

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200798





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

147

***“Ανάπτυξη Αναλυτικών Μεθόδων Προσδιορισμού του
Υπεροξειδίου του Υδρογόνου και Οργανικών Υπεροξέων.
Εφαρμογές σε Βιομηχανικά και Βιολογικά Δείγματα”***

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Χ. ΠΑΠΠΑΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2004



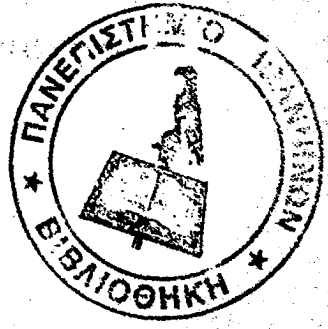


ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΑΙ ΠΕΔΑΓΩΓΙΚΟ
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ
ΕΡΓΑΣΙΟ

Το παρόν έγγραφο αποτελεί μέρος της συλλογής των εργασιών
των μελών του Εργαστηρίου και αποτελεί προϊόν της
επιστημονικής και διδακτικής δραστηριότητας του

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΤΩΝ
ΕΡΕΥΝΗΤΩΝ

ΚΑΤΑΡΤΙΣΤΩΝ ΚΑΙ



ΕΡΕΥΝΗΤΩΝ ΚΑΙ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Σχολή Θετικών Επιστημών

Τμήμα Χημείας

Αλέξανδρος Χ. Παππάς

Χημικός

***“Ανάπτυξη Αναλυτικών Μεθόδων Προσδιορισμού του
Υπεροξειδίου του Υδρογόνου και Οργανικών Υπεροξέων.
Εφαρμογές σε Βιομηχανικά και Βιολογικά Δείγματα”***

Διδακτορική Διατριβή

Επταμελής Επιτροπή:

Ομότιμος Καθηγητής Μιλτιάδης Καραγιάννης

Καθηγητής Νικόλαος Ευμοιρίδης

Λέκτορας Κωνσταντίνος Σταλίκας

Καθηγητής Νικόλαος Χανιωτάκης

Καθηγητής Παναγιώτης Σίσκος

Αναπληρωτής Καθηγητής Γιώργος Πηλίδης

Επίκουρη Καθηγήτρια Κωνσταντίνα Κονιδάρη

Επιβλέπων Καθηγητής

Μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής

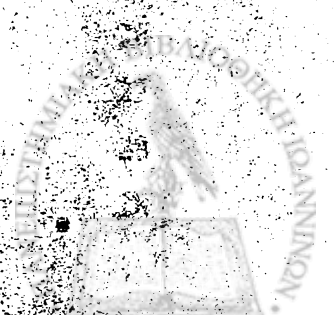
Μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής

Ιωάννινα, 2004



Αφιερώνεται

στη σύζυγό μου Ιουλία και την κόρη μου Χριστίνα



Περιεχόμενα

Πρόλογος IX

Αρκτικόλεξα XI

I. Θεωρητικό Μέρος

1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: Παρασκευή, ιδιότητες και χρήσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου και οργανικών υπεροξείων

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1

1.1 Παρασκευή του υπεροξειδίου του υδρογόνου 3

1.2 Φυσικές ιδιότητες του υπεροξειδίου του υδρογόνου 8

1.3 Χημικές ιδιότητες του υπεροξειδίου του υδρογόνου 11

1.4 Χρήσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου 14

1.5 Το υπεροξείδιο του υδρογόνου στο περιβάλλον 15

1.6 Παρασκευή του υπεροξικού οξέος 16

1.7 Φυσικές και χημικές ιδιότητες του υπεροξικού οξέος 19

1.8 Χρήσεις του υπεροξικού οξέος 20

Βιβλιογραφία 1^{ου} Θεωρητικού κεφαλαίου 21

2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: Χημικοί Αισθητήρες και Βιοαισθητήρες

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 25

2.1 Χημικοί Αισθητήρες 26

2.1.1 Πιεζοηλεκτρικοί ή Αισθητήρες μάζας 27

2.1.2 Θερμικοί Αισθητήρες 28

2.1.3 Ηλεκτροχημικοί Αισθητήρες 28



2.1.4 Οπτικοί Αισθητήρες ή Αισθητήρες Οπτικών Ινών	29
2.2 Οπτικές Ίνες	31
2.2.1 Τρόποι εκπομπής και μετάδοσης στις οπτικές ίνες	34
2.2.1.1 Πολύτροπες οπτικές ίνες	34
2.2.1.2 Οπτική ίνα διακριτού δείκτη	35
2.2.1.3 Οπτική ίνα βαθμιαίου δείκτη	35
2.2.1.4 Μονότροπες οπτικές ίνες	36
2.2.2 Χαρακτηριστικά και επιδόσεις	36
2.2.3 Καλώδια οπτικών ινών	37
2.2.4 Χρήσεις – Παραδείγματα	38
2.2.5 Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα	39
2.2.6 Υλικά οπτικών ινών	40
2.3 Βιοαισθητήρες	41
2.3.1 Βασικές ιδιότητες ενζύμων	41
2.3.2 Βασικές αρχές ακινητοποιημένων ενζύμων	42
2.3.2.1 Ιδιότητες των ακινητοποιημένων ενζύμων	42
2.3.2.2 Μέθοδοι ακινητοποίησης ενζύμων	44
2.3.2.3 Προσρόφηση	45
2.3.2.4 Διαμοριακή σύνδεση ενζύμων	46
2.3.2.5 Ομοιοπολική σύνδεση	47
2.3.3 Αναλυτικές εφαρμογές των ακινητοποιημένων ενζύμων	48
2.3.4 Ενζυμικοί αντιδραστήρες	48
2.4 Ανάλυση ροής με έγχυση δείγματος	50
2.4.1 Σήματα που λαμβάνονται στα συστήματα FIA	53
2.4.2 Διασπορά Δείγματος	54
2.4.3 Συντελεστής διασποράς Ruzicka	55
Βιβλιογραφία 2^{ου} Θεωρητικού Κεφαλαίου	57

3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

3.1 Χρωματογραφήματα	61
3.1.1 Χρόνος κατακράτησης	62
	63



3.1.2 Μέθοδοι για την περιγραφή της αποδοτικότητας της στήλης	64
3.1.3 Ο ορισμός του ύψους μιας θεωρητικής πλάκας	65
3.1.4 Σχέση μεταξύ του ύψους πλάκας και των μεταβλητών της στήλης	65
3.1.5 Επίδραση της ταχύτητας της κινητής φάσης στους όρους της εξίσωσης van Deemter	66
3.1.6 Μονάδα διαλυτών και συστήματα απαέρωσης και διήθησής τους	68
3.1.7 Σύστημα άντλησης	69
3.1.7.1 Αντλίες παλινδρόμησης	69
3.1.7.2 Αντλίες Εκτόπισης	70
3.1.7.3 Πνευματικές αντλίες	70
3.1.8 Το σύστημα ανάμιξης των διαλυτών	71
3.1.9 Το σύστημα έγχυσης	71
3.1.10 Στήλες Υγρής Χρωματογραφίας	72
3.1.10.1 Προστήλες	72
3.1.10.2 Αναλυτικές Στήλες	72
3.1.11 Συστήματα μεταφοράς και σύνδεσης	73
3.1.12 Σύστημα ανίχνευσης	73
3.2 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ	75
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	75
3.2.1 Δομές σωματιδίων που απορροφούν	76
3.2.2 Βασικά στάδια φασματοφωτομετρικών μετρήσεων	77
3.2.2.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός μίας ένωσης	77
3.2.2.2 Αποκλίσεις από το νόμο του Beer	80
3.2.2.3 Πραγματικές αποκλίσεις	80
3.2.2.3 Φαινομενικές αποκλίσεις	81
3.2.2.4.1 Αποκλίσεις των οργάνων	81
3.2.2.4.2 Χημικές αποκλίσεις	82
3.2.3 Η πορεία της ποσοτικής φασματοφωτομετρικής ανάλυσης	82
3.2.3.1 Η επιλογή της ένωσης που θα απορροφήσει και λήψη του φάσματος απορρόφησης	82
3.2.3.2 pH	83
3.2.3.3 Συγκέντρωση αντιδραστηρίων	83



3.2.3.4 Διαλύτης	83
3.2.3.5 Σειρά προσθήκης αντιδραστηρίων	83
3.2.3.6 Χρόνος	84
3.2.3.7 Σταθερότητα	84
3.2.3.8 Θερμοκρασία	84
3.2.3.9 Μοριακή απορροφητικότητα της παράγωγης ένωσης	84
3.2.4 Η επιλογή του μήκους κύματος	85
3.2.5 Χάραξη καμπύλης αναφοράς και μέτρηση απορρόφησης αγνώστου διαλύματος και υπολογισμοί	85
3.2.6 Προετοιμασία δείγματος	86
3.2.7 Σφάλματα φασματοφωτομετρίας	86
3.2.7.1 Όργανα	86
3.2.7.2 Προσωπικά σφάλματα	87
3.2.7.3 Προσμείξεις	87
3.2.7.4 Απορροφούσες παρεμποδίζουσες ουσίες	88
3.2.7.5 Χημικές παρεμποδίσεις	88
3.2.8 Οργανολογία	88
3.2.8.1 Πολυδιαυλικοί μεταλλάκτες φωτονίων	89
3.2.8.2 Ανιχνευτής σύζευξης φορτίου	90
3.2.8.3 Πηγές θορύβου σε ένα ανιχνευτή CCD	91
Βιβλιογραφία 3^{ου} Θεωρητικού Κεφαλαίου	92
Παράρτημα	95



