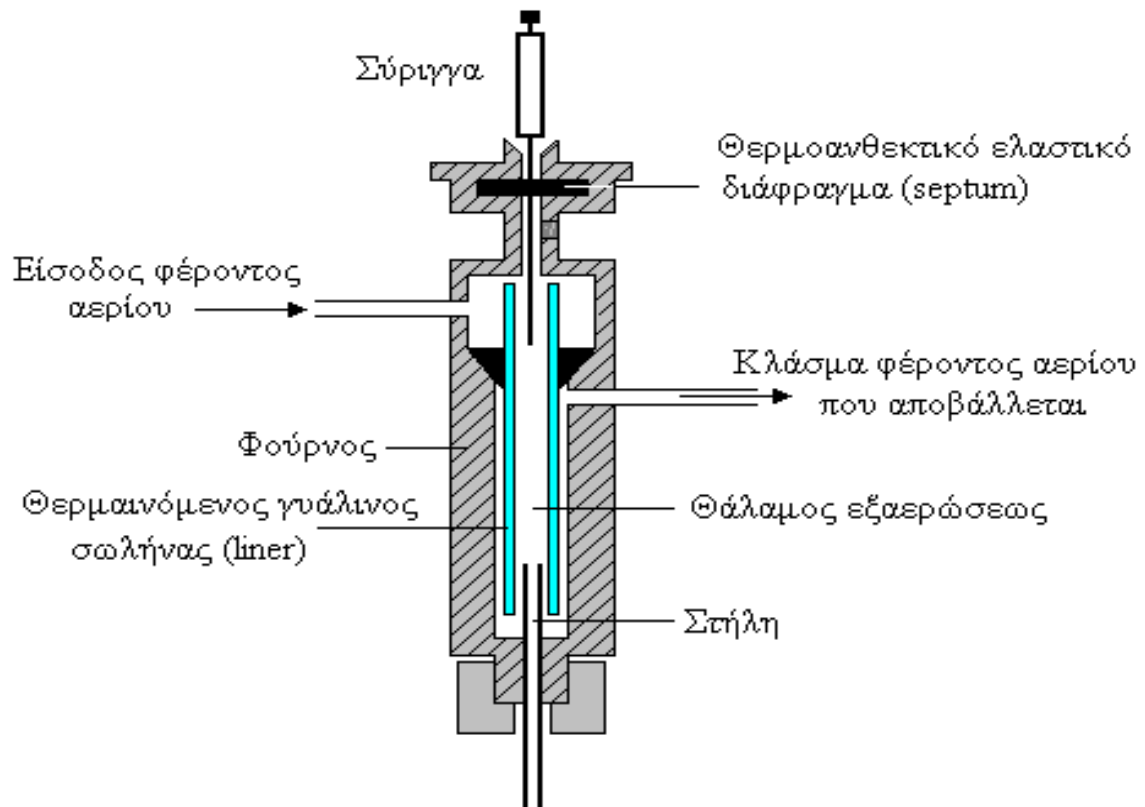
Σχήμα 3: Σχηματική παράσταση τριχοειδούς στήλης

Ποιοτικά χαρακτηριστικά υγρής στατικής φάσης

- Οι ουσίες που επιλέγονται ως υγρή στατική φάση διαφέρουν ως προς την πολικότητα και την περιοχή των θερμοκρασιών όπου χρησιμοποιούνται.
- Η υγρή φάση πρέπει να έχει αμελητέα τάση ατμών και μεγάλη ρευστότητα στην περιοχή των θερμοκρασιών όπου χρησιμοποιείται.
- Να είναι αδρανής χημικά με το φέρον αέριο και τον αναλύτη
- Να αποτελεί καλό διαλύτη για τον αναλύτη και να παρέχει διαφορετικούς συντελεστές κατανομής για τα συστατικά που διαχωρίζονται.
- Να διατίθεται στο εμπόριο σε τυποποιημένη μορφή.

