

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ
ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ
ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ

ΕΝΟΡΓΑΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΙΟΤΙΚΗΣ ΚΑΙ
ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΡΟΓΩΝ
(ΔΡΟΓΟΦΥΣΙΚΗ)

ΠΡΟΚΟΠΗΣ ΜΑΓΙΑΤΗΣ
Επίκουρος Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2008

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι εργαστηριακές ασκήσεις στο μάθημα της Φαρμακογνωσίας χωρίζονται σε τρεις ομάδες. Η πρώτη ομάδα ασκήσεων περιλαμβάνει την εξέταση των δρογών με ενόργανες-φυσικές μεθόδους (δρογοφυσική). Η δεύτερη την εξέταση των δρογών με χημικές μεθόδους (δρογοχημεία) και η τρίτη τη μικροσκοπική εξέταση των δρογών.

Οι ενόργανες-φυσικές μέθοδοι αναλύσεως έχουν σήμερα ουσιαστικά την μεγαλύτερη σημασία στον ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο των δρογών, περιλαμβανομένων και των δραστικών συστατικών φυσικής προέλευσης.

Οι κυριώτερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό είναι:

1. Προσδιορισμός σημείου τήξεως (σ.τ)
2. Προσδιορισμός σημείου ζέσεως (σ.ζ).
3. Προσδιορισμός δείκτη διάθλασης (n_D).
4. Προσδιορισμός στροφικής ικανότητας ($[\alpha]_D$)
5. Φασματοσκοπία
 - 5.1. Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (**UV-Vis**)
 - 5.2. Φασματοφωτομετρία υπερύθρου (**IR**)
 - 5.3. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (**NMR**)
 - 5.4. Φασματομετρία μάζας (**MS**)
6. Χρωματογραφία
 - 6.1. Χρωματογραφία επί λεπτής στοιβάδας (**TLC**)
 - 6.2. Χρωματογραφία επί χάρτου
 - 6.3. Χρωματογραφία στήλης
 - 6.4. Υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (**MPLC**)
 - 6.5. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (**HPLC**)
 - 6.6. Αεριοϋγροχρωματογραφία (**GC**)
7. Συζευγμένες χρωματογραφικές-φασματοσκοπικές μέθοδοι
 - 7.1. **GC-MS**
 - 7.2. **HPLC-UV, HPLC-MS, HPLC-NMR**

1. Προσδιορισμός σημείου τήξεως (σ.τ) (melting point m.p.)

ΟΡΙΣΜΟΣ: Σημείο τήξεως είναι η θερμοκρασία στην οποία μια ουσία μεταπίπτει από τη στερεή στην υγρή κατάσταση. Το σημείο τήξεως αποτελεί μια φυσική σταθερά η οποία είναι χαρακτηριστική για κάθε ουσία (υπό σταθερές συνθήκες πίεσης).

ΣΗΜΑΣΙΑ-ΧΡΗΣΗ: Η μέθοδος αυτή έχει ιδιαίτερη σημασία για τον έλεγχο της καθαρότητας μιας στερεάς ουσίας καθώς η παρουσία προσμίξεων προκαλεί μείωση στο σημείο τήξεως, η οποία γίνεται πολύ εύκολα αντιληπτή. Πρόκειται για μια φθηνή και γρήγορη μέθοδο.

Εναλλακτικά χρησιμοποιείται και η τεχνική της λήψης «μικτού σημείου τήξεως», δηλαδή του σημείου τήξεως ποσότητας της ουσίας αναμεμιγμένης με πρότυπη καθαρή ουσία. Εφόσον η υπο εξέταση ουσία είναι καθαρή δεν θα παρατηρηθεί μείωση στο σημείο τήξεως.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι συσκευών προσδιορισμού του σημείου τήξεως με μεγαλύτερη ή μικρότερη ακρίβεια.

1.1. Συσκευή προσδιορισμού του σ.τ με θερμαινόμενη πλάκα κατά Kofler.

Αποτελείται από μεταλλική θερμαινόμενη πλάκα η οποία είναι προσαρμοσμένη σε μικροσκόπιο και η οποία στο κέντρο έχει άνοιγμα από το οποίο διέρχεται το φως του φωτιστικού στοιχείου του μικροσκοπίου.

Η ουσία τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα, καλύπτεται με καλυπτρίδα και στη συνέχεια με δυο γυάλινες πλάκες **Pyrex** για να μη διαχέεται η θερμότητα από την επιφάνεια της πλάκας. Η θερμοκρασία της πλάκας ρυθμίζεται με θερμοστάτη και μετράται με προσαρμοσμένο θερμομέτρο (ή με ψηφιακή ένδειξη).

Η λήψη του σημείου τήξεως γίνεται δυο φορές. Την πρώτη φορά γίνεται με γρήγορη ανύψωση της θερμοκρασίας ώστε να προσδιορισθεί περίπου το σημείο τήξεως. Τη δεύτερη φορά ανεβάζουμε γρήγορα τη θερμοκρασία μέχρι λίγους °C κάτω από το κατά προσέγγιση σημείο τήξεως (από την πρώτη μέτρηση) και στη συνέχεια η άνοδος της θερμοκρασίας ρυθμίζεται να γίνεται πολύ αργά (**1 °C/min**). Σαν σημείο τήξεως στην πράξη θεωρούμε εκείνη τη θερμοκρασία στην οποία οι κρύσταλλοι

παρουσιάζουν αποστρογγύλευση των γωνιών, σχηματισμό σταγονιδίων και τελικά υγροποίηση.

Υπάρχει και η περίπτωση μια ουσία να μην παρουσιάζει σημείο τήξεως αλλά να αποσυντίθεται κατά την θέρμανση. Σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρούμε υγροποίηση αλλά ένα χαρακτηριστικό μαύρισμα της υπο εξέταση ουσίας.

1.2. Συσκευή προσδιορισμού του σ.τ με θερμαινόμενη τράπεζα κατά Kofler.

Η συσκευή αποτελείται από μια μακρόστενη θερμαινόμενη πλάκα, της οποίας κάθε σημείο έχει διαφορετική θερμοκρασία (**60-300 °C**). Επί της πλάκας υπάρχει προσαρμοσμένη μια κινούμενη ακίδα, η οποία αντιστοιχεί κάθε σημείο της πλάκας με συγκεκριμένη θερμοκρασία, η οποία αναγιγνώσκεται από μια προσαρτημένη κλίμακα. Η πλάκα προθερμαίνεται για κάποιο διάστημα (περίπου **15-30 min**) ώστε να πάρει τις θερμοκρασίες που αναγράφει η βαθμολογημένη κλίμακα.

Στη συνέχεια τοποθετούμε μικρή ποσότητα ουσίας με τη βοήθεια σπάτουλας σε διάφορα σημεία της πλάκας για να δούμε περίπου σε ποιο σημείο τήκεται η ουσία. Εναλλακτικά, τοποθετούμε μια ποσότητα ουσίας στην άκρη της πλάκας με τη χαμηλότερη θερμοκρασία και με τη βοήθεια σπάτουλας προωθούμε την ουσία προς θερμότερα σημεία της πλάκας. Η παρατήρηση της τήξης γίνεται με γυμνό οφθαλμό.

Αφού διαπιστώσουμε το κατά προσέγγιση σημείο τήξεως τοποθετούμε μια νέα ποσότητα ουσίας στο σημείο της πλάκας που παρατηρήσαμε την τήξη στην πρώτη μέτρηση και με προσοχή μετακινούμε την ουσία πάνω στην πλάκα έτσι ώστε να σχηματισθεί μια διαχωριστική γραμμή μεταξύ υγρής και στερεάς φάσης. Τότε τοποθετούμε την ακίδα στο ακριβές σημείο της πλάκας όπου παρατηρήθηκε η τήξη και διβάζουμε τη βαθμολογημένη κλίμακα.

Η ακρίβεια της συσκευής ρυθμίζεται με έλεγχο του σημείου τήξεως προτύπων ουσιών.

Η τεχνική αυτή έχει την μικρότερη ακρίβεια αλλά είναι η ταχύτερη.

1.3. Συσκευή προσδιορισμού του σ.τ με τριχοειδές σωληνάκι.

Στην περίπτωση αυτή η υπό εξέταση ουσία τοποθετείται σε τριχοειδές σωληνάκι, το οποίο με τη σειρά του τοποθετείται εντός χώρου που θερμαίνεται (πχ ελαιόλουτρο). Σε κατάλληλο σημείο βρίσκεται τοποθετημένος ισχυρός μεγενθυντικός φακός με τον

οποίο μπορούμε να παρατηρούμε την τήξη της ουσίας. Για την λουπή διαδικασία της λήψης του σ.τ ισχύει ό,τι και στην παράγραφο 1.1.

Η τοποθέτηση της ουσίας στο τριχοειδές σωληνάκι γίνεται όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα: Το τριχοειδές σωληνάκι είναι ανοικτό από τη μια μεριά και κλειστό από την άλλη. Βυθίζουμε το σωληνάκι εντός της σκόνης από την ανοικτή του μεριά και στη συνέχεια το κτυπάμε από την αντίθετη μεριά ελαφρά πάνω σε σταθερή επιφάνεια ώστε η σκόνη να κατακαθίσει στην κλειστή μεριά.



1.4. Αυτόματη συσκευή προσδιορισμού του σ.τ.

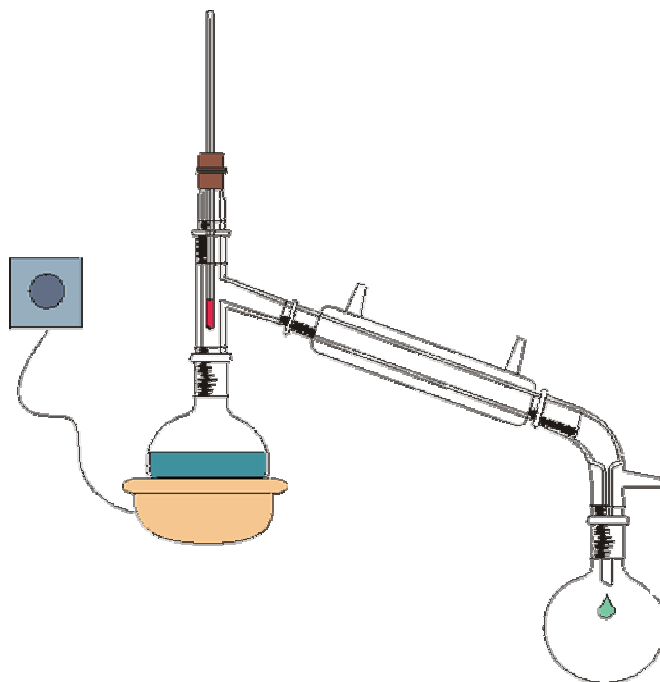
Η ουσία τοποθετείται σε τριχοειδές σωληνάκι όπως και στην περίπτωση 1.3. Το σωληνάκι θερμαίνεται με ηλεκτρική αντίσταση και ταυτόχρονα φωτίζεται από ηλεκτρική λυχνία. Μόλις η ουσία τακεί, τότε το φως μπορεί να διέλθει από το υγροποιηθέν περιεχόμενο του σωληνίσκου και να προσπέσει σε φωτοκύτταρο το οποίο με τη σειρά του διακόπτει τη λειτουργία ενός ψηφιακού θερμομέτρου που μας δείχνει αυτόματα το σημείο τήξεως.

2. Προσδιορισμός σημείου ζέσεως (σ.ζ) (boiling point b.p.)

Όλα όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως εφαρμόζονται στην περίπτωση στερεών ουσιών. Στην περίπτωση υγρών ουσιών η αντίστοιχη σταθερά η οποία προσδιορίζεται είναι το σημείο ζέσεως.

ΟΡΙΣΜΟΣ: Σημείο ζέσεως είναι η θερμοκρασία στην οποία μια ουσία μεταπίπτει από την υγρή στην αέρια κατάσταση. Το σημείο ζέσεως αποτελεί και αυτό μια φυσική σταθερά η οποία είναι χαρακτηριστική για κάθε ουσία (υπό σταθερές συνθήκες πίεσης). Η μέθοδος αυτή έχει ιδιαίτερη σημασία για τον έλεγχο της καθαρότητας μιας υγρής ουσίας.

Για τον προσδιορισμό του σημείου ζέσεως χρησιμοποιείται αποστακτική συσκευή η οποία φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Πρακτικά θεωρούμε ότι βρισκόμαστε στο σ.ζ. όταν παρατηρήσουμε την πρώτη στάγωνα να εξέρχεται από την έξοδο του ψυκτήρα. Αν η ουσία είναι καθαρή τότε η ένδειξη του θερμομέτρου (η οποία αντιστοιχεί στην θερμοκρασία των ατμών) θα πρέπει να διατηρηθεί σταθερή μέχρι να αποστάξει όλη η ποσότητα του υγρού. Τυχόν

απόσταξη υγρού σε θερμοκρασία χαμηλότερη ή υψηλότερη από το αναμενόμενο σημείο ζέσεως αποτελεί απόδειξη ύπαρξης πρόσμιξης.

Σε περίπτωση υγρών με πολύ υψηλό σημείο ζέσεως μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η απόσταξη υπό κενό. Στην περίπτωση αυτή το προσδιοριζόμενο σ.ζ. πρέπει να συνοδεύεται και από την τιμή του κενού στο οποίο μετρήθηκε.

Επίσης κατά τον προσδιορισμό του σ.ζ. πρέπει να λαμβάνεται υπ'όψη και η βαρομετρική πίεση όποτε προκύπτει το διορθωμένο σ.ζ. σύμφωνα με τον τύπο:

$$t_{\delta} = t_{\pi\rho} + K(101,3 - b)$$

K = συντελεστής διόρθωσης

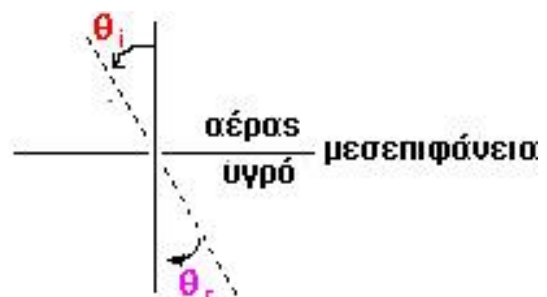
b = βαρομετρική πίεση

t_{πρ} = προσδιορισθείσα θερμοκρασία.

3. Προσδιορισμός δείκτη διάθλασης

Μια ακόμα φυσική σταθερά που προσδιορίζεται σε υγρές ουσίες είναι ο δείκτης διάθλασης. Ενώ οι προηγούμενες σταθερές (σ.τ., σ.ζ.) αφορούσαν καθαρές ουσίες, ο δείκτης διάθλασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να χαρακτηρίσει και καθαρές ουσίες αλλά και ολόκληρες δρόγες (πχ αιθέρια έλαια).

Όταν μια δέσμη φωτός διέλθει υπό γωνία (όχι κάθετα) από τη μεσεπιφάνεια δυο μέσων διαφορετικής πυκνότητας τότε διαθλάται. Αυτό συμβαίνει διότι αλλάζει η ταχύτητα του φωτός από το ένα μέσο στο άλλο.



Σαν δείκτης διάθλασης ορίζεται:

$$n = \frac{\eta_{\mu i}}{\eta_{\mu r}} = \frac{C_A}{C_B}$$

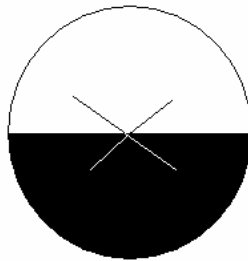
όπου θ_i = γωνία προσπτώσεως, θ_r = γωνία διαθλάσεως και C_A = ταχύτητα του φωτός στο πρώτο μέσο, C_B = ταχύτητα του φωτός στο δεύτερο μέσο.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι διαθλασιμέτρων. Ένας τύπος είναι το διαθλασίμετρο **Abbe** το οποίο αποτελείται από τα εξής μέρη:

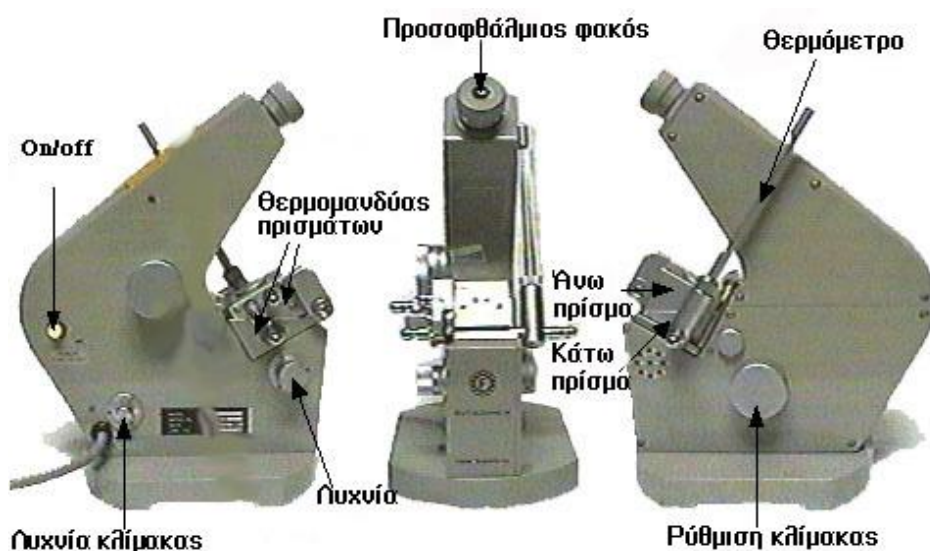
A. Δύο πρίσματα μεταξύ των οποίων τοποθετείται η υπο εξέταση ουσία.