II. Πειραματικό Μέρος

1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: Αναλυτικές Εφαρμογές Παραγώγων της 4-Αμινοαντιπυρίνης για τον Ενζυμικό Φασματοφωτομετρικό Προσδιορισμό του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου και της Γλυκόζης

1.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	97
1.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	100
1.3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	103
1.3.1 Αντιδραστήρια	103
1.3.2 Πειραματική διάταξη	104
1.3.3 Η χημική αντίδραση	106
1.3.4 Πορεία εργασίας	107
1.3.4.1 Προσδιορισμός υπεροξειδίου του υδρογόνου	107
1.3.4.2 Προσδιορισμός γλυκόζης	108
1.3.5 Πραγματικά δείγματα	109
1.3.5.1 Δείγματα για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε εκκλύματα ζυθοποιίας	109
1.3.5.2 Δείγματα για τον προσδιορισμό της γλυκόζης	110
1.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	111
1.4.1 Χρήση των παραγώγων της 4-αμινοαντιπυρίνης στον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου	111
1.4.2 Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης των πυραζολονικών παραγώγων	112
1.4.3 Επίδραση του pH και της θερμοκρασίας	114
1.4.4 Βαθμονόμηση του Συστήματος Ανίχνευσης του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου	116
1.4.5 Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της γλυκόζης	117
1.4.6 Σταθερότητα των προϊόντων των αντιδράσεων	118
1.4.7 Παρεμποδίσεις	119
1.4.8 Εφαρμογές στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων	119
1.5 Συμπεράσματα	121
Βιβλιογραφία 1^{ου} Πειραματικού Κεφαλαίου	122

2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: Προσδιορισμός Υπεροξειδίου του Υδρογόνου με Σύστημα Ανάλυσης δια Εγχύσεως σε Συνεχή Ροή (F.I.A) Συνδυασμένο με Τριχοειδή Κυψελίδα Μεγάλης Οπτικής Διαδρομής. Εφαρμογή στην Ανάλυση Εκκλυμάτων Ζυθοποιίας.

2.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ	125
2.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	126



2.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	129
2.3.1 Αντιδραστήρια	129
2.3.2 Πραγματικά δείγματα	130
2.3.3 Πειραματική διάταξη	130
2.3.4 Διαδικασία ακινητοποίησης του ένζυμου	133
2.3.5 Κατασκευή του ενζυμικού αντιδραστήρα	136
2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	136
2.4.1 Η χημική αντίδραση	136
2.4.2 Βελτιστοποίηση της πειραματικής διάταξης και των παραμέτρων των πειραμάτων	137
2.5 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου	140
2.6 Παρεμποδίζουσες ενώσεις και ανάλυση πραγματικών δειγμάτων	142
2.7 Χρόνος ζωής των αντιδραστήρων	144
2.8 Συμπεράσματα	145

Βιβλιογραφία 2^{ου} Πειραματικού Κεφαλαίου	146
---	-----

3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: Ανάπτυξη Υγροχρωματογραφικής Μεθόδου (HPLC) με Παραγωγοποίηση μετά τη Στήλη για τον Ταυτόχρονο Προσδιορισμό του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου και Οργανικών Υπεροξέων

3.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ	149
3.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	151
3.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	155
3.3.1 Αντιδραστήρια	155
3.3.2 Διαλύματα εργασίας	156
3.3.3 Πειραματική διάταξη	156
3.3.4 Σύστημα μεταβολής της πολικότητας των διαλυτών κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού των αναλυτών του δείγματος	157
3.4 Η χημική αντίδραση	159
3.5 Βέλτιστες πειραματικές συνθήκες για την αντίδραση παραγωγοποίησης	161
3.6 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου	163
3.6.1 Καμπύλες αναφοράς– Όρια ανίχνευσης μεθόδου	163
3.6.2 Επαναληψιμότητα της μεθόδου	165
3.7 Εφαρμογή της μεθόδου στην ανάλυση απορρυπαντικών	165
3.8 Συμπεράσματα	167

Βιβλιογραφία 3^{ου} Πειραματικού Κεφαλαίου	168
---	-----



4^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: Ανάπτυξη Χημικού Αισθητήρα Οπτικών Ινών για τον Εκλεκτικό Προσδιορισμό του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου

4.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ	171
4.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	172
4.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	175
4.3.1. Αντιδραστήρια	175
4.3.2 Πραγματικά δείγματα	177
4.3.3 Κατασκευή του χημικού αισθητήρα	205
4.3.4 Άμεση Χύτευση της Πολυμερικής Επικάλυψης	178
4.3.5 Παρασκευή της Πολυμερικής Μεμβράνης - Προσαρμογή στην Επιφάνεια του αισθητήρα	178
4.3.6 Πειραματική Διάταξη	179
4.3.7 Πορεία Εργασίας	180
4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	181
4.4.1 Η χημική αντίδραση	181
4.4.2 Επίδραση πειραματικών συνθηκών	182
4.4.3 Σύγκριση του χημικού αισθητήρα με τη φωτομετρική μέθοδο. Φασματικές ιδιότητες του ακινητοποιημένου DCI	185
4.4.4 Βαθμονόμηση του Συστήματος	187
4.4.5 Παρεμποδίζουσες ενώσεις και ανάλυση πραγματικών δειγμάτων	188
4.4.6 Σταθερότητα του Χημικού Αισθητήρα	190
4.5 Συμπεράσματα	191
Βιβλιογραφία 4^{ου} Πειραματικού Κεφαλαίου	192
Summary	195
Περίληψη	199



Πρόλογος

Η εκπόνηση της διατριβής αυτής πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος EUROPEROX της Ευρωπαϊκής Ένωσης, με τίτλο "*New methods and instrumentation for the determination of peroxides in industrial processes*", από το οποίο χρηματοδοτήθηκε.

Η διατριβή αποτελείται από δύο μέρη. Το πρώτο μέρος είναι θεωρητικό και περιλαμβάνει μια σύντομη περιγραφή της χημείας του υπεροξειδίου του υδρογόνου και των οργανικών υπεροξέων, των χημικών αισθητήρων και βιοαισθητήρων με βάση τις οπτικές ίνες και την ανάπτυξη βασικών αρχών των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος της διατριβής. Το δεύτερο μέρος είναι πειραματικό και αποτελείται από τέσσερα κεφάλαια, στα οποία περιγράφονται αναλυτικά οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου και οργανικών υπεροξέων. Η βιβλιογραφική κάλυψη της διατριβής αποτελείται από παραπομπές σε βιβλία, άρθρα ανασκόπησης και ερευνητικές εργασίες δίνεται ξεχωριστά για κάθε κεφάλαιο του θεωρητικού και πειραματικού μέρους.

Στο τέλος της διατριβής υπάρχει μια αγγλική και μια ελληνική περίληψη, ώστε να δίνεται η δυνατότητα μιας σύντομης επισκόπησης του περιεχομένου της.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να αναφέρω και να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίηση της διατριβής μου.

Η επίβλεψη της διατριβής αυτής έγινε από τον Καθηγητή Μιλτιάδη Καραγιάννη, στον οποίο θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση και τη μεγάλη συμπαράσταση σε όλη τη διάρκεια των εργασιών.

Επίσης ευχαριστώ ιδιαίτερα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Λέκτορα Κωνσταντίνο Σταλικά για τις εύστοχες υποδείξεις και την καθοδήγησή του και τον Καθηγητή Νικόλαο Ευμοιρίδη για την εποικοδομητική κριτική και τις διορθωτικές επεμβάσεις του.

Ευχαριστώ πολύ τους συναδέλφους μου και όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας για την πολύ καλή συνεργασία.



X

Ιδιαίτερα θερμές ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στους γονείς μου και τα αδελφιά μου για την ηθική υποστήριξη, την ποικιλόμορφη βοήθεια και τη συμπαράστασή τους.

Τέλος οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη σύζυγό μου Ιουλία για την υπομονή, την αμέριστη κατανόηση που έδειξε και τη συμπαράστασή της σε όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Αλέξανδρος Χ. Παππάς

Ιωάννινα, Ιανουάριος 2004



ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ

1,2-D: 4-amino-1,2-diphenyl-5-methylpyrazol-3-one, (4-αμινο-1,2-διφαινυλο-5-μεθυλοπυραζολ-3-όνη)

2,5-D: 4-amino-2,5-diphenyl-1-methylpyrazol-3-one, (4-αμινο-2,5-διφαινυλο-1-μεθυλοπυραζολ-3-όνη)

4-AAP: 4-aminoantipyrine, (4-αμινοαντιπυρίνη)

4-AEP: 4-amino-1-ethyl-5-methyl-2-phenylpyrazol-3-one, (4-αμινο-1-αιθυλο-5-μεθυλο-2-φαινυλοπυραζολόνη)

ALPS: *N*-ethyl-*N*-sulphopropylaniline, (N-αιθυλο-N-(3-σουλφοπροπυλο))-ανιλίνη

CA/DCI: DCI incorporated in a Cellulose Acetate membrane (μεμβράνη οξικής κυτταρίνης με ενσωματωμένο το DCI)

CCD: Charge-Coupled Device, (Συσκευή Ζεύξης Φορτίου)

CIP: Cleaning-in-place Process, (Επιτόπια Διαδικασία Καθαρισμού)

Cl-2,5-D: 4-amino-1-methyl-2-phenyl-5-(*p*-chlorophenyl) pyrazol-3-one, (4-αμινο-1-μεθυλο-2-φαινυλο-5-(*p*-χλωροφαινυλο)πυραζολόνη)

CPG: Controlled Pore Glass (Υαλος Ελεγχόμενου Πορώδους)

DAA: 4-amino-2-(*p*-aminophenyl)-1-methylpyrazol-3-one, (4-αμινο-2-(*p*-αμινοφαινυλο)-1-μεθυλοπυραζολ-3-όνη)