Εισαγωγή δείγματος σε τριχοειδείς στήλες

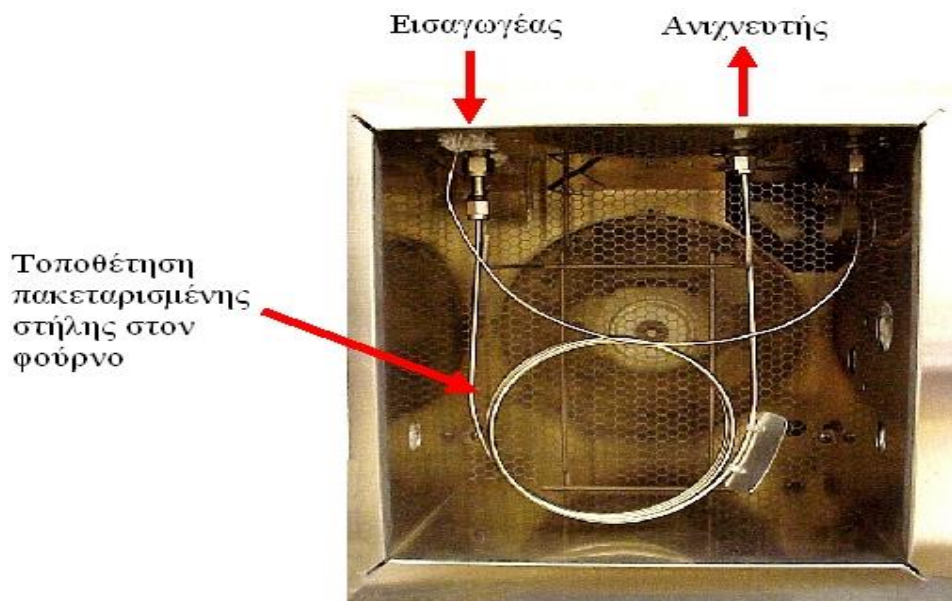
- Σύστημα εισαγωγής διαμοιρασμού (split injection): Η στήλη εισέρχεται στο κάτω μέρος του γυάλινου σωλήνα του εισαγωγέα. Το εξαερωμένο δείγμα παρασυρμένο από το φέρον αέριο περνά από την είσοδο της στήλης και μόνο μέρος αυτού εισέρχεται στη στήλη ενώ το υπόλοιπο αποβάλλεται. Η αναλογία διαμοιρασμού ρυθμίζεται από το επιλεγόμενο κλάσμα του φέροντος αερίου το οποίο θα αποβάλλεται.
- Σύστημα εισαγωγής μη διαμοιρασμού (splitless injection): Το εξαερωμένο δείγμα παρασυρμένο από το φέρον αέριο εισέρχεται συνολικά στη στήλη. Απαιτούνται στήλες μεγαλύτερης διαμέτρου.
- Σύστημα εισαγωγής στην κορυφή της στήλης (on column injection): Το δείγμα εισάγεται απευθείας στη στήλη με χρήση μικροσύριγγας με βελόνα μεγάλου μήκους που διαπερνά όλο τον εισαγωγέα.



Σχήμα 4: Σχηματική παράσταση Split – splitless εισαγωγή

Πακεταρισμένες στήλες

- Έχουν μήκος από 1 έως 4m και εσωτερική διάμετρο 2,0 έως 4,0mm.
- Το πάχος της στατικής φάσης η οποία τοποθετείται ως λεπτή στιβάδα στα εσωτερικά τοιχώματα της στήλης κυμαίνεται από 0,2 έως 1,0 μ m.
- Είναι πακεταρισμένες με κατάλληλο στερεό υπόστρωμα το οποίο επικαλύπτεται με τη στιβάδα υγρής ουσίας όταν η στατική φάση είναι υγρή και όχι στερεά.
- Οι πακεταρισμένες στήλες δεν επιτυγχάνουν καλούς διαχωρισμούς λόγω μικρού πλήθους θεωρητικών πλακών και διότι δίνουν κορυφές διευρυμένες λόγω διαχύσεως.



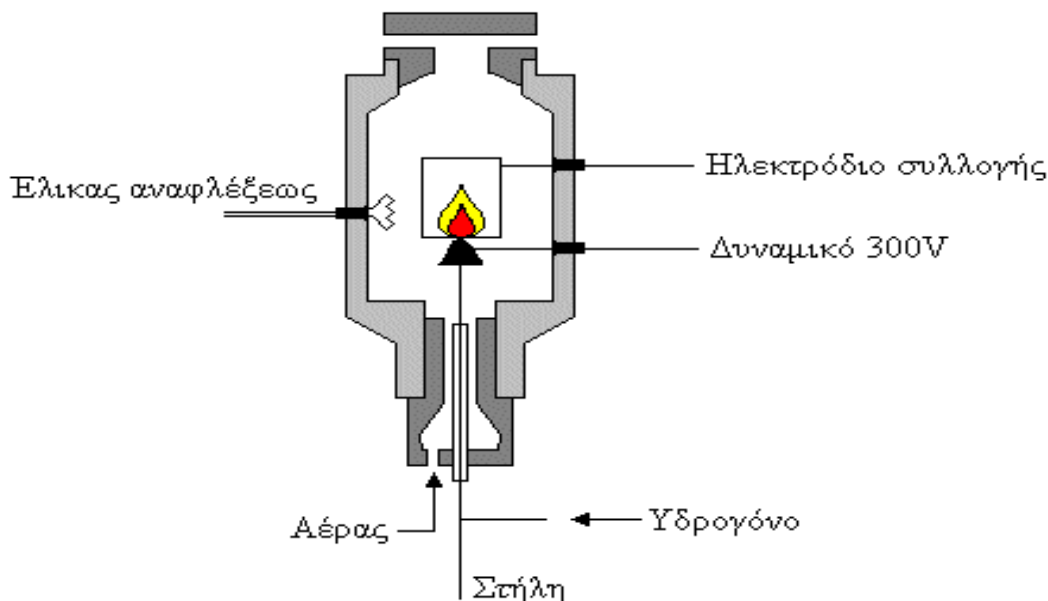
Σχήμα 5: Σχηματική παράσταση πακεταρισμένης στήλης

Ποιοτικά χαρακτηριστικά αεριοχρωματογραφικού ανιχνευτή

- Μεγάλη περιοχή αποκρίσεως για μεγάλη δυναμική περιοχή συγκεντρώσεων αναλύτη.
- Χαμηλός θόρυβος.
- Υψηλή ευαισθησία
- Εκλεκτικότητα
- Μικρός χρόνος απόκρισης.
- Μη καταστρεπτικός.
- Υψηλή αξιοπιστία.

Ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας (Flame ionization Detector F.I.D.)

- Ο ανιχνευτής ιοντισμού με φλόγα υδρογόνου ανιχνεύει όλες σχεδόν τις οργανικές ενώσεις εκτός ελαχίστων μικρής ανιχνευσιμότητας (φορμικό οξύ, ακεταλδεΐδη, κλπ.).
- Οι οργανικές ενώσεις πυρολύονται με φλόγα H₂-αέρα και παράγουν ιόντα και ηλεκτρόνια (καταστρεπτικός ανιχνευτής).
- Με εφαρμογή υψηλού δυναμικού παράγεται ρεύμα ανάλογο του αριθμού ατόμων άνθρακα κάθε ιόντος που ανιχνεύεται.
- Είναι ανιχνευτής ευρείας χρήσεως με υψηλή ευαισθησία, περιοχή αποκρίσεως για μεγάλη δυναμική περιοχή συγκεντρώσεων και χαμηλό θόρυβο.



Σχήμα 6: Σχηματική παράσταση ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας

Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (Thermal Conductivity Detector T.C.D.)

- Ο ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας έχει εφαρμογή στην ανίχνευση οργανικών και ανόργανων ενώσεων.
- Βασίζεται στην μεταβολή της θερμικής αγωγιμότητας ρεύματος αερίου λόγω της παρουσίας των μορίων κάθε διαχωριζόμενου συστατικού.
- Είναι ανιχνευτής με μικρή ευαισθησία έχει δε περιοχή αποκρίσεως για σχετικά μεγάλη δυναμική περιοχή συγκεντρώσεων.
- Είναι μη καταστρεπτικός ανιχνευτής επιτρέποντας τη συλλογή του δείγματος μετά την ανίχνευση.

Ανιχνευτής φωτοϊοντισμού (Photoionization Detector P.I.D.)

- Ο ανιχνευτής φωτοϊοντισμού ανιχνεύει με υψηλή εκλεκτικότητα αρωματικές οργανικές ενώσεις
- Οι ενώσεις που εκλύονται από τη στήλη ιοντίζονται με επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας.
- Τα ιόντα συλλέγονται από ηλεκτρόδια και παράγεται ρεύμα ανάλογο του συγκεντρώσεως κάθε ιόντος που ανιχνεύεται.
- Είναι ανιχνευτής με υψηλή ευαισθησία και περιοχή αποκρίσεως για μεγάλη δυναμική περιοχή συγκεντρώσεων.

Οργανολογία

Αεριοχρωματογράφος Agilent 6890 Series Gas Chromatograph με ανιχνευτή ιοντισμού με φλόγα υδρογόνου (FID) εφοδιασμένος με split/splitless εισαγωγή. Ο αεριοχρωματογράφος περιέχει τα βασικά μέρη του συστήματος, δηλαδή το φούρνο με θέση για δύο στήλες, δύο χώρους εισαγωγής του δείγματος αντιστοίχως (injectors) και τον ανιχνευτή (detector).



Σχήμα 7: Αεριοχρωματογράφος Agilent 6890 Series Gas Chromatograph



Σχήμα 8: Στήλη:DB-23 capillary column (60m×0.25mm i.d., 0.15 μm film) [50%-Cyanopropyl) methylpolysiloxane], υψηλήςπολικότητας, σχεδιασμένη για την ανάλυση μεθυλεστέρωνλιπαρόνοξέων(FAMEs), με εξαιρετική διαχωριστική ικανότητα των cis- και trans- FAME ισομερών



Σχήμα 9: Στήλη:HP-88 capillary column (60m×0.25mm i.d., 0.20μm film) [88%-Cyanopropyl)-methylarylpolysiloxane], υψηλής πολικότητας, σχεδιασμένη για την ανάλυση μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (FAMES), με μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα των cis- και trans- FAME ισομερών έναντι της DB-23

Οβίδα αερίου ηλίου (He) (φέρον αέριο), η οποία συνδέεται με τον αεριοχρωματογράφο μέσω βαλβίδας μείωσης της πίεσης. (μειωτήρας) που φέρει μανόμετρο.

Οβίδα αερίου υδρογόνου (H₂) (καύσιμο), η οποία συνδέεται με τον αεριοχρωματογράφο μέσω βαλβίδας μείωσης της πίεσης (μειωτήρας) που φέρει μανόμετρο.

Οβίδα ατμοσφαιρικού αέρα (οξειδωτικό), η οποία συνδέεται με τον αεριοχρωματογράφο μέσω βαλβίδας μείωσης της πίεσης (μειωτήρας) που φέρει μανόμετρο.

Μικροσύριγγα Hamilton, 1 μL.

H/Y με το υποστηρικτικό λογισμικό Hewlett Packard (Agilent) ChemStation Software.

Καταγραφέας HP.