B. Σύστημα κατόπτρων και πρισμάτων δια των οποίων κατευθύνεται η ακτίνα προς τον προσοφθάλμιο φακό.

Γ. Προσοφθάλμιο φακό δια του οποίου παρατηρείται οπτικό πεδίο (μισό σκοτεινό μισό φωτεινό) το οποίο φέρει δυο γραμμές τεμνόμενες χιαστί και κλίμακα μέτρησης του δείκτη διάθλασης.



Η συσκευή είναι ρυθμισμένη ώστε όταν με τον κοχλία φέρουμε τη γραμμή που διαχωρίζει το φωτεινό και το σκοτεινό πεδίο στο κέντρο του X, η συγχρόνως στρεφόμενη κλίμακα μας δείχνει το δείκτη διάθλασης.



Ο προσδιορισμός του δείκτη διάθλασης γίνεται με δυο τρόπους:

A. Σε κανονικά υγρά το φώς πέφτει από το πάνω πρίσμα

B. Σε πολύ πυκνά, έντονα χρωματισμένα ή όχι τελείως διαυγή υγρά η απορρόφηση του φωτός είναι μεγάλη και γι'αυτό το λόγο το φως πέφτει από το κάτω πρίσμα και ανακλάται ολικά στο υπό εξέταση δείγμα.

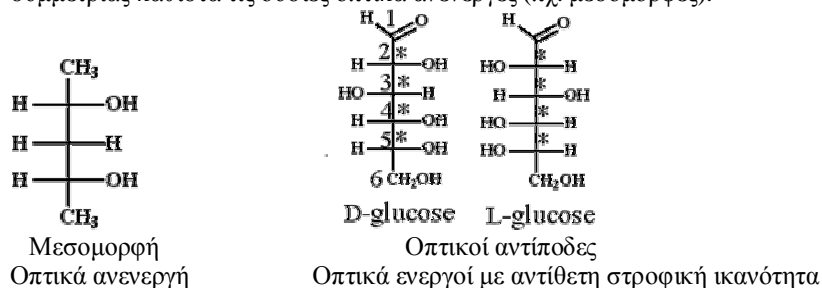
Επειδή ο δείκτης διάθλασης εξαρτάται από τη θερμοκρασία, η συσκευή είναι εξοπλισμένη με θερμόμετρο και με σύστημα θέρμανσης των πρισμάτων. Ο δείκτης διάθλασης αναφέρεται πάντα σε ορισμένη θερμοκρασία.

4. Προσδιορισμός της στροφικής ικανότητας $[\alpha]_D$.

Όταν μονοχρωματικό φως διέλθει από πρίσμα Nicol υφίσταται πόλωση. Ορισμένες ουσίες, τις οποίες αποκαλούμε οπτικά ενεργές, έχουν την ικανότητα να στρέφουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός κατά μια συγκεκριμένη γωνία. Αυτό ονομάζεται στροφική ικανότητα και είναι μια χαρακτηριστική σταθερά όλων των ουσιών που δεν διαθέτουν κέντρο ή επίπεδο συμμετρίας. Στις περισσότερες περιπτώσεις η οπτική ενεργότητα οφείλεται στην ύπαρξη τουλάχιστον ενός ασύμμετρα υποκατεστημένου ατόμου άνθρακα.¹ Η στροφική ικανότητα μετράται με το πολωσίμετρο.'

Η συσκευή αποτελείται από τα εξής μέρη:

¹ Προσοχή πρέπει να δίδεται στις περιπτώσεις που ενώ υπάρχουν ασύμμετρα άτομα άνθρακα, η ύπαρξη επιπέδου συμμετρίας καθιστά τις ουσίες οπτικά ανενεργές (πχ. μεσομορφές).





A. Λυχνία νατρίου ή υδραργύρου που παράγει μονοχρωματικό φως σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιείται η λυχνία νατρίου NaD στα **521 nm**. Σε οποιαδήποτε άλλη περίπτωση το μήκος κύματος πρέπει να αναφέρεται.

B. Πολωτή του φωτός (πρίσμα **Nicol**)

Γ. Κυκλικό διάφραγμα από ειδική ύαλο

Δ. Ειδικό υποδοχέα (κυψελίδα) του υγρού ή του διαλύματος της προς μελέτη ουσίας.



E. Αναλυτή του πολωμένου φωτός (πρίσμα **Nicol**).

Στ. Σύστημα μέτρησης της γωνίας στροφής.

Στα σύγχρονα πολωσίμετρα το σύστημα μέτρησης είναι ψηφιακό και η γωνία στροφής μετράται αυτόματα.

Η ειδική γωνία στροφής εκφράζεται με το $[\alpha]_D^t$ και αντιστοιχεί στη μετρούμενη γωνία στροφής μιας ουσίας σε συγκέντρωση **100%** (δηλ. **100 g/100 ml**) σε κυψελίδα μήκους **1 dm (10 cm)** στην αναφερόμενη θερμοκρασία.

Ο τύπος που χρησιμοποιείται για την έυρεση της ειδική γωνία στροφής είναι ο εξής:

$$[\alpha]_D^{t_0} = \frac{\beta \cdot 100}{\mu \cdot d}$$

όπου β = αναγνωσθείσα γωνία στροφής

μ = μήκος σωλήνα κυψελίδας σε **dm**

d = συγκέντρωση διαλύματος σε γραμμάρια ανα **100 ml**

Στην περίπτωση που το πολωσίμετρο δεν είναι ψηφιακό τότε ακολουθείται η εξής διαδικασία μέτρησης της γωνίας στροφής:

Αρχικά μηδενίζεται η συσκευή ως εξής:

Όταν το φως περάσει από τον πολωτή για να φανεί ολόκληρο πρέπει ο αναλυτής να στραφεί σε ακριβώς παράλληλη θέση προς τον πολωτή. Εάν ο αναλυτής στραφεί σε κάθετη θέση προς τον πολωτή, τότε από τη διόπτρα όλο το πεδίο θα φαίνεται σκοτεινό. Όταν όμως το πεδίο είναι τελείως φωτεινό ή τελείως σκοτεινό δεν μπορούμε να έχουμε ένα μέτρο σύγκρισης. Γι' αυτό υπάρχει μέσα στη συσκευή ένα ημικυκλικό διάφραγμα. Αυτό προκαλεί το σχηματισμό δυο φωτεινών ημικυκλίων των οποίων ρυθμίζεται κατάλληλα η ένταση. Το διάλυμα της ουσίας τοποθετείται μέσα σε σωλήνες (κυψελίδες) κλεισμένους αεροστεγώς (χωρίς φυσαλίδες). Στις παλαιότερες μη ψηφιακές συσκευές το μήκος των σωλήνων είναι συνήθως **20 cm** (δηλ. **2 dm**).

Για να γίνει η μέτρηση τοποθετείται αρχικά στη δίοδο του φωτός ο σωλήνας που περιέχει τον διαλύτη του υπό εξέταση διαλύματος και στρέφεται ο αναλυτής μέχρις ότου τα δυο ημικύκλια του πεδίου να είναι εξίσου σκοτεινά. Στη συνέχεια το διάλυμα και κατά τον ίδιο τρόπο λαμβάνεται η μέτρηση. Από αυτήν αφαιρείται αλγεβρικά η μέτρηση του διαλύτη. Όταν η ανάγνωση είναι μικρότερη των **180°** τότε η ουσία θεωρείται δεξιόστροφη (+). Όταν υπερβαίνει τις **180°** τότε η ανάγνωση αφαιρείται από το **360°** και το υπόλοιπο είναι η γωνία στροφής της ουσίας, η οποία είναι αριστερόστροφη (-).

Ανάγνωση γωνίας στροφής:

Υπάρχουν δυο κλίμακες. Η κυρίως κλίμακα (κάτω) και η κλίμακα του βερνιέρου (άνω). Από την κάτω κλίμακα λαμβάνονται οι μοίρες και τα δέκατα αυτών τα οποία αντιστοιχούν πριν από τη γραμμή «Ο» του βερνιέρου. Στη συνέχεια προστίθενται τα εκατοστά από την κλίμακα του βερνιέρου, όσα αντιστοιχούν στη γραμμή της κλίμακας του βερνιέρου η οποία ακριβώς συμπίπτει με οποιαδήποτε γραμμή της κύριας κλίμακας. Οι **20** υποδιαίρεσεις του βερνιέρου αντιστοιχούν σε μια υποδιαίρεση της κύριας κλίμακας και εφόσον κάθε υποδιαίρεση της κύριας κλίμακας είναι **0,2°** κάθε υποδιαίρεση του βερνιέρου είναι **0,01°**.

Τρόπος τοποθέτησης του διαλύματος εντός της κυψελίδας του πολωσιμέτρου.

Η κυψελίδα απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα. Όπως φαίνεται υπάρχουν δυο οπές. Από τη μία εισάγεται το διάλυμα με τη βοήθεια πιπέτας και από την άλλη εξέρχεται ο αέρας. Η εισαγωγή του διαλύματος γίνεται αργά και σταθερά και κρατώντας την κυψελίδα υπό κλίση (η έξοδος του αέρα πρέπει να βρίσκεται πάντα λίγο πιο ψηλά από την είσοδο του διαλύματος). Όταν το διάλυμα φθάσει στην έξοδο απομακρύνουμε την πιπέτα, επαναφέρουμε την κυψελίδα στην ευθεία και τοποθετούμε τα πώματα στις δυο οπές. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται ο εγκλωβισμός αέρα με τη μορφή φυσαλίδων εντός του σωλήνα της κυψελίδας, ο οποίος καθιστά αδύνατη τη μέτρηση. Ο έλεγχος για την ύπαρξη φυσαλίδων γίνεται κοιτώντας κατά μήκος του σωλήνα. Αν υπάρχει αέρας ή αν το διάλυμα είναι πολύ πυκνό τότε κοιτώντας μέσω του σωλήνα δεν θα μπορούμε να παρατηρήσουμε τι βρίσκεται από την άλλη μεριά. Στις ψηφιακές συσκευές πάντα γίνεται έλεγχος και της ενέργειας που φθάνει στον ανιχνευτή. Αν η ενέργεια είναι χαμηλή τότε η μέτρηση είτε είναι αδύνατη είτε είναι αβέβαιη, δηλ. δεν υπάρχει σταθερότητα στην ένδειξη της γωνίας τροφής. Η χαμηλή ενέργεια μπορεί να οφείλεται:

A. Στην ύπαρξη φυσαλίδων

B. Στη μεγάλη πυκνότητα του διαλύματος

Γ. Στη μεγάλη απορροφητικότητα της διαλυμένης ουσίας στο συγκεκριμένο μήκος κύματος που γίνεται η μέτρηση (πχ σε έντονα έγχρωμες ουσίες)

Στην α περίπτωση πρέπει να επανατοποθετήσουμε το διάλυμα

Στην β περίπτωση πρέπει ή να το κάνουμε πιο αραιό ή να χρησιμοποιήσουμε κυψελίδα μεγαλύτερης χωρητικότητας.

Στη γ περίπτωση πρώτα επιχειρούμε να λύσουμε το πρόβλημα κάνοντας ότι και στη β περίπτωση και αν εξακολουθεί να υπάρχει πρόβλημα τότε κάνουμε μέτρηση σε κάποιο άλλο από τα διαθέσιμα μήκη κύματος.

Σε όλες τις περιπτώσεις χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή στο να χρησιμοποιούμε διαλύτες της μέγιστης δυνατής καθαρότητας γιατί ακόμα και η παραμικρή οπτικά ενεργή πρόσμιξη μπορεί να επηρεάσει την τελική μέτρηση. Πολλή προσοχή χρειάζεται

και στον καθαρισμό της κυψελίδας ο οποίος γίνεται με διαλύτη ο οποίος στο τέλος στεγνώνεται προσεκτικά με ρεύμα αέρα. Τυχόν υπολείματα διαλύτη μπορεί να επηρεάσουν τη συγκέντρωση των υπο μελέτη διαλυμάτων και να αλλοιώσουν την τελική τιμή της στροφικής ικανότητας.

Επίσης όπως φαίνεται στην εικόνα της κυψελίδας ο εσωτερικός σωλήνας στον οποίο τοποθετείται το διάλυμα περιβάλλεται από εξωτερικό σωλήνα στον οποίο υπάρχει η δυνατότητα εισαγωγής ψυκτικού υγρού όταν απαιτείται μέτρηση στροφικής ικανότητας σε συγκεκριμένη θερμοκρασία.

Η στροφική ικανότητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για την εκτίμηση της καθαρότητας μιας οπτικά ενεργής ουσίας είτε για την εκτίμηση της ποιότητας ενός εκχυλίσματος ή ενός αιθερίου ελαίου.

5. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

Κατά τη φασματοσκοπική εξέταση μιας ουσίας μελετούμε την επίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας διαφόρου μήκους κύματος επί των μορίων της ουσίας. Η μέτρηση της έντασης απορρόφησης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στα διάφορα μήκη κύματος μας δίνει πολύτιμες πληροφορίες για τη δομή του μορίου καθώς επίσης και για τον ποσοτικό του προσδιορισμό.

5.1. Φασματοφωτομετρία υπεριώδους ορατού (UV-VIS)

Όταν υπεριώδης (200-400 nm) ή ορατή (400-800 nm) ακτινοβολία απορροφηθεί από ένα οργανικό μόριο τότε λαμβάνουν χώρα μεταθέσεις ηλεκτρονίων σθένους από καταστάσεις χαμηλότερης σε καταστάσεις υψηλότερης ενέργειας.

Τέτοιες μεταθέσεις είναι οι εξής:

σ ηλεκτρόνια $\rightarrow \sigma^*$ πχ -C-C- και -C-H

π ηλεκτρόνια $\rightarrow \pi^*$ πχ -C=C-

n ηλεκτρόνια $\rightarrow \pi^*$ πχ -C=O

Ο βασικός νόμος στον οποίο στηρίζεται η φασματοφωτομετρία υπεριώδους ορατού είναι ο νόμος **Lambert-Beer** ο οποίος εκφράζεται από τη σχέση:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc = -\log T$$

Όπου P_0 είναι η ισχύς της ακτινοβολίας του προσπίπτοντος φωτός, P είναι η ισχύς του εξερχόμενου φωτός, ϵ είναι η μοριακή απορροφητικότητα (παλαιότερα μοριακός συντελεστής αποσβέσεως), b είναι το μήκος της διαδρομής (σε **cm**) που διανύθηκε μέσα στο διάλυμα (παλαιότερα πάχος στοιβάδας διαλύματος l ή d) και c η συγκέντρωση του διαλύματος σε **mol/L**.

Ο λόγος P/P_0 ονομάζεται διαπερατότητα T (**transmittance**) και εκφράζει το ποσοστό% της ισχύος του φωτός που περνάει από το διάλυμα. Ο όρος A ονομάζεται απορρόφηση (**absorbance**) (παλαιότερα ονομαζόταν και οπτική πυκνότητα (**optical density**) ή απόσβεση).

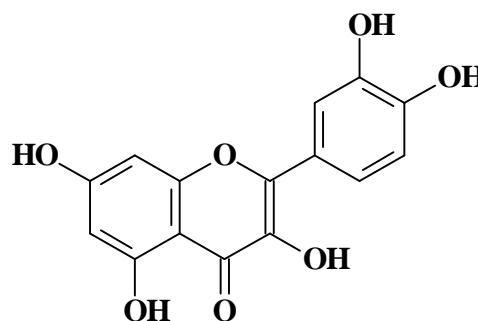
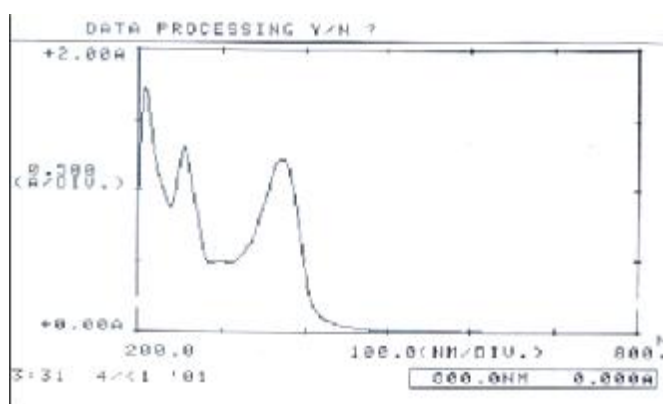
Ένας άλλος όρος που χρησιμοποιείται είναι το a που ονομάζεται απορροφητικότητα και αντικαθιστά το ϵ όταν η συγκέντρωση εκφράζεται σε **g/L**. Ο όρος ειδικός συντελεστής απορρόφησης $A^{1\%_{1cm}}$ αντιστοιχεί στην απορρόφηση για συγκέντρωση **1%** (β/ο) και σε μήκος διαδρομής (ή πάχος κυψελίδας) **1 cm**.

Αναλυτικά εξεταζόμενος ο νόμος **Lambert-Beer** μας δείχνει ότι η απορρόφηση είναι ανεξάρτητη από την ισχύ του προσπίπτοντος φωτός αλλά είναι ανάλογη προς το μήκος της διαδρομής που διανύει το φως εντός του διαλύματος και ανάλογη προς τη συγκέντρωση του διαλύματος. Επομένως, μια διαλυμένη ουσία σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση, σε κυψελίδα συγκεκριμένου πάχους και σε συγκεκριμένο μήκος κύματος θα έχει πάντα την ίδια τιμή απορρόφησης. Όταν όμως η ίδια ουσία μετρηθεί στην ίδια συγκέντρωση και στην ίδια κυψελίδα αλλά σε διαφορετικό μήκος κύματος τότε θα έχει διαφορετική τιμή απορρόφησης. Ο τρόπος απορρόφησης του κάθε μήκους κύματος είναι χαρακτηριστικός για κάθε ουσία και καθορίζεται από την ύπαρξη ή μη στο μόριο συγκεκριμένων χρωμοφόρων ομάδων (πχ **C=C**, **C=O**, **N=N** κτλ).