DADP: 4-amino-2-(*p*-aminophenyl)-1-methyl-5-phenylpyrazol-3-one, (4-αμινο-2-(*p*-αμινοφαινυλο)-1-μεθυλο-5-φαινυλοπυραζολόνη)

DAP: 4-amino-5-(*p*-aminophenyl)-1-methyl-2-phenylpyrazol-3-one, (4-αμινο-5-(*p*-αμινοφαινυλο)-1-μεθυλο-2-φαινυλοπυραζολόνη)

DCI: Dinuclear Complex of Iron(III) (διπυρηνικό σύμπλοκο του τρισθενούς σιδήρου)

DCPS: 3,5-dichloro-2-hydroxybenzosulfonic acid, (3,5-διχλωρο-2-υδροξυβενζυλο-σουλφονικό οξύ)

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)

FLA: Flow Injection Analysis (ανάλυση συνεχούς ροής με έγχυση δείγματος)

GO: Glucose oxidase, (Γλυκόζη Οξειδάση)

HEPES: (N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), (N-2-υδροξυαιθυλοπιπεραζινο-N'-αιθανο-σουλφονικό οξύ)



HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης)

HPR: Horseradish peroxidase (υπεροξειδάση από αγριοραφανίδα)

LWCC: Liquid Waveguide Capillary Cell (Τριχοειδής κυψελίδα μεγάλης οπτικής διαδρομής)

MCPBA: m-chloro-Perbenzoic Acid (*m*-χλωρο-υπερβενζοϊκό οξύ)

MOPS: (3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid), (3-(N-μορφολινο)-προπανοσουλφονικό οξύ)

NAD⁺: Nicotinamide-adenine-dinucleotide (νικοτιναμίδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο)

NADH: Nicotinamide-adenine-dinucleotide –reduced form (Ανηγγμένη Μορφή του νικοτιναμίδο-αδενο-δινουκλεοτιδίου)

PAA: Peracetic Acid (Υπεροξικό Οξύ)

PVC: Polyvinylchloride (πολυβινυλοχλωρίδιο)

RSD: Relative Standard Deviation (Σχετική Τυπική Απόκλιση)

RT: Trinder Reaction (Αντίδραση Trinder)

SD: Standard Deviation (Τυπική Απόκλιση)

TAED: tetraacetyl ethylenediamine (τετραακέτυλο αιθυλενοδιαμίνη)

Tris-HCl: (tris-(hydroxy-methyl)aminomethane), (τρις(υδροξυ-μεθυλο)-αμινομεθάνιο)



**Παρασκευή, ιδιότητες και
χρήσεις του υπεροξειδίου του
υδρογόνου και οργανικών
υπεροξέων**

Θεωρητικό Μέρος

1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου και τα οργανικά υπεροξέα, κυρίως το υπεροξικό οξύ, χρησιμοποιούνται ευρέως στην έρευνα και τη βιομηχανία εδώ και πολλές δεκαετίες.

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου, παρ' ότι είναι ένα απλό ανόργανο μόριο εύκολης σχετικά παρασκευής, έχει φυσικές και χημικές ιδιότητες που το καθιστούν αναντικατάστατο σε πολλές εφαρμογές. Από το 1818 που παρασκευάστηκε για πρώτη φορά έχει χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση πολλών χημικών προϊόντων, στις διεργασίες λεύκανσης και απολύμανσης, ως οξειδωτικό μέσο, για την επεξεργασία του πόσιμου νερού και αποβλήτων λόγω της φιλικότητάς του προς το περιβάλλον, κ.ά. Η αυξημένη χρήση του επιβάλλεται λόγω των αυστηρών νομοθεσιών διεθνώς που αφορούν τη μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος. Επίσης, λόγω της μη-τοξικότητάς του, χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών όπου απαιτείται η εφαρμογή αξιόπιστων μεθόδων απολύμανσης για την εξασφάλιση της υγείας των καταναλωτών [1,2].

Το υπεροξικό οξύ χρησιμοποιείται κυρίως ως μικροβιοκτόνο στη βιομηχανία τροφίμων και ως οξειδωτικό στη σύνθεση άλλων χημικών ενώσεων [3]. Χρησιμοποιείται μόνο του ή σε συνδυασμό με το υπεροξείδιο του υδρογόνου αφού οι οξειδωτικές και απολυμαντικές τους ιδιότητες αλληλοσυμπληρώνονται.

Οι βασικότερες ουσίες με λευκαντικές και απολυμαντικές δράσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι οι αλκοόλες, οι αλδεΐδες, οι φαινόλες, τα υπεροξείδια και τα αλογονωμένα προϊόντα. Τα τελευταία έχουν επικρατήσει λόγω του χαμηλότερου κόστους [4].

Τα τελευταία 20 χρόνια παρατηρείται αυξημένη χρήση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του υπεροξικού οξέος στις διεργασίες απολύμανσης και λεύκανσης. Τα



πλεονεκτήματα τους περιορίζονται όμως από το κόστος παραγωγής το οποίο παραμένει ακόμα υψηλό. Το κόστος του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι σχεδόν τριπλάσιο από αυτό των αλογονωμένων προϊόντων που χρησιμοποιούνται στις διεργασίες λεύκανσης [4]. Επιπλέον, το κόστος τους αυξάνεται από την έλλειψη μεθόδων ακριβείας για τον προσδιορισμό και την παρακολούθησή τους στις διεργασίες όπου χρησιμοποιούνται, κάτι που υποχρεώνει τους χρήστες να αυξήσουν τη δοσολογία κατά 20% για να εξασφαλίσουν το απαιτούμενο αποτέλεσμα. Η αύξηση της χρησιμοποιούμενης ποσότητας υπεροξειδίων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της κατανάλωσης των προϊόντων καθώς και την αύξηση των υπολειμματικών ποσοτήτων, γεγονός που αυξάνει τον κίνδυνο να βρεθούν αυτά στα παραγόμενα βιομηχανικά προϊόντα [5].

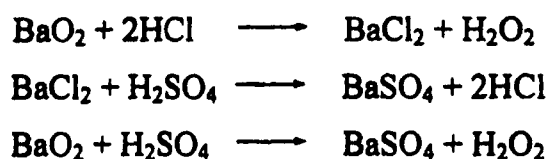
Έτσι, για να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά σε βιομηχανική κλίμακα, θα πρέπει να αναπτυχθούν μέθοδοι ακριβείας προσδιορισμού και παρακολούθησης των συγκεντρώσεών τους κατά τη διάρκεια της απολύμανσης, αλλά και μετά την απολύμανση, ώστε να αποφευχθεί τυχόν μόλυνση των προϊόντων στον επόμενο κύκλο παραγωγής.

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση η χρήση των υπεροξειδίων αυξάνεται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια [6]. Η αυξανόμενη χρήση επιβάλλει την ανάπτυξη νέων μεθόδων για τον προσδιορισμό τους με σκοπό τη μείωση του κόστους στις εφαρμογές λεύκανσης και απολύμανσης, καθώς και για την προστασία των εργαζομένων στις βιομηχανίες και των καταναλωτών. Ένα από τα προγράμματα που χρηματοδοτήθηκε από την ΕΕ και αποσκοπούσε στην ανάπτυξη τέτοιων μεθόδων σε υγρή και αέρια φάση, ήταν το EUROPEROX (SMT4-CT97-2153, 1997-2000) στο οποίο συμμετείχαν τρία πανεπιστήμια και τέσσερις εταιρίες από ευρωπαϊκές χώρες. Μεταξύ των παραδοτέων του προγράμματος περιλαμβάνονται η ανάπτυξη ηλεκτροχημικών, φασματοφωτομετρικών και υδροχρωματογραφικών μεθόδων ανάλυσης για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του υπεροξικού οξέος. Πάνω σ' αυτές τις τεχνικές στηρίχτηκε και η παρούσα διατριβή με στόχο τον ποσοτικό προσδιορισμό των προαναφερθεισών ενώσεων.



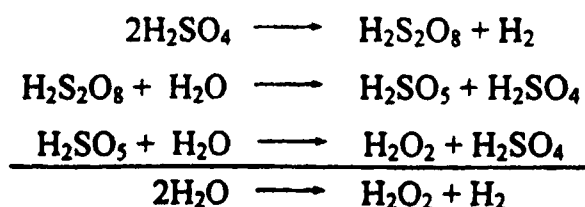
1.1 Παρασκευή του υπεροξειδίου του υδρογόνου

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου παρασκευάστηκε για πρώτη φορά το 1818 από τον L.J. Thenard [7]. Η παρασκευή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σύμφωνα με την μέθοδο Thenard γίνεται με την επίδραση νιτρικού οξέος σε στερεό BaO_2 . Το σχηματιζόμενο διάλυμα του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι χαμηλής περιεκτικότητας, αλλά η απόδοση της αντίδρασης βελτιώνεται με την προσθήκη υδροχλωρικού οξέος. Τα προϊόντα της αντίδρασης είναι ευδιάλυτα στο νερό και γι' αυτό προστίθεται θειικό οξύ για την καταβύθιση των κατιόντων Ba^{2+} ως BaSO_4 , το οποίο είναι αδιάλυτο και μπορεί εύκολα να απομακρυνθεί από το σύστημα. Η περιγραφείσα διαδικασία απεικονίζεται από τις ακόλουθες αντιδράσεις:



Η μέθοδος Thenard εφαρμόστηκε 60 χρόνια αργότερα για την παρασκευή του υπεροξειδίου του υδρογόνου για εμπορικούς σκοπούς [8]. Μέχρι τα μέσα του 20^{ου} αιώνα η βιομηχανική παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου βασιζόταν στην παραπάνω μέθοδο. Στα τέλη του 19^{ου} αιώνα η παγκόσμια παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου είχε φτάσει στους 2000 τόνους ετησίως. Η διεργασία Thenard έχει όμως μερικά μειονεκτήματα όπως η χαμηλή περιεκτικότητα του παραγόμενου διαλύματος, και συνεπώς η περιορισμένη διάθεσή του στην αγορά, το υψηλό κόστος παραγωγής και το σημαντικότερο, η χαμηλή σταθερότητα του προϊόντος από την παρουσία προσμείξεων.