Προσδιορισμός Λιπαρών οξέων

Αρχή μεθόδου: Τα λιπαρά οξέα των δειγμάτων μετατρέπονται στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες μέσω trans-εστεροποίησης, σε αλκαλικό περιβάλλον και στη συνέχεια ενίονται σε αέριο χρωματογράφο, όπου αναλύονται ποιοτικά και ποσοτικά.

Μεθανόλυση των λιπαρών οξέων Λαμβάνεται δείγμα μέχρι 20-30 mg λιπιδίων και εξατμίζεται ο.διαλύτης μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου. Κατόπιν προστίθενται 0.75mL n-εξάνιου και 0.1mL KOH 2M σε μεθανόλη και το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται ισχυρά για 2 min σε κυκλοαναδευτήρα. Στη συνέχεια προστίθεται άνυδρο Na₂SO₄ (αφυδατικό μέσο) και το διάλυμα αφήνεται προς εξισορρόπηση των φάσεων για 15min. Στο υπερκείμενο (φάση εξάνιου) λαμβάνονται οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων ενώ στο ίζημα παραμένουν η γλυκερίνη και τα άλλα αδιάλυτα συστατικά του δείγματος.

Το δείγμα των μεθυλεστέρων εισάγεται με μικροσύριγγα των 1μL. Λαμβάνεται 1μL δείγματος. Αναφέρεται ότι οι μεθυλεστέρες είναι ασταθείς και ο προσδιορισμός πρέπει να γίνει αμέσως μετά την μεθανόλυση.

Πρόγραμμα λήψης χρωματογραφήματος

1. Θέρμανση στους 100°C για 0min
2. Άνοδος της θερμοκρασίας με ρυθμό 10°C /min μέχρι τους 150°C (5 min), όπου διατηρείται για 0min.
3. Άνοδος της θερμοκρασίας με ρυθμό 2°C /min μέχρι τους 195°C (22.50 min), όπου διατηρείται για 5min.
4. Άνοδος της θερμοκρασίας με ρυθμό 1°C /min μέχρι τους 210°C (15 min), όπου διατηρείται για 0 min.
5. Άνοδος της θερμοκρασίας με ρυθμό 10°C /min μέχρι τους 240°C (3 min), όπου διατηρείται για 5min.
6. Η διάρκεια όλης της μεθόδου είναι 55,50min.
7. Detector 260°C - Injector 250°C

Πρότυπα για αέριο χρωματογράφο

- 1) Supelco™ 37 Component FAME Mix C4-C24, 100 mg Neat, Catalog No: 18919-1AMP (Merck, Darmstadt, Germany).
- 2) Supelco PUFA No. 1, Marine Source, 100 mg Neat, Catalog No: 47033. Metal standards (titrisol) (Merck, Darmstadt, Germany).

Ποιοτική - Ποσοτική ανάλυση λιπαρών οξέων

Η ποιοτική ανάλυση επιτυγχάνεται με συγχρωματογράφιση με τα πρότυπα και έλεγχο του χρόνου εκλούσεως κάθε λιπαρού οξέος.

Η ποσοτική ανάλυση βασίζεται στην εφαρμογή του παρακάτω τύπου:

$\mu\text{g (FA)} = \text{εμβαδόν κορυφής FAME} \times \text{FAME Rf}$

όπου οι FAME Rf υπολογίζονται με χρήση προτύπων λιπαρών οξέων στις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες από το πηλίκιο της μάζας του ενιομένου λιπαρού οξέος προς το εμβαδόν της κορυφής του που προκύπτει από το χρωματογράφημα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΙΑΤΡΟΣCAN (TLC / FID) ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Αρχή Μεθόδου

- Το IatrosScan MK-6 (TLC / FID - FPD Analyser) είναι αυτόματο σύστημα ανίχνευσης λιποειδικών συστατικών.
- Χρησιμοποιεί ανιχνευτή ιοντισμού με φλόγα υδρογόνου (F.I.D.) και φωτομετρικού ανιχνευτή (F.P.D).
- Η ανάπτυξη του χρωματογραφήματος, για τον διαχωρισμό, πραγματοποιείται σε ράβδους λεπτής στιβάδας από χαλαζία, τα Chromarods.
- Πλεονεκτήματα: ποιότητα των διαχωρισμών, ακρίβεια και σαφήνεια των αποτελεσμάτων.



Σχήμα 1: IatrosScan MK-6 (TLC / FID - FPD Analyser)

Σύστημα διαλυτών αναπτύξεως (κινητή φάση)

- Η προετοιμασία του συστήματος διαλυτών αναπτύξεως πρέπει να γίνεται με χρήση απολύτως καθαρών και στεγνών ογκομετρικών σκευών.
- Σύστημα διαλυτών προσφάτως παρασκευασμένο
- Η αναλογία και το είδος των διαλυτών επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος (χρόνος, ικανότητα διαχωρισμού)

Όγκος συστήματος διαλυτών αναπτύξεως

Προκειμένου να διατηρείται σταθερή η απόσταση από την επιφάνεια του συστήματος διαλυτών αναπτύξεως και του σημείου που έχουν τοποθετηθεί οι κηλίδες των

δειγμάτων στα Chromarods, επιλέγεται πάντα σταθερός συνολικός όγκος διαλύτη που καθορίζεται από τον τύπο του θαλάμου αναπτύξεως των Chromarods.