Αν μετρήσουμε την τιμή απορρόφησης σε διάφορα μήκη κύματος υπό σταθερή συγκέντρωση και στην ίδια κυψελίδα τότε σχηματίζουμε την καμπύλη απορρόφησης της διαλυμένης ουσίας (ή απλούστερα το φάσμα **UV-VIS**). Σαν τετμημένη λαμβάνεται το μήκος κύματος (σε **nm**) και σαν τεταγμένη η απορρόφηση (ή το **logε**). Στα φάσματα

των διαφόρων ουσιών (όπως φαίνεται στην παρατιθέμενη εικόνα) παρατηρούμε σε ορισμένα μήκη κύματος μέγιστες τιμές απορρόφησης (**peaks**), ορισμένες ελάχιστες τιμές απορρόφησης (**valleys**) και ορισμένες διευρύνσεις κάποιων κορυφών που αποκαλούνται ώμοι. Τα μήκη κύματος που παρατηρούνται οι μέγιστες τιμές απορρόφησης (λ_{max}) και οι ώμοι καθώς και το **log ϵ** σε αυτά τα μήκη κύματος χρησιμοποιούνται για να χαρακτηρίσουν κάποια ουσία.

Παράδειγμα φάσματος UV του φλαβονοειδούς κερκετίνη



Ορισμένες ουσίες οι οποίες δεν φέρουν χρωμοφόρες ομάδες και δεν μπορούν να μελετηθούν με τη φασματοφωτομετρία υπεριώδους ορατού, τις υποβάλλουμε σε κατάλληλες αντιδράσεις παραγωγοποίησης (**derivatization**) και εισάγουμε ή τροποποιούμε χρωμοφόρες ομάδες μεταθέτοντας την απορρόφηση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Η μετατόπιση αυτή ονομάζεται βαθυχρωμία ενώ το αντίθετο ονομάζεται υψιχρωμία.

Χρησιμοποίηση της φασματοφωτομετρία υπεριώδους ορατού για τον ποσοτικό προσδιορισμό.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται συνήθως με την κατασκευή καμπύλης αναφοράς με τετμημένη τη συγκέντρωση και τεταγμένη την απορρόφηση. Για την κατασκευή αυτής της καμπύλης χρησιμοποιούνται διάφορες αραιώσεις της υπο προσδιορισμό ουσίας και μετράμε τις αντίστοιχες απορροφήσεις σε ένα ορισμένο

μήκος κύματος (συνήθως σε κάποιο μέγιστο). Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ενός αγνώστου δείγματος μετράμε την απορρόφηση του και από την καμπύλη αναφοράς βρίσκουμε τη συγκέντρωση.

Οργανολογία



Ένα σύγχρονο φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού διπλής δέσμης αποτελείται συνοπτικά από τα εξής τμήματα:

A. Λυχνία υδρογόνου για την παραγωγή υπεριώδους ακτινοβολίας (**200-340 nm**) και βολφραμίου για την παραγωγή ορατής ακτινοβολίας (**340-800 nm**)

B. Μονοχρωμάτορα (πρίσματος ή φράγματος ανακλάσεως) για την παραγωγή μονοχρωματικής δέσμης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Γ. Κυψελίδες υποδοχής του δείγματος και του τυφλού (διαλύτη). Οι κυψελίδες μπορεί να είναι είτε από χαλαζία (για την περιοχή του υπεριώδους), ενώ αν οι μετρήσεις γίνουν μόνο στην περιοχή του ορατού μπορούν να χρησιμοποιηθούν και γυάλινες κυψελίδες.

Δ. Φωτοκύτταρο ή φωτοπολλαπλασιαστή για τη μετατροπή της φωτεινής ενέργειας σε ηλεκτρικό ρεύμα η ένταση του οποίου ανταποκρίνεται στην απορρόφηση στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.

Ε. Καταγραφέα για την καταγραφή της καμπύλης απορρόφησης.



Οι ουσίες εξετάζονται υπό μορφή διαλύματος με σε κατάλληλο διαλύτη υψηλής καθαρότητας και σε συγκεντρώσεις συνήθως 10^{-4} - 10^{-5} M.

5.2. Φασματοφωτομετρία υπέρυθρου (IR)

Τα φάσματα υπέρυθρου λαμβάνονται στην περιοχή της υπέρυθρης ακτινοβολίας (2-16 μm). Οι απορροφήσεις στην περιοχή αυτή δεν οφείλονται σε μεταπτώσεις ηλεκτρονίων αλλά σε διεγέρσεις δόνησης, ταλάντωσης ή περιστροφής του μορίου.

Σε ένα διατομικό μόριο η συχνότητα ταλάντωσης του δεσμού δίνεται από τη σχέση:

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{f/\mu}$$

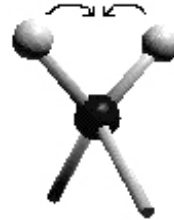
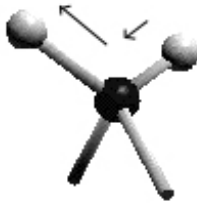
όπου f = σταθερά ισχύος του δεσμού, c = η ταχύτητα του φωτός, και

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

όπου m_1 και m_2 οι μάζες των δυο ατόμων.

Εαν στο πιο πάνω μόριο πέσει υπέρυθρη ακτινοβολία με συχνότητα ίση με τη συχνότητα ν του μορίου τότε έχουμε απορρόφηση. Επειδή όμως κάθε δεσμός έχει διαφορετική σταθερά ισχύος κάθε δεσμός έχει ορισμένο μήκος κύματος στο οποίο

απορροφά. Οι βασικότεροι τύποι δονήσεων των ομάδων του τύπου AX_2 φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



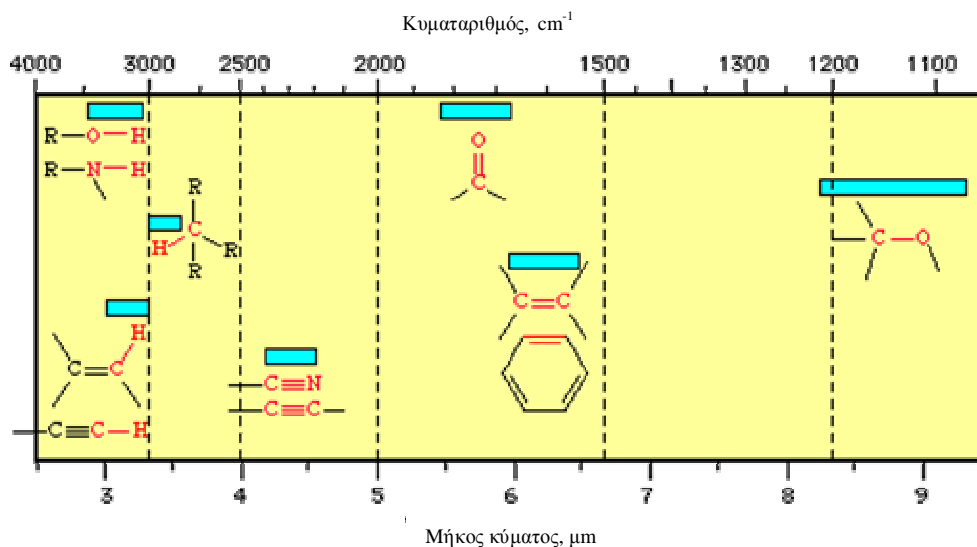
Δονήσεις τάσεως (**Stretching**)

Δονήσεις κάμψεως (**Bending**)

Οι απορροφήσεις στα φάσματα **IR** είναι συνήθως μικρού πλάτους και γι' αυτό έχουμε κορυφές απορροφήσεως και όχι καμπύλες όπως στα φάσματα **UV-VIS**.

Η περιοχή συχνοτήτων στην οποία λαμβάνεται το φάσμα μιας ουσίας είναι **670-4000 cm^{-1}** ($\nu (cm^{-1}) = 1/\lambda (\mu m) \times 10^4$)

Οι απορροφήσεις μεταξύ **670-1250 cm^{-1}** οφείλονται στη δόνηση ολόκληρου του μορίου και μπορούμε να θεωρήσουμε αυτή την περιοχή σαν το δακτυλικό αποτύπωμα του μορίου. Οι απορροφήσεις στην περιοχή **1250-4000 cm^{-1}** οφείλονται σε ειδικές ομάδες ή δεσμούς και μπορούν να μας δώσουν πολύτιμες πληροφορίες για τη δομή μιας ένωσης. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι απορροφήσεις μερικών χαρακτηριστικών ομάδων στο **IR**.



Οργανολογία

Τα βασικά τμήματα ενός φασματοφωτομέτρου υπέρυθρου είναι τα εξής

A. Λυχνία πυρακτώσεως **Nerst** ή πυρακτωτής **Globar** ή λάμπα κεραμικού υλικού **Nichrome** ή πηγή **lazer** για την παραγωγή υπέρυθρης ακτινοβολίας.

B. Μονοχρωμάτορας: Πρίσμα ή φράγμα ανακλάσεως **NaCl** ή **KBr**.

Γ. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος σε μορφή διαλύματος, γλισχράσματος ή σε στερεά μορφή.

Δ. Ανιχνευτής: Ευπαθές θερμοζεύγος

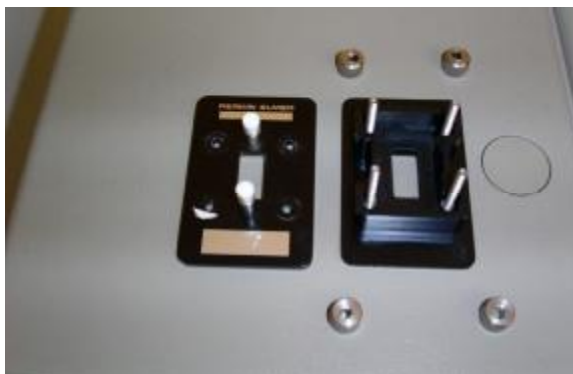
Ε. Σύστημα καταγραφής (Σύστημα επεξεργασίας **FID**)



Το φάσμα μιας ουσίας μπορούμε να το πάρουμε με τους εξής τρόπους:

1. Αν η ουσία είναι διαλυτή σε διαλύτες όπως το **CHCl₃** τότε μπορούμε να την τοποθετήσουμε σε μορφή διαλύματος σε κυψελίδα με κρυστάλλους **NaCl**. Η κυψελίδα συναρμολογείται όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα και το διάλυμα της υπο εξέταση ουσίας τοποθετείται με τη βοήθεια πιπέτας **Pasteur**. Κατά την τοποθέτηση του διαλύματος η εισαγωγή γίνεται από την οπή που βρίσκεται στην κάτω μεριά ενώ η κυψελίδα κρατείται υπό κλίση ώστε να αποφευχθεί ο εγκλωβισμός αέρα ανάμεσα στους κρυστάλλους. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται κατά τον χειρισμό, τον καθαρισμό και την συντήρηση των

κρυστάλλων οι οποίοι είναι ευπαθείς στην υγρασία. Τονίζουμε ότι απαγορεύεται η χρήση πολικών διαλυτών οι οποίοι καταστρέφουν τους κρυστάλλους.



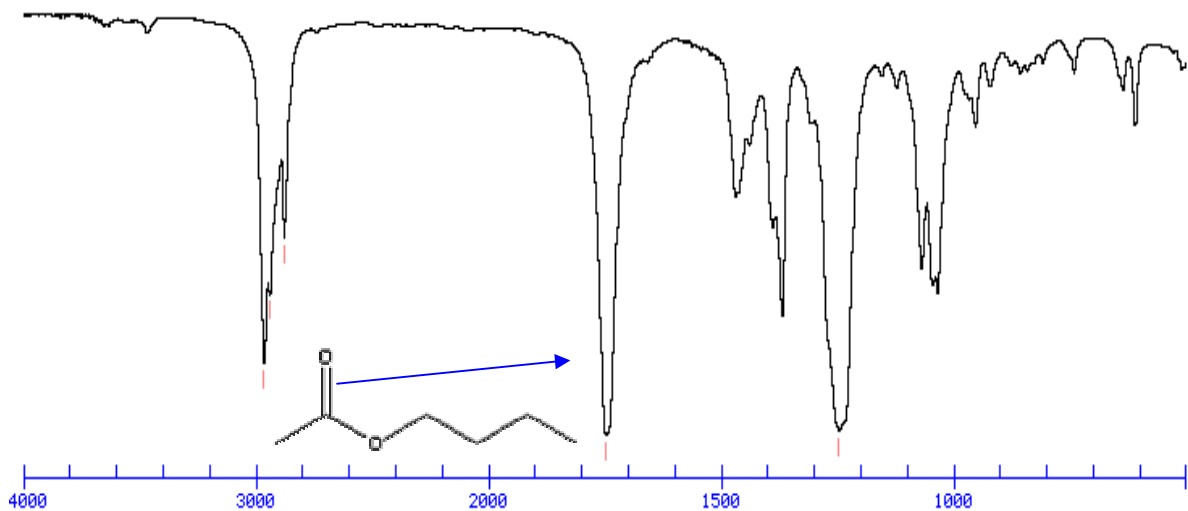
2. Αν η ουσία δεν είναι διαλυτή σε άπολους διαλύτες τότε μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε πολικούς διαλύτες όπως η μεθανόλη. Σε αυτή όμως την περίπτωση δεν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε κρυστάλλους NaCl , γιατί αυτοί είναι ευπαθείς. Αντί αυτών χρησιμοποιούμε κρυστάλλους πχ CaF_2 οι οποίοι είναι ανθεκτικοί, όμως η παρουσία της μεθανόλης μας δυσκολεύει να παρατηρήσουμε απορροφήσεις πάνω από τα 3000 cm^{-1} .
3. Εναλλακτικά των μεθόδων διαλύσεως της ουσίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν δυο άλλες τεχνικές. Η τεχνική του γλίσχράσματος και του δισκίου από KBr . Στην πρώτη τεχνική, η ουσία μετά από καλή λειοτριβήση διασπείρεται σε **Nujol** (παραφινέλαιο) και το παραγόμενο γλίσχρασμα απλώνεται πάνω στην επιφάνεια των κρυστάλλων οι οποίοι στη συνέχεια τοποθετούνται εντός της κυψελίδας.
4. Κατα την τεχνική του δισκίου η ουσία αναμιγνύεται με KBr και τοποθετείται εντός ειδικής πρέσσας η οποία παράγει ένα δισκίο. Το δισκίο τοποθετείται απ'ευθείας σε ειδική υποδοχή μέσω της οποίας διέρχεται η υπέρυθη ακτινοβολία.
5. Τέλος υπάρχει και η τεχνική των πολλαπλών ανακλάσεων (**MIR**). Η ουσία σε μορφή λεπτής σκόνης τοποθετείται επί της επιφάνειας ειδικού κρυστάλλου, ο οποίος στη συνέχεια τοποθετείται επί ειδικού υποδοχέα. Μέσω κατάλληλων



κατόπτρων η ακτινοβολία κατευθύνεται στην επιφάνεια του κρυστάλλου. Εκεί ανακλάται πολλαπλώς επί του στρώματος της ουσίας (όπου και απορροφάται) μέχρι να εξέλθει από την άλλη μεριά

του κρυστάλλου και να οδηγηθεί πάλι μέσω κατόπτρων στον ανιχνευτή. Η τεχνική αυτή απαιτεί ελάχιστη ποσότητα ουσίας, δεν έχει κανένα περιορισμό ως προς τη διαλυτότητα και μετά τη λήψη του φάσματος η ουσία δεν χρειάζεται καμία επεξεργασία για να ανακτηθεί.

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣ IR



5.3. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ **NMR** (*Nuclear Magnetic Resonance*)

Η φασματοσκοπία **NMR** αποτελεί σήμερα τη σπουδαιότερη ενόργανη τεχνική μελέτης των φυσικών προϊόντων και γενικότερα των οργανικών ενώσεων. Στηρίζεται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή των βραχέων ραδιοκυμάτων (10^2 MHz). Αντίθετα από τις προηγούμενες φασματοσκοπικές τεχνικές η απορρόφηση της ακτινοβολίας δεν οδηγεί ούτε σε μεταπτώσεις ηλεκτρονίων σθένους ούτε σε μεταβολές της ενεργειακής κατάστασης των δεσμών. Σε αυτή τη φασματοσκοπική τεχνική η απορροφόμενη ενέργεια οδηγεί σε μεταβολή του πυρηνικού **spin**.

Κάθε πυρήνας χαρακτηρίζεται από τον κβαντικό αριθμό **I** ο οποίος σχετίζεται με την περιστροφή του πυρήνα γύρω από τον άξονα του. Στην περίπτωση που ένας πυρήνας διαθέτει είτε περιττό μαζικό αριθμό είτε περιττό ατομικό αριθμό είτε και τα δύο τότε διαθέτει στροφορμή **P**.

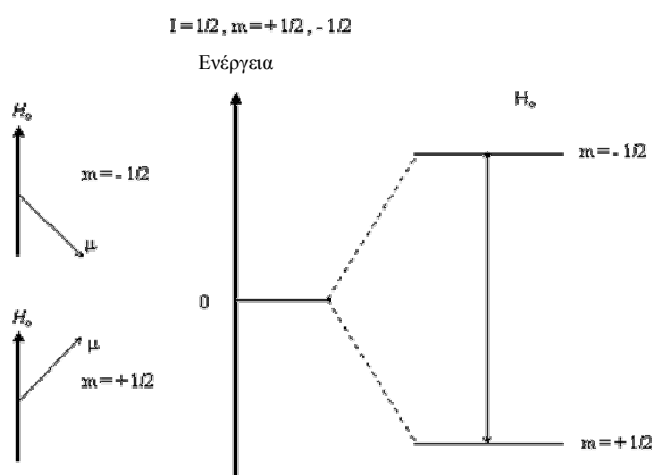
Ο πυρήνας επειδή έχει ηλεκτρικό φορτίο, η περιστροφή του δημιουργεί μαγνητικό δίπολο του οποίου το μέγεθος εκφράζεται από τη μαγνητική ροπή μ .

Το άνυσμα της μαγνητικής ροπής μ μέσα ένα μαγνητικό πεδίο H_0 μπορεί να πάρει $2I+1$ προσανατολισμούς.

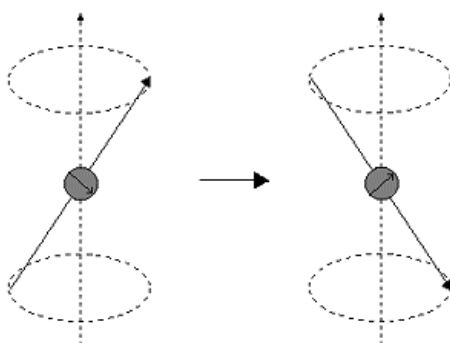
Στη φασματοσκοπία **NMR** οι πυρήνες που δίνουν αξιοποιήσιμα σήματα είναι αυτοί με κβαντικό αριθμό $I = \frac{1}{2}$.

Κβαντικός αριθμός Spin ανάλογα με τον πυρήνα			
Αριθμός Πρωτονίων	Αριθμός Νετρονίων	Κβαντικός αριθμός Spin	Παράδειγμα
Άρτιος	Άρτιος	0	^{12}C , ^{16}O , ^{32}S
Περιττός	Άρτιος	1/2	^1H , ^{19}F , ^{31}P
"	"	3/2	^{11}B , ^{35}Cl , ^{79}Br
Άρτιος	Περιττός	1/2	^{13}C
"	"	3/2	^{127}I
"	"	5/2	^{17}O
Περιττός	Περιττός	1	^2H , ^{14}N

Τέτοιοι πυρήνες όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα είναι ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P . Αυτοί οι πυρήνες μπορούν να λάβουν $2I+1 = 2$ επιτρεπτές ενεργειακές καταστάσεις: $+1/2$ και $-1/2$. Στην πρώτη κατάσταση (χαμηλής ενέργειας) τα άνωσμα της μαγνητικής ροπής είναι παράλληλο με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Στη δεύτερη περίπτωση (υψηλής ενέργειας) τα άνωσμα της μαγνητικής ροπής είναι αντιπαράλληλο με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο.



Για τη μετάβαση από τη θεμελιώδη στη διεγερμένη κατάσταση απαιτείται απορρόφηση ενέργειας μέσω ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με μήκος κύματος στην περιοχή των βραχέων ραδιοκυμάτων.



Η ενέργεια αυτή δίνεται από το τύπο:

$$\Delta E = \gamma \cdot H_0 \cdot \frac{h}{2\pi}$$

Όπου γ = γυρομαγνητικός λόγος (χαρακτηριστικός για κάθε πυρήνα)

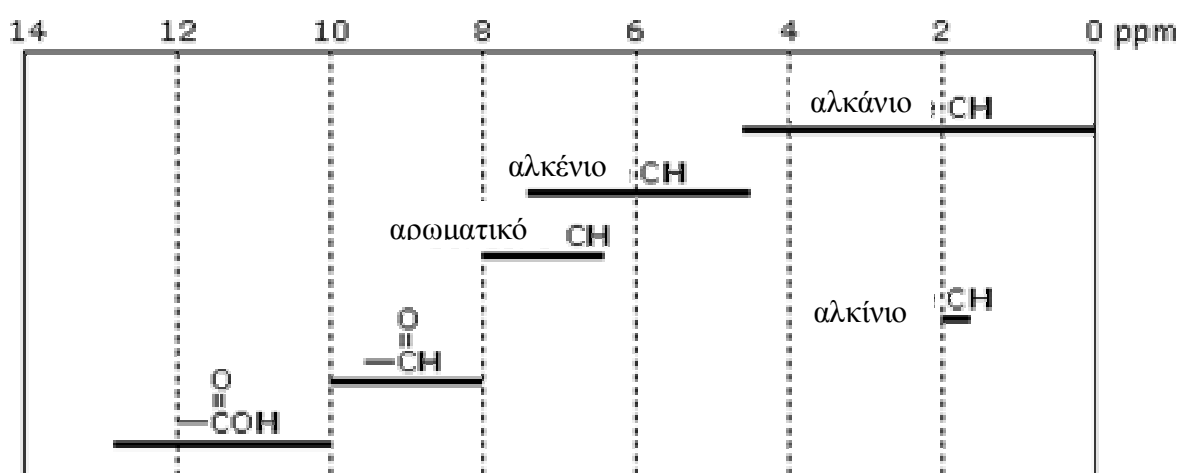
H_0 = ένταση εξωτερικού μαγνητικού πεδίου

h = σταθερά του **Planck**

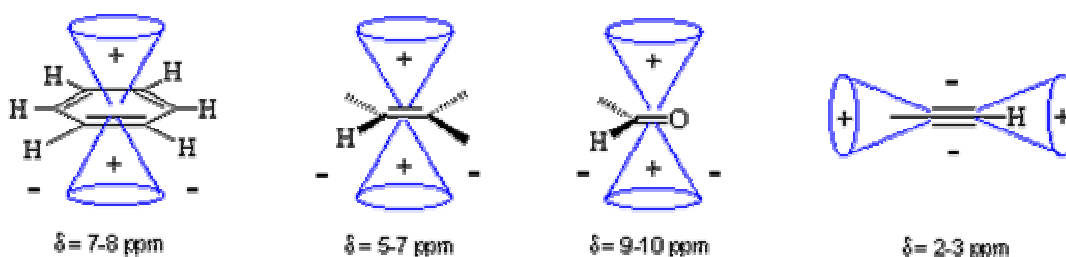
Η διαφορά ενέργειας ΔE μεταξύ των δυο καταστάσεων περιστροφής είναι πολύ μικρή. Αυτή είναι και η αιτία που η φασματοσκοπία **NMR** έχει τη μικρότερη ευαισθησία από όλες τις άλλες φασματοσκοπικές μεθόδους.

Χημική μετατόπιση

Η μεγάλη χρησιμότητα της φασματοσκοπίας **NMR** στη διερεύνηση της δομής των οργανικών ενώσεων έγκειται στο ότι όλοι οι ομοειδείς πυρήνες σε ένα μόριο δεν συντονίζονται ακριβώς στην ίδια συχνότητα, αλλά υπάρχει μεταξύ τους μια μικρή διαφορά οφειλόμενη στο διαφορετικό χημικό περιβάλλον του καθενός. Στην πραγματικότητα κάθε πυρήνας δεν δέχεται μόνο την επίδραση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου H_0 αλλά δέχεται και την επίδραση του αντίθετου εξ επαγωγής μαγνητικού πεδίου που προκαλείται από τα ηλεκτρόνια που τον περιβάλλουν. Όμως η ηλεκτρονιακή πυκνότητα γύρω από κάθε πυρήνα εξαρτάται από το είδος των ατόμων και των δεσμών στο γειτονικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα κάθε πυρήνας να έχει μια ελαφρά διαφορετική συχνότητα συντονισμού. Το γεγονός αυτό έχει πολύ μεγάλη σημασία γιατί από τη συχνότητα συντονισμού (που για διευκόλυνση τη μετατρέπουμε σε χημική μετατόπιση δ) μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για τη δομή μιας ουσίας. Παρατίθεται ενδεικτικός πίνακας με τις τιμές δ για διάφορες χαρακτηριστικές ομάδες.



Ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη χημική μετατόπιση ενός πρωτονίου είναι η μαγνητική ανισοτροπία των δεσμών. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται με (+) ή (-) οι περιοχές (κώνοι) προστασίας ή αποπροστασίας που προκαλούν τα ηλεκτρόνια των δεσμών. Τα επαγόμενα μαγνητικά πεδία που δημιουργούνται από αυτά τα ηλεκτρόνια έχουν ανισότροπη κατανομή σε σχέση με τον άξονα του δεσμού και έτσι για παράδειγμα εξηγείται γιατί τα πρωτόνια του τριπλού δεσμού είναι πιο θωρακισμένα από τα πρωτόνια του διπλού δεσμού.



Ορισμός της χημικής μετατόπισης

Ορίζουμε σαν χημική μετατόπιση τη διαφορά στη συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα από τη συχνότητα συντονισμού μιας ουσίας αναφοράς.

Ως ουσία αναφοράς χρησιμοποιείται το TMS ($\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, τετραμεθυλοσιλάνιο). Η ουσία αυτή είναι χημικά ανενεργή, απομακρύνεται εύκολα καθότι έχει χαμηλό σ.ζ, και δίνει στα φάσματα μια απλή κορυφή σε συχνότητα συντονισμού που δεν επικαλύπτει τα σήματα των συνήθων οργανικών ενώσεων.

Η χημική μετατόπιση μπορεί να εκφραστεί σε μονάδες συχνότητας (Hz) όμως αυτό δεν είναι πρακτικό. Προκειμένου η χημική μετατόπιση να έχει πιο πρακτικές μονάδες και να είναι ανεξάρτητη από τη ένταση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου κάθε συσκευής καθιερώθηκε να εκφράζεται ως δ σύμφωνα με την εξής σχέση:

$$\delta = \frac{\text{διαφορά στη συχνότητα συντονισμού του πυρήνα από το TMS}}{\text{συχνότητα λειτουργίας οργάνου}} \times 10^6 \text{ (ppm)}$$

Παλαιότερα είχε χρησιμοποιηθεί η κλίμακα τ ($\tau=10-\delta$), όμως σήμερα ισχύει διεθνώς η κλίμακα δ .

Η χημική μετατόπιση έχει διαφορετικό εύρος τιμών ανάλογα με τον πυρήνα στον οποίο αναφέρεται. Για το ^1H η περιοχή είναι **0-18 ppm** και για τον ^{13}C **0-220 ppm** με το TMS να βρίσκεται αντίστοιχα στο **0** της κάθε κλίμακας.

Spin-Spin σύζευξη

Εκτός από τη χημική μετατόπιση, πολύ σημαντικά στοιχεία για τη δομή μιας ουσίας μας δίνει και το φαινόμενο της σύζευξης (**spin-spin coupling**). Σε ένα φάσμα NMR μια κορυφή που αντιστοιχεί σε ένα είδος πυρήνων (με το ίδιο χημικό περιβάλλον) μπορεί να είναι πολλαπλή. Αυτό οφείλεται στην αλληλεπίδραση των **spin** γειτονικών πυρήνων (μέσω των δεσμών). Ο αριθμός της πολλαπλότητας μιας κορυφής είναι **n+1**, όπου **n** ο αριθμός των ισοδύναμων γειτονικών πυρήνων. Η απόσταση σε Hz (όχι σε ppm) μεταξύ των πολλαπλών κορυφών ενός σήματος ονομάζεται σταθερά σύζευξης και συμβολίζεται με **J**. Η τιμή του **J** είναι ανεξάρτητη του H_0 και εξαρτάται από το είδος των πυρήνων που αλληλεπιδρούν, από την απόστασή τους σε δεσμούς, από το χημικό τους περιβάλλον και από τη μεταξύ τους γωνία.

Επειδή η σταθερά σύζευξης έχει ακριβώς την ίδια αριθμητική τιμή μόνο για τους πυρήνες που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, μπορούμε από τη μελέτη των σταθερών σύζευξης να βρούμε ποιοι πυρήνες γειτνιάζουν με ποιούς.

Όταν ένα είδος πυρήνων δεν έχει δίπλα του γειτονικούς πυρήνες με τους οποίους να μπορεί να αλληλεπιδράσει τότε εμφανίζεται ως απλή κορυφή.

Δυο πυρήνες ονομάζονται χημικά ισοδύναμοι όταν έχουν το ίδιο χημικό περιβάλλον και την ίδια χημική μετατόπιση, ενώ μαγνητικά ισοδύναμοι εκείνοι που έχουν τις ίδιες σταθερές σύζευξης με όλους τους γειτονικούς πυρήνες.

Όταν έχουμε μια πολλαπλή κορυφή, η χημική μετατόπιση θεωρούμε ότι αντιστοιχεί ακριβώς στο μέσο της.

Ολοκλήρωση

Ένα πολύ σημαντικό στοιχείο που προκύπτει από τη μελέτη των φασμάτων NMR είναι η ολοκλήρωση. Όλα τα πρωτόνια ενός μορίου που έχουν το ίδιο χημικό

περιβάλλον (δηλ. εμφανίζονται στην ίδια χημική μετατόπιση) ανήκουν στην ίδια κορυφή. Ολοκλήρωση της κάθε κορυφής (δηλ. μέτρηση του εμβαδού) μπορεί να μας δείξει την αναλογία των πρωτονίων που αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή. Αν τώρα γνωρίζουμε το μοριακό βάρος ή το μοριακό τύπο με τη βοήθεια κάποιας άλλης τεχνικής, μπορούμε να υπολογίσουμε πόσα ακριβώς πρωτόνια και πόσων διαφορετικών ειδών υπάρχουν στο υπο μελέτη μόριο.

Φάσματα ^{13}C - NMR

Αν και μόνο το **1,1%** του φυσικού άνθρακα αποτελείται από ^{13}C , τα φάσματα ^{13}C είναι σήμερα απαραίτητα για την πλήρη φασματοσκοπική μελέτη ενός προϊόντος. Η μικρή περιεκτικότητα στο ισότοπο που δίνει σήμα στο NMR (σε αντίθεση με το ^1H που είναι το **>99%** του φυσικού υδρογόνου) κάνει τη φασματοσκοπία ^{13}C πολύ λιγότερο ευαίσθητη σε σχέση με τη φασματοσκοπία ^1H . Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα ή μεγαλύτερος χρόνος για τη λήψη ενός ικανοποιητικού φάσματος. Είναι αξιοσημείωτο ότι ένα φάσμα ^1H μπορεί να ληφθεί σε λίγα δευτερόλεπτα (ή το πολύ λίγα λεπτά) και σε ποσότητες έως και λιγότερο από **0,5 mg**, ένα φάσμα ^{13}C σε ποσότητα **3-4 mg** μπορεί να χρειαστεί **24-48** ώρες.

Τα φάσματα ^{13}C στην πραγματικότητα είναι πολύ περίπλοκα λόγω της **spin-spin** σύζευξης ^{13}C - ^1H . Οι συζεύξεις ^{13}C - ^{13}C λόγω της μικρής περιεκτικότητας του ισότοπου δεν παρατηρούνται στο φάσμα. Για να απλουστευθούν τα φάσματα του άνθρακα πραγματοποιείται μια διαδικασία που ονομάζεται ετεροπυρηνική αποσύζευξη. Μετά από αυτή τη διαδικασία κάθε πυρήνας άνθρακα του υπο μελέτη μορίου εμφανίζεται στο φάσμα ως απλή κορυφή. Απλά μετρώντας τον αριθμό των κορυφών μπορούμε να βρούμε τον αριθμό των ανθράκων του μορίου.

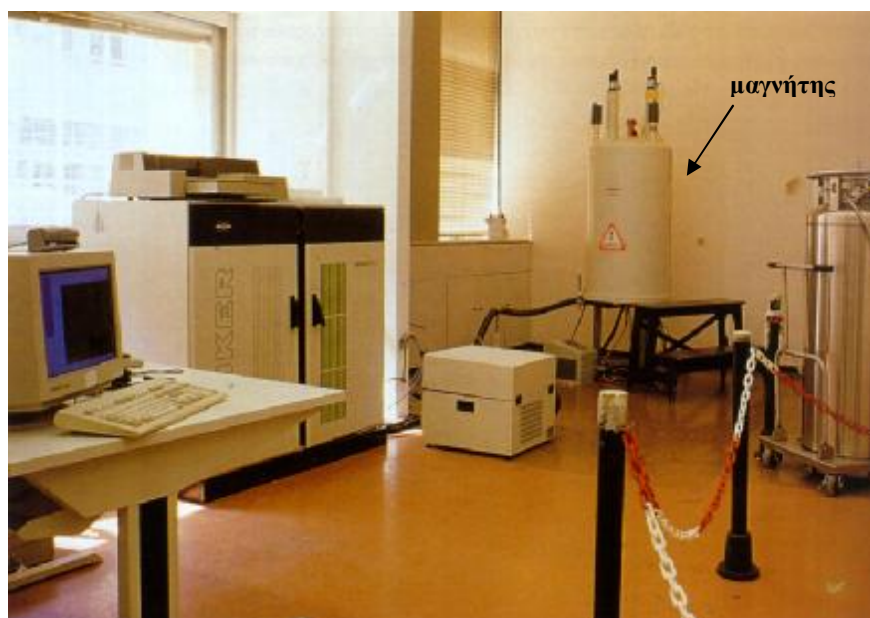
Φάσματα δύο διαστάσεων

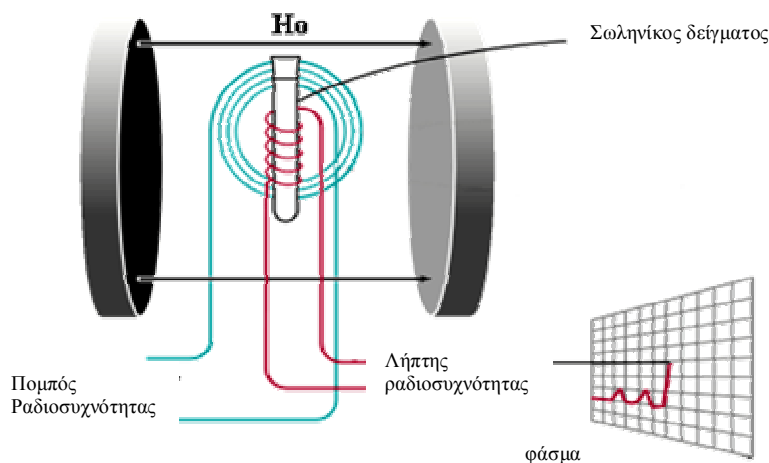
Όσα αναφέρθηκαν παραπάνω αφορούν φάσματα που ονομάζονται μιας διάστασης δηλαδή αποτελούνται μόνο από έναν άξονα χημικής μετατόπισης. Σήμερα

χρησιμοποιούνται ευρύτατα τα φάσματα δύο διαστάσεων τα οποία δίνουν και το μεγαλύτερο αριθμό πληροφοριών για τη δομή ενός μορίου.

Τα φάσματα δυο διαστάσεων αποτελούνται από δύο άξονες χημικής μετατόπισης με το ίδιο ή διαφορετικό είδος πυρήνων. Στα φάσματα αυτά παρατηρούμε κορυφές συσχέτισης μεταξύ δυο πυρήνων. Τα φάσματα δύο διαστάσεων μπορεί να είναι ομοπυρηνικά (**COSY**, **NOESY**, **TOCSY**, κτλ) ή ετεροπυρηνικά (**HMQC**, **HMBC** κτλ). Για παράδειγμα το φάσμα **COSY** μας δείχνει συσχέτιση μεταξύ των πυρήνων υδρογόνου που βρίσκονται πάνω σε γειτονικούς άνθρακες, ενώ το φάσμα **NOESY** μας δείχνει συσχέτιση μεταξύ πυρήνων υδρογόνου που βρίσκονται σε απόσταση στο χώρο μικρότερη από 3Å. Το φάσμα **HMQC** μας δείχνει συσχέτιση μεταξύ των πυρήνων υδρογόνου και άνθρακα που συνδέονται μεταξύ τους με ένα δεσμό ενώ το φάσμα **HMBC** μεταξύ των πυρήνων που συνδέονται με τρεις δεσμούς.

Οργανολογία





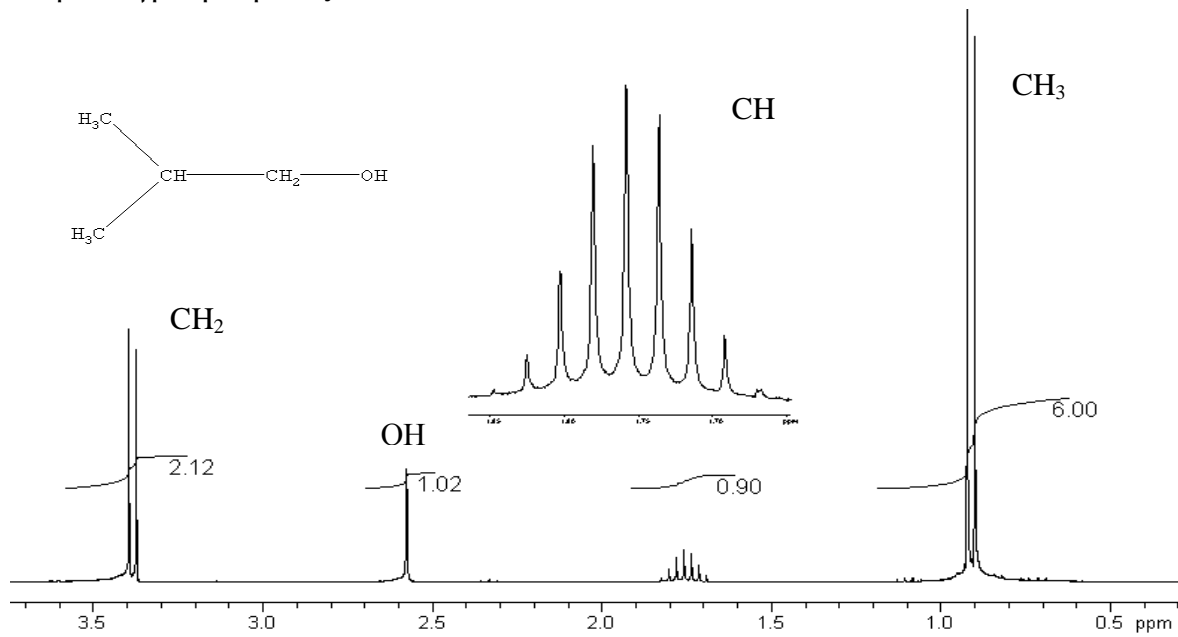
Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα ένα σύστημα φασματοσκοπίας **NMR** αποτελείται επιγραμματικά από

- Ένα ισχυρό μαγνήτη
- Ένα σύστημα εισαγωγής του δείγματος εντός του μαγνητικού πεδίου
- Ένα πομπό ραδιοσυχνότητας
- Ένα λήπτη ραδιοσυχνότητας
- Ένα ηλεκτρονικό σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας του σήματος.

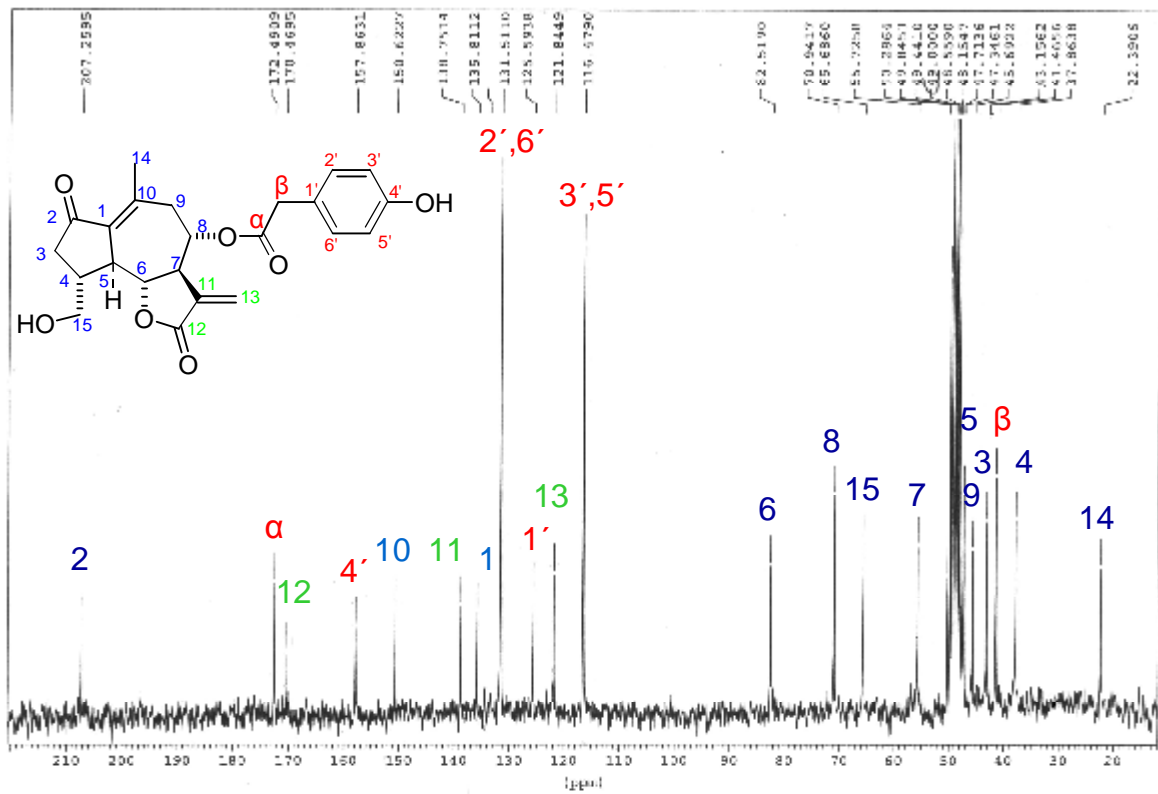
Τρόπος εισαγωγής δείγματος

Το δείγμα διαλύεται σε δευτεριωμένο διαλύτη όγκου περίπου **0,5 ml** και τοποθετείται εντός ειδικού σωληνίσκου. Αυτός συγκρατούμενος από ειδικό υποδοχέα κατέρχεται εντός του μαγνήτη με την βοήθεια πιεσμένου αέρα. Στη φασματοσκοπία **NMR** οι ουσίες διαλύονται υποχρεωτικά σε δευτεριωμένους διαλύτες, δηλαδή διαλύτες στους οποίους το υδρογόνο έχει αντικατασταθεί από δευτέριο (2H). Αυτό γίνεται για να μην παρεμποδίζεται παρατήρηση των υδρογόνων της διαλυμένης ουσίας από την πληθώρα των πυρήνων υδρογόνου που προέρχονται από το διαλύτη.

Παράδειγμα φάσματος $^1\text{H-NMR}$



Παράδειγμα φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$



5.4. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

Η φασματομετρία μάζας είναι μια πολύ σπουδαία τεχνική για τη μελέτη των φυσικών προϊόντων. Τυπικά εξετάζεται μαζί με τις φασματοσκοπικές τεχνικές αλλά διαφέρει ουσιωδώς απ' αυτές καθ'ότι δεν χρησιμοποιεί κάποια ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Η αρχή της φασματομετρία μάζας είναι η παραγωγή ιόντων (με διάφορους τρόπους) τα οποία στη συνέχεια ευρισκόμενα στην αέρια φάση και σε υψηλό κενό διαχωρίζονται και καταγράφονται με βάση το λόγο της μάζας τους προς το φορτίο τους (m/z).

Η κυριώτερη εφαρμογή της φασματομετρίας μάζας είναι ο καθορισμός του μοριακού βάρους μιας ουσίας. Ορισμένες εφαρμογές της φασματομετρίας μάζας επιτρέπουν τον ακριβή προσδιορισμό του μοριακού τύπου ενώ άλλες μέσω της καταγραφόμενης θραυσματοποίησης οδηγούν σε συμπεράσματα για τη δομή μιας ουσίας.

Οργανολογία

Οι βασικές λειτουργίες ενός φασματογράφου μάζας είναι οι εξής:

- Παραγωγή ιόντων
- Διαχωρισμός ιόντων με βάση το λόγο μάζα προς φορτίο
- Ανίχνευση και καταγραφή των ιόντων και επεξεργασία από ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Τα βασικά τμήματα ενός φασματομέτρου μάζας είναι τα εξής:

- Σύστημα εισαγωγής δείγματος
- Θάλαμος ιονισμού
- Πηγή ηλεκτρονίων με θερμαινόμενο μεταλλικό νήμα
- Επιταχυντής ηλεκτρονίων
- Αναλυτής μαζών
- Καταγραφέας ιόντων

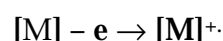
Οι τύποι αναλυτών που υπάρχουν στα φασματομέτρα είναι:

- Μαγνητικής εκτροπής. Αυτός αποτελείται από μαγνητικό πεδίο το οποίο εκτρέπει τα φορτισμένα σωματίδια από την τροχιά τους οδηγώντας τα σε κυκλική τροχιά
- Υψηλής ανάλυσης (**High resolution**). Σε αυτόν τον τύπο αναλυτή εκτός από το μαγνητικό πεδίο έχουμε και εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Οι αναλυτές αυτοί μπορούν να διαχωρίσουν ιόντα με πολύ παραπλήσια μάζα και να τα καταγράψουν με ακρίβεια έως και 4^ο δεκαδικού ψηφίου. Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους με τόσο υψηλή ακρίβεια μας επιτρέπει να υπολογίσουμε τον μοριακό τύπο της ουσίας. Σε αυτή την περίπτωση το μοριακό βάρος της ουσίας υπολογίζεται πρώτα θεωρητικά χρησιμοποιώντας τα ατομικά βάρη με υψηλή ακρίβεια 4^ο δεκαδικού ψηφίου.
- Τετραπολικός αναλυτής (**Quadrupole**). Τα ιόντα περνάνε από ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο το οποίο δημιουργείται από 4 ράβδους που διαγώνια τροφοδοτούνται με υψίσυχη εναλλασσόμενη αλλά και συνεχή τάση. Τα ιόντα περνάνε διαμέσου των ράβδων και αυτό εξαρτάται από τις μεταβολές του ρεύματος. Οι αναλυτές αυτοί καταγράφουν ιόντα μέχρι **m/z 1000** με μικρή διαχωριστική ικανότητα.

Μέθοδοι παραγωγής ιόντων

*Βομβαρδισμός με δέσμη ηλεκτρονίων, **Electron impact (EI)***

Τα ιόντα παράγονται κατά τον βομβαρδισμό των μορίων με δέσμη ηλεκτρονίων. Τα ηλεκτρόνια παράγονται στον θάλαμο ιονισμού από θερμαινόμενο μεταλλικό νήμα και έχουν δυναμικό της τάξεως των **70 eV**. Το δυναμικό αυτό είναι αρκετό για να αποσπάσει ένα ηλεκτρόνιο από το υπο μελέτη μόριο και να το μετατρέψει σε θετικά φορτισμένο μοριακό ιόν:



Το μοριακό ιόν $[M]^+$ λόγω του μεγάλου ενεργειακού του φορτίου διασπάται στη συνέχεια σε επιμέρους θετικά φορτισμένα ιόντα. Όλα τα ιόντα καταγράφονται και μας δίνουν το φάσμα μάζας. Το μοριακό ιόν μας δείχνει απευθείας το μοριακό βάρος

της ουσίας. Τα επιμέρους θραύσματα μας δίνουν πληροφορίες για τη δομή. Όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος EI το μοριακό ιόν είναι συνήθως μικρό και πολλές φορές δυσδιάκριτο γι' αυτό και με αυτή τη μέθοδο δεν μπορούμε να είμαστε πάντα βέβαιοι για το ΜΒ. Όσον αφορά τα υπόλοιπα ιόντα πρέπει να τονισθεί ότι η μέθοδος EI μας δίνει την πλουσιότερη και πιο επαναλήψιμη θραυσματοποίηση η οποία μάλιστα είναι χαρακτηριστική για κάθε ουσία. Ειδικά προγράμματα επεξεργασίας φασμάτων μάζας σε συνδυασμό με ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες φασμάτων μάζας επιτρέπουν την ταχύτατη ταυτοποίηση μιας ουσίας με βάση τη θραυσματοποίηση της, η οποία χρησιμοποιείται σαν δακτυλικό αποτύπωμα.

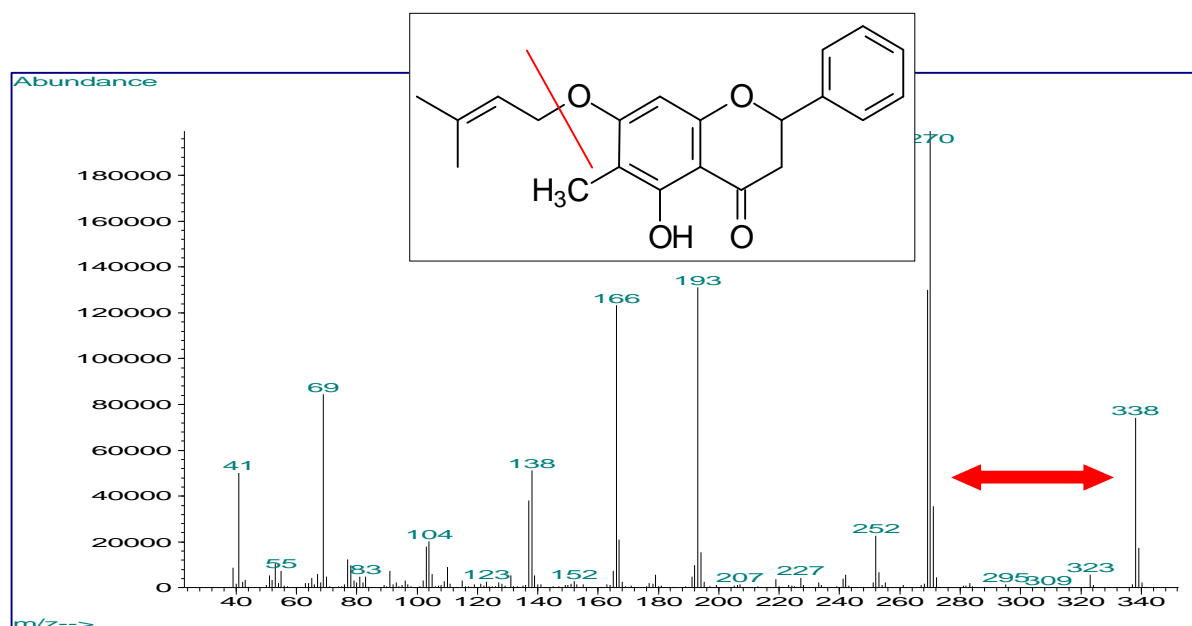
Η ένταση των κορυφών σε ένα φάσμα μάζας εκφράζεται σαν σχετική ένταση % με βάση την κορυφή με τη μεγαλύτερη ένταση που λαμβάνεται ίση με **100** και καλείται βασική κορυφή:

$$\text{Σχετική ένταση\%} = \alpha / \beta \times 100$$

α = η ένταση μιας κορυφής

β = η ένταση της βασικής κορυφής.

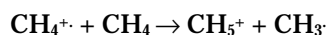
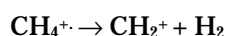
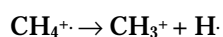
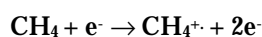
ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣ EI-MS



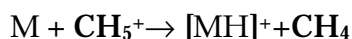
Χημικός ιονισμός, **Chemical ionization (CI)**

Στη μέθοδο αυτή η δέσμη των ηλεκτρονίων δεν βομβαρδίζει απ'ευθείας τα μόρια της ουσίας αλλά τα μόρια κάποιου αερίου (CH_4 , NH_3 , ισοβουτάνιο). Το αέριο εισέρχεται στο θάλαμο ιονισμού και από αυτό παράγονται θετικά ιόντα τα οποία στη συνέχεια αντιδρούν με τα μόρια της υπο μελέτη ουσίας σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα:

Περίπτωση CH_4 :

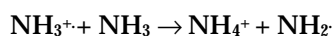
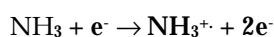


Το ιόν CH_5^+ είναι εκείνο το οποίο εμφανίζεται με τη μεγαλύτερη συχνότητα και το οποίο αντιδρά με την υπό εξέταση ουσία ως εξής:

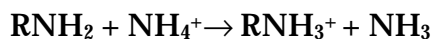


Το ιόν $[\text{MH}]^+$ ονομάζεται ψευδομοριακό ιόν και αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος αυξημένο κατά μια μονάδα. Συνήθως αυτό είναι το πιο άφθονα παρατηρούμενο ιόν, ανάλογα όμως με τη δομή της ουσίας μπορεί να παρατηρηθούν και τα ιόντα M-1 (πχ για κορεσμένους υδρογονάνθρακες) ή M+15 (για μόρια με πολικές ομάδες).

Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται αέρια NH_3 έχουμε το παρακάτω σχήμα αντιδράσεων:



Το ιόν NH_4^+ αντιδρά με το μόριο της υπο μελέτη ουσίας δίνοντας το ψευδομοριακό ιόν $[\text{MNH}_4]^+$ το οποίο αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος M+18. Ειδικά στην περίπτωση που το μόριο περιέχει μια αμινομάδα τότε γίνεται η εξής αντίδραση:



Οπότε το ψευδομοριακό ιόν είναι το RNH_3^+ που αντιστοιχεί σε MB = M+1

FAB (Fast atom Bombardment)

Στην τεχνική αυτή γίνεται βομβαρδισμός από δέσμη ταχέως κινουμένων ουδέτερων ατόμων. Χρησιμοποιείται για λήψη φασμάτων από ουσίες οι οποίες είναι πολικές και διαλύονται σε διαλύτες όπως η γλυκερίνη. Χρησιμοποιούνται αδρανή αέρια για την

παραγωγή των ιόντων της υπό μελέτη ουσίας πχ το **Ar**. Τα ιόντα τα οποία παράγονται (**Ar+**) συγκρούονται με άλλη δέση ουδετέρων ατόμων **Ar** και ανταλλάσσουν φορτίο. Έτσι δημιουργούνται ταχέως κινούμενα ουδέτερα άτομα τα οποία έρχονται σε επαφή με το διάλυμα της υπό εξέταση ουσίας. Η σύγκρουση οδηγεί στη παραγωγή ιόντων τα οποία καταγράφονται. Με αυτή την τεχνική μπορούμε να καταγράψουμε το ψευδομοριακό ιόν ουσιών που είναι πολύ πολικές, θερμοευαίσθητες και μη πτητικές (πχ γλυκοσίδες).

LD (Laser desorption). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί παλμούς **Laser**.

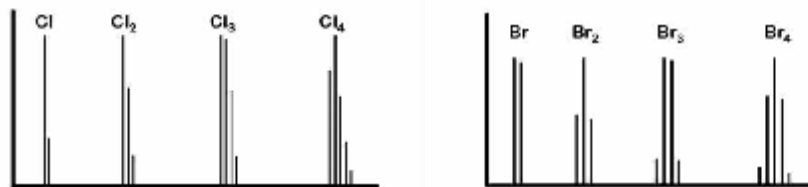
ES (Electrospray)

Είναι πολύ πρόσφατη τεχνική και συνίσταται στη χρησιμοποίηση ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου (**3-7 KV**) υπό ατμοσφαιρική πίεση η οποία εφαρμόζεται στο διάλυμα της υπο εξέταση ουσίας.

Ισοτοπικές κορυφές

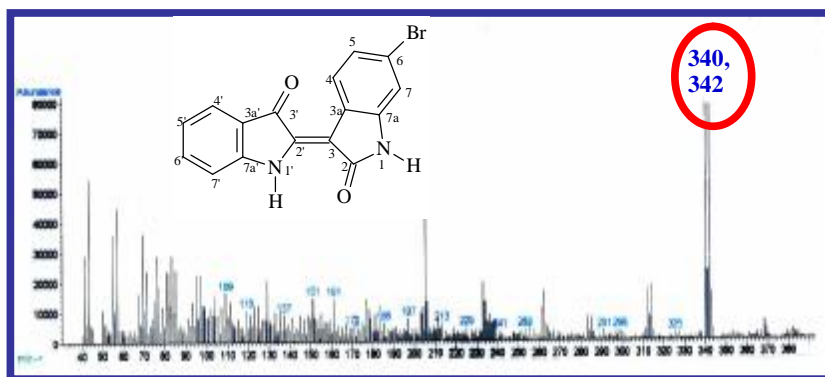
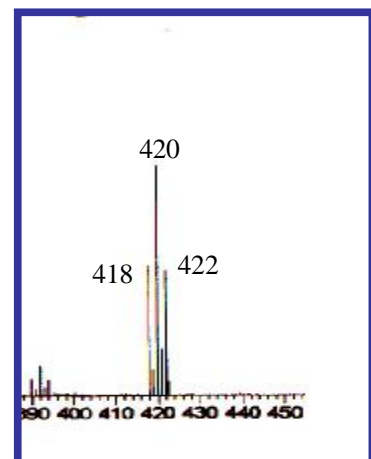
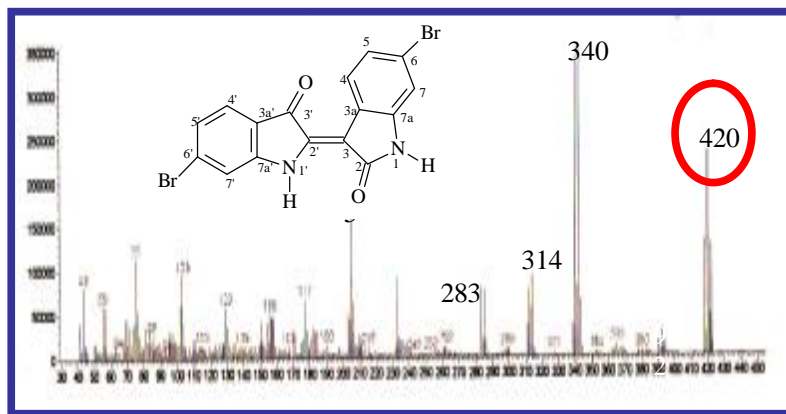
Δίπλα σε κάθε κορυφή του φάσματος **M** παρατηρούνται οι κορυφές **M+1** και **M+2** με μικρότερη ένταση οι οποίες αντιστοιχούν στα ισότοπα βαρύτερα κατά **1** και **2** μονάδες μάζας. Οι εντάσεις αυτών των κορυφών καθορίζονται από την αναλογία του ισότοπου και του κανονικού στοιχείου. Έτσι το ²H υπάρχει σε ποσοστό **0.015%**, ο ¹³C σε ποσοστό **1.1%**, το ¹⁷O σε ποσοστό **0.04%** και επομένως για ένα μόριο που περιέχει μόνο αυτά τα στοιχεία το **M+1** είναι πολύ μικρό. Δεν συμβαίνει όμως το ίδιο για μόρια που περιέχουν **Cl**, **Br** ή **S**. Τα ισότοπα ³⁵Cl και ³⁷Cl υπάρχουν σε αναλογία **3:1** με αποτέλεσμα η κορυφή **M** και η ισοτοπική κορυφή **M+2** εμφανίζεται με αναλογία **3:1**. Ακόμα πιο χαρακτηριστική είναι η περίπτωση του βρωμίου για τα οποία τα ισότοπα ⁷⁹Br και ⁸¹Br εμφανίζονται με αναλογία **1:1** με αποτέλεσμα η κορυφή **M** και η ισοτοπική κορυφή **M+2** να εμφανίζεται με αναλογία **1:1**. Για το Θείο η αναλογία είναι πολύ μικρότερη αλλά αρκετά χαρακτηριστική (βλ. Παρακάτω πίνακα).

^{16}O	100	^{18}O	0.2
^{32}S	100	^{33}S	0.8
^{34}S		^{36}S	4.4
^{35}Cl	100	^{37}Cl	32.5
^{79}Br	100	^{81}Br	98



Μορφή κορυφής μοριακού ιόντος ανάλογα με τον αριθμό των περιεχομένων ατόμων χλωρίου ή βρωμίου.

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΚΑΝΟΝΑ ΙΣΟΤΟΠΩΝ



Κανόνας του αζώτου

Το μοριακό ιόν M^+ υπακούει στον κανόνα του αζώτου σύμφωνα με τον οποίο οργανικές ενώσεις με άρτιο ΜΒ περιέχουν μηδενικό ή άρτιο αριθμό ατόμων αζώτου ενώ οργανικές ενώσεις με περιττό ΜΒ έχουν περιττο αριθμό ατόμων αζώτου. Ο κανόνας ισχύει για τις ενώσεις που περιέχουν κάθε δυνατό συνδυασμό των ατόμων **C, H, N, O, S, Si, As, P**, αλογόνα δηλαδή πρακτικά για όλα τα φυσικά προϊόντα.

6. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η χρωματογραφία είναι μια πολύ σπουδαία μέθοδος ανίχνευσης, διαχωρισμού και καθαρισμού των φυσικών προϊόντων και γενικότερα των οργανικών ενώσεων.

Η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται από την αλληλεπίδραση (με διάφορους μηχανισμούς) των συστατικών ενός μίγματος με δυο μη μιγνυόμενες φάσεις. Η μια από αυτές ονομάζεται στατική και μπορεί να είναι στερεή ή υγρή και η άλλη ονομάζεται κινητή και μπορεί να είναι υγρή ή αέρια.

Οι διάφοροι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης μεταξύ των συστατικών του μίγματος και της στατικής ή της κινητής φάσης είναι η προσρόφηση, η κατανομή, η ιοντοανταλλαγή και ο μοριακός αποκλεισμός.

Ανάλογα με το μηχανισμό αλληλεπίδρασης και ανάλογα με τη φύση της στατικής ή της κινητής φάσης οι ουσίες διαχωρίζονται με βάση την πολικότητα, την πιητικότητα, το μοριακό βάρος, ή το ηλεκτρικό φορτίο.

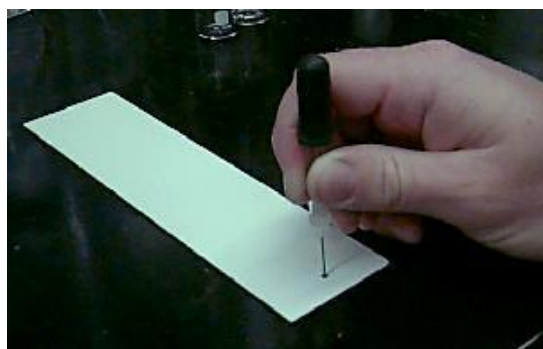
Υπάρχουν διάφορες εφαρμογές της χρωματογραφίας οι οποίες αναλύονται παρακάτω.

6.1. Χρωματογραφία επί λεπτής στοιβάδας (*thin layer chromatography, TLC*).

Πρόκειται για μια χρωματογραφική τεχνική η οποία στηρίζεται στο μηχανισμό της προσρόφησης και στην οποία η στατική φάση είναι στερεή και η κινητή υγρή. Συγκεκριμένα, σε αυτή τη χρωματογραφική τεχνική χρησιμοποιούνται γυάλινες ή αλουμινένιες πλάκες επιστρωμένες με μια λεπτή στοιβάδα στατικής φάσης. Η στατική φάση συνήθως είναι γέλη πυριτίου ή λιγότερο συχνά οξείδιο αργιλίου, κυτταρίνη κτλ. Η στατική φάση υπό τη μορφή ομοιογενούς υγρού επιστρώνεται στην πλάκα με τη βοήθεια ειδικής συσκευής και κατόπιν τοποθετείται σε κλίβανο για ενεργοποίηση. Η διαδικασία αυτή συνήθως παρακάμπτεται με την προμήθεια έτοιμων προεπιστρωμένων πλακών σταθερής ποιότητας και πάχους.

Σε ένα φαρμακογνωστικό εργαστήριο η **TLC** είναι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη χρωματογραφική τεχνική επειδή είναι γρήγορη, απλή, φθηνή και αποτελεσματική.

Το διάλυμα του υπο εξέταση δείγματος τοποθετείται υπο τη μορφή κηλίδας στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου **2 cm**. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια εντός αεροστεγούς θαλάμου στον οποίο έχει ήδη εισαχθεί κατάλληλο σύστημα διαλυτών σε ύψος κάτω από αυτό της κηλίδας.



Οι διαλύτες πρέπει να έχουν τοποθετηθεί εντός του θαλάμου τουλάχιστον **10 min** πριν την τοποθέτηση της πλάκας ώστε να έχει κορεσθεί ο υπερκείμενος χώρος από τους ατμούς των διαλυτών.

Ακολούθως ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων (περίπου **10-20 min**, ανάλογα με το ύψος της πλάκας) μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας. Ύστερα, η πλάκα αποσύρεται και στεγνώνεται με ρεύμα αέρα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπο εξέταση δείγμα μετακινούνται επι της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητα τους και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (**254** ή **356 nm**) ή μετά από ψεκασμό με ειδικά αντιδραστήρια. Από το χρώμα των κηλίδων στο ορατό, από την απορρόφηση στο υπεριώδες και ανάλογα με το χρησιμοποιηθέν αντιδραστήριο ψεκασμού μπορεί να εξαχθούν συμπεράσματα για την κατηγορία των ουσιών που παρατηρούμε (φλαβονοειδές, αλκαλοειδές, σάκχαρο κτλ). Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια εμφάνισης είναι: διάλυμα θειικής βανιλίνης*,

* Συνταγή: Διάλυμα 5g βανιλίνης σε 100 ml μεθανόλης αναμειγνύεται λίγο πριν τη χρήση με ίσο όγκο διαλύματος 5% θειικού οξέος σε μεθανόλη

αντιδραστήριο **Dragendorff** (ειδικό για αλκαλοειδή), διάλυμα ανισαλδεύδης, διάλυμα θειικού οξέος.

ΣΥΓΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΣΗ

Για την ταυτοποίηση μιας ουσίας χρησιμοποιείται η τεχνική της συγχρωματογράφησης με πρότυπη ουσία. Το διάλυμα της υπο εξέταση ουσίας τοποθετείται επί της πλάκας και στη συνέχεια ακριβώς επί της κηλίδας αυτής τοποθετείται το διάλυμα της πρότυπης ουσίας. Αν μετά την ανάπτυξη παρατηρηθεί μόνο μια κηλίδα με ομοιόμορφη συμπεριφορά στην απορρόφηση και στην εμφάνιση τότε με πολύ μεγάλη πιθανότητα πρόκειται για την ίδια ουσία.

- Εναλλακτικά, αν δεν υπάρχει πρότυπη ουσία για συγχρωματογράφηση χρησιμοποιείται η φυσική σταθερά R_f (συντελεστής ανασχέσεως) (**retention factor**). Η σταθερά αυτή ορίζεται ως ο λόγος της αποστάσεως που διήνυσε ένα συστατικό προς την απόσταση που διήνυσε ο διαλύτης. Είναι χαρακτηριστική σταθερά μιας ουσίας για συγκεκριμένο σύστημα στατικής και κινητής φάσης.

Η TLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για εξαγωγή ημιοσοτικών δεδομένων. Συγκεκριμένα μπορεί να γίνει σύγκριση εμβαδού και εντάσεως χρώματος ή φθορισμού της υπο εξέταση ουσίας με διάφορες αραιώσεις συγχρωματογραφηθέντος προτύπου. Μεγαλύτερη ακρίβεια μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση πυκνομέτρου που καταγράφει (σαρώνει) την επιφάνεια της πλάκας.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ TLC

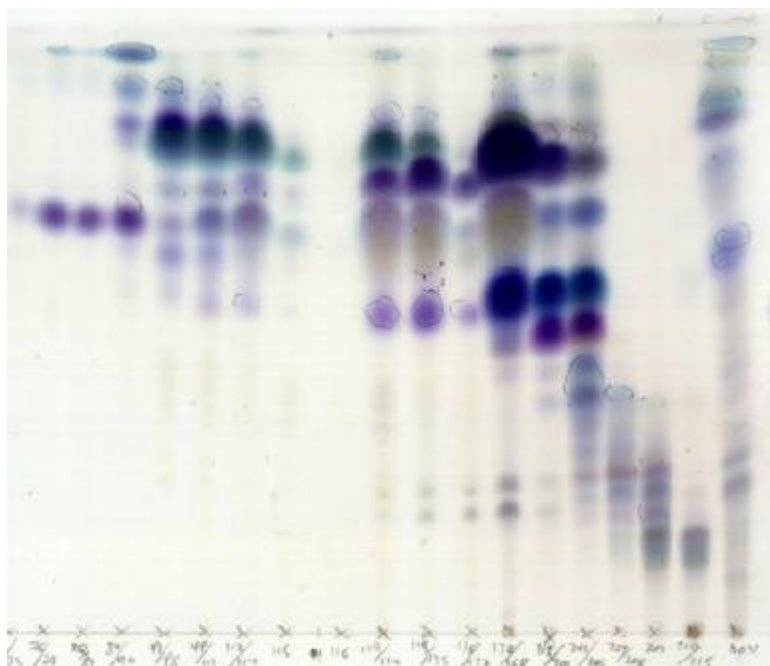
Η TLC εκτός από αναλυτικούς σκοπούς χρησιμοποιείται και για παρασκευαστικούς σκοπούς. Συγκεκριμένα η ζώνη της στατικής φάσης που φαίνεται ότι περιέχει την επιθυμητή ουσία μπορεί να αποξεσθεί από την επιφάνεια της πλάκας και να εκχυλισθεί με κατάλληλο διαλύτη. Η στατική φάση απομακρύνεται με διήθηση και η παραληφθείσα ουσία μπορεί να μελετηθεί με άλλες μεθόδους.

ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΙΝΗΤΗΣ-ΣΤΑΤΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ

Η σωστή ανάπτυξη του χρωματογραφήματος σε TLC και ο ικανοποιητικός διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της σωστής επιλογής του διαλύτη ανάπτυξης, του

προσροφητικού υλικού και της ποσότητας του δείγματος που τοποθετείται επί της πλάκας.

Σε πολική στατική φάση (πχ γέλη πυριτίου) η υπερβολική αύξηση της πολικότητας του μίγματος των διαλυτών οδηγεί σε συσσώρευση των κηλίδων στο άνω μέρος της πλάκας, ενώ η υπερβολική μείωση της πολικότητας εμποδίζει τις ουσίες να διχωριστούν καθώς τις κατακρατεί στη βάση της πλάκας. Επιτυχημένο μίγμα διαλυτών οδηγεί σε διάκριση όλων των κηλίδων. Τα συνηθέστερα μίγματα χρησιμοποιούμενων διαλυτών είναι: κυκλοεξάνιο με οξικό αιθυλεστέρα (για πιο άπολες ουσίες) και διχλωρομεθάνιο με μεθανόλη (για πιο πολικές ουσίες). Αύξηση της περιεκτικότητας του μίγματος σε οξικό αιθυλεστέρα ή μεθανόλη αντίστοιχα οδηγεί σε αύξηση της πολικότητας του μίγματος και συνεπώς μεγαλύτερη ανύψωση των κηλίδων.



Στην περίπτωση πολύ πολικών ουσιών χρησιμοποιούνται πλάκες επιστρωμένες με αλκυλιωμένο πυρίτιο (αντιστρόφου φάσεως, **reversed phase TLC**). Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιούνται μίγματα διαλυτών νερό με μεθανόλη ή νερό με ακετονιτρίλιο. Εδώ αύξηση της περιεκτικότητας σε μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο (που

αποτελούν το λιγότερο πολικό διαλύτη του μίγματος) οδηγεί σε μείωση της πολικότητας του μίγματος και σε μεγαλύτερη ανύψωση των κηλίδων.

Η χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας είναι πολύ στενά συνδεδεμένη με τη χρωματογραφία στήλης. Όλες οι δοκιμές για την επιλογή του συστήματος διαλυτών για τη χρωματογραφία στήλης πραγματοποιούνται αρχικά σε TLC. Επίσης η παρακολούθηση της πορείας έκλουσης των συστατικών από τη στήλη καθώς και το τι περιέχεται σε κάθε κλασμα της στήλης βρίσκεται με TLC.

6.1.1. Φυγόκεντρική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (*centrifugal thin layer chromatography, CTLC*)

Πρόκειται για μια ειδική εφαρμογή της TLC. Η τεχνική της φυγόκεντρου χρωματογραφίας στηρίζεται στη φυγόκεντρο δύναμη η οποία επιταχύνει την κινητή φάση δια μέσου ενός κυκλικού δίσκου. Ο δίσκος περιστρέφεται με υψηλή ταχύτητα (**800 rpm**) με ηλεκτρικό μοτέρ. Το δείγμα τοποθετείται στο κέντρο και ο διαλύτης κινείται κατά μήκος της στατικής φάσης. Η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί ως προς την TLC στην ταχύτητα ανάπτυξης και στην διαχωριστική ικανότητα ειδικά στην παρασκευαστική κλίμακα.

6.2. Χρωματογραφία επί χάρτου (*paper chromatography, PC*)

Στη μέθοδο αυτή το χρωματογράφημα πραγματοποιείται επί μιας λωρίδας ειδικού χαρτιού (**Whatman No1** ή **3 MM**). Όπως για την TLC έτσι και για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούμε ένα γυάλινο θάλαμο ο οποίος κλείνει αεροστεγώς με γυάλινη πλάκα. Ο θάλαμος έχει στηρίγματα και σκαφίδια για την τοποθέτηση των χρωματογραφημάτων. Σε μια απόσταση από την άκρη του χαρτιού τοποθετείται το υπο εξέταση δείγμα υπό μορφή κηλίδας. Εκλέγεται το κατάλληλο σύστημα ανάπτυξης ανάλογα με την πολικότητα των ουσιών και τοποθετείται στο σκαφίδιο του θαλάμου. Το χρωματογράφημα αναπτύσσεται είτε με ανιούσα είτε με κατιούσα φορά και στη συνέχεια αφήνεται να στεγνώσει. Η εμφάνιση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες ή μετά από ψεκασμό με αντιδραστήρια που δεν καταστρέφουν το χαρτί. Χρησιμοποιείται και εδώ το R_f των ουσιών καθώς και η σύγκριση τους με πρότυπες ουσίες. Αυτή η μέθοδος χρωματογραφίας χρησιμοποιείται για ελάχιστα καθώς έχει

αντικατασταθεί από την **TLC**, καθώς υστερεί στην ταχύτητα και στη διακριτική ικανότητα.

6.3. Χρωματογραφία στήλης

Η χρωματογραφία στήλης αποτελεί τον συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο τρόπο διαχωρισμού των φυσικών προϊόντων. Πρόκειται για μια τεχνική η οποία είναι απλή, φθηνή, ευέλικτη και συνήθως αποτελεσματική ειδικά στα πρώτα στάδια του καθαρισμού ενός μίγματος.

Όπως και στην περίπτωση της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας πρόκειται για μια χρωματογραφική τεχνική η οποία στηρίζεται στο μηχανισμό της προσρόφησης και στην οποία η στατική φάση είναι στερεή και η κινητή υγρή. Η διαφορά έγκειται στο ότι η στατική φάση τοποθετείται εντός γυάλινων σωλήνων (διαφόρων διαστάσεων μήκους και διαμέτρου) οι οποίοι καταλήγουν σε στρόφιγγα πάνω από την οποία υπάρχει πορώδες υλικό. Το πορώδες υλικό συγκρατεί τη στατική φάση και επιτρέπει τη διέλευση μόνο της υγρής κινητής φάσης.

Σαν στατική φάση χρησιμοποιείται συνήθως γέλη πυριτίου με μέγεθος κόκκου **63-200 μm** ή **40-63 μm**. (στη δεύτερη περίπτωση αποκαλείται χρωματογραφία **flash**).

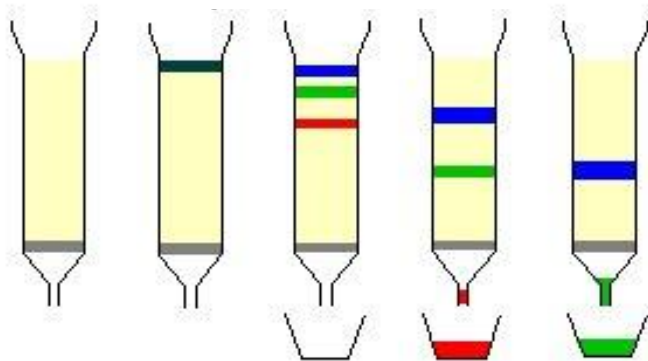
Η στατική φάση τοποθετείται εντός της στήλης με μορφή εναιωρήματος με τον αρχικό διαλύτη έκλουσης. Κατά την πλήρωση της στήλης απαιτείται προσοχή ώστε η στατική φάση να είναι ομοιόμορφη και απαλλαγμένη από φυσαλίδες αέρα ή ρωγμές. Η ποσότητα της στατικής φάσης που θα χρησιμοποιηθεί καθώς και η διάμετρος της στήλης εντός της οποίας θα τοποθετηθεί εξαρτάται από την ποσότητα του δείγματος που θα διαχωρισθεί.

Το προς ανάλυση δείγμα εισάγεται είτε υπό τη μορφή διαλύματος στην κορυφή της στήλης (εαν αυτό είναι διαλυτό στον αρχικό διαλύτη έκλουσης) είτε υπό ξηρή μορφή. Η παρασκευή του δείγματος σε ξηρή μορφή γίνεται με τον εξής τρόπο: Το δείγμα διαλύεται σε όποιον διαλύτη μπορεί να διαλυθεί καλύτερα και στο διάλυμα προστίθεται τριπλάσια ποσότητα πυριτίου με μέγεθος κόκκου **63-200 μm**. Το διάλυμα

εξατμίζεται μέχρι ξηρού και η σκόνη που προκύπτει είναι έτοιμη να εισαχθεί στην κορυφή της στήλης

Η ροή του διαλύτη γίνεται είτε βαρυτικά είτε με άσκηση χαμηλής πίεση (**300 mbar**).

Κατά τη χρωματογραφία στήλης η δίοδος της του διαλύτη της κινητής φάσης οδηγεί στη διαδοχική έκλυση των συστατικών από τη στήλη τα οποία και συλλέγονται.



Η απλή χρωματογραφία στήλης δεν μπορεί να συνδυαστεί με κάποιο αυτόματο ανιχνευτή και γι'αυτό το λόγο η καθαρότητα του κάθε κλάσματος ελέγχεται με τη βοήθεια χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας.

6.4. Υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (**Medium pressure liquid chromatography, MPLC**)

Αυτή η χρωματογραφική τεχνική διακρίνεται από την απλή χρωματογραφία στήλης γιατί έχει καλύτερη διαχωριστική ικανότητα η οποία στηρίζεται στη χρήση πιο λεπτόκοκκου πυριτίου και μεγαλύτερης πίεσης.

- Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται στατική φάση γέλης πυριτίου (κανονικής ή αντίστροφης φάσης) με μέγεθος κόκκων **25-40 μm** που είναι μικρότερο από την απλή (**63-200 μm**) ή τη **flash** χρωματογραφία (**40-63 μm**) αλλά μεγαλύτερο από την HPLC.

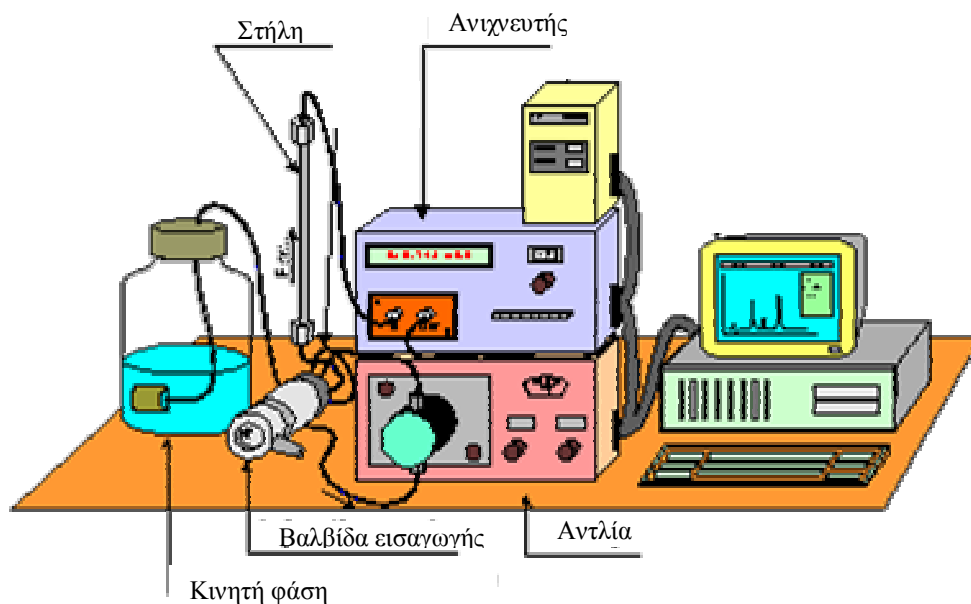


- Η στήλη πακετάρεται από το χρήστη όπως και στην απλή χρωματογραφία γεγονός που οδηγεί σε μειωμένο κόστος και μεγαλύτερη ευελιξία σε σχέση με την HPLC που οι στήλες είναι πάντα προκατασκευασμένες. Το πακετάρισμα της στήλης γίνεται με ρεύμα αζώτου υπό πίεση **10 bar** με τη βοήθεια ειδικής συσκευής. Οι στήλες είναι φτιαγμένες από ειδικό γυαλί ενισχυμένο με πλαστικό για να αντέχει στην αυξημένη πίεση.
- Η προώθηση του διαλύτη εντός της στήλης γίνεται με τη βοήθεια αντλίας υπό πίεση **5-40 bar**. Η πίεση αυτή είναι μεγαλύτερη από την ανοιχτή στήλη ή τη **flash** αλλά πολύ μικρότερη από αυτήν της HPLC.
- Η τεχνική MPLC μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί και να συνδεθεί με ανιχνευτή, καταγραφέα και σύστημα συλλογής κλασμάτων.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαχωρισμό μιγμάτων **100 mg – 100 g**.
- Η διαχωριστική ικανότητα είναι σαφώς ανώτερη από την απλή ή τη **flash** χρωματογραφία αλλά μικρότερη από την HPLC.

6.5 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High performance liquid chromatography, HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιεί το πιο λεπτόκοκκο και ομοιόμορφο πυρίτιο σε σχέση με όλες τις άλλες υγρές χρωματογραφικές τεχνικές και ταυτόχρονα την υψηλότερη πίεση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την επίτευξη της καλύτερης διαχωριστικής ικανότητας. Σε εργαστηριακό επίπεδο η HPLC χρησιμοποιείται ευρύτατα κυρίως για αναλυτικούς σκοπούς αλλά και για τον διαχωρισμό και καθαρισμό των ουσιών.

Τα βασικά τμήματα ενός συστήματος HPLC φαίνονται στο παρακάτω σχήμα:



Το σύστημα αποτελείται κατ'ελάχιστον από:

- ένα δοχείο στο οποίο περιέχεται η κινητή φάση
- μια αντλία η οποία προωθεί την κινητή φάση προς τη στήλη με πίεση έως και **200 bar**
- Μια βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος συνδεδεμένη με ένα **loop** για την προσωρινή αποθήκευση το δείγματος μέχρι τη στιγμή της εισαγωγής του
- Μια μεταλλική στήλη η οποία περιέχει εξαιρετικά ομοιογενή στατική φάση (πχ συνήθως πυρίτιο με μέγεθος κόκκου **5 μm**)
- Έναν ανιχνευτή (συνήθως **UV**, δείκτη διάθλασης, ηλεκτροχημικός, μάζας) για την παρακολούθηση της έκλυσης των συστατικών
- Ένα Η/Υ για την καταγραφή και την επεξεργασία του σήματος

Επίσης συνήθως ένα σύστημα **HPLC** μπορεί να περιλαμβάνει

- Δύο ή περισσότερες αντλίες και αναμεικτή για την ανάμιξη των διαλυτών της κινητής φάσης ώστε να επιτυγχάνεται βαθμιδωτή (**gradient**) μεταβολή της πολικότητας της κινητής φάσης.
- Συσκευή απαέρωσης των διαλυτών (**degasser**) ώστε να αποφεύγεται η παρουσία φυσαλίδων αέρα

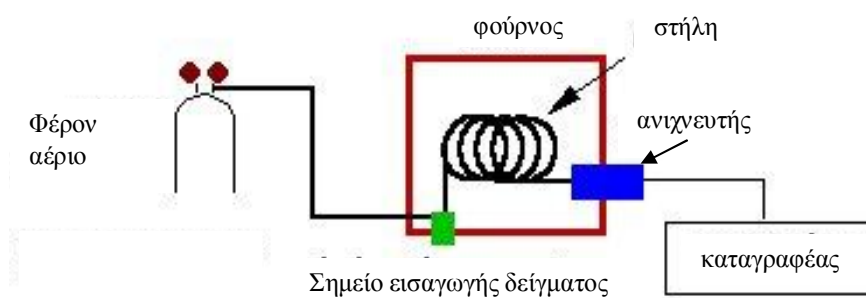
- Προσθήκη για την προστασία της στήλης
- Σύστημα αυτόματης δειγματοληψίας

6.6. Αέριος χρωματογραφία (*gas chromatography GC*)

Πρόκειται για χρωματογραφία κατανομής αερίου-υγρού και βασίζεται στο νόμο του **Nerst**. Η κινητή φάση είναι ένα αδρανές αέριο (συνήθως ήλιο ή άζωτο). Η στατική φάση είναι υγρή (πχ ηλεκτρική πολυαιθυλενογλυκόλη, σιλικόνη κα) προσροφημένη σε αδρανές στερεό (ή συγκρατείται με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων)

Οργανολογία

Η συσκευή αεριοχρωματογραφίας αποτελείται από τα εξής μέρη όπως φαίνονται και στο παρακάτω σχήμα:



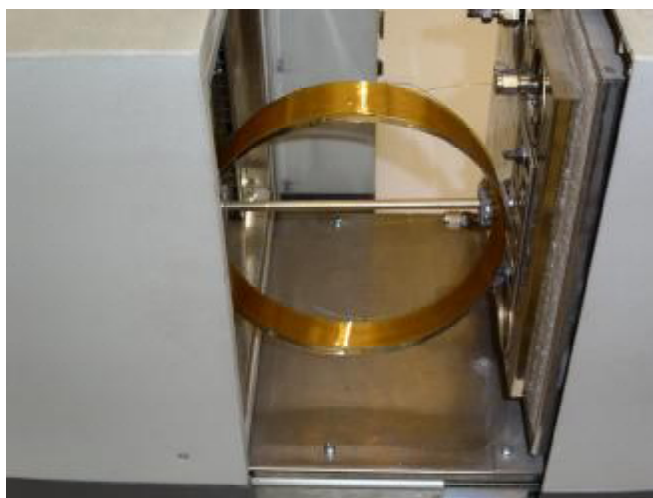
A. Πηγή φέροντος αερίου. Το φέρον αέριο βρίσκεται μέσα σε οβίδα υπό πίεση και συνήθως είναι **He, Ar, N₂**.

B. Ρυθμιστής πίεσεως

Γ. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος (**injector**). Το υπο εξέταση δείγμα (συνήθως **2-3 μl**) με τη βοήθεια ειδικής τριχοειδούς σύριγγας εισάγεται στη στήλη διαχωρισμού. Το σημείο εισαγωγής έχει συνήθως υψηλή θερμοκρασία (πχ **200°C**) ώστε όλες οι ουσίες στιγμαία να μεταπίπτουν σε αέρια κατάσταση.

Δ. Θάλαμος ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας (φούρνος, **oven**). Στην αέριο χρωματογραφία έχει πολύ μεγάλη σημασία η πολύ ακριβής ρύθμιση της θερμοκρασίας καθώς αυτή αποτελεί πολύ βασικό παράγοντα διαχωρισμού. Συνήθως η θερμοκρασία ρυθμίζεται με τη βοήθεια Η/Υ και ακολουθεί κάποιο πρόγραμμα που περιλαμβάνει αρχική θερμοκρασία (πχ **60 °C**), τελική θερμοκρασία (πχ **220 °C**) και ρυθμό ανόδου (πχ **3 °C/min**).

Ε. Στήλη χρωματογραφίας. Αυτό είναι το βασικότερο τμήμα του οργάνου. Οι στήλες που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως από χάλυβα, γυαλί, χαλκό ή από ειδικό πλαστικό και έχουν το σχήμα σπείρας για να καταλαμβάνουν το μικρότερο δυνατό χώρο. Το μήκος τους συνήθως **1-2 m** ή αρκετές δεκάδες για την περίπτωση τριχοειδών στηλών. Για τις αναλυτικές στήλες η εσωτερική διάμετρος τους είναι της τάξεως των **mm**.



Τριχοειδής στήλη σε μορφή σπείρας εντός του θαλάμου ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας

Στ. Ανιχνευτής. Υπάρχουν διάφορα είδη ανιχνευτών ανάλογα με την εφαρμογή. Τα βασικότερα είδη είναι τα εξής:

α. Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας.

Ο ανιχνευτής αυτός αποτελείται από συμπαγές κομμάτι μετάλλου με κυλινδρική κοιλότητα μέσα στην οποία υπάχει μεταλλικό νήμα το οποίο θερμαίνεται. Όταν το ρεύμα είναι σταθερό, ο ρυθμός παραγωγής θερμότητας είναι επίσης σταθερός. Η θερμότητα αυτή μεταφέρεται προς τα μεταλλικά τοιχώματα του ανιχνευτή, λόγω της θερμικής αγωγιμότητας του στρώματος αερίου μεταξύ του νήματος και των τοιχωμάτων. Η μεταφορά υτή εξαρτάται από τη σύσταση του αερίου που περιβάλλει το νήμα. Κατ'αυτό τον τρόπο η μεταβολή στην απώλεια θερμότητας συντελεί στη μεταβολή της θερμοκρασίας του νήματος και τελικά στη μεταβολή της ωμικής αντίστασης αυτού. Η διαφορετική σύσταση του αερίου που περιβάλλει τα δυο νήματα Α και Β συντελεί στο να έχουμε δυο διαφορετικές αντιστάσεις οι οποίες μέσω συνδεσμολογίας της γέφυρας **Wheatstone** στέλνουν διαφορετικά ηλεκτρικά σήματα, ανάλογα με τη σύσταση του αερίου που περνάει από τη στήλη και έχουμε καταγραφή των κορυφών στον καταγραφέα.

β. Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (**FID**).

Οι ατμοί των οργανικών ενώσεων καθώς εξέρχονται από τη στήλη καίγονται σε φλόγα υδρογόνου. Η κάυση αυτή δημιουργεί ηλεκτρικούς φορείς που κάνουν τη φλόγα ηλεκτρικά αγώγιμη. Η φλόγα μόνο με κινητή φάση ήλιο είναι ελάχιστα αγώγιμη και η αγωγιμότητα της αυξάνεται ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης σε οργανικές ουσίες. Ο ανιχνευτής αυτός χρησιμοποιείται ως επι το πλείστον για τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών του υπο εξέταση δείγματος.

γ. Ανιχνευτής μάζας.

Ο ανιχνευτής μάζας λόγω της ιδιαίτερα εκτεταμένης εφαρμογής που βρίσκει στο χώρο των φυσικών προϊόντων αναλύεται στο ειδικό κεφάλαιο των συζευγμένων χρωματογραφικών τεχνικών **7.1**

Z. Καταγραφέας. Συνήθως σήμερα γίνεται αποθήκευση και επεξεργασία των καταγραφομένων σημάτων μέσω Η/Υ. Παλαιότερα γινόταν απ'ευθείας καταγραφή των σημάτων σε ειδικό καταγραφικό σύστημα ή εκτυπωτή.

Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός μιας ουσίας με την αέριο χρωματογραφία.

Κάθε φορά που κάποιο συστατικό βγαίνει από τη στήλη ο ανιχνευτής στέλνει σήμα στο καταγραφικό σύστημα και καταγράφεται μια κορυφή. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της ουσίας τόσο μεγαλύτερο είναι το εμβαδό της κορυφής. Μετρώντας λοιπόν τον αριθμό των κορυφών γνωρίζουμε και τον αριθμό των περιεχομένων κορυφών στο δείγμα. Σημειώνεται ότι στην περίπτωση των αιθερίων ελαίων όπου έχουμε πολύ εκτεταμένη εφαρμογή της αεριοχρωματογραφίας ο αριθμός των κορυφών που καταγράφονται μπορεί να ξεπερνά τις **100** ή και τις **200**.

Για τον ποιοτικό έλεγχο και την ταυτοποίηση των συστατικών μετράται ο χρόνος ανάσχεσης (**Rt**) ή ο δείκτης **Kovat's*** και γίνεται σύγκριση με τους αντίστοιχους χρόνους ή δείκτες προτύπων ουσιών ή με τις τιμές της βιβλιογραφίας. Δύο ουσίες που έχουν τον ίδιο χρόνο ανάσχεσης ή τον ίδιο δείκτη **Kovat's** είναι πολύ πιθανό να ταυτίζονται, όμως για να είμαστε απολύτως βέβαιοι χρειαζόμαστε και επιπλέον στοιχεία όπως πχ το φάσμα μάζας (βλ. Κεφ. 7.1) ή τη συγχρωματογράφηση με πρότυπη ουσία.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό μετράται το εμβαδό του τριγώνου που σχηματίζεται από την κορυφή και τη γραμμή βάσης και συγκρίνεται με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς με το αντίστοιχο εμβαδό διαφόρων αραιώσεων της ταυτοποιηθείσας πρότυπης ουσίας. Με τη βοήθεια Η/Υ η διαδικασία αυτή είναι σήμερα αρκετά απλουστευμένη καθώς η ολοκλήρωση και η μέτρηση του εμβαδού κάθε κορυφής γίνεται αυτόματα. Επίσης αυτόματα γίνεται και η σχετική σύγκριση των εμβαδών των

* Ο δείκτης Kovat's είναι ανεξάρτητος του προγράμματος της θερμοκρασίας και είναι σταθερός για συγκεκριμένου τύπου στήλες. Η τιμή του βρίσκεται με τον εξής τρόπο: Η υπό εξέταση ουσία x συγχρωματογραφείται με μίγμα υδρογονανθράκων από C8 ως C25. Αν η ουσία εκλούεται χρόνο t_x μετά τον υδρογονάνθρακα με z άτομα άνθρακα και πριν τον άνθρακα με z+1 άτομα τότε ο δείκτης Kovat's είναι $I=100*[(\log t_x - \log t_z)/(\log t_{z+1} - \log t_z)] + 100z$

κορυφών ενός χρωματογραφήματος με αποτέλεσμα να έχουμε πολύ εύκολα την εκατοστιαία σύσταση του δείγματος.

- Ουσίες που δεν είναι αρκετά πτητικές για να τις μελετήσουμε με την αέριο χρωματογραφία, μπορούμε να τις μετατρέψουμε με κατάλληλα αντιδραστήρια σε πτητικά παράγωγα και μετά να τις χρωματογραφήσουμε. Για παράδειγμα τα λιπαρά οξέα μπορούν να μετατραπούν σε μεθυλεστέρες και τα σάκχαρα σε σίλυλαιθέρες.

6.7. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Η χρωματογραφία αυτή εφαρμόζεται για ενώσεις που μπορούν να ιονιστούν. Σαν στατική φάση χρησιμοποιείται ιοντοανταλλακτική ρητίνη, ενώ σαν κινητή φάση χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα. Οι ρητίνες είναι αδιάλυτες στην κινητή φάση και έχουν πορώδη δομή. Στην επιφάνεια τους βρίσκονται σταθερά συνδεδεμένες ανιονικές ή κατιονικές ομάδες των οποίων το ιόν μπορεί εύκολα να ανταλλάξει με ιόντα της προς διαχωρισμό ουσίας.

Ο διαχωρισμός στηρίζεται στη διαφορική ισχύ των ηλεκτροστατικών δυνάμεων με τις οποίες τα διάφορα ιόντα συγκρατούνται από τη ρητίνη.

Χαρακτηριστικό γνώρισμα των ρητινών είναι η ικανότητα τους να αναγεννώνται και να επαναχρησιμοποιούνται.

Η χρωματογραφία αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για το διαχωρισμό ενζύμων, νουκλειικών οξέων, απλών ανόργανων ενώσεων αλλά και για το διαχωρισμό ορισμένων αλκαλοειδών. Ειδικότερα εφαρμόζεται στον απιονισμό του εργαστηριακού νερού.

Για παράδειγμα μπορούμε να αναφέρουμε μια κατιονανταλλακτική ρητίνη η οποία αποτελείται από πολυστυρένιο στο οποίο βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένη η ομάδα $-SO_3^-$ ενώ το κατιόν Na^+ μπορεί να ανταλλάξει. Παρόμοια μια ανιονανταλλακτική ρητίνη από πολυστυρένιο φέρει μια ομάδα $-N^+(CH_3)_4$ σταθερά συνδεδεμένη ενώ το ιόν Cl^- μπορεί να ανταλλάξει.

6.8. Χρωματογραφία γέλης

Η χρωματογραφία γέλης (ή μοριακής διήθησης) χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ουσιών ανάλογα με το μέγεθος των μορίων τους. Η στατική φάση αποτελείται από γέλη πολυσακχαριτών (**Sephadex**) που δημιουργούν δομή με πόρους συγκεκριμένου μεγέθους. Τα μεγάλα μόρια που δεν χωρούν να εισέλθουν στους πόρους εκλύονται αμέσως από τη στήλη. Τα μικρότερα μόρια εξέρχονται με διαφορετικό ρυθμό ανάλογα με το μεγεθός τους. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται με επιτυχία στο διαχωρισμό ουσιών με πολύ μεγάλες διαφορές στο μοριακό τους βάρος.

7 Συζευγμένες χρωματογραφικές-φασματοσκοπικές μέθοδοι

7.1 Αέριος χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας (**Gas Chromatography-Mass spectrometry, GC-MS**)

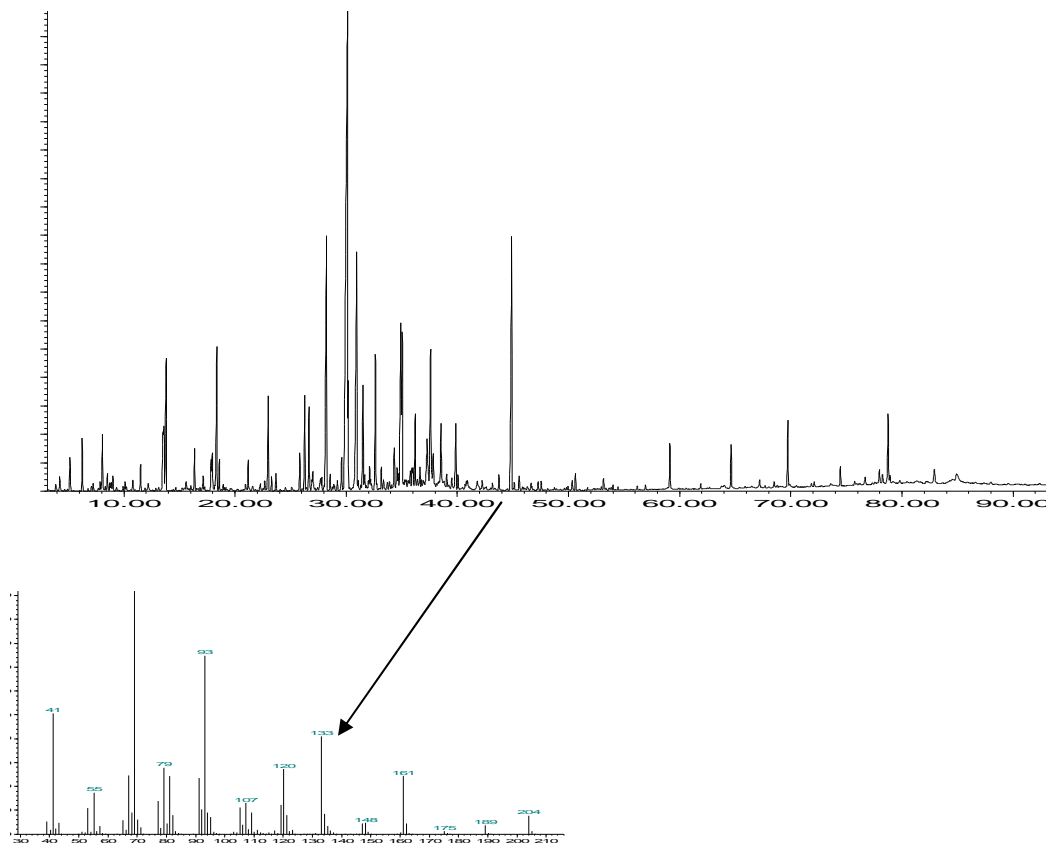


Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο **6.6** η συζευγμένη τεχνική **GC-MS** αποτελεί σήμερα τον κυριώτερο τρόπο μελέτης των αιθερίων ελαίων και γενικότερα των πτητικών φυσικών προϊόντων και γι' αυτό το λόγο εξετάζεται χωριστά.

Η αρχή λειτουργίας του **GC-MS** είναι ότι κάθε συστατικό που εξέρχεται από τη στήλη του αέριου χρωματογράφου οδηγείται σε ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας. Ως επι το πλείστον χρησιμοποιείται ανιχνευτής **electron impact** ο οποίος μας δίνει όπως έχει αναφερθεί πολλά στοιχεία για τη δομή μιας ουσίας και μπορεί το προκύπτον φάσμα μάζας να χρησιμοποιηθεί ως δακτυλικό αποτύπωμα.

Η μεγάλη επιτυχία της σύζευξης αυτών των δυο μεθόδων έγκειται στο ότι αφενός η αέριος χρωματογραφία μπορεί να επιτύχει εξαιρετικής ποιότητας διαχωρισμούς ενώ η φασματομετρία μάζας μπορεί να οδηγήσει άμεσα στην ταυτοποίηση μιας ουσίας. Εξαιρετικά μεγάλη σημασία στην επιτυχία αυτής της μεθόδου έχει διαδραματίσει η δημιουργία ηλεκτρονικών βάσεων δεδομένων με χιλιάδες φάσματα μάζας της πλειονότητας των συστατικών των αιθερίων ελαίων. Με τη βοήθεια του Η/Υ το φάσμα μάζας που αντιστοιχεί στην κάθε υπο εξέταση κορυφή του χρωματογραφήματος συγκρίνεται με όλα τα γνωστά φάσματα μάζας της

ηλεκτρονικής βιβλιοθήκης και σε ελάχιστο χρόνο καταρτίζεται μια λίστα πιθανών δομών συνοδευόμενη από την αντίστοιχη πιθανότητα.



Ταυτοποίηση μιας κορυφής με βάση την ταυτότητα στο φάσμα μάζας και στον αντίστοιχο δείκτη **Kovats** οδηγεί με βεβαιότητα στη δομή της υπο μελέτη ουσίας.

7.2 HPLC-UV, HPLC-MS, HPLC-NMR

Η χρωματογραφία **HPLC** αποτελεί τον κυριώτερο τρόπο μελέτης των μη πιητικών φυσικών προϊόντων. Η χρωματογραφία **HPLC** συνήθως είναι συζευγμένη με κάποια φασματοσκοπική τεχνική ώστε να οδηγεί σε πληρέστερα και ακριβέστερα αποτελέσματα..

Η αρχή λειτουργίας της συζευγμένης υγροχρωματογραφίας είναι ότι κάθε συστατικό που εξέρχεται από τη στήλη της **HPLC** οδηγείται σε κατάλληλο ανιχνευτή ο οποίος μπορεί να μας δώσει είτε το πλήρες φάσμα **UV-Vis**, είτε το φάσμα μάζας (**LC-MS**) είτε και το φάσμα **NMR (LC-NMR)**. Ως επί το πλείστον χρησιμοποιείται ο ανιχνευτής **UV**,

όμως τα τελευταία χρόνια η τεχνική **LC-MS** γνωρίζει πολύ μεγάλη ανάπτυξη καθώς συνδυάζει την πολύ καλή διαχωριστική ικανότητα της **HPLC** με την πολύ μεγάλη ευαισθησία του ανιχνευτή **MS** καθώς και με το πλήθος των διαγνωστικών στοιχείων που μπορεί να μας προσφέρει το φάσμα μάζας. Όσον αφορά την τεχνική **LC-NMR** αυτή λόγω του υψηλού της κόστους παραμένει μια πολύ εξειδικευμένη εφαρμογή.