Τα μειονεκτήματα αυτά εξαλήφθησαν με την ανακάλυψη από τον Meidinger, το 1853, της ηλεκτρολυτικής παραγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου από υδατικό διάλυμα θειικού οξέος [9]. Ο Bertholet απέδειξε αργότερα ότι σχηματίζεται πρώτα υπερθειικό οξύ ως ενδιάμεσο προϊόν [10], το οποίο στη συνέχεια υδρολύεται, δίνοντας υπεροξείδιο του υδρογόνου και θειικό οξύ, όπως δείχνουν οι αντιδράσεις:



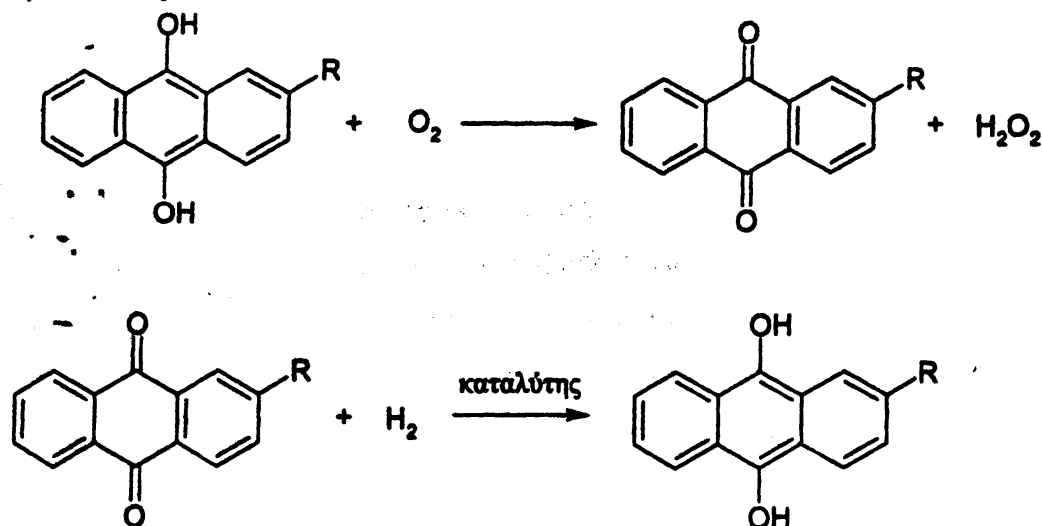
Το 1908 η εταιρία Österreichische Chemische Werke έθεσε σε λειτουργία την πρώτη μονάδα ηλεκτροχημικής παραγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο Weissenstein. Το 1924 οι Reidel και Lowenstein χρησιμοποίησαν θειικό αμμώνιο στη θέση του θειικού οξέος με αποτέλεσμα την αύξηση της ετήσιας παραγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου στους 35.000 τόνους [11].

Το 1901 ο Manchot ανακάλυψε μια επαναστατική μέθοδο για την παρασκευή του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ο Manchot παρατήρησε ότι αυτοοξειδώσιμες (autooxidizable) ενώσεις όπως οι υδροκινόνες ή τα υδραζωβενζόλια δίνουν υπεροξειδία υπό αλκαλικές συνθήκες [12]. Το 1932, οι Walton και Filson, πρότειναν μια μέθοδο, η οποία βασίζεται στη διαδοχική οξείδωση και αναγωγή των υδραζωβενζολίων [13]. Ο Pfleiderer ανέπτυξε μια μέθοδο αυτοοξείδωσης των υδραζωβενζολίων σε αλκαλικές συνθήκες [14]. Η Φινλανδική εταιρία Kymmene AB ήταν αυτή που έθεσε σε λειτουργία την πρώτη μονάδα παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου η οποία βασιζόταν στην παραπάνω διεργασία. Το 1935 η εταιρία BASF ανέπτυξε ένα πιλοτικό πρόγραμμα για την παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου με τη μέθοδο της ανθρακινόνης (γνωστή και ως μέθοδος ΑΟ). Το 1953 ο E.I. Dupont de Nemours παρήγγειλε την πρώτη μονάδα παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου με τη μέθοδο ΑΟ. Το 1996 η παγκόσμια παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου έφτασε τους $1,3 \times 10^6$ τόνους [15].

Η μέθοδος ΑΟ βασίζεται στην οξείδωση της 2-αιθυλο-ανθρακινόλης προς παραγωγή κινόνης και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η 2-αιθυλο-ανθρακινόλη διαλύεται σε μίγμα βενζολίου-αλκοόλης (με μεγάλες ανθρακικές αλυσίδες) και σ' αυτό διαβιβάζεται αέρας. Η κίνηση που σχηματίζεται ανάγεται με υδρογόνο παρουσία καταλύτη Pt ή Pd στην αρχική ανθρακινόλη. Το διάλυμα της 2-αιθυλο-ανθρακινόλης αναφέρεται και ως ο φορέας της αντίδρασης, φορέας υδρογόνου ή και πρώτη ύλη. Το μίγμα 2-αιθυλο-ανθρακινόλη-διαλύτης ονομάζεται και διάλυμα εργασίας. Άλλες κινόνες που χρησιμοποιούνται είναι η 2-tert-αμυλοανθρακινόνη και η 2-sec-αμυλοανθρακινόνη. Το διάλυμα εργασίας που περιέχει την κινόλη διαχωρίζεται από τον καταλύτη υδρογόνωσης, και στη συνέχεια αναμειγνύεται με συμπιεσμένο αέρα για να δώσει την κινόνη και το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το H_2O_2 που παράγεται εκχυλίζεται με απιονισμένο νερό. Το προϊόν είναι περιεκτικότητας 20% και συμπυκνώνεται με απόσταξη σε ελαττωμένη πίεση. Με τη μέθοδο ΑΟ ουσιαστικά παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου από υδρογόνο και οξυγόνο. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα καθώς

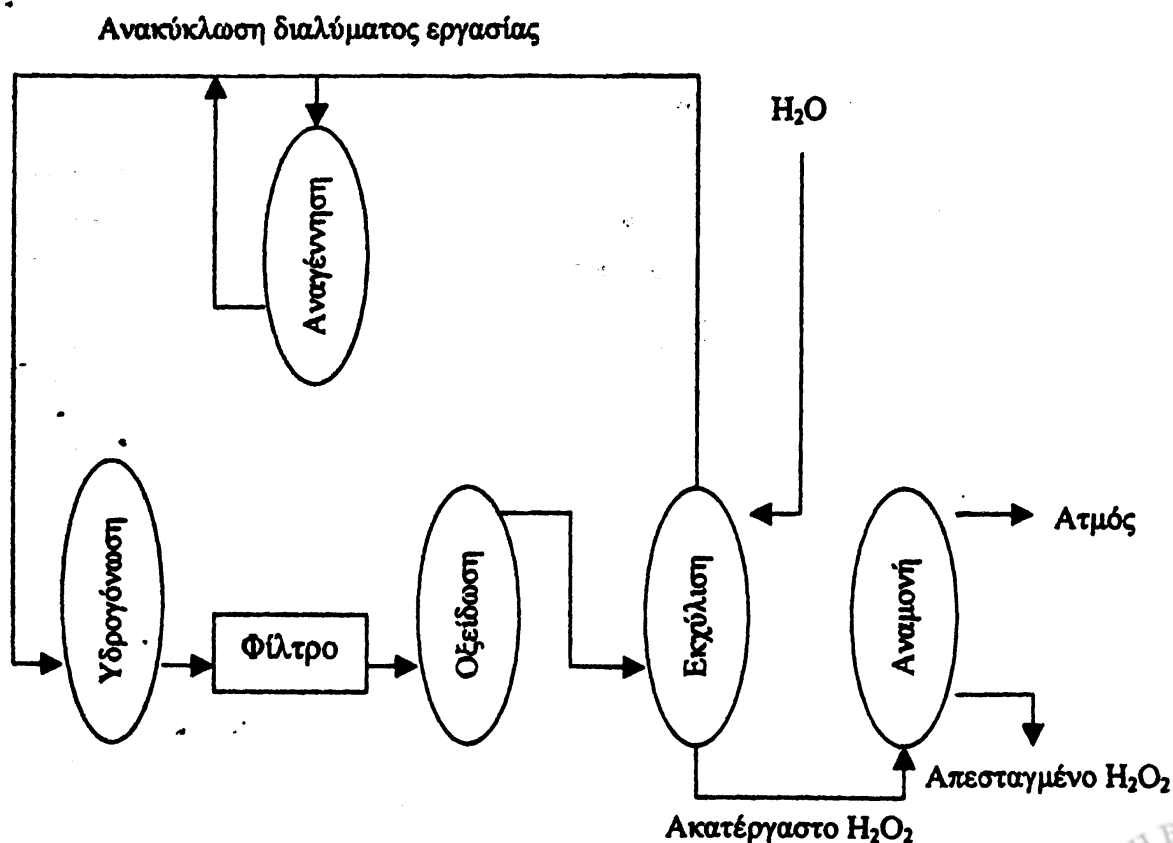


και οι διαδοχικές διεργασίες παραγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου με τη μέθοδο αυτή απεικονίζονται στα σχήματα 1.1 και 1.2, αντίστοιχα.