Θερμοκρασία αναπτύξεως

- Η ανάπτυξη των Chromarods πρέπει να γίνεται σε σταθερή θερμοκρασία
- Η μεταβολή της επηρεάζει την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος και την διαχωριστική ικανότητα.

Κορεσμός θαλάμου αναπτύξεως

Είναι ιδιαιτέρως σημαντικό να εξασφαλίζεται σταθερός κορεσμός στον θάλαμο αναπτύξεως από τους ατμούς της κινητής φάσεως, ώστε να επιτυγχάνονται καλά αναλυτικά και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα. Για τον λόγο αυτό μέσα στον θάλαμο τοποθετείται διηθητικό χαρτί που καλύπτει το ραχιαίο εσωτερικό τοίχωμα του θαλάμου και διαβρέχεται από την κινητή φάση ώστε αφ' ενός να επιταχύνει τον κορεσμό και αφ' ετέρου να τον διατηρήσει ομοιόμορφο και σταθερό καθ' όλη την διάρκεια της αναπτύξεως.

Chromarods (ράβδοι χαλαζία λεπτής στιβάδας)

- Τα Chromarods είναι ράβδοι χαλαζία λεπτής στιβάδας που έχουν επιστρωθεί με κατάλληλο ανόργανο προσροφητικό υλικό (Silica-gel ή Alumina).
- Είναι τοποθετημένα σε μεταλλικό πλαίσιο χωρητικότητας δέκα ράβδων και με βαθμονόμηση του ύψους των ράβδων (1-100mm).
- Συνθήκες ενεργοποίησης των ράβδων είναι ροή υδρογόνου 160 mL/min, ροή αέρα 2 L/min και ταχύτητα καύσης 30s/ράβδο.
- Ο καθαρισμός και η ενεργοποίηση των ράβδων επιτυγχάνεται με την καύση τους με την φλόγα υδρογόνου ακριβώς πριν την έναρξη του κάθε προσδιορισμού.
- Για καλύτερο αποτέλεσμα ή στην περίπτωση που αλλάζει το είδος του προσδιορισμού οι ράβδοι πρέπει να εκπλένονται με το νέο σύστημα διαλυτών αναπτύξεως και στην συνέχεια να καίγονται ώστε να γίνεται πλήρης απομάκρυνση των πιθανών ενεργών συστατικών που έχουν παραμείνει σε αυτές.

Τοποθέτηση δείγματος στα Chromarods

Ο διαλύτης για την διαλυτοποίηση του δείγματος πρέπει να επιλέγεται έτσι ώστε να διαθέτει την μεγαλύτερη δυνατή πτητικότητα και την μικρότερη πολικότητα, από αυτούς που είναι κατάλληλοι για την διαλυτοποίηση του δείγματος, διότι η κηλίδα που τοποθετείται εξαπλώνεται περισσότερο όσο αυξάνεται το σημείο ζέσεως και η πολικότητα του διαλύτη. Γενικώς όσο μικρότερης διαμέτρου είναι η κηλίδα του δείγματος που τοποθετείται στην ράβδο τόσο καλύτερα γίνεται ο διαχωρισμός και περιορίζεται σημαντικά ο κίνδυνος αλληλοεπικαλύψεως των διαχωρισθέντων συστατικών. Οι πιο κατάλληλοι διαλύτες για την διαλυτοποίηση δειγμάτων λιποειδικών συστατικών είναι το εξάνιο, το βενζόλιο και το χλωροφόρμιο.

Η συνολική συγκέντρωση του προς ανάλυση διαλύματος δείγματος θα πρέπει να κυμαίνεται από 10 έως 20 mg/mL (1-2%w/v). Το διάλυμα του δείγματος τίθεται στην κάθε ράβδο με μικροσύριγγα σε καθορισμένη απόσταση από την βάση της ράβδου και ο όγκος που επιλέγεται για καλύτερο διαχωρισμό είναι 1μL (2-5 μg/κορυφή ή συστατικό του δείγματος). Το σημείο θέσεως της κηλίδας του διαλύματος του δείγματος σε κάθε ράβδο είναι καθορισμένο και επιλέγεται με την τοποθέτηση του

μεταλλικού πλαισίου με τις ράβδους σε κατάλληλη γυάλινη βάση που διαθέτει μια άσπρη γραμμή-οδηγό βάση της οποίας τίθεται η κάθε κηλίδα (Σχήμα 2). Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων και αφού εξατμισθεί ο διαλύτης τους τίθεται το μεταλλικό πλαίσιο με τις ράβδους στον κορεσμένο θάλαμο αναπτύξεως.



Σχήμα 2: Τοποθέτηση δείγματος στα Chromarods

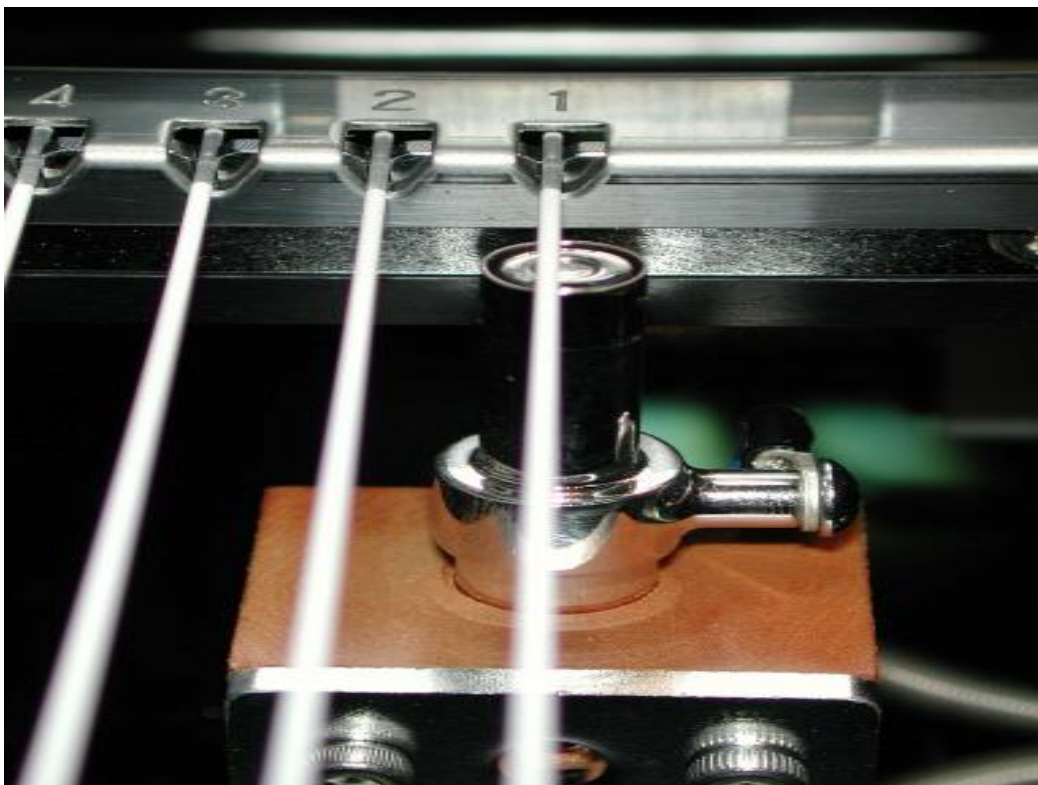
Ανάπτυξη των Chromarods

Η ανάπτυξη γίνεται σε απόσταση καθορισμένη από την βάση της ράβδου και πάντα μικρότερη από το άνω άκρο αυτής (10cm). Η απόσταση αναπτύξεως δεν πρέπει να διαφοροποιείται σε κάθε μέτρηση διότι όταν μεταβάλλεται επηρεάζει σημαντικά και την απόσταση που διανύουν οι κηλίδες των συστατικών (R_f) όπως και το εμβαδόν των κορυφών στο χρωματογράφημα (peak area). Όσο μεγαλύτερο είναι το μέτωπο του διαλύτη (απόσταση που διανύει η κινητή φάση) τόσο αυξάνεται το R_f κάθε συστατικού και μειώνεται το εμβαδόν των κορυφών οπότε εξασφαλίζεται καλύτερη διαχωριστική ικανότητα (Σχήμα 3).

Όταν ολοκληρώνεται η ανάπτυξη των ράβδων εξέρχονται με το μεταλλικό πλαίσιο από τον θάλαμο αναπτύξεως και αφήνονται για 2min σε θερμοκρασία δωματίου ή με παροχή ρεύματος κρύου αέρα ώστε να εξατμισθεί πλήρως ο διαλύτης.



Σχήμα 3: Ανάπτυξη των Chromarods

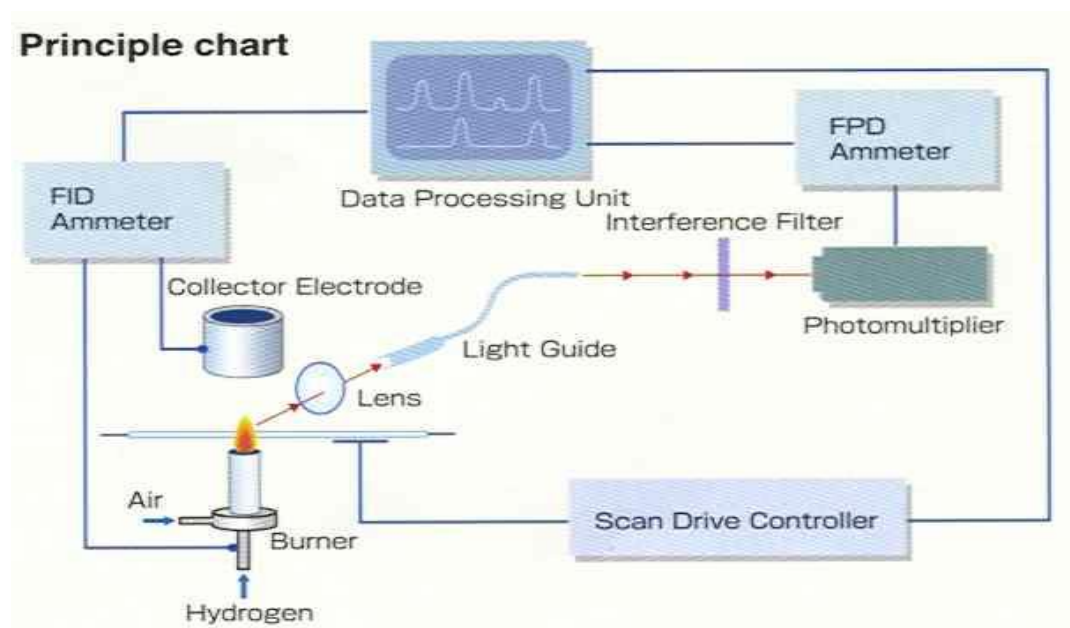


Σχήμα 4: Καύση των Chromarods με την φλόγα υδρογόνου

Μέτρηση με ανιχνευτή ιοντισμού με φλόγα υδρογόνου (FID) και με φωτομετρικού ανιχνευτή με φλόγα υδρογόνου (FPD).

Η ευαισθησία του ανιχνευτή ιοντισμού με φλόγα υδρογόνου (F.I.D.) και του φωτομετρικού ανιχνευτή με φλόγα υδρογόνου (F.P.D.) εξαρτάται από την ταχύτητα ροής του αέρα και του υδρογόνου όπως και από την ταχύτητα σαρώσεως των ράβδων από τον καυστήρα (Σχήμα 4). Η βέλτιστη ροή αέρα και υδρογόνου είναι αντιστοίχως 2 L/min και 160 mL/min. Μικρότερη ροή υδρογόνου μειώνει την θερμοκρασία της φλόγας και μπορεί να επιφέρει ατελή καύση ορισμένων συστατικών.

Αντιθέτως μεγάλη παροχή υδρογόνου αυξάνει την θερμοκρασία της φλόγας οπότε οι ράβδοι υπερθερμαίνονται και ο συσχετισμός μεταξύ του εμβαδού της κάθε κορυφής και της συγκεντρώσεως των συστατικών που διαχωρίστηκαν αποκλίνει σημαντικά από την αληθή τιμή. Τέλος όσον αφορά την ταχύτητα σαρώσεως των ράβδων από τον καυστήρα μπορεί να κυμανθεί από 10 έως 60s/ράβδο επιλέγεται δε ως βέλτιστη η τιμή των 20-30s/ράβδο (0.50-0.33 cm/sec).



Πειραματικό Μέρος

Iatroscan ανάλυση ολικών λιπιδίων σε ιχθυηρά

Οργανολογία:

Iatroscan MK-6 (TLC / FID - FPD Analyser) (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc., Tokyo, Japan)

Chromarods: Types SIII (Silica gel type)

Ανιχνευτής: Hydrogen flame ionization detector (F.I.D.)

Ροή υδρογόνου: 160 mL/min

Ροή αέρα: 2 L/min

Ταχύτητα σαρώσεως των ράβδων από τον καυστήρα 30s/ράβδο (0.33cm/sec)

Αναλυτική πορεία:

Λαμβάνονται μίγματα λιπιδίων (ολικά, ουδέτερα ή πολικά), εξατμίζονται μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου και το υπόλειμμα αναδιαλύεται σε χλωροφόρμιο/μεθανόλη (9:1 v/v), προς σχηματισμό διαλύματος συγκέντρωσης 10-20 mg/mL. Από κάθε δείγμα

λιποειδών λαμβάνονται 0,5-1,0 mL διαλύματος και τοποθετούνται με μικροσύριγγα σε απόσταση 1,00 cm από το ένα άκρο της ράβδου (Christie et al., 1979; Tanaka et al., 1980; Sinanoglou and Miniadis, 1998; Sinanoglou and Miniadis, 2000).

Λαμβάνονται διαλύματα προτύπων λιπιδίων (εστέρες στερολών, τριπαλμιτίνη, τριελαΐνη, χοληστερόλη, διγλυκερίδιο, μονογλυκερίδιο, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοσερίνη, καρδιολιπίνη, σφιγγομυελίνη, λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, καθαρότητας 99%) ίδιας συγκεντρώσεως. Οι ράβδοι στη συνέχεια τοποθετούνται σε κορεσμένο θάλαμο με κατάλληλο σύστημα διαλυτών ανάπτυξης. Όταν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη οι ράβδοι ανασύρονται από το θάλαμο και αφήνονται μέχρι πλήρους εξατμίσεως των διαλυτών. Μία ράβδος (η πρώτη συνήθως) λαμβάνεται κενή ώστε να χρησιμοποιηθεί για λευκό προσδιορισμό. Στη συνέχεια ακολουθεί τοποθέτηση των ράβδων στο θάλαμο του Iatroskan και καύση των διαχωρισμένων λιπιδίων με φορά από το μέτωπο του διαλύτη προς το σημείο τοποθέτησης των δειγμάτων. Για δείγματα ολικών λιπιδίων επιτυγχάνεται πλήρης διαχωρισμός τους σε ουδέτερα, γλυκο- και πολικά λιπίδια ως εξής:

α) Γίνεται αρχικώς ανάπτυξη σε πολικό σύστημα διαλυτών μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φτάσει τα 5,00 cm και στη συνέχεια και αφού εξατμισθούν πλήρως οι διαλύτες, ακολουθεί ανάπτυξη σε ουδέτερο σύστημα μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φτάσει τα 10,00 cm, οπότε και ολοκληρώνεται η ανάπτυξη. Τέλος οι ράβδοι καίγονται σε όλο το μήκος τους.

β) Γίνεται αρχικώς ανάπτυξη σε πολικό σύστημα διαλυτών μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φτάσει τα 7,00 cm και στη συνέχεια και αφού εξατμισθούν πλήρως οι διαλύτες, ακολουθεί ανάπτυξη σε ουδέτερο σύστημα μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φτάσει τα 10,00 cm, οπότε και ολοκληρώνεται η ανάπτυξη. Τέλος οι ράβδοι καίγονται σε όλο το μήκος τους.

γ) Γίνεται ανάπτυξη πρώτα σε ουδέτερο σύστημα διαλυτών και οι ράβδοι καίγονται μέχρι απόστασης 2.5 cm από το άκρο τοποθέτησης των δειγμάτων. Στη συνέχεια ακολουθεί ανάπτυξη σε σύστημα για γλυκολιπίδια και οι ράβδοι καίγονται μέχρι απόστασης 2 cm από το άκρο τοποθέτησης των δειγμάτων. Τέλος ακολουθεί ανάπτυξη σε σύστημα πολικό και οι ράβδοι καίγονται σε όλο το μήκος τους.

Συστήματα διαλυτών ανάπτυξης:

α) Ουδετέρων λιπιδίων

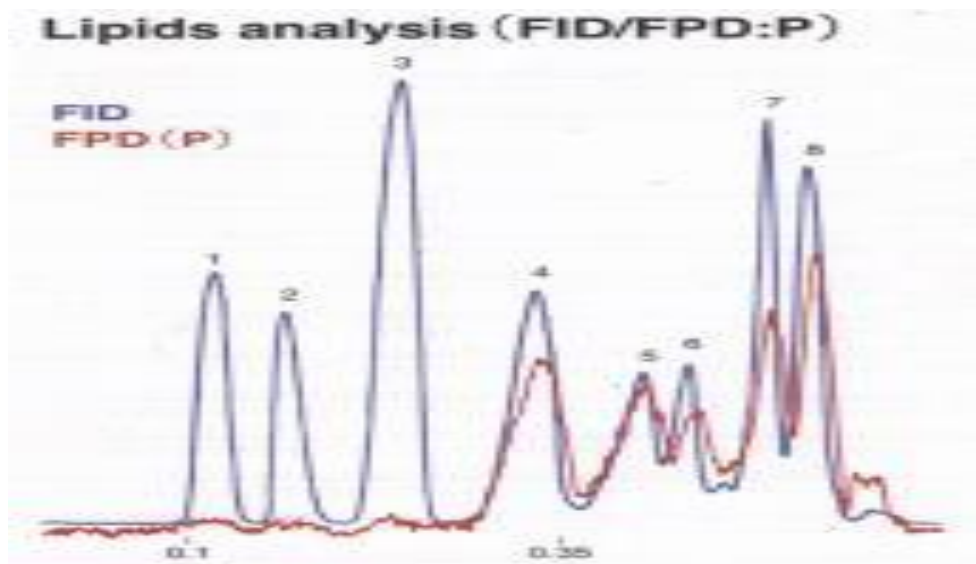
n-Εξάνιο / διαιθυλαιθέρας / φορμικό οξύ	(65:5:0,15	v/v/v)
n-Εξάνιο / διαιθυλαιθέρας / φορμικό οξύ	(60:15:1,5	v/v/v)
n-Εξάνιο / διαιθυλαιθέρας / φορμικό οξύ	(66,5:3,5:1,7	v/v/v)
n-Εξάνιο / διαιθυλαιθέρας	(72:0,8	v/v)

β) Γλυκολιπιδίων

Χλωροφόρμιο / μεθανόλη / νερό	(63:7:0,7	v/v/v)
-------------------------------	-----------	--------

γ) Πολικών λιπιδίων

Χλωροφόρμιο / μεθανόλη / νερό	(50:20:2,5	v/v/v)
Χλωροφόρμιο / μεθανόλη / νερό	(52:20:3,2	v/v/v)
Χλωροφόρμιο / μεθανόλη / νερό	(56:28:2,8	v/v/v)
Χλωροφόρμιο / μεθανόλη / νερό	(48:24:2,8	v/v/v)



Sample: Standard mixture

1. Cholesterol ester
2. Triglyceride
3. Cholesterol
4. Phosphatidyl ethanolamine
5. Phosphatidyl choline
6. Phosphatidyl inositol
7. Sphingomyelin
8. Lysophosphatidyl choline