



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

# Χημική κινητική

Διάλεξη 6<sup>η</sup>

Δρ. Ανθή Πανάρα  
Χημικός, MSc, PhD

# Πειραματικές μέθοδοι

## Τι είναι οι πειραματικές μέθοδοι;

Η μελέτη μιας σειράς τεχνικών που μελετούν:

- την ταχύτητα της αντίδρασης,
- την εξήγηση των πειραματικών δεδομένων
- την εκτίμηση των ακριβών τιμών για τη σταθερά ταχύτητας βάσει των πειραματικών δεδομένων.

## Πώς κατηγοριοποιούνται οι χημικές αντιδράσεις βάσει της ταχύτητας;

Βάσει της ταχύτητας της αντίδρασης κατηγοριοποιούνται σε:

- Αργές αντιδράσεις π.χ. Οξείδωση του σιδήρου
- Γρήγορες αντιδράσεις: π.χ. Καύση του προπανίου, διάσπαση TNT

Πειραματικές μέθοδοι

Αργές Αντιδράσεις

Χημικές μέθοδοι

Φυσικές μέθοδοι

Μέθοδος έκλυσης αεριού

Μέθοδος με διαστολόμετρο

Φασματοφωτομετρική μέθοδος

Μέθοδος οπτικής στροφικής ικανότητας

Ποτενσιομετρική μέθοδος

Μέθοδος ηλεκτρικής αγωγιμότητας

Γρήγορες Αντιδράσεις

NMR

Αέριοχρωματογραφία

Υγροχρωματογραφία

Μέθοδος Ροής

Φασματομετρία μάζας

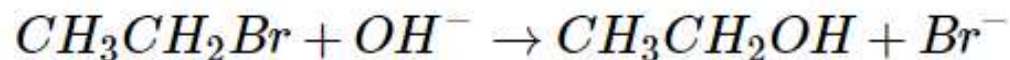
# Χημικές μέθοδοι

## Χημικές μέθοδοι

Οι χημικές μέθοδοι αφορούν την απόθεση μιας δεδομένης ποσότητας δείγματος και την ανάλυσή του. Τα υποδείγματα (aliquots) μπορούν να αναλυθούν ογκομετρικά ύστερα από ψύξη ή απενεργοποίηση (quenching).

## Προκατεργασία χημικών μεθόδων

- Τα υποδείγματα του μίγματος της αντίδρασης προετοιμάζονται σε ίσες ποσότητες, μεταφέρονται σε vials και **σφραγίζονται** (aliquoting).
- Οι σωλήνες τοποθετούνται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 40°C. Οι σωλήνες αφήνονται να θερμοστατηθούν.
- Όταν φτάσουν ξανά στη θερμοκρασία του υδρόλουτρου απομακρύνονται ένας ένας **σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα** και αμέσως ψύχονται με ψυκτικό μίγμα.
- Το περιεχόμενο αναλύεται για τον προσδιορισμό υδροξυλιόντων με τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα  $\text{AgNO}_3$



- Από την ποσότητα του τιτλοδότη που καταναλώνεται, μπορούμε να βρούμε τη συγκέντρωση του δείγματος που έχει αντιδράσει.

Πειραματικές μέθοδοι

Αργές  
Αντιδράσεις



Φυσικές  
μέθοδοι



Μέθοδος έκλυσης  
αεριού

Μέθοδος με  
διαστολόμετρο

Φασματοφωτομετρική  
μέθοδος

Μέθοδος  
οπτικής στροφικής  
ικανότητας

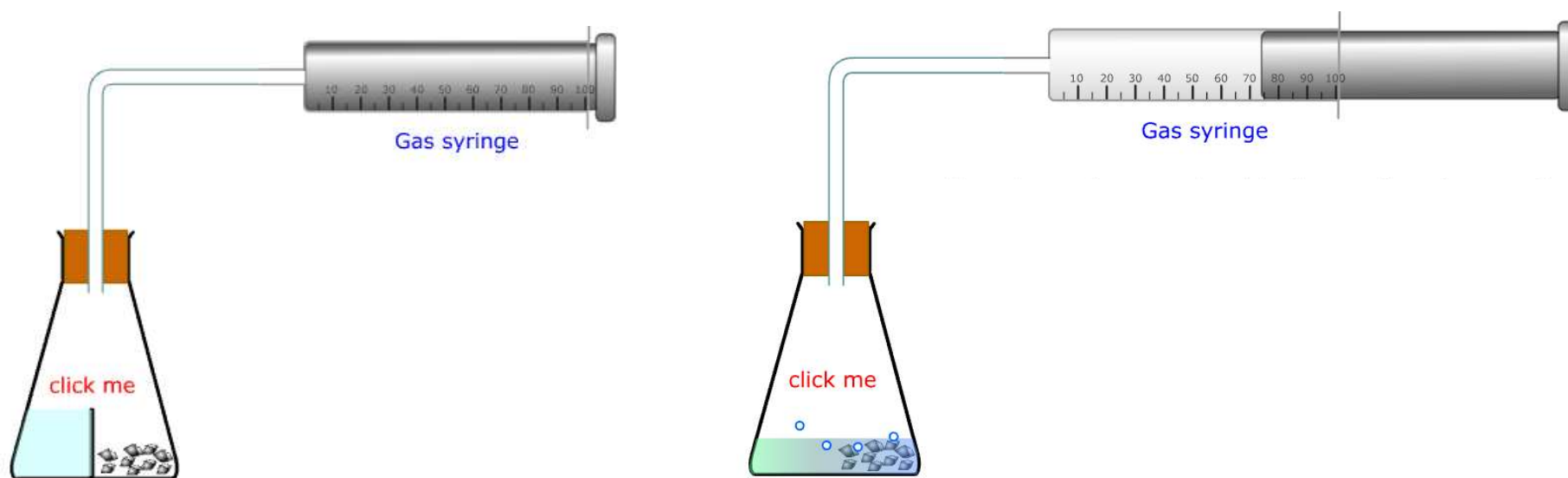
Ποτενσιομετρική  
μέθοδος

Μέθοδος ηλεκτρικής  
αγωγιμότητας

# Μέθοδος έκλυσης αερίου

## 1) Αλλαγή στον όγκο σε συνθήκες σταθερής πίεσης

Οι αντιδράσεις έκλυσης αερίου σε σταθερή πίεση είναι αντιδράσεις όπου παράγεται αέριο κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και η πίεση παραμένει σταθερή. Αυτές οι αντιδράσεις είναι συχνές σε χημικές αντιδράσεις που περιλαμβάνουν αέρια προϊόντα.

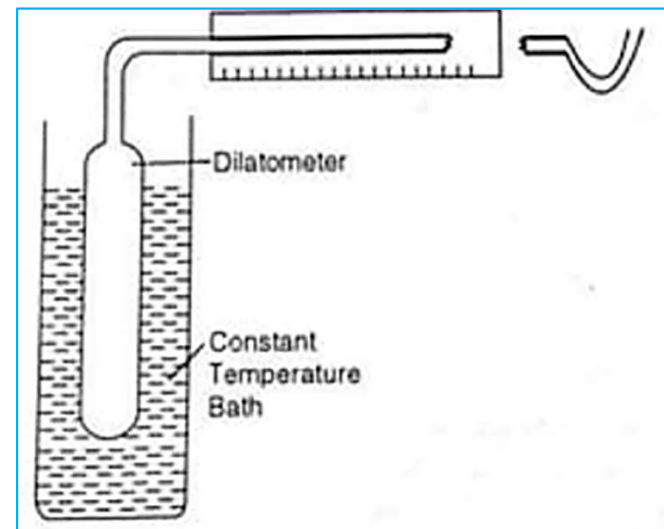


Ο όγκος του αερίου που παράγεται από την αντίδραση κάθε στιγμή είναι ίση με τη μεταβολή της ένδειξης στη σύριγγα. Από το νόμο του Avogadro, ο όγκος του αερίου συνδέεται αναλογικά με τον αριθμό των moles

# Μέθοδος με διαστολόμετρο

## Αρχή μεθόδου:

- Μια κοινή χρήση της μεθόδου περιλαμβάνει **τη μέτρηση στην αλλαγή του όγκου** που είναι ταυτόχρονη με την πρόοδο της αντίδρασης.
- Η αλλαγή στη μέτρηση του όγκου μπορεί να μετρηθεί με ένα διαστολόμετρο.
- Το διαστολόμετρο έχει μια φιάλη που παρέχεται με ένα παράπλευρο σωλήνα.
- Στην άκρη του σωλήνα βάζω κάποιο υγρό και από τη μετατόπιση του υγρού, μπορώ να γίνει αντιληπτή η αλλαγή του όγκου.
- Μια **μικρή % αλλαγή** στον όγκο έχει ως αποτέλεσμα την εύκολη ανίχνευση της κίνησης του μηνίσκου στο τριχοειδές.



# Μέθοδος με διαστολόμετρο

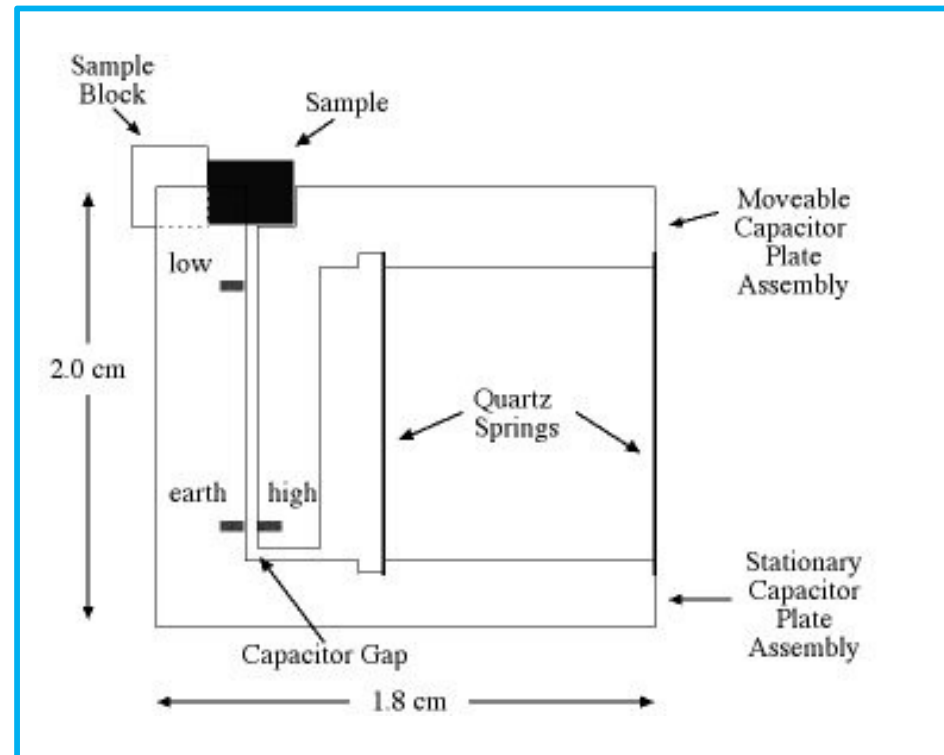
## Ηλεκτρικό διαστολόμετρο:

- Το διαστολόμετρο έχει δύο πλάκες.
- Κατά την έκλυση του αερίου, αυξάνεται ο όγκος του, έτσι η μια πλάκα μετακινείται προς την άλλη.
- Μετρείται η **διαφορά της απόστασης (πριν και μετά την έκλυση αερίου)** και βρίσκουμε πόσο αέριο έχει παραχθεί.
- Ιδιαίτερα ευαίσθητο καθώς μπορεί να μετρήσει μεταβολές 4  $\mu\text{m}$
- $C = \epsilon A d$ ,

όπου  $\epsilon$ : ηλεκτρική σταθερά του μέσου του πυκνωτή,

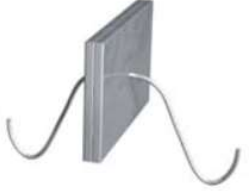
A: εμβαδόν της κάθε πλάκας,

d: απόσταση






### Factors Affecting Capacitance



Capacitance = 354.20 picoFarads

Dielectric	Plate Area	Distance
Air 1.0	0.04 sq.m	0.001 m


### Factors Affecting Capacitance



Capacitance = 35.42 picoFarads

Dielectric	Plate Area	Distance
Air 1.0	0.04 sq.m	0.010 m


### Factors Affecting Capacitance



Capacitance = 23.61 picoFarads

Dielectric	Plate Area	Distance
Air 1.0	0.04 sq.m	0.015 m

### Factors Affecting Capacitance

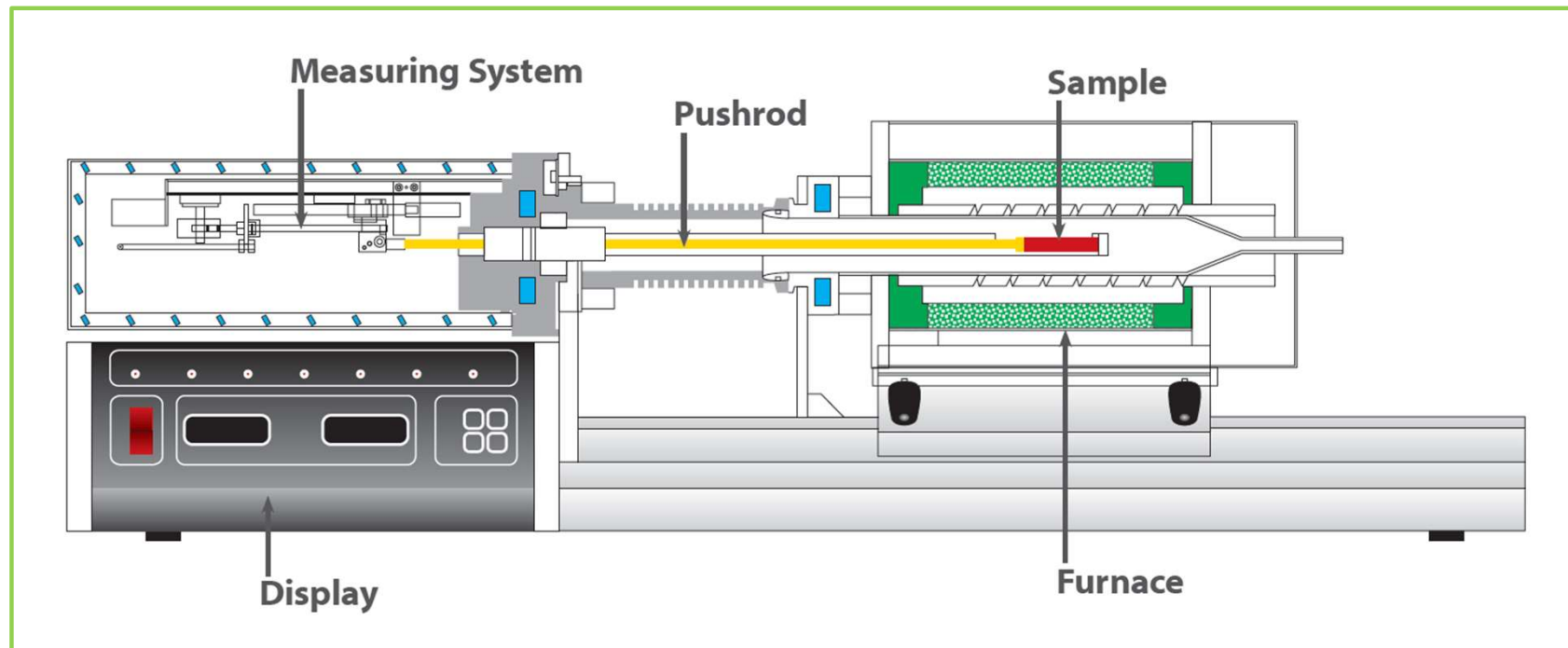


Capacitance = 17.71 picoFarads

Dielectric	Plate Area	Distance
Air 1.0	0.04 sq.m	0.020 m

# Μέθοδος με διαστολόμετρο

- Σύγχρονα διαστολόμετρα, τα οποία συνδέονται με υπολογιστές και μπορεί να δώσουν αποτελέσματα με μεγάλη ακρίβεια.
- Μπορούν να μετρηθούν μικροποσότητες με τα κατάλληλα αναλυτικά χαρακτηριστικά (πιστότητα, ορθότητα).
- Δυνατότητα θερμοστάτης του συστήματος και μελέτη της κινητικής της αντίδρασης σε διαφορετικές θερμοκρασίες.



# Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι

## Φασματοφωτομετρία Ορατού/Υπεριώδους (UV/Vis)

### Αρχή μεθόδου:

- Ο νόμος του Beer Lambert μπορεί να διατυπωθεί ως εξής:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon b C}$$

$$A = \epsilon b C$$

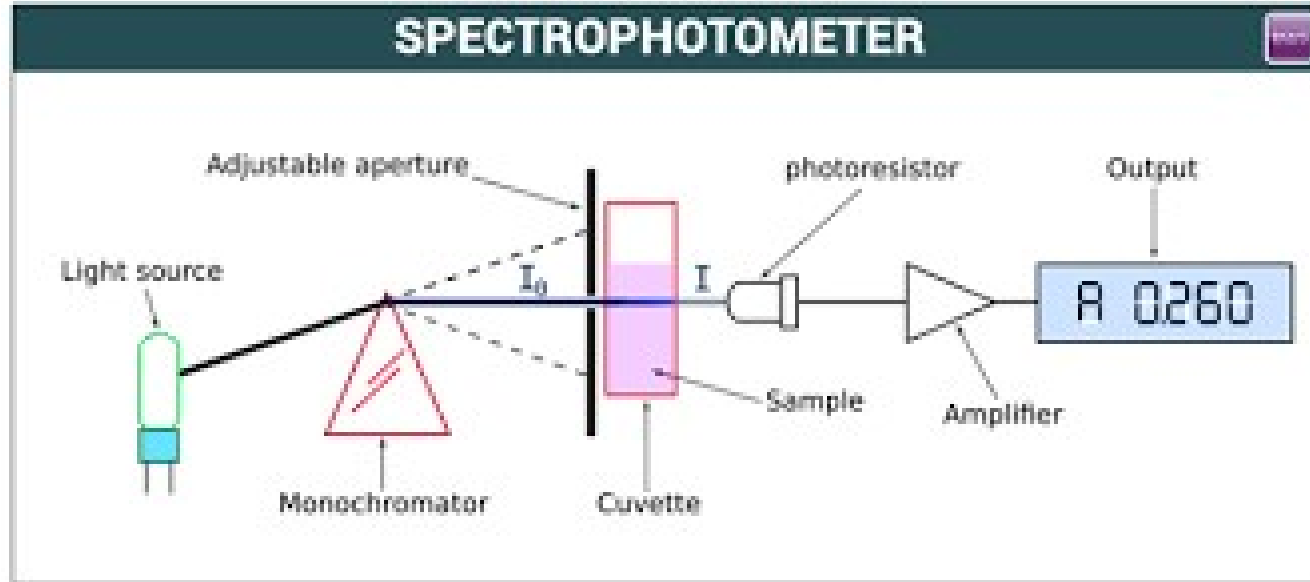
- Σε μια φασματοφωτομετρική μέθοδο είναι πιθανή η μελέτη της αντίδρασης **μετρώντας την απορρόφηση (absorbance)** σε συγκεκριμένο μήκος κύματος  $\lambda$  (wavelength) ως **συνάρτηση του χρόνου**.
- Η **απορρόφηση** θα είναι γραμμικά ανάλογη της συγκέντρωσης και από τα δεδομένα αυτά μπορεί να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς.
- Χρησιμοποιώντας την  $A=f(C)$ , μπορεί να προσδιοριστεί η **συγκέντρωση των αντιδρώντων** στα διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

π.χ. κινητική της αλκαλικής υδρόλυσης του οξικού μεθυλεστέρα

Μπορεί να μετρηθεί στα 332 nm με τη μείωση της θερμοστατούμενου μίγματος της αντίδρασης σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα.

# Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι

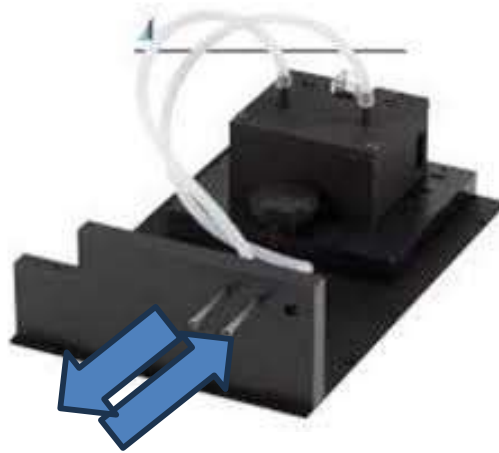
## Φασματοφωτομετρία Ορατού/Υπεριώδους (UV/Vis)



# Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι

## Φασματοφωτομετρία Ορατού/Υπεριώδους (UV/Vis)

Κυψελίδες που χρησιμοποιούνται στις μεθόδους κινητικής



**Θερμαινόμενες  
κυψελίδες**

Ρέει νερό ή ψυκτικό και  
ψύχει την κυψελίδα

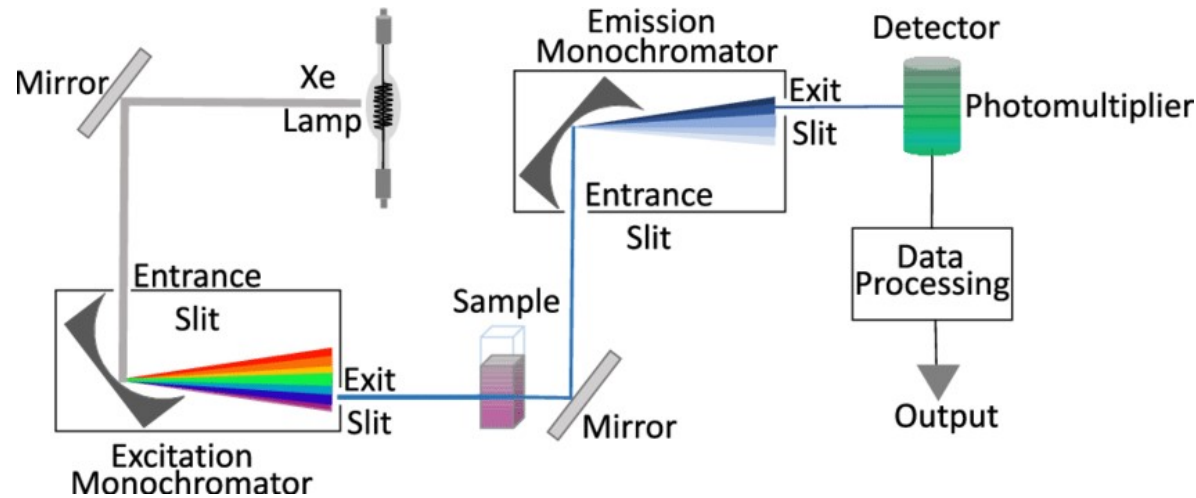


**Κυψελίδες με  
μαγνητική  
ανάδευση**

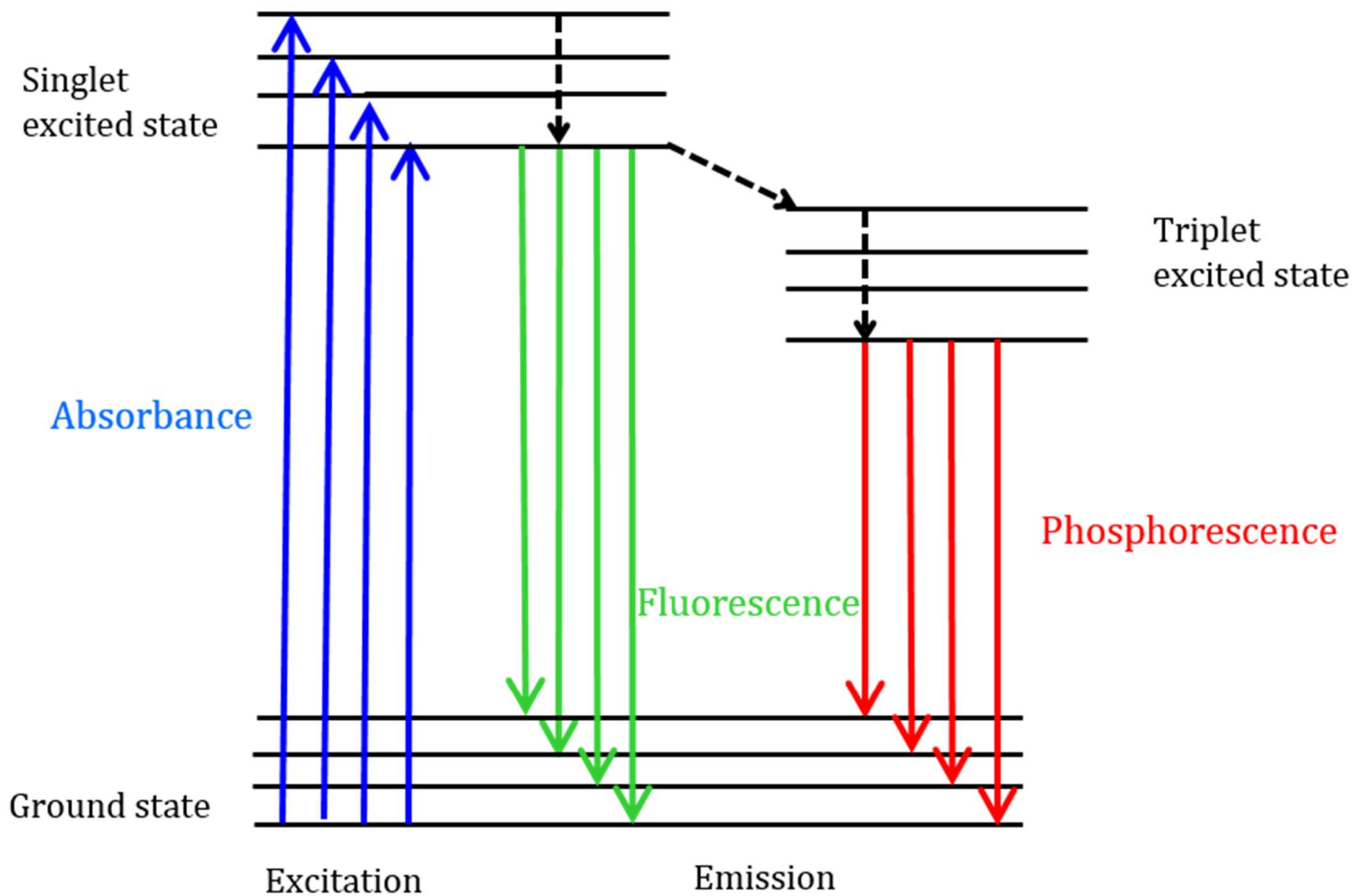
- Ιδανικά, συνδυασμός θερμαινόμενων κυψελίδων με μαγνητική ανάδευση.

# Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι

## Φθορισμομετρική μέθοδος

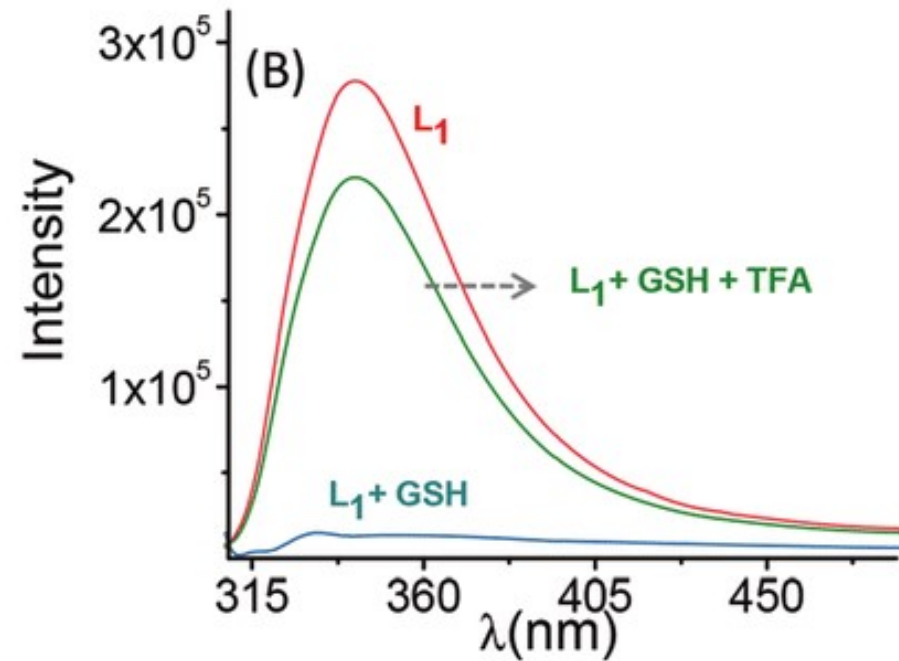
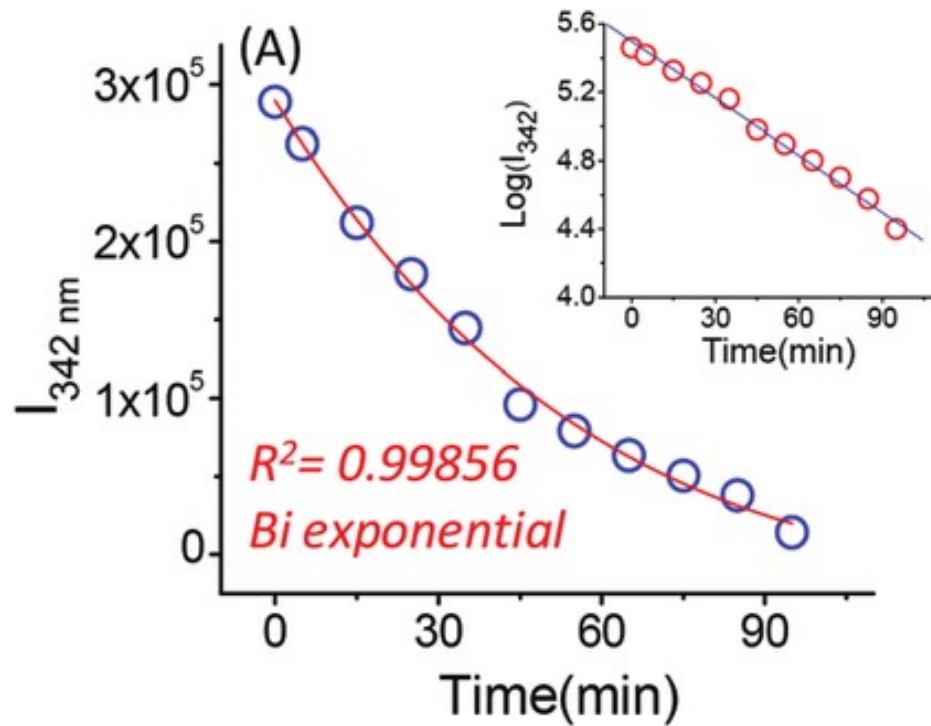


- Αφορά μικρό αριθμό ενώσεων που μπορεί να φθορίζουν
- Παρόμοια αρχή λειτουργίας με τη φασματοφωτομετρία ορατού/υπεριώδους
- Στο φθορισμό η διαδικασία της απορρόφησης καλείται διέγερση
- Στη διάταξη του φθορισμομέτρου έχουμε 2 μονοχρωμάτορες
  - 1 μονοχρωμάτορα που επιλεγεί τα κατάλληλα φωτόνια για τη διέγερση
  - και 1 μονοχρωμάτορα εκπομπής που σκανάρει την ακτινοβολία για να βρει τι μήκος κύματος έχει το φωτόνιο εκπομπής



# Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι

## Φθορισμομετρική μέθοδος

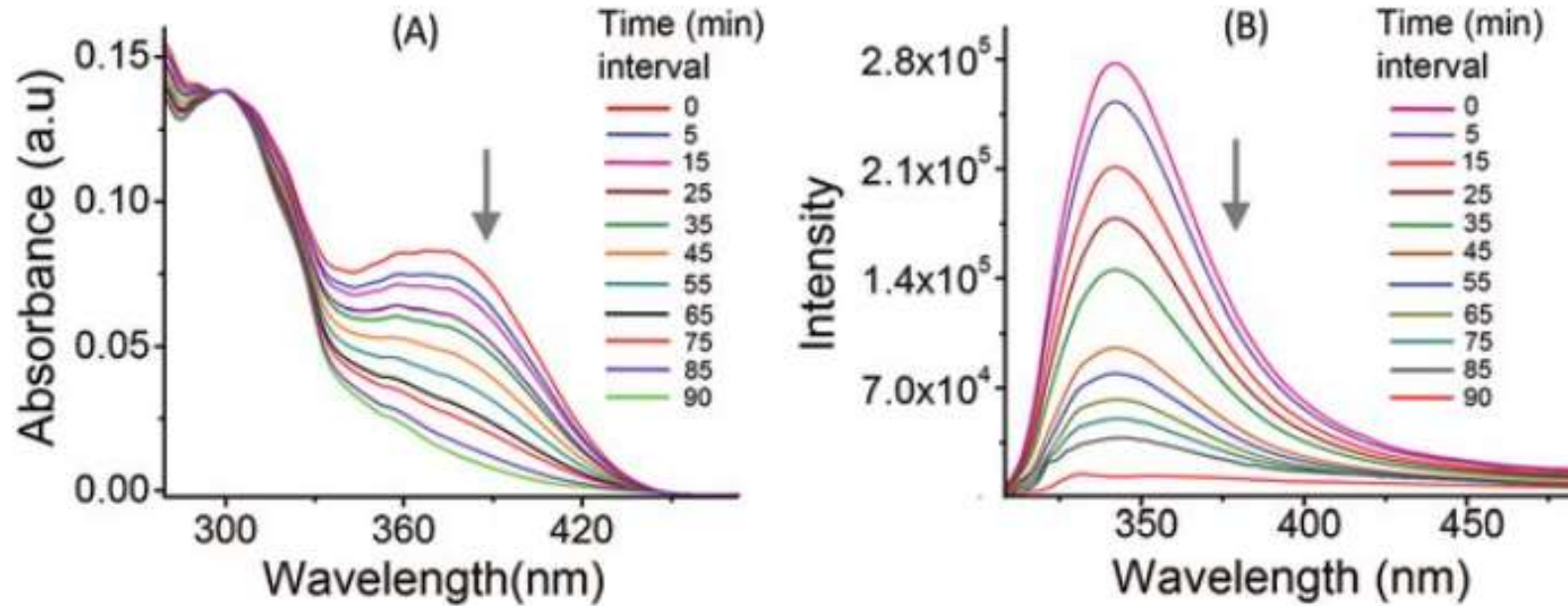


Αντίδραση πρώτης τάξης με φθορισμό



# Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι

## Σύγκριση φασμάτων UV/Vis με FLD



**Φάσματα (A) UV-Vis και (B) φθορισμού σε διαφορετικά χρονικά σημεία**

Αρκετή  
παρεμπόδιση λόγω  
απορρόφησης του  
υποστρώματος

Λήψη φασματικών κορυφών  
χωρίς παρεμπόδιση  
(zero background technique)

# Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι

## Φθορισμομετρική μέθοδος



Θερμαινόμενες  
κυψελίδες  
φθορισμού



Κυψελίδες  
φθορισμού με  
μαγνητική  
ανάδευση

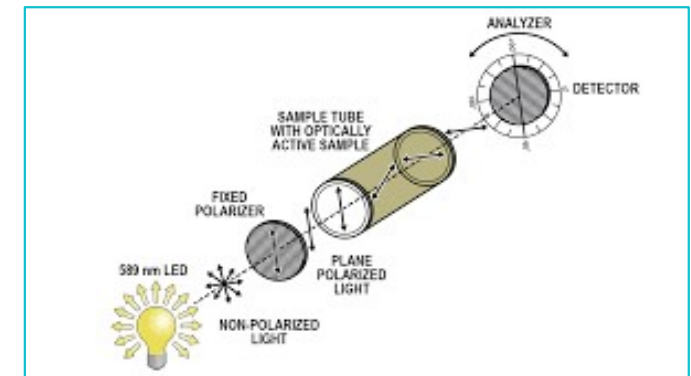
# Μέθοδος οπτικής στροφικής ικανότητας

## Αρχή μεθόδου:

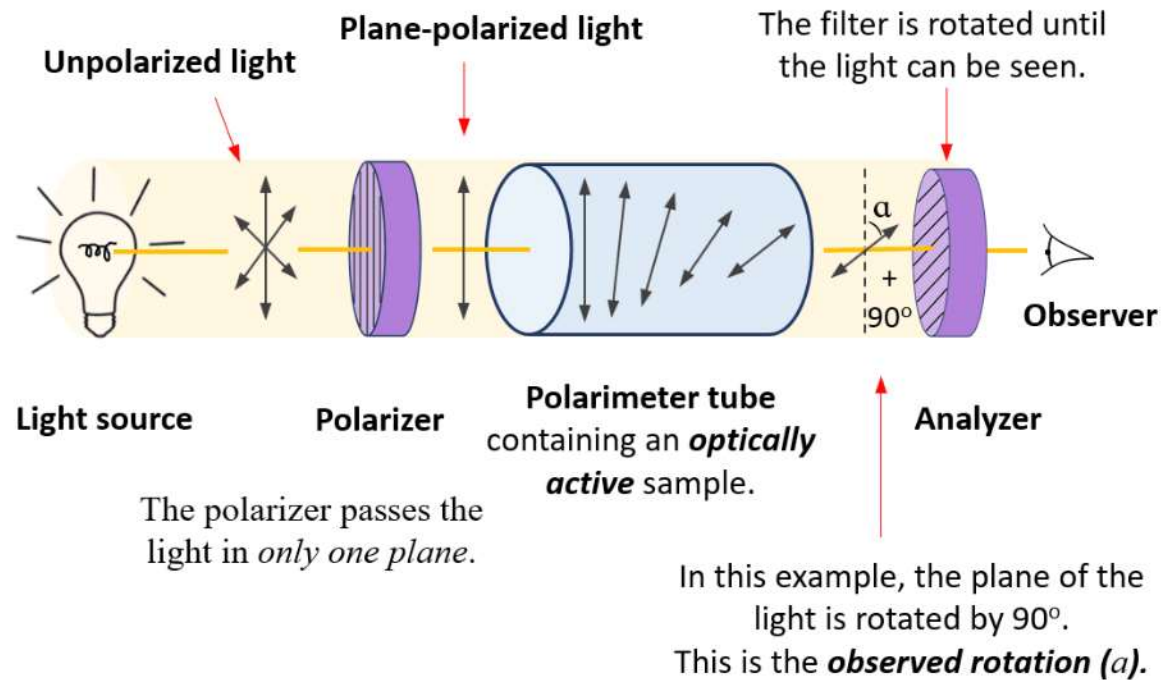
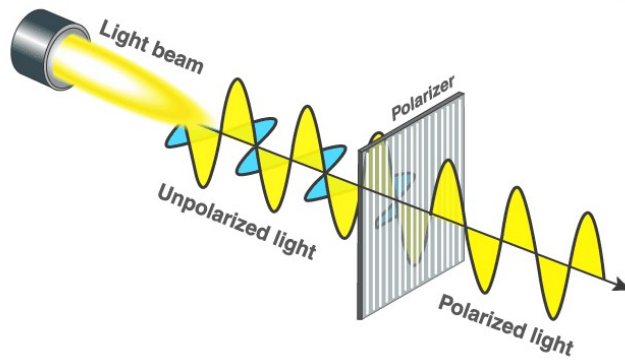
- Η αντίδραση πραγματοποιείται μόνο για οπτικά ενεργές ενώσεις και μπορεί να μετρηθεί του βαθμού της περιστροφής του πολωμένου φωτός
- Ο βαθμός της περιστροφής εξαρτάται από τη συγκέντρωση των οπτικά ενεργών ενώσεων
- Η χρήση καλώς κατασκευασμένων πολωσιμόμετρων είναι απαραίτητη για λήψη αποτελεσμάτων με καλή ακρίβεια για τις κινητικές μελέτες.
- Η σταθερά της ταχύτητας της αντίδρασης μπορεί να υπολογιστεί από την ακόλουθη εξίσωση:

$$k = \frac{2.303}{t} \log \frac{r_0 - r_\infty}{r_t - r_\infty}$$

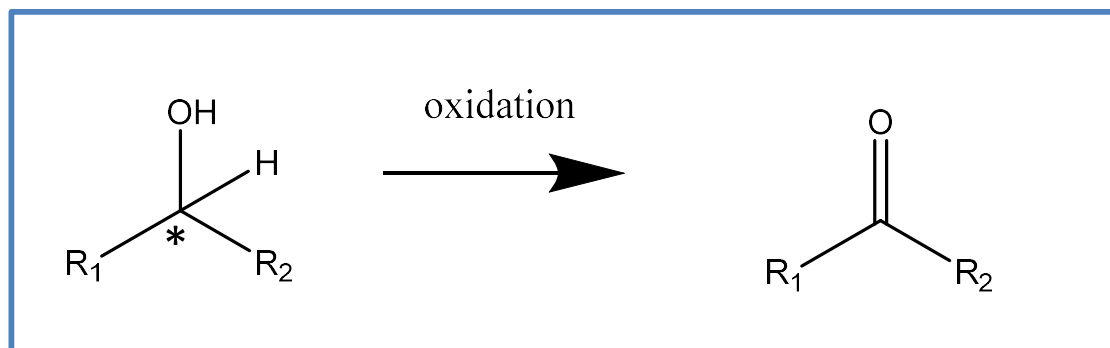
Όπου  $r$  είναι περιστροφή επειδή καταστρέφεται/ διαφοροποιείται το ασύμμετρο κέντρο του αντιδρώντος.



# Μέθοδος οπτικής στροφικής ικανότητας



# Μέθοδος οπτικής στροφικής ικανότητας



Ασύμμετρο  
κέντρο

Καταστροφή του  
ασύμμετρου  
κέντρου λόγω  
της οξείδωσης

- ✓ Για να μελετηθεί η κινητική της αντίδρασης, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένα πολωσίμετρο, γιατί η στροφή του πολωμένου φωτός εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αλκοόλης.
- ✓ Όσο μειώνεται η συγκέντρωση της αλκοόλης, τόσο θα μειώνεται η οπτική στροφική ικανότητα, γιατί οφείλεται αποκλειστικά στην αλκοόλη η μονή που έχει ασύμμετρο κέντρο

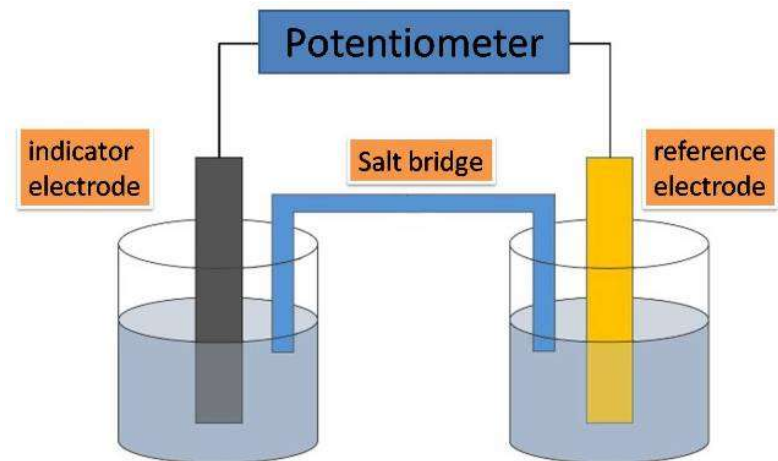
# Ποτενσιομετρική μέθοδος

## Αρχή μεθόδου:

- Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι το **δυναμικό** ενός εκλεκτικού ηλεκτροδίου σε ένα διάλυμα, διαφοροποιείται **με τη συγκέντρωση του ιόντος**, δρώντας ως αντιδρών ή ως προϊόν (άνοδος ή κάθοδος ανάλογα με την αντίδραση)
- Το δυναμικό του ηλεκτροχημικού κελιού δίνεται ως:

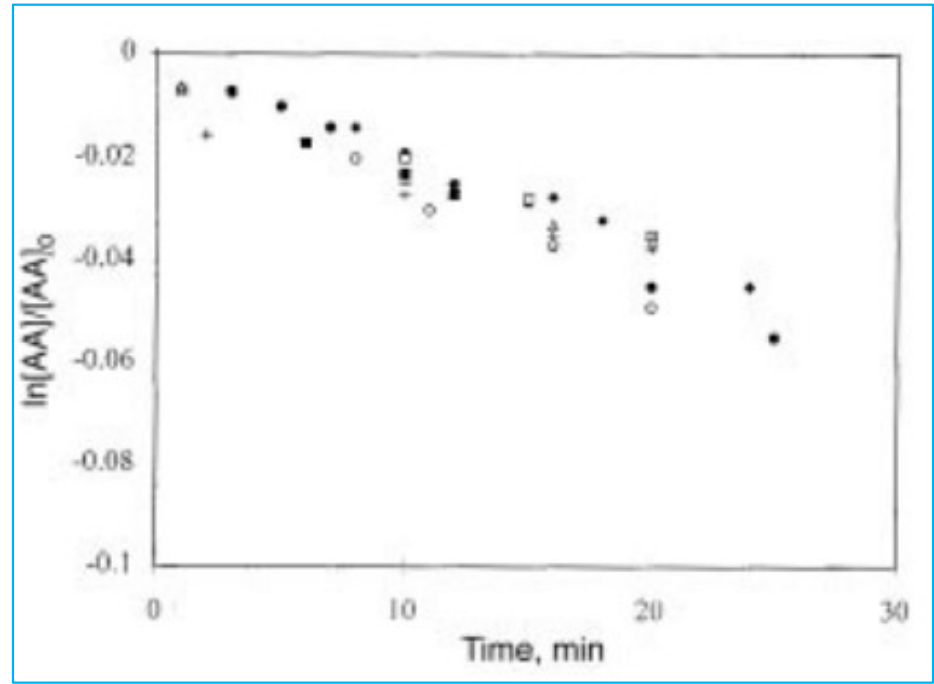
$$E = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_O^*}{C_R^*}$$

- Μπορεί το E(δυναμικό ) μπορεί να μετρηθεί με ένα ποτενσιόμετρο.
- Μπορούμε να βρούμε τις συγκεντρώσεις από την εξίσωση  $y=ax+b$ )
- Στις ποτενσιομετρικές μεθόδους χρησιμοποιούνται 2 είδη ηλεκτροδίων
- Το ηλεκτρόδιο αναφοράς και το εκλεκτικό ηλεκτρόδιο.



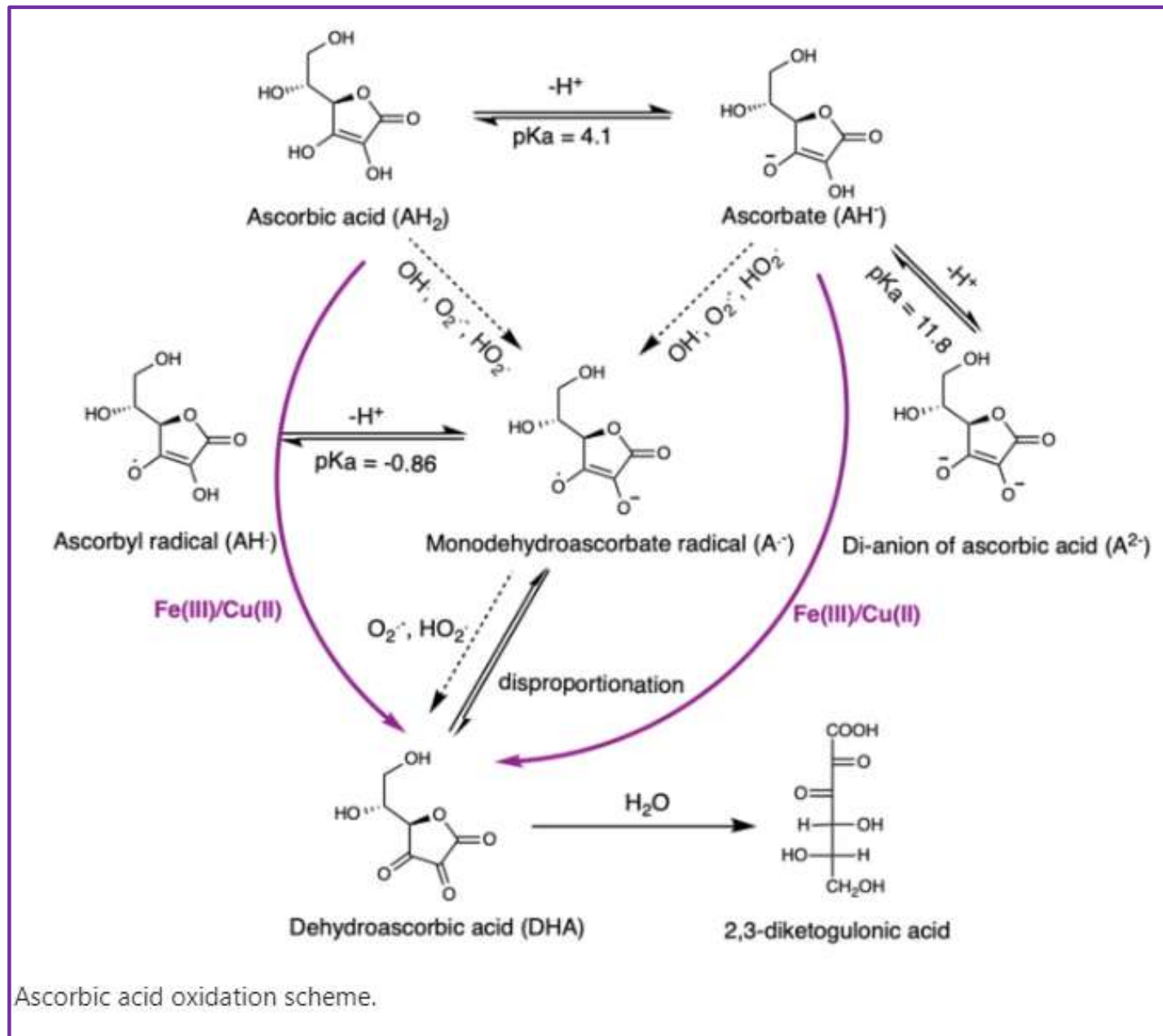
# Electro-oxidation of Ascorbic Acid in an Aqueous Citrate Buffer Solution

A.M. Sullivan & P.A. Kohl, PLATING & SURFACE FINISHING, 1998



Διάγραμμα ln (συγκέντρωσης) συναρτήσει του χρόνου

# Ascorbate oxidation by iron, copper and reactive oxygen species: review, model development, and derivation of key rate constants





# Ascorbate oxidation by iron, copper and reactive oxygen species: review, model development, and derivation of key rate constants

**Table 1 Ascorbic acid model.**

From: [Ascorbate oxidation by iron, copper and reactive oxygen species: review, model development, and derivation of key rate constants](#)

#	Reaction	$k_f$	$k_r$	$K_{eq}$
<b>Ascorbate chemistry</b>				
1a	$AH_2 \rightleftharpoons AH^- + H^+$			7.94E-5
2a	$AH^- \rightleftharpoons A^{2-} + H^+$			1.58E-12
3a	$AH \rightleftharpoons A'^- + H^+$			7.24
4b	$AH_2 + OH^- = A'^- + H_2O + H^+$	7.9E9		
5c	$AH_2 + HO_2 = A'^- + H_2O_2 + H^+$	1.6E4		
6c	$AH_2 + O_2^- = A'^- + H_2O_2$	0.2k <sub>6</sub> + k <sub>8</sub> = 1.22E7		
7a	$AH^- + OH^- = A'^- + H_2O$	1.1E10		
8c	$AH^- + HO_2 = A'^- + H_2O_2$			

# Μέθοδος ηλεκτρικής αγωγιμότητας

## Αρχή μεθόδου:

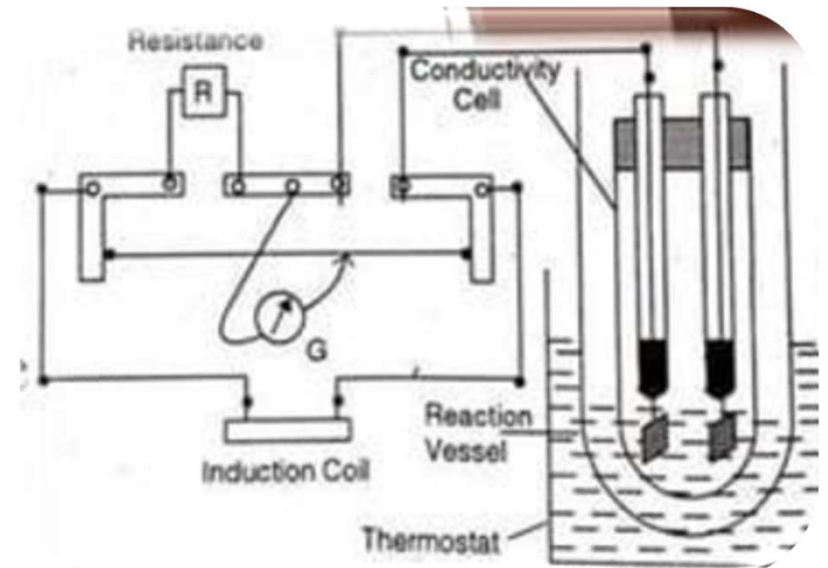
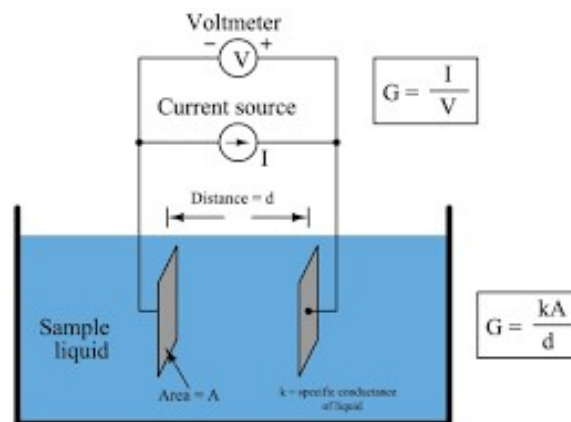
- Η ταχύτητα των ιοντικών αντιδράσεων σε ιοντισμένα διαλύματα καθορίζεται μετρώντας την αγωγιμότητα του αντιδρώντος μίγματος.
- Οι κινητικές αντιδράσεις μπορεί να μελετηθούν μετρώντας την αγωγιμότητα σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα στην επιθυμητή θερμοκρασία χρησιμοποιώντας τη γέφυρα αγωγιμότητας.
- Η κλίση του διαγράμματος

$$\frac{C_0 - Ct}{C_t - C_\infty}$$

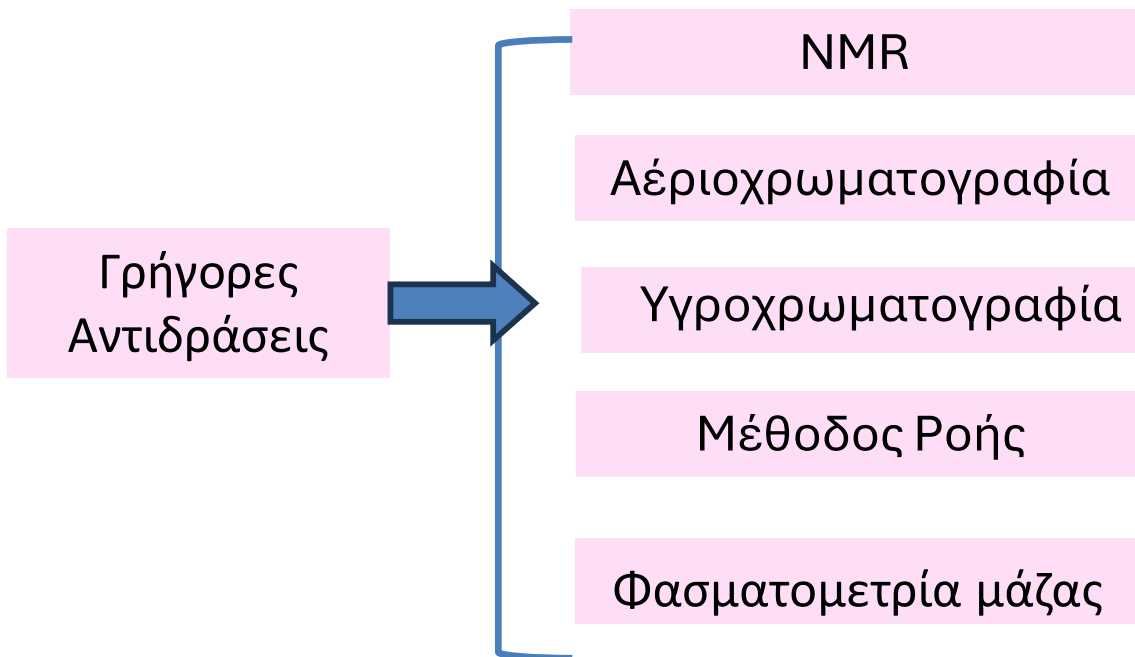
ως συνάρτηση του χρόνου μας δίνει τη σταθερά

## **Παράδειγμα:**

Υδρόλυση οξικών ανυδριτών



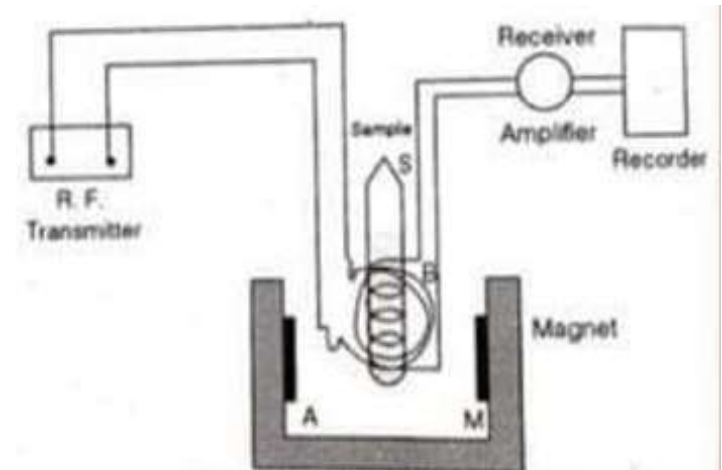
Πειραματικές μέθοδοι



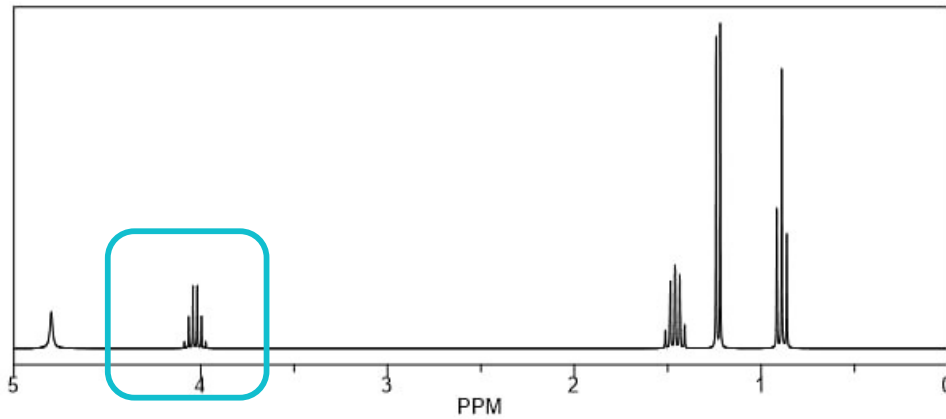
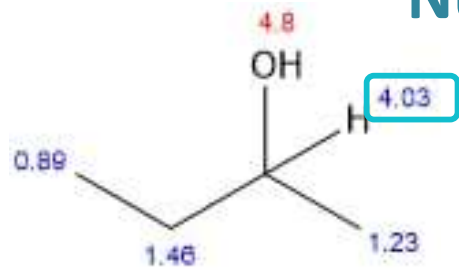
# Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

## Αρχή μεθόδου:

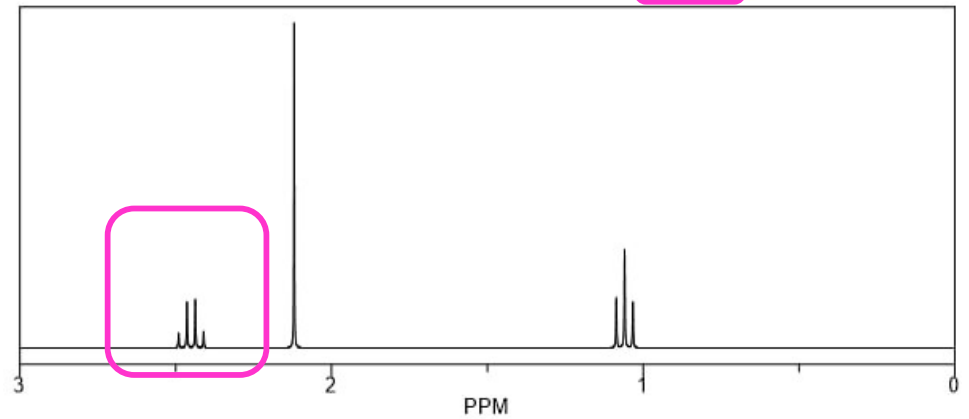
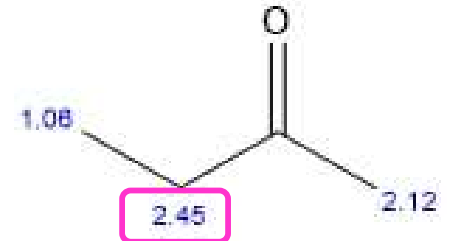
- Η συχνότητα απόκρισης είναι στη περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων.
- Μπορεί να υπολογιστεί η ταχύτητα της αντίδρασης προσδιορίζοντας το χημικό συντονισμό και το εμβαδόν της κορυφής από το φάσμα NMR.
- Παρακολουθούμε τη κινητική μιας αντίδρασης (είτε παρακολουθώντας την εξαφάνιση του αντιδρώντος ή την αύξηση του προϊόντος).
- Με μια τέτοια μεθοδολογία μπορούμε να υπολογίσουμε και τις σταθερές  $k$ .



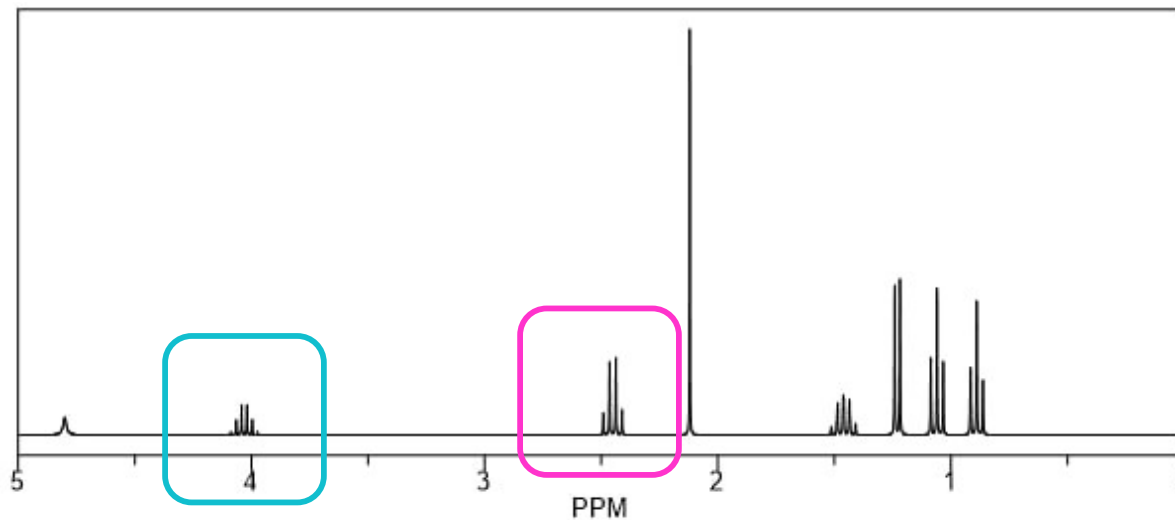
# Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H-NMR}$ )



Φάσμα NMR της 2-βουτανόλης

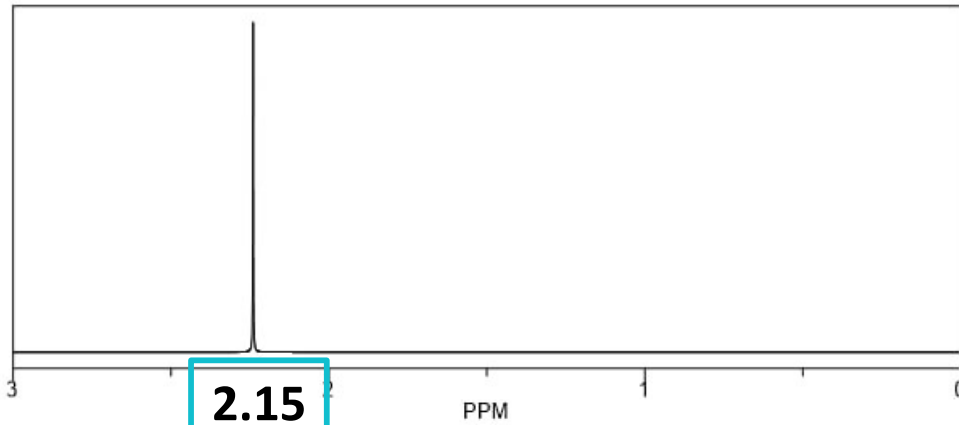
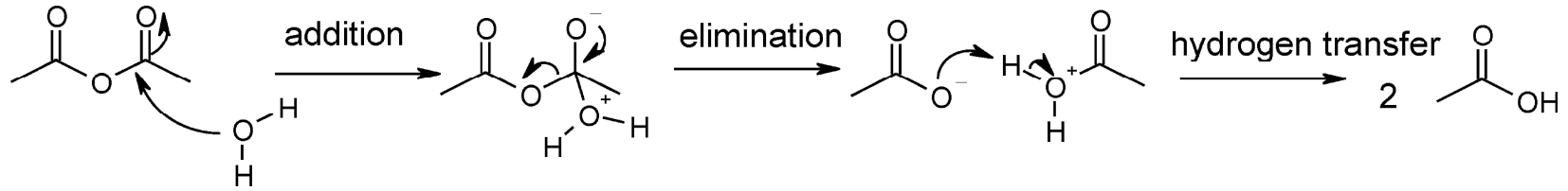


Φάσμα NMR της 2-βουτανόνης

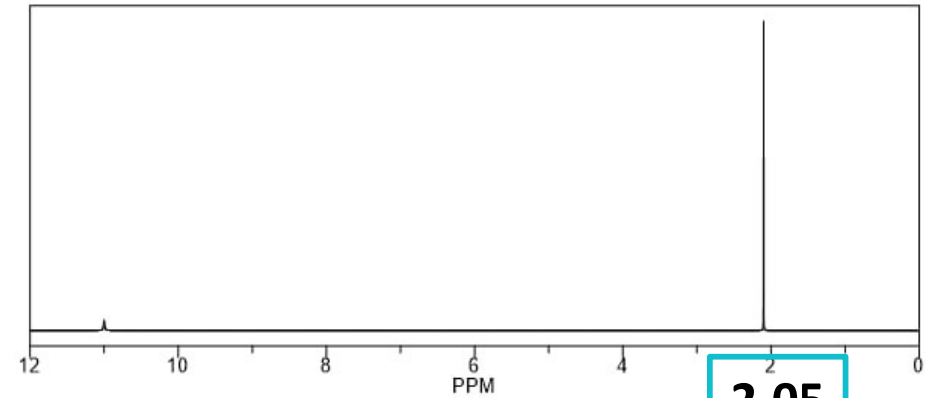


Φάσμα NMR μίγματος 2-βουτανόνης+ 2-βουτανόλης

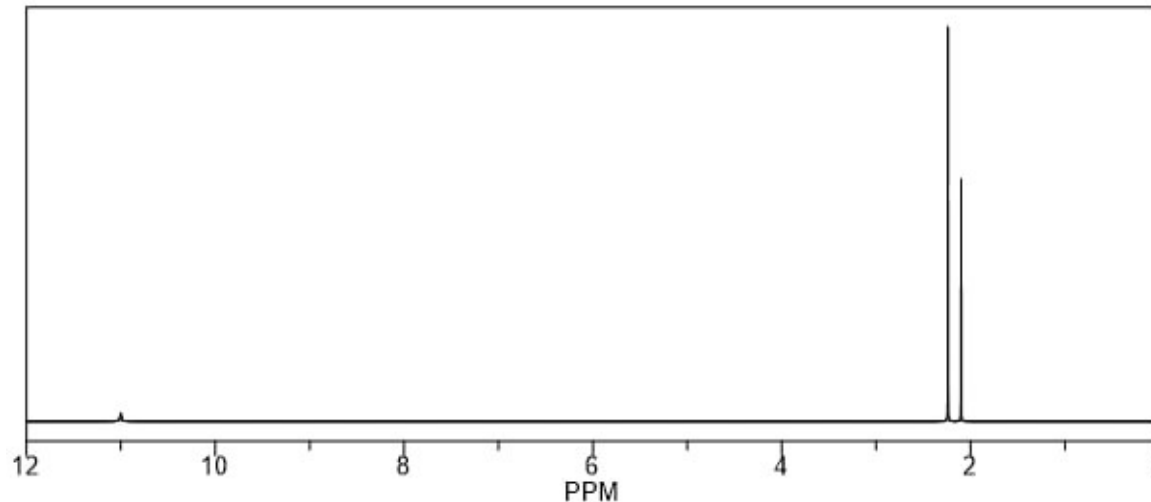
# Nuclear Magnetic Resonance (NMR)



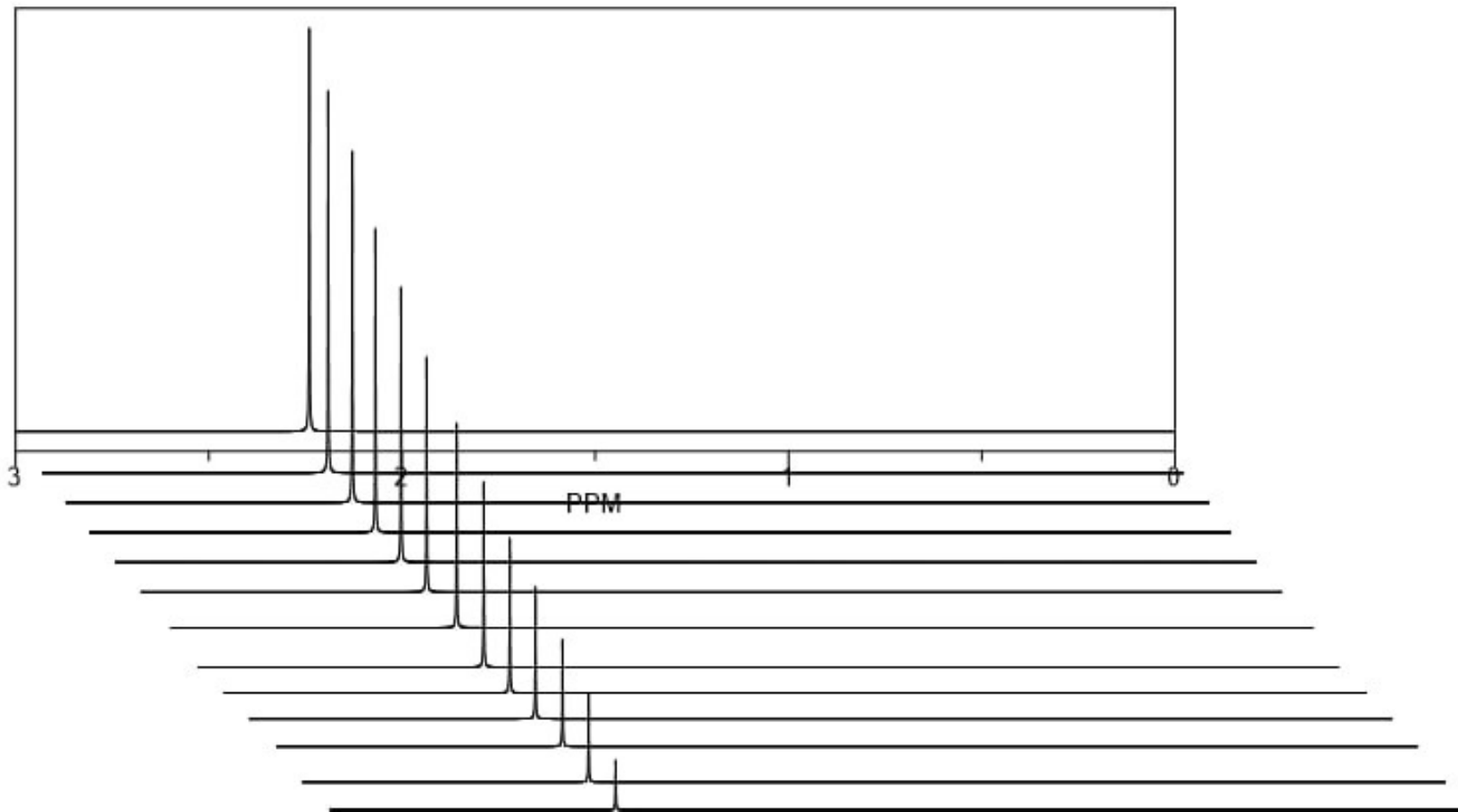
Φάσμα NMR οξικού ανυδρίτη



Φάσμα NMR οξικού οξέος

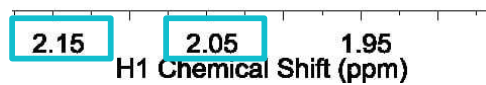
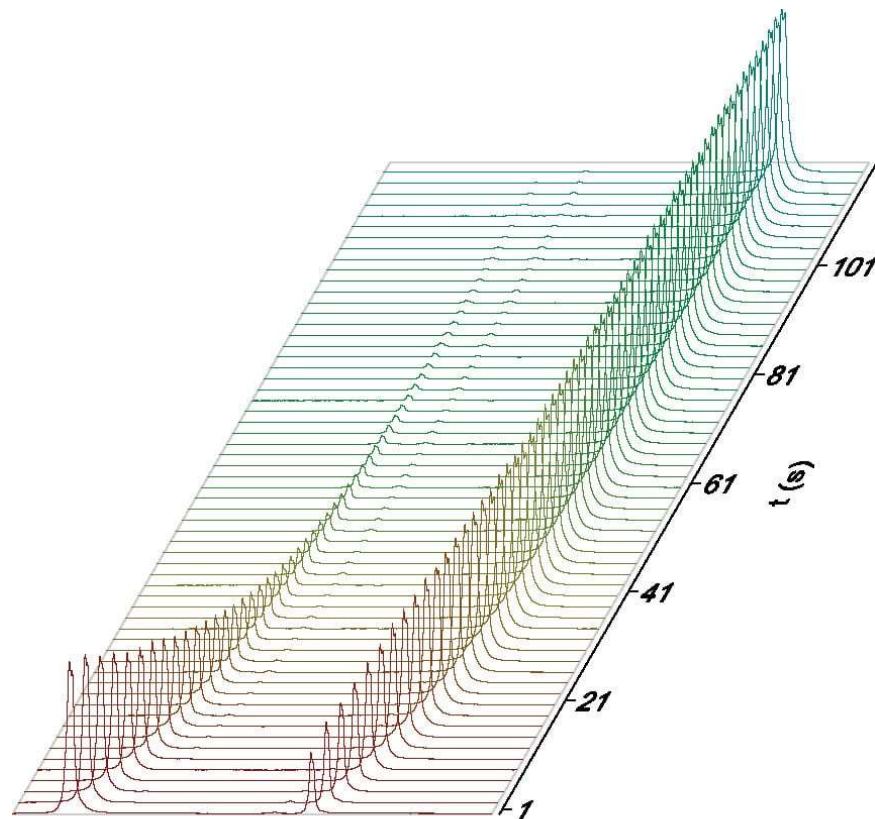
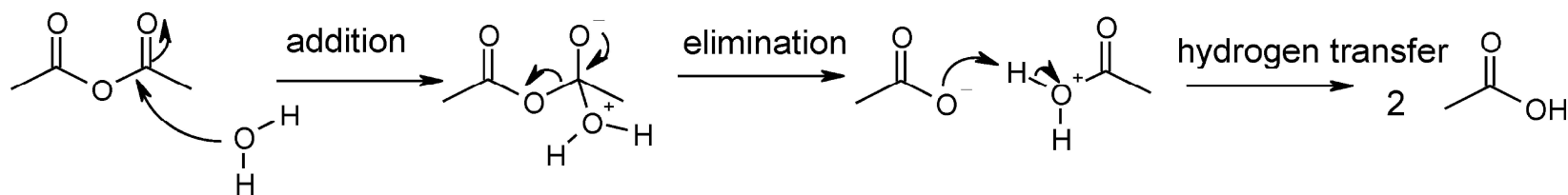


Φάσμα NMR μίγματος οξικού ανυδρίτη και του οξικού οξέος



Φάσμα NMR οξικού ανυδρίτη σε διαφορετικές χρονικές στιγμές

# Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

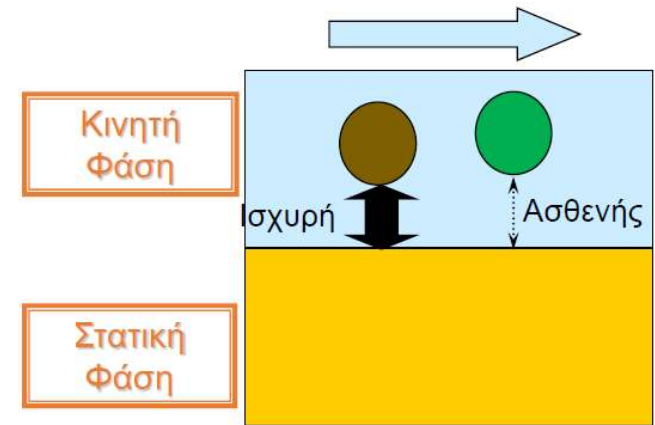




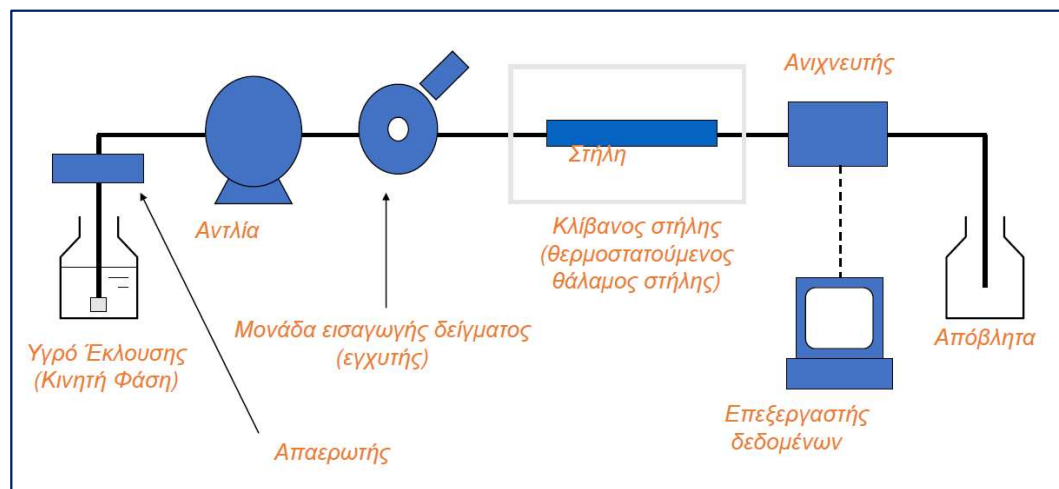
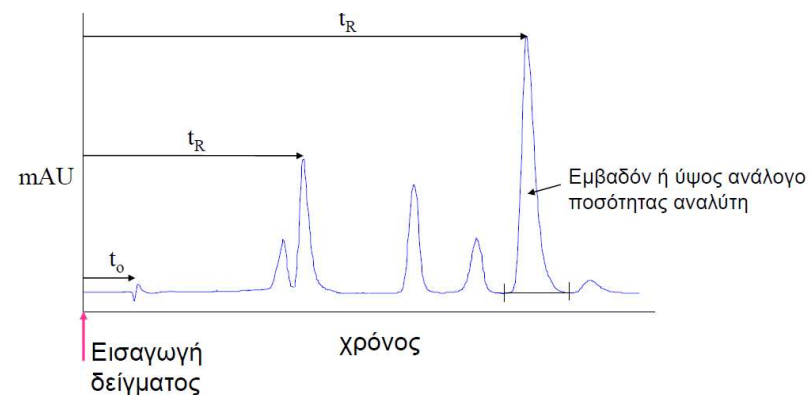
# Υγροχρωματογραφία

## Αρχή μεθόδου:

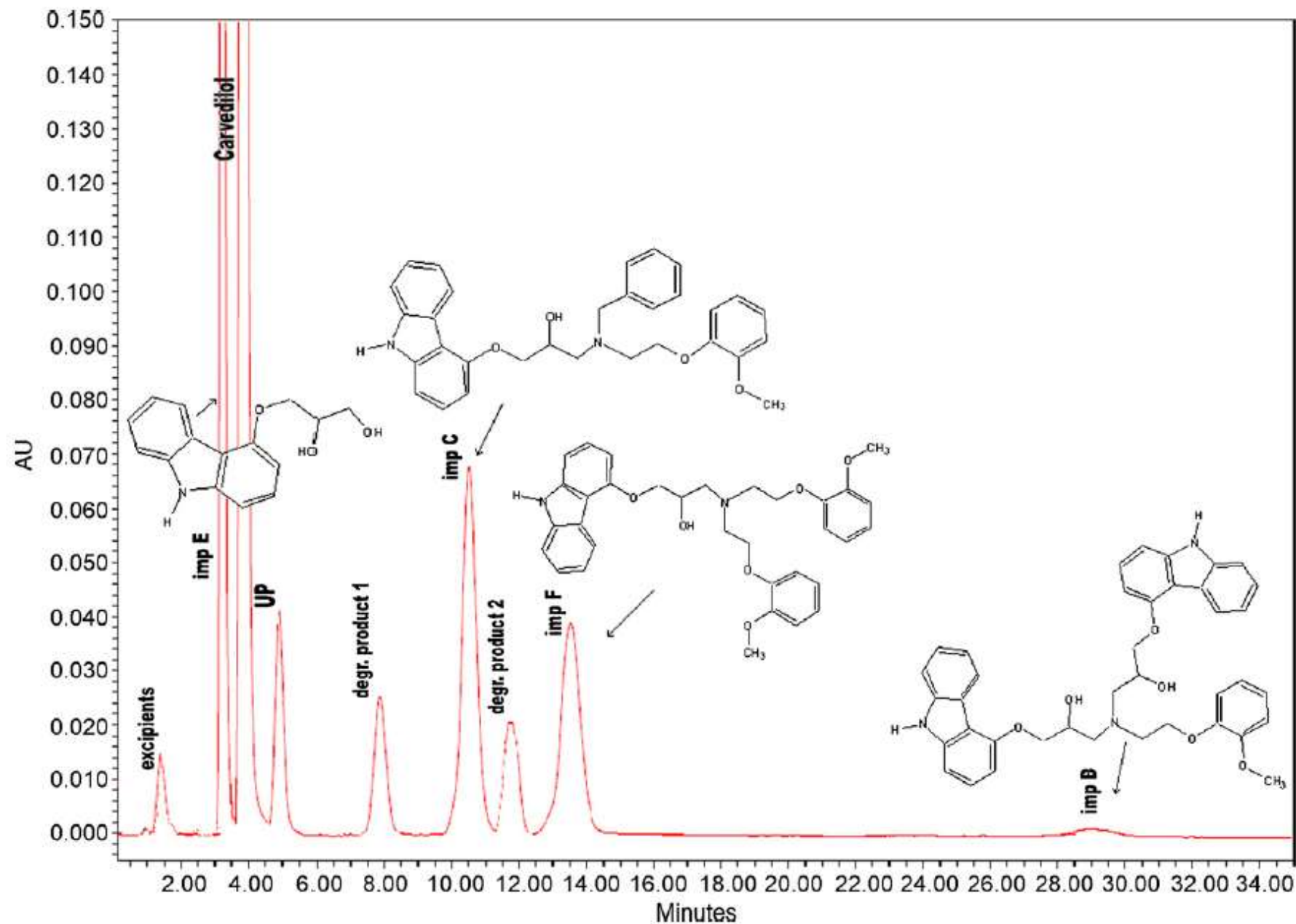
- Μια κινητή και μια στατική φάση έρχονται σε επαφή μέσω μια μεσεπιφάνειας
- Η συγγένεια των συστατικών με την κινητή φάση και στατική φάση διαφέρει, έτσι προκύπτει διαχωρισμός λόγω της διαφοράς στην ταχύτητα κίνησης.
- Ένα μίγμα δύο ουσιών διαχωρίζεται βάσει της συγγένειας με τη χρωματογραφική στήλη.
- Τα συστατικά ανάλογα με την πολικότητα τους εκκλύονται σε διαφορετικούς χρόνους και λαμβάνεται το εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής που μπορεί να συσχετιστεί με τη συγκέντρωση.
- Από το ρυθμό μεταβολής της συγκέντρωσης μπορεί να βρεθεί η κινητική της αντίδρασης.



# Υγροχρωματογραφία



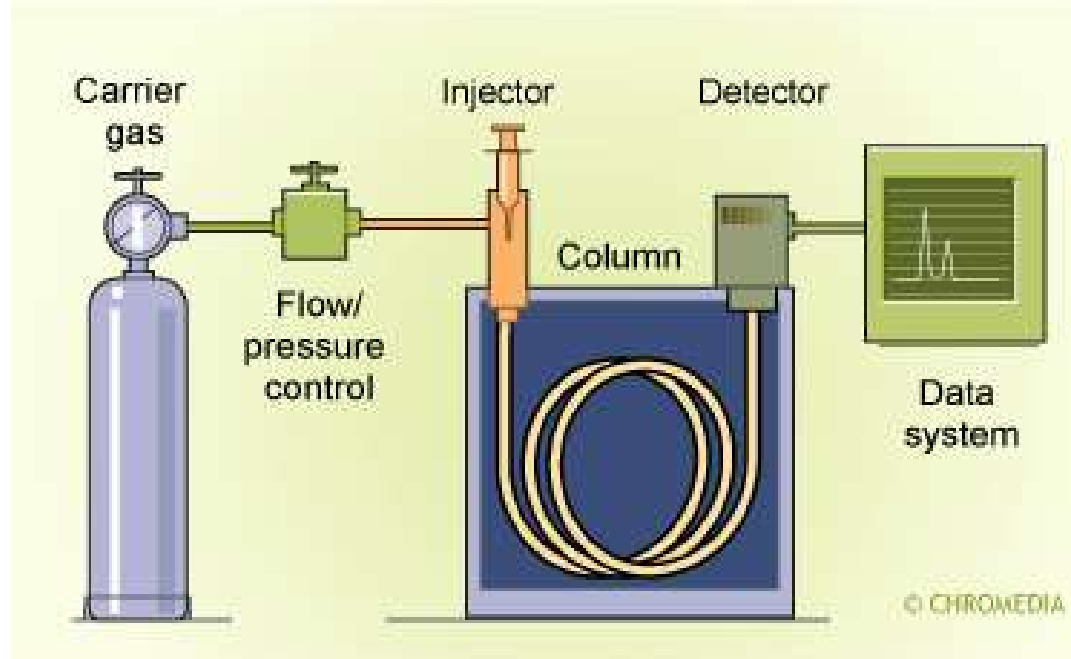
# Διαχωρισμός με χρωματογραφική μέθοδο HPLC ειδική για τη χημική κινητική της καρβεδιλόλης



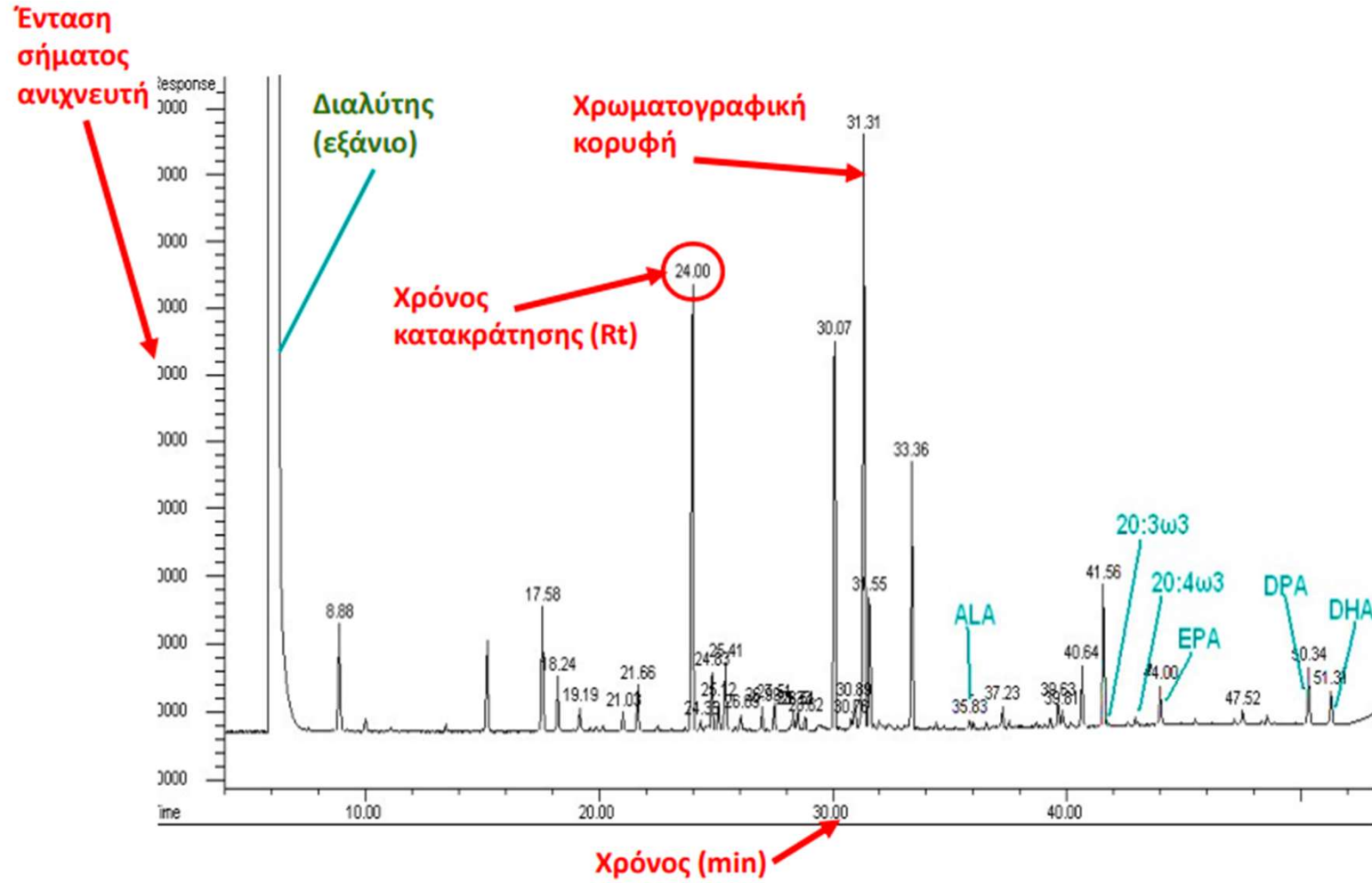
# Αεριοχρωματογραφία

## Αρχή μεθόδου:

- Ο διαχωρισμός γίνεται μέσα σε μια λεπτή (τριχοειδή) χρωματογραφική στήλη, όπου τα συστατικά του μείγματος συγκρατούνται σε διαφορετικούς βαθμούς από ένα προσροφητικό υλικό (στάσιμη φάση), ενώ ταυτόχρονα αναγκάζονται να κινούνται παρασυρόμενα από μια αέρια κινητή φάση (φέρων αέριο: He, N<sub>2</sub> ή H<sub>2</sub> )
- Αυτό έχει αποτέλεσμα τα συστατικά του μίγματος να εξέρχονται ένα-ένα σε διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης ( $t_R$ ) και -αφού ανιχνευθούν από κατάλληλους ανιχνευτές- να ταυτοποιούνται ή/και να προσδιορίζονται ποσοτικά.

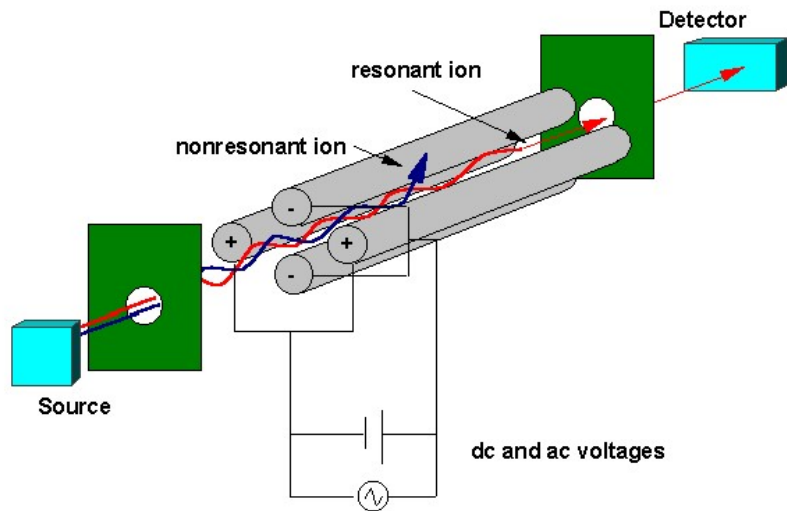


# Αεριοχρωματογραφία

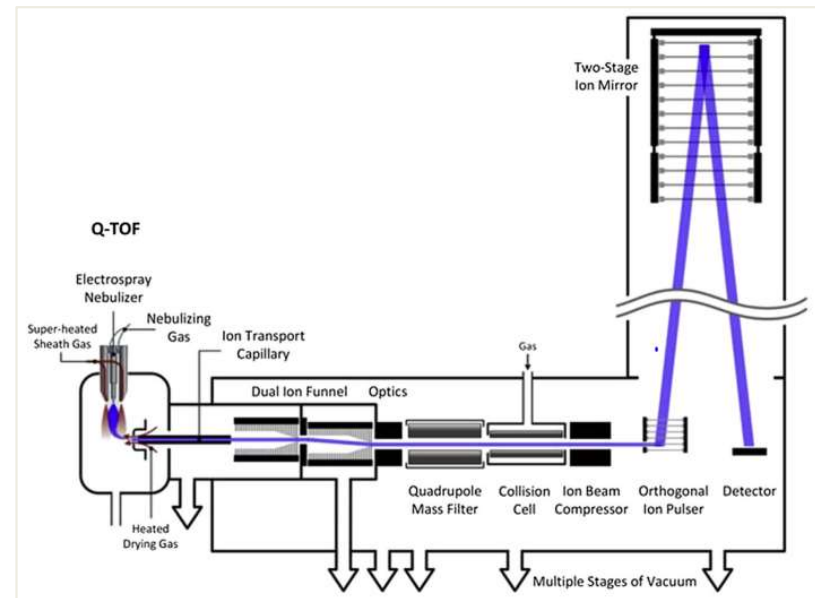


# Φασματομετρία μάζας

- Πρόκειται για με τεχνική που είναι συζευγμένη είτε με υγροχρωματογραφία είτε με αέριο χρωματογραφία.
- Το δείγμα (σε ιονισμένη μορφή) φτάνει στον ανιχνευτή του οργάνου
- Το ιόντα και ανιχνεύονται βάσει του λόγου μάζας/φορτίου (mass/charge ratio)
- Οι συγκεντρώσεις προσδιορίζονται από τα συγκεκριμένα ιόντα στον ανιχνευτή αντιστοιχιζόμενα σε χρωματογραφικές κορυφές.



Τριπλό τεράπολο



QTOF

# Δείγματα που μελετώνται σε μια κινητική αντίδραση

## Τα δείγματα που μελετώνται σε μια κινητική αντίδραση

1. αρχικό δείγμα
2. το αρχικό δείγμα που έχει αποικοδομηθεί κατά δύο ημιζωές και
3. δείγματα από ενδιάμεσες καταστάσεις (δείγματα στα διαφορετικά χρονικά σημεία).

# Πορεία ελέγχου για κινητικές μεθόδους

Μια μέθοδος χημικής κινητικής θα πρέπει να πληροί μια σειρά από προϋποθέσεις με βασικότερη το διαχωρισμό **όλων** των προϊόντων από τα αντιδρώντα καθώς και από πιθανές παρεμποδίσεις.

**Βήμα 1:** Εκτίμηση της πιθανής πορείας αντίδρασης βάσει δομής, γνώσεων για ανάλογα μόρια κτλ.

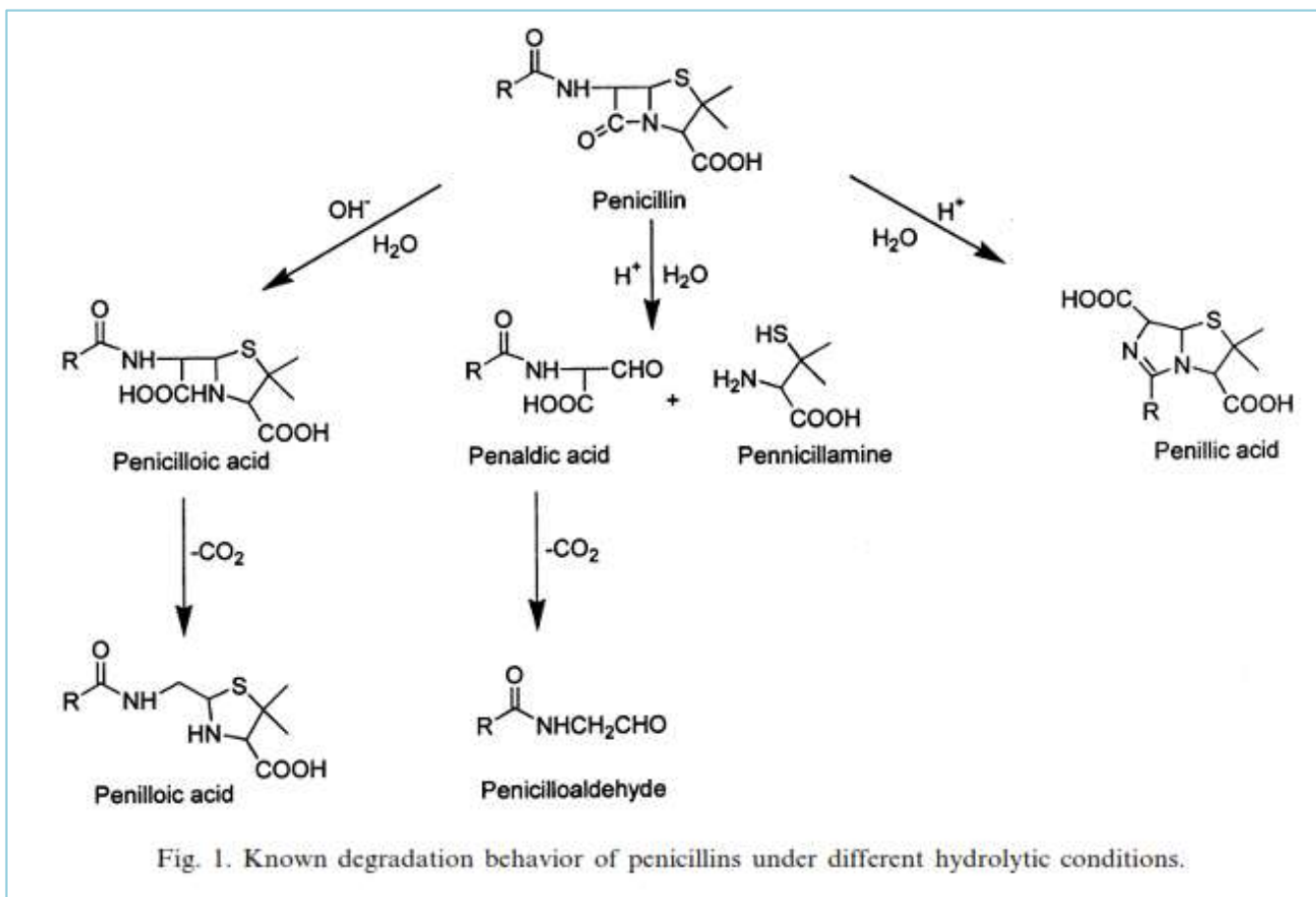


Fig. 1. Known degradation behavior of penicillins under different hydrolytic conditions.



# Πορεία ελέγχου για κινητικές μεθόδους

**Βήμα 2:** Προσδιορισμός των φυσικοχημικών ιδιοτήτων όπως  $pK_a$ ,  $\log P$ ,  $\lambda_{max}$  κτλ  
Το  $pK_a$  είναι κρίσιμη παράμετρος, καθώς μεταβολές του  $pH \pm 1,5$  συνδέονται με αλλαγή στους χρόνους κατακράτησης των ενώσεων (φορτισμένο-αφόρτιστο μόριο)

**Βήμα 3:** Διενέργεια stress tests

-Ένας ελάχιστος αριθμός 3 δειγμάτων πρέπει να χρησιμοποιείται για κάθε δοκιμασία προκειμένου να εκτιμηθεί η επαναληψιμότητα της μέτρησης  
Είναι απαραίτητη η μέτρηση αντίστοιχων λευκών δειγμάτων για να εκτιμηθεί η ειδικότητα και η εκλεκτικότητα της μεθόδου.

**Βήμα 4:** Βελτιστοποίηση μεθόδου

**Βήμα 5:** Χαρακτηρισμός παραπροϊόντων με διάφορες τεχνικές όπως με MS, NMR, IR

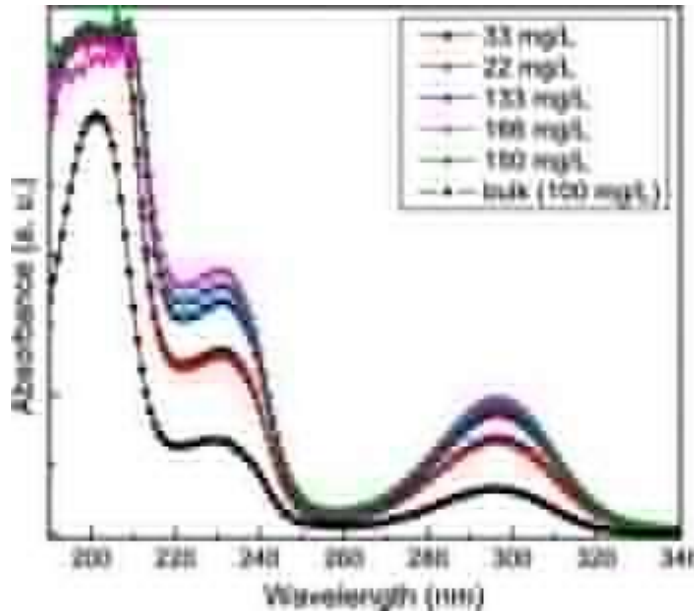
**Βήμα 6:** Ακολουθεί επικύρωση μεθόδου (Χαρακτηριστικά ποιότητας)

# Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι

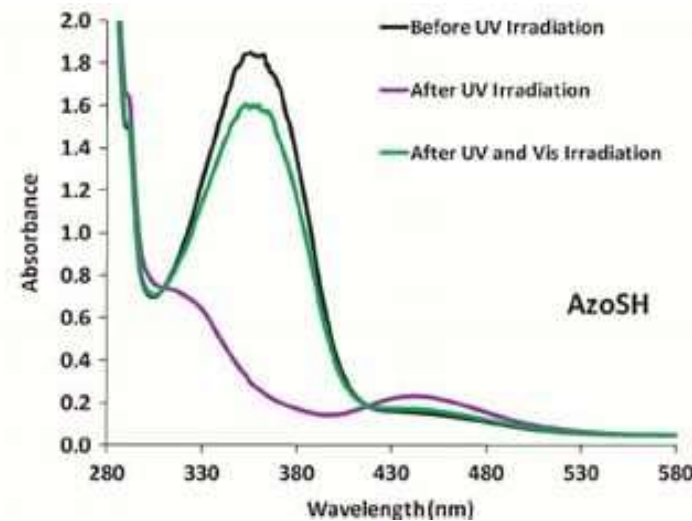
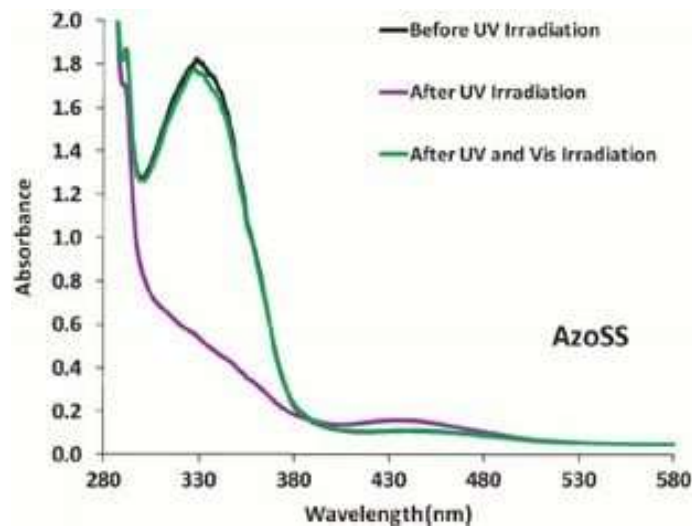
- **Κατάλληλη παρασκευή διαλυμάτων:**
  - Τα διαλύματα θα πρέπει να παρασκευάζονται σε κατάλληλες συγκεντρώσεις, ώστε η απορρόφηση να είναι μεταξύ 0,2-0,9 (φωτομετρικό σφάλμα).
  - Δομή της ένωσης (συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας).
- **Επιλογή διαλύτη:**
  - Θα πρέπει να διαλυτοποιεί τις ενώσεις που θα μελετήσουμε.
  - Ο διαλύτης δε θα πρέπει να είναι στο μήκος κύματος αποκοπής (cut-off).
  - Ο διαλύτης θα πρέπει να ευνοεί τη χημική αντίδραση.
- **Επιλογή μήκους κύματος:**
  - Τα μήκη κύματος αντιδρώντων και προϊόντων να διαχωρίζονται ώστε να πέτυχουμε εκλεκτικότητα, αλλιώς θα πρέπει να επιλέξουμε μήκη κύματος που τα προϊόντα να μην επικαλύπτουν το φάσμα των αντιδρώντων.
  - Η μέτρηση γίνεται ιδανικά στο  $\lambda_{\max}$  για κάθε αναλύτη. Εάν αυτό δε μπορεί να καταστεί εφικτό επιλέγονται παραπάνω από ένα μήκη κύματος.

**Μπορεί να απαιτηθεί χρήση περισσότερων του ενός μηκών κύματος ( $\lambda$ ), αλλά δεν πρέπει να υπάρχει αλληλεπικάλυψη των φασμάτων!**

# Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι



Solvent	$\lambda$ Cutoff [nm]
Acetic acid	260
Acetone	330
Acetonitrile	190
Chloroform	245
Cyclohexane	210
Dimethyl sulfoxide	265
Ethanol	210
Ethyl acetate	255
Heptane	197
Hexane	210
Methanol	210
2-Propanol	210
Tetrahydrofuran	220
Toluene	286
Water	191



Cut-off διαλύτη

# Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι

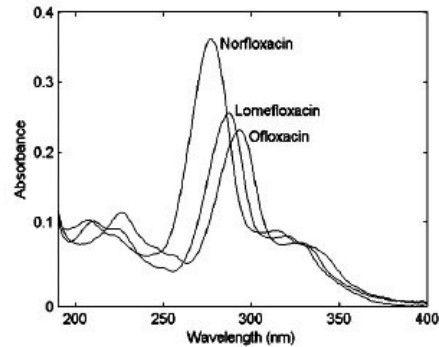
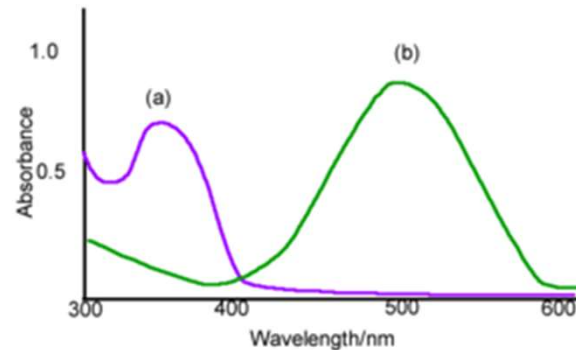


Fig. 2 Absorption spectra of norfloxacin ( $3.0 \text{ mg L}^{-1}$ ), ofloxacin ( $3.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) and lomefloxacin ( $3.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) in a Britton-Robinson buffer solution ( $\text{pH}=1.81$ ).



- **Επιλογή κατάλληλων κυψελίδων:**

- Θέλουμε κυψελίδες που να σφραγίζονται, ώστε να εξασφαλιστεί η μη εξάτμιση του διαλύτη που θα οδηγήσει σε αύξηση της συγκέντρωσης του δείγματος.
- Σε περιπτώσεις που απαιτείται να χρησιμοποιηθούν υψηλές θερμοκρασίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ειδικές διατάξεις ή/και η σφράγιση του περιέκτη υαλουργικά.
- Για κινητικές μελέτες επιλέγονται κυψελίδες με θέρμανση ή/και κυψελίδες με ανάδευση.

# Υγροχρωματογραφία

- **Κατάλληλη παρασκευή διαλυμάτων:**

- Τα διαλύματα να παρασκευάζονται σε κατάλληλες συγκεντρώσεις, ώστε η ένταση της κορυφής να είναι εντός της γραμμικής περιοχής.
- Δομή της ένωσης (ώστε να δούμε αν χρωματογραφείται).

- **Επιλογή χρωματογραφικών συνθηκών**

## Κινητή φάση

- Θα πρέπει να διαλυτοποιεί τις ενώσεις που θα μελετήσουμε.
- Ο διαλύτης δε θα πρέπει να είναι στο μήκος κύματος αποκοπής (cut-off).
- Επιλογή διαλυτών συμβατών με το χρωματογραφικό σύστημα.
- Επιλογή οργανικού διαλύτη (ACN, MeOH) και επιμέρους σύστασης.
- Επιλογή βαθμιδωτής (gradient) έκλουσης που μπορεί να επιτευχθεί επαρκής χρωματογραφικός διαχωρισμός.

## Στατική φάση

- Επιλογή κατάλληλης χρωματογραφικής στήλης
  - ανάλογα με την πολικότητα των ενώσεων → reversed phase vs HILIC,
  - εναντιομερείς ενώσεις, χειρόμορφες στήλες\_chiral)
- Επιλογή θερμοκρασίας στήλης
- Επιλογή pH κινητής φάσης

# Υγροχρωματογραφία

**Είναι πιο κατάλληλη για κινητικές μελέτες**

- ✓ Είναι συμβατή με οργανικούς διαλύτες και υδατικά διαλύματα
- ✓ Υψηλή εκλεκτικότητα
- ✓ Υψηλή ευαισθησία
- ✓ Ικανότητα ανίχνευσης μορίων διαφορετικής πολικότητας (πολύ πολικά-μετριώς πολικά και άπολα)
- ✓ Μπορεί να πραγματοποιηθεί μελέτη σε διαφορετικές θερμοκρασίες (επιλογή θερμοκρασίας ή θερμοκρασιακού προγράμματος στήλης)

# Φασματομετρία μάζας

Ισχύουν οι προϋποθέσεις που αναφέρθηκαν στη χρωματογραφία εφόσον χρησιμοποιείται αυτή η μέθοδος διαχωρισμού.

## Επιπλέον:

- Οι ουσίες:
  - Να ιοντίζονται
  - Να έχουν μοριακά βάρη από 50-1000 Da (LC-MS/LCqtofMS)
  - Να δίνεται προσοχή στη **θερμοανθεκτικότητα** των ενώσεων τους, λόγω των ακραίων συνθηκών (ESI, υψηλή θερμοκρασία, συμπύκνωση των ενώσεων)
- Οι διαλύτες:
  - να είναι συμβατοί με το MS σύστημα ώστε να μην υπάρχει καταστολή σήματος (π.χ φωσφορικά, τριεθυλαμίνη, TFA)
  - Να μην προκαλούν διάσπαση της ουσίας που θέλουμε να προσδιορίσουμε (ESI, υψηλή θερμοκρασία, συμπύκνωση των ενώσεων)

## Διατήρηση της μάζας

- **Διατήρηση της μάζας:** Αφορά το **άθροισμα** των αντιδρώντων και των προϊόντων ώστε να διαπιστωθεί πόσο κοντά στο **100%** της αρχικής τιμής φτάνει το συνολικό άθροισμα, λαμβανομένων υπόψιν των αναλυτικών σφαλμάτων.
- Είναι βασικό να γίνεται στα πρώτα στάδια για να διαπιστωθεί ότι η κινητική μελέτη γίνεται σωστά και ότι δε χάνουμε κάποιο ενδιάμεσο προϊόν της αντίδρασης.



## Σε ποιες περιπτώσεις μπορεί να είναι δύσκολο να αποδειχθεί η διατήρηση της μάζας;

- Πολύπλοκοι μηχανισμοί διάσπασης οδηγούν σε μη αναμενόμενα προϊόντα.
- Ανεπαρκής ανιχνευσιμότητα στο UV λόγω απώλειας χρωμοφόρου ή μη ομοιόμορφη «συμπεριφορά».
- Απώλεια κάποιου ενδιάμεσου λόγω εξάτμισης (πτητικό προϊόν)
- Προσρόφηση σε περιέκτες.
- Λόγω έλλειψης standards άγνωστη συμπεριφορά π.χ. στην έκλυση (π.χ. συνέκλυση με δραστική) ή στην απορρόφηση.
- Συστατικά σφάλματα (όχι τυχαία) στον προσδιορισμό.

Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι απαραίτητη η απόδειξη εκλεκτικότητας της κινητικής μεθόδου και διενέργεια συμπληρωματικών μη συσχετιζόμενων τεχνικών.