Σχήμα 1.1: Οι αντιδράσεις αυτοοξειδωσης για την παρασκευή του υπεροξειδίου του υδρογόνου

Η επιλογή της κινόνης είναι σημαντική και στην επιλογή της πρέπει να ληφθούν υπόψη η διαλυτότητά της, η διαλυτότητα της αντίστοιχης κινόλης, η εκλεκτική οξείδωση και να είναι εμπορικά διαθέσιμη.



Σχήμα 1.2: Σχηματικό διάγραμμα μονάδας παραγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου με τη μέθοδο ΑΟ



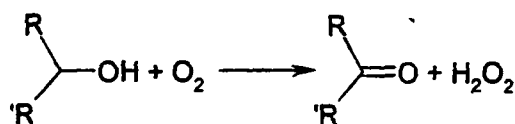
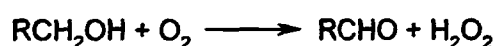
Κατά τη διάρκεια της υδρογόνωσης παράγονται και παραπροϊόντα ανάμεσα στα οποία και μερικά εποξειδία που δεν συμμετέχουν στο σχηματισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου, μειώνοντας έτσι την απόδοση της μεθόδου. Το βασικότερο βήμα είναι η υδρογόνωση διότι πολλά προϊόντα διάσπασης της κίνησης δεν μπορούν να αναχθούν κατά τη διάρκεια της υδρογόνωσης.

Η BASF κατασκεύασε στα μέσα της δεκαετίας του 1960 μια άλλη συσκευή υδρογόνωσης με καταλύτη νικέλιο (μέθοδος Raney) που λειτουργεί υπό πίεση. Ο καταλύτης αυτός έχει όμως περιορισμένη εκλεκτικότητα και πριν τη χρήση του απαιτείται προκατεργασία με μυρμηκικό αμμώνιο.

Οι περισσότερες μονάδες παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου χρησιμοποιούν ως καταλύτη το Pd λόγω της υψηλής εκλεκτικότητας, της σταθερότητάς του έναντι του υπολειμματικού υπεροξειδίου του υδρογόνου, της ευκολότερης χρήσης καθώς και της δυνατότητας επανενεργοποίησης του [16, 17].

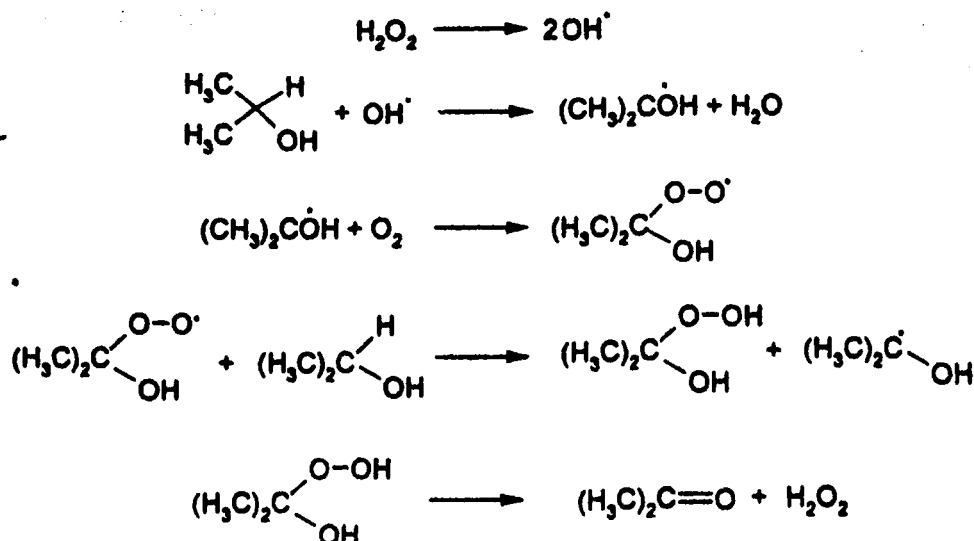
Το στάδιο της οξείδωσης γίνεται με αέρα υπό πίεση. Σήμερα εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές οξείδωσης όπως αυτή της BASF με τέσσερις στήλες στη σειρά ή της Solvay Interlox's με μια στήλη [18].

Η μέθοδος της ανθρακινόνης είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος παρασκευής υπεροξειδίου του υδρογόνου παγκοσμίως. Ως εναλλακτικές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί είναι η μέθοδος που ανέπτυξε ο Harris [19] το 1954 και χρησιμοποιήθηκε από την Shell από το 1957 μέχρι το 1980. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην οξείδωση πρωτοταγών και δευτεροταγών αλκοολών προς υπεροξείδιο του υδρογόνου και την αντίστοιχη αλδεύδη ή κετόνη όπως περιγράφεται από τις αντιδράσεις:



Μόνο η 2-προπανόλη έχει βιομηχανική χρήση διότι οι αλδεύδες που παράγονται από τις πρωτοταγείς αλκοόλες οξειδώνονται εύκολα. Η οξείδωση της 2-προπανόλης σε υγρή φάση δεν απαιτεί καταλύτη επειδή η αντίδραση είναι αυτοκαταλυόμενη από μια μικρή ποσότητα υπεροξειδίου του υδρογόνου η οποία προστίθεται στο διάλυμα για να μειώσει τον χρόνο επώασης. Η αντίδραση αυτοοξείδωσης της 2-προπανόλης και ο μηχανισμός της αντίδρασης απεικονίζονται από τις παρακάτω αντιδράσεις:





Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται απόδοση 90-94% ως προς το υπεροξειδίο του υδρογόνου και 92-94% ως προς την ακετόνη.

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί ηλεκτροχημικές μέθοδοι για την παρασκευή του υπεροξειδίου του υδρογόνου [20,21]. Μια πρωτότυπη μέθοδος αναπτύχθηκε από τους Tatarudi και Fenton [21] και συμπεριλαμβάνει τον ταυτόχρονο σχηματισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του όζοντος στην κάθοδο και άνοδο, αντίστοιχα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην παραγωγή των παραπάνω οξειδωτικών από το νερό και το οξυγόνο πάνω σε μια μεμβράνη ανταλλαγής πρωτονίων (proton-exchange membrane).

Παρά τον μεγάλο αριθμό μεθόδων παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου, η επικρατέστερη μέθοδος παραμένει η αυτοοξειδωση των παραγώγων της ανθρακινόνης.

Στην Ευρωπαϊκή ένωση λειτουργούν 22 μονάδες παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου όπως φαίνεται και στον πίνακα 1.1 [22]. Το 1997 στην Ε.Ε η συνολική παραγωγή του έφτασε τους 750.000 τόνους ως καθαρό υπεροξειδίο του υδρογόνου, σημειώνοντας αύξηση της τάξεως του 15% σε σχέση με το 1994. Ο λόγος της αύξησης της παραγωγής είναι η αντικατάσταση του χλωρίου από το υπεροξειδίο του υδρογόνου στις διεργασίες λεύκανσης και απολύμανσης σε πολλούς τομείς της βιομηχανίας.

Το 1994 η παγκόσμια κατανάλωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου έφτασε τους 1.250.000 τόνους από τα οποία το 40% στην Ευρώπη, το 34% στην Β. Αμερική, το 5% στην Ν. Αμερική, το 19% στην Ασία και το 3 % στην Αφρική και τη Μ. Ανατολή. Το 1995 υπήρχαν καταγεγραμμένες 75 μονάδες παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου σ' όλο τον κόσμο (χωρίς την Κίνα).



Πίνακας 1.1: Μονάδες παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου στην ΕΕ

Εταιρία	Τοποθεσία	Χώρα
Ausimont	Bussi	Ιταλία
	Bitterfeld (ξεκίνησε το 1996)	Γερμανία
Elf Atochem	Jarrie	Γαλλία
	Leuna (ξεκίνησε το 1997)	Γερμανία
Degussa AG	Rheinfelden	Γερμανία
	Antwerp	Βέλγιο
ÖCW Zweigniederlassung der Degussa Austria GmbH	Weissenstein	Αυστρία
EKA Chemicals	Alby	Σουηδία
	Bohus	Σουηδία
	Rjukan	Νορβηγία
Finnish Peroxides	Kuusankoski	Φινλανδία
FMC FORET	La Zaida	Ισπανία
	Delfzijl (ξεκίνησε το 1995)	Ολλανδία
Kemira Chemicals	Oulu	Φινλανδία
	Rozenburg	Ολλανδία
	Helsingborg (ξεκίνησε το 1997)	Σουηδία
	Bernburg	Γερμανία
Solvay Interox	Bad Hönningen	Γερμανία
	(σταμάτησε το 1995)	Βέλγιο
	Jemeppe	Πορτογαλία
	Povoa	Ιταλία
	Rosignano	Ισπανία
	Torrelavega	Ηνωμένο Βασίλειο

1.2 Φυσικές ιδιότητες του υπεροξειδίου του υδρογόνου

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι ένα σιροπώδες, άχρωμο υγρό, πικρής γεύσεως που σε μεγάλο όγκο παίρνει χρώμα θολό μπλε. Αναμειγνύεται με το νερό σε κάθε όγκο, ενώ διαλύεται εύκολα στις αλκοόλες και στον αιθέρα [23]. Οι βασικές του φυσικές ιδιότητες φαίνονται στον πίνακα 2.1 και δίνονται σε σύγκριση με το νερό.

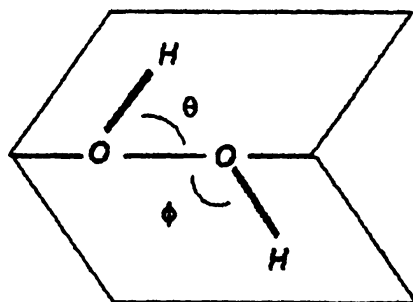
Χαρακτηριστικό είναι ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου και το νερό δεν σχηματίζουν αζεοτροπικό μίγμα και μπορούν να διαχωριστούν με απόσταξη. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου έχει υψηλό σημείο ζέσεως, το οποίο οφείλεται στο μεγάλο αριθμό δεσμών υδρογόνου με τους οποίους είναι συζευγμένα τα μόρια του. Έχει μοριακό βάρος $M.B=34,01$ και σημείο τήξεως $\Sigma.T.=-0,46^{\circ}C$ στερεοποιούμενο σε τετραγωνικούς κρυστάλλους.



Πίνακας 1.2: Φυσικές ιδιότητες του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του νερό

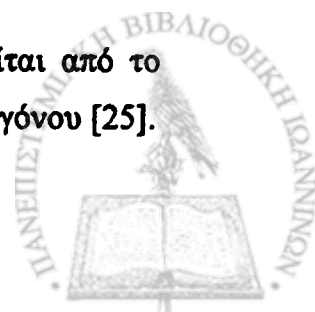
Ιδιότητα	Υπεροξείδιο του υδρογόνου	Νερό
Σημείο τήξεως (°C)	-0,43	0,0
Σημείο ζέσεως (°C)	150,2	100
Θερμότητα τήξεως (J/g)	368	334
Θερμότητα εξάτμισης (J g ⁻¹ K ⁻¹)		
Στους 25°C	1519	2443
Στο σημείο ζέσεως	1387	2258
Ειδική θερμότητα (J g ⁻¹ K ⁻¹)		
Υγρού (25°C)	2,629	4,182
Αερίου (25°C)	1,352	1,865
Σχετική πυκνότητα (g cm ⁻³)		
0°C	1,4700	0,9998
20°C	1,4500	0,9980
25°C	1,4425	0,9971
Ιξώδες (mPa s)		
0°C	1,819	1,792
20°C	1,249	1,002
Κρίσιμη θερμοκρασία (°C)	457	374,2
Κρίσιμη πίεση (Μρα)	20,99	21,44
Δείκτης διάθλασης (η _D ²⁰)	1,4084	1,3330

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου έχει τη δομή του σχήματος 1.3, με γωνίες θ και ϕ 95° και 120°, αντίστοιχα, όπως αποδείχτηκε από μετρήσεις της διπολικής ροπής ($\mu = 2.2$ debyes) και από τα φάσματα στο υπέρυθρο [24]. Όπως φαίνεται στο σχήμα, ένα Η εξέρχεται από το επίπεδο των τριών άλλων ατόμων κατά γωνία 93°51'. Το μόριο έχει άξονα συμμετρίας δευτέρας τάξεως κάθετο στο δεσμό O-O. Οι δεσμοί H-O και O-O έχουν μήκη $0,097 \pm 0,001$ nm και $0,149 \pm 0,001$ nm, αντίστοιχα, και η ενέργεια διάσπασης του υπεροξειδικού δεσμού O-O είναι 51 ± 1 kcal/mole.

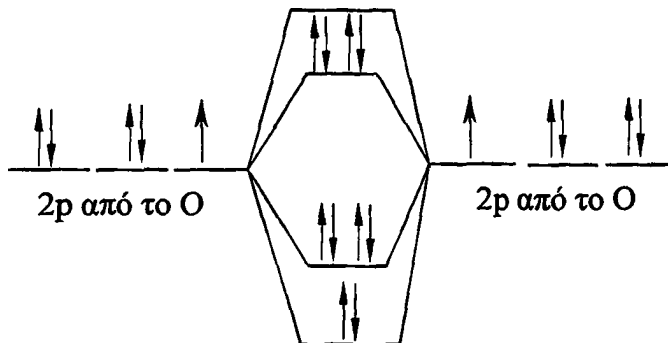


Σχήμα 1.3: Δομή του μορίου του υπεροξειδίου του υδρογόνου

Η χαμηλή ενέργεια διάσπασης του υπεροξειδικού δεσμού O-O εξηγείται από το διάγραμμα μοριακού τροχιακού του δεσμού O-O του υπεροξειδίου του υδρογόνου [25].



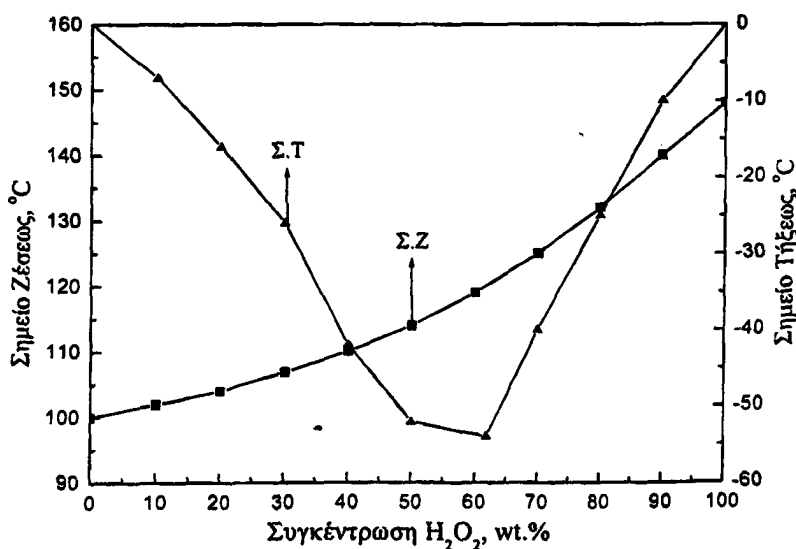
Όπως φαίνεται και στο σχήμα 1.4 στο υπεροξειδικό ανιόν επειδή το κάθε οξυγόνο συνεισφέρει από 5 ηλεκτρόνια στα 12 μοριακά τροχιακά, δύο μη δεσμικά τροχιακά είναι συμπληρωμένα, αφήνοντας έτσι μόνο ένα δεσμικό τροχιακό.



Σχήμα 1.4: Διάγραμμα μοριακών τροχιακών για το δεσμό O-O του H_2O_2

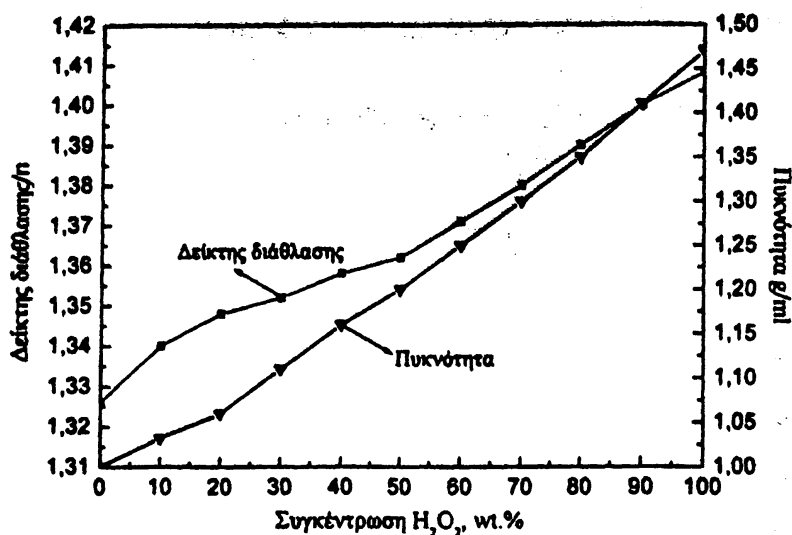
Η αστάθεια των υδατικών διαλυμάτων του υπεροξειδίου του υδρογόνου, ειδικά παρουσία μεταλλικών ιόντων, οφείλεται στην χαμηλή τιμή της ενέργειας διάσπασης. Τα πυκνά κυρίως διαλύματά του, διασπώνται βίαια όταν έλθουν σε επαφή με ίχνη ακαθαρσιών, ζωικού άνθρακα και μετάλλων σε λεπτό διαμερισμό και άλλων ουσιών σε κονιώδη μορφή. Δραστικοί καταλύτες για τη διάσπασή του είναι το MnO_2 , το μέλαν της Pt, το κολλοειδές παλλάδιο και τα κατιόντα $Cu(II)$. Διασπώνται επίσης δια θερμάνσεως ή προσθήκης αλκαλίων, ενώ η παρουσία ορυκτών οξέων τα σταθεροποιεί.

Τα διαγράμματα των σχημάτων 1.5 και 1.6 απεικονίζουν τη μεταβολή των σημείων ζέσεως και τήξεως για διάφορα διαλύματα υπεροξειδίου του υδρογόνου, καθώς και του δείκτη διάθλασης και της πυκνότητάς του [26].



Σχήμα 1.5: Εξάρτηση του Σ.Ζ. και Σ.Τ. από τη συγκέντρωση του H_2O_2

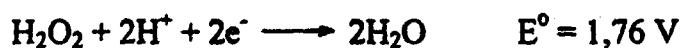




Σχήμα 1.6: Εξάρτηση του δείκτη διάθλασης και της πυκνότητας από τη συγκέντρωση του H₂O₂

1.3 Χημικές ιδιότητες του υπεροξειδίου του υδρογόνου

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου έχει δυναμικό οξειδοαναγωγής $E^{\circ} = 1,76 \text{ V}$ για την ημιαντίδραση:



Το δυναμικό αυτό το κατατάσσει στις ισχυρές οξειδωτικές ενώσεις, όπως φαίνεται και στον πίνακα 1.3 [1].

Πίνακας 1.3: Δυναμικά οξείδωσης μερικών οξειδωτικών ουσιών

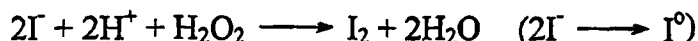
Οξειδωτική ουσία	E°/V
F ₂	3,00
HO [•]	2,80
[O]	2,42
O ₃	2,01
H ₂ SO ₅	1,81
H ₂ O ₂	1,76
KMnO ₄	1,70
HO ₂ [•]	1,70
HOCl	1,49
Cl ₂	1,27
ClO ₂	1,27
O ₂	1,20



Το υπεροξείδιο του υδρογόνου δρα ως οξειδωτικό και ως αναγωγικό. Η οξειδωτική του δράση φαίνεται από την αντίδραση:



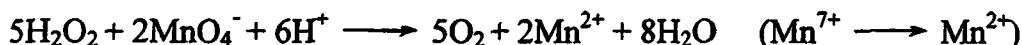
Άλλο παράδειγμα οξείδωσης σε όξινο περιβάλλον είναι:



Ως οξειδωτικό μέσο δρα και σε αλκαλικό περιβάλλον σύμφωνα με την ημιαντίδραση:



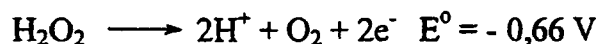
Η αναγωγική δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε όξινο και αλκαλικό περιβάλλον φαίνεται από τις παρακάτω αντιδράσεις:



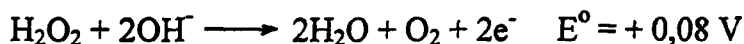
Σε αλκαλικό περιβάλλον, παράδειγμα αναγωγής αποτελεί η παρακάτω αντίδραση:



Η ημιαντίδραση αναγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε όξινο περιβάλλον είναι:



Η ημιαντίδραση αναγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε αλκαλικό περιβάλλον είναι:

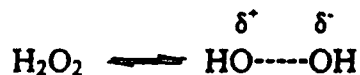


Ως μέσο αναγωγής το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι πιο ήπιο σε όξινο περιβάλλον, ενώ σε αλκαλικό είναι αρκετά ισχυρό.

Είναι πολύ ασθενές οξύ με σταθερά διαστάσεως $K_{a1} = 2,50 \times 10^{-12}$ στους 25°C μόνον για το πρώτο στάδιο ιοντισμού, αφού το δεύτερο είναι ουσιαστικά αμελητέο, με συνέπεια τα άλατά του με ισχυρές βάσεις, καλούμενα και μεταλλικά υπεροξείδια, να υδρολύονται ακαριαία και βίαια σε άμεση επαφή με το νερό.



Το υπεροξειδίο του υδρογόνου έχει ηλεκτρονιόφιλες και πυρηνόφιλες ιδιότητες. Οι ηλεκτρονιόφιλες ιδιότητές του προκύπτουν από την πόλωση του δεσμού O-O, όπως φαίνεται και στο σχήμα:



Το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι 10^4 φορές πιο πυρηνόφιλο από το νερό και συμμετέχει σε αντιδράσεις προσθήκης, π.χ. με την καρβονυλική ομάδα σχηματίζοντας υδροξυυδροούπεροξειδία (υπερακετάλες και υπερκετάλες). Οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται ως καταλύτες έναρξης (εκκινητές) σε πολλές αντιδράσεις πολυμερισμού, παρέχοντας ελεύθερες ρίζες από την αντίδραση ομόλυσης του δεσμού O-O. Η ομόλυση συμβαίνει υπό θέρμανση παρουσία μετάλλων μετάπτωσης και υπεριώδους ακτινοβολίας. Η ρίζα OH· που παράγεται όταν το υπεροξειδίο του υδρογόνου ακτινοβολείται στα 254 nm, είναι πολύ ισχυρό μη εκλεκτικό οξειδωτικό μέσο, δεύτερο μετά το φθόριο. Επειδή είναι μη εκλεκτικό οξειδωτικό δεν χρησιμοποιείται στην οργανική σύνθεση. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας χρησιμοποιείται ευρέως στην απολύμανση του πόσιμου νερού και στην επεξεργασία των αποβλήτων [27]. Το OH· παράγεται και από αντιδράσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου με πολλά στοιχεία μετάπτωσης, από τα οποία το Fe(II) χρησιμοποιείται περισσότερο, και η αντίδραση αυτή είναι γνωστή και ως αντίδραση Fenton [28]. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου αντιδρά επίσης με ακυλοενώσεις, όπως οι ανυδρίτες, δίνοντας υπεροξέα.

Σε αλκαλικό περιβάλλον το υπεροξειδίο του υδρογόνου διίσταται σύμφωνα με την αντίδραση:



Το ανιόν HO_2^- (υπερυδροξύλιο) δρα ως ισχυρό πυρηνόφιλο και είναι το σημαντικότερο δραστικό ενδιάμεσο που συμμετέχει στις διεργασίες λεύκανσης.

Σε ισχυρό όξινο περιβάλλον (μη υδατικό) το υπεροξειδίο του υδρογόνου πρωτονιώνεται ή δίνει υδροξύλια.



Το πρωτονιωμένο προϊόν δρα ως ισχυρό ηλεκτρονιόφιλο και χρησιμοποιείται σε αντιδράσεις υδροξυλίωσης, όπως η υδροξυλίωση της φαινόλης, αλλά οι ακραίες όξινες συνθήκες που απαιτούνται για τον σχηματισμό του περιορίζουν τη χρήση του.

1.4 Χρήσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου χρησιμοποιείται ευρύτατα ως κύριο αντιδραστήριο και λευκαντικό μέσο στη βιομηχανία πλαστικών, χρωμάτων, υφασμάτων, τροφίμων και ποτών, καθώς και στην φαρμακευτική και ιατρική ως ισχυρό αντισηπτικό, αντιμικροβιακό και απολυμαντικό μέσο [29,30]. Χρησιμοποιείται επίσης ως καύσιμη ύλη προώσεως πυραύλων στη διαστημική τεχνολογία, σε συνδυασμό με ένα ισχυρό αναγωγικό σώμα, όπως η πυκνή υδραζίνη (rocket propulsion). Υδατικά του διαλύματα περιεκτικότητας 3-98% w/w, διατίθενται σταθεροποιημένα με ακετανιλίδιο, αιθέρα, γλυκερίνη ή βαρβιτουρικό οξύ.

Τα συνηθέστερα εμπορικά του σκευάσματα είναι: Α) Oxydol, περιεκτικότητας 6%, Β) Superoxol, περιεκτικότητας 12% και Γ) Perhydrol, περιεκτικότητας 30%, τα οποία αναφέρονται και ως "20 όγκων", "40 όγκων" και "100 όγκων" αντιστοίχως. Τούτο διότι όγκος 1 mL από τα διαλύματα αυτά μετά την πλήρη θερμική διάσπαση απελευθερώνει όγκους 20, 40 και 100 mL (cm³) ενεργού οξυγόνου αντιστοίχως, μετρημένο υπό κανονικές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας.

Επίσης διατίθεται στο εμπόριο και σε στερεή μορφή ως σύμπλοκο με την ουρία, με το ανθρακικό νάτριο (Sodium Percarbonate–PCS) και το βορικό νάτριο (Sodium Perborate–PBS). Το σύμπλοκο ουρία–υπεροξείδιο του υδρογόνου περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου που φθάνει σε ποσοστά πάνω από 85%. Το σύμπλοκο αυτό χρησιμοποιείται ως πηγή υπεροξειδίου του υδρογόνου για τη σύνθεση άλλων ενώσεων, κυρίως υπεροξέων [31,32]. Τα δύο τελευταία σύμπλοκα είναι σχετικά φθηνά προϊόντα και χρησιμοποιούνται ευρέως στα απορρυπαντικά ως πηγές υπεροξειδίου του υδρογόνου το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με τους ενεργοποιητές λεύκανσης όπως η τετραακετυλο αιθυλενοδιαμίνη (TAED-tetraacetyl ethylenediamine) και ελευθερώνουν υπεροξικό οξύ το οποίο είναι ισχυρότερο απολυμαντικό μέσο από το υπεροξείδιο του υδρογόνου [33-35]. Το PCS και το PBS είναι σταθερές ουσίες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και διασπώνται σε θερμοκρασία 100°C. Επίσης έχουν σημασία στην οργανική σύνθεση αφού ελευθερώνουν υπεροξείδιο του υδρογόνου και σε μη υδατικά διαλύματα.



Οι σημαντικότερες συνθέσεις οργανικών ενώσεων, όπου η χρήση του υπεροξειδίου του υδρογόνου θεωρείται απαραίτητη, είναι η παρασκευή οργανικών υπεροξειδίων (υπεροξέων, υδροϋπεροξειδίων, διακυλούπεροξειδίων, κ.ά.), η εποξείδωση των ολεφινών, η υδροξυλίωση των φαινολών και η οξείδωση των αμινών [36-40].

Στη χημεία τροφίμων χρησιμοποιείται και στις μηχανές αποστείρωσης για την απολύμανση των υλικών συσκευασίας. Στις διεργασίες αυτές η ενεργοποίηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου γίνεται με θέρμανση ή με την παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας [41].

Σημαντική είναι η χρήση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και σε προϊόντα καθημερινής υγιεινής, όπως οι οδοντόκρεμες, τα διαλύματα καθαρισμού των δοντιών, διάφορα αποσμητικά, καλλυντικά, υγρά καθαρισμού φακών επαφής, κ.ά.

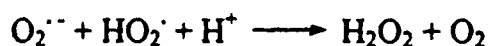
1.5 Το υπεροξείδιο του υδρογόνου στο περιβάλλον

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου στο περιβάλλον προέρχεται από φυσικές διεργασίες και ανθρωπογενείς παράγοντες. Στους ανθρωπογενείς παράγοντες περιλαμβάνονται η παραγωγή, συσκευασία και διάφορες διεργασίες χρήσης προϊόντων που περιέχουν υπεροξείδιο του υδρογόνου. Στη φύση το υπεροξείδιο του υδρογόνου παράγεται από φωτοχημικές, χημικές και βιοχημικές αντιδράσεις.

Στους ζωντανούς οργανισμούς το υπεροξείδιο του υδρογόνου παράγεται από τα κύτταρα κατά τη διάρκεια αντιδράσεων υδροξυλίωσης και οξείδωσης που λαμβάνουν χώρα στον αερόβιο μεταβολισμό. Στους ζωντανούς οργανισμούς υπάρχει μια ισορροπία ανάμεσα στις αντιδράσεις που παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου και αυτές που το καταστρέφουν [42].

Στις αντιδράσεις σχηματισμού του υπεροξειδίου του υδρογόνου στα κύτταρα συμπεριλαμβάνονται η αυτοοξειδοαναγωγή του υπερωπεροξειδίου (superoxide dismutation) και οι αντιδράσεις που συμμετέχουν οξειδάσες.

Στην πρώτη κατηγορία έχουμε την αντίδραση του υπερωπεροξειδικού ανιόντος με την πρωτονιωμένη του μορφή σύμφωνα με την αντίδραση:



Στη δεύτερη κατηγορία το υπεροξείδιο του υδρογόνου παράγεται από αντιδράσεις οξείδωσης όπου συμμετέχουν οξειδάσες. Για παράδειγμα, η οξείδωση της γλυκόζης παρουσία γλυκόζης οξειδάσης παράγει υπεροξείδιο του υδρογόνου. Οι αντιδράσεις αυτής της κατηγορίας έχουν μεγάλη σημασία στην κλινική χημεία για τον



προσδιορισμό αναλυτών που αποτελούν σημαντικές παραμέτρους για την κατάσταση της υγείας του ανθρώπου.

Στις αντιδράσεις καταβολισμού του υπεροξειδίου του υδρογόνου περιλαμβάνονται η διάσπασή του σε νερό και οξυγόνο παρουσία καταλάσης και η διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου με τη συμμετοχή της γλουταθειόνης υπεροξειδάσης. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου αντιδρά με ένα τριπεπτίδιο που ονομάζεται γλουταθειόνη το οποίο οξειδώνεται και στη συνέχεια ξαναανάγεται με τη βοήθεια του φωσφορυλιωμένου NADH, το οποίο είναι η πηγή ηλεκτρονίων για την αντίδραση αναγωγής.

1.6 Παρασκευή του υπεροξικού οξέος

Το υπεροξικό οξύ ανήκει στην ομόλογη σειρά των υπεροξέων και είναι το σημαντικότερο απ' αυτά σε ότι αφορά τις χρήσεις του στην οργανική σύνθεση και τις εφαρμογές του ως οξειδωτική ουσία. Παρασκευάστηκε για πρώτη φορά από τον Brodie το 1864 ως πρόσμιξη με το διακετυλοϋπεροξείδιο. Ο D'Ans και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που το απομόνωσαν και το χαρακτήρισαν 20 χρόνια αργότερα [43]. Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα παρασκευάστηκαν τα πρώτα αραιά διαλύματα του υπεροξικού οξέος με υδρόλυση του διακετυλοϋπεροξειδίου και του βενζοϋλοακετυλο-υπεροξειδίου.

Ο D'Ans και οι συνεργάτες του παρασκεύασαν τα πρώτα πυκνά διαλύματα υπεροξικού οξέος με χρήση πυκνών διαλυμάτων υπεροξειδίου του υδρογόνου [43]. Η μέθοδος που εφάρμοσαν στηρίζεται στην αντίδραση του διακετυλοϋπεροξειδίου με πυκνό διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (98%) από την οποία παράγεται πυκνό διάλυμα υπεροξικού οξέος σε οξικό οξύ. Αργότερα χρησιμοποιήθηκαν και άλλες αντιδράσεις όπως η αντίδραση του οξικού ανυδρίτη, του ακετυλοχλωριδίου και του οξικού οξέος με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα για την παρασκευή του υπεροξικού οξέος είναι αυτές που βασίζονται στην αντίδραση του οξικού οξέος με υπεροξείδιο του υδρογόνου με καταλύτη το θειικό οξύ και η αυτοοξείδωση της ακεταλδεΐδης.

Η σημαντικότερη και η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος παρασκευής του υπεροξικού οξέος βασίζεται στην αντίδραση του οξικού οξέος με πυκνό υπεροξείδιο του υδρογόνου (30-98%) παρουσία θειικού οξέος σύμφωνα με την αντίδραση:



Η παραπάνω αντίδραση είναι αμφίδρομη και η επίτευξη της ισορροπίας απαιτεί την παρουσία ενός ισχυρού ανόργανου οξέος ως καταλύτη. Η ταχύτητα σχηματισμού του υπεροξικού οξέος και αυτή της υδρόλυσής του εξαρτώνται από την συγκέντρωση του ανόργανου οξέος και, για την περίπτωση που ως καταλύτης χρησιμοποιείται υπερχλωρικό οξύ, είναι $1 \times 10^{-4} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ στους 25°C . Η μέγιστη ταχύτητα διάσπασης επιτυγχάνεται σε pH 8,2 που συμπίπτει με το pKa του υπεροξικού οξέος.

Το θειικό οξύ (2%) χρησιμοποιείται συνήθως ως καταλύτης της αντίδρασης, αλλά και το σουλφονικό, το νιτρικό, το φωσφορικό και το υδροφθορικό οξύ έχουν χρησιμοποιηθεί γι' αυτό το σκοπό.

Για την επίτευξη της παραπάνω ισορροπίας χρειάζονται 12 έως 16 ώρες. Έτσι για παράδειγμα ένα ισομοριακό μίγμα αποτελούμενο από οξικό οξύ, υπεροξειδίο του υδρογόνου 98% και θειικό οξύ 2% φθάνει σε ισορροπία σε 16 ώρες και το σχηματιζόμενο υπεροξικό οξύ έχει περιεκτικότητα 50%. Εάν η περιεκτικότητα του H_2O_2 που χρησιμοποιείται είναι 90%, τότε το σχηματιζόμενο διάλυμα θα έχει περιεκτικότητα 40% και αν η αρχική περιεκτικότητα του H_2O_2 είναι 30%, τότε παράγεται διάλυμα 10% σε υπεροξικό οξύ.

Για το διαχωρισμό του καθαρού υπεροξικού οξέος από το μίγμα της ισορροπίας εφαρμόζεται συνήθως κλασματική απόσταξη υπό κενό. Λόγω της πτητικότητας του υπεροξικού οξέος, ακόμα και με απόσταξη αραιών διαλυμάτων υπεροξικού οξέος (στους 20 με 30°C και σε πίεση 10 έως 15 mm Hg) μπορούν να παρασκευαστούν διαλύματα που φτάνουν έως και 80% σε υπεροξικό οξύ.

Η σταθερά ισορροπίας για την αντίδραση παρασκευής του υπεροξικού οξέος είναι 3 και εξαρτάται από τη συγκέντρωση του θειικού οξέος και του υπεροξειδίου του υδρογόνου, καθώς και από τη θερμοκρασία. Η μετατόπιση της χημικής ισορροπίας προς τα δεξιά επιτυγχάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου ή με περίσσεια οξικού οξέος. Πειραματικά, έχει βρεθεί, ότι για καλύτερη απόδοση της αντίδρασης σχηματισμού του υπεροξικού οξέος, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και το οξικό οξύ πρέπει να αναμιχθούν σε αναλογία 1:10 όταν η περιεκτικότητα του υπεροξειδίου του υδρογόνου κυμαίνεται από 70 έως 90%.

Η περίσσεια τού οξικού οξέος μειώνει την απόδοση της αντίδρασης λόγω της αντίδρασής του με το σχηματιζόμενο υπεροξύ παρουσία θειικού οξέος προς σχηματισμό διακετυλούπεροξειδίου:



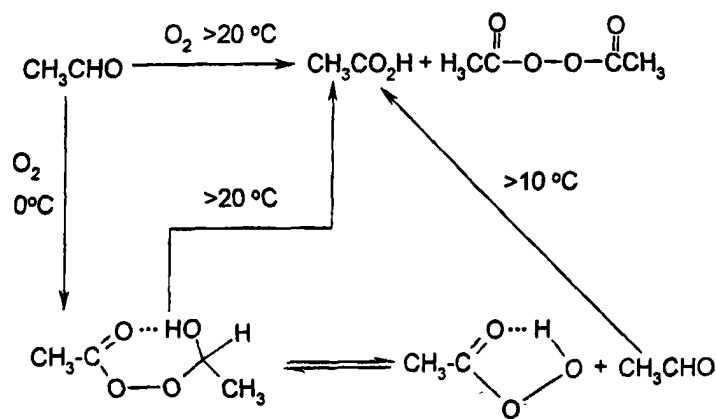
Η παραπάνω μέθοδος χρησιμοποιείται περισσότερο για την παρασκευή του υπεροξικού οξέος και τα εμπορικά του διαλύματα περιέχουν 35-40% υπεροξικό οξύ, 45% οξικό οξύ, 15% νερό και λιγότερο από 5% υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Αν χρησιμοποιηθεί οξικός ανυδρίτης στη θέση του οξικού οξέος, το προϊόν θα είναι διάλυμα υπεροξικού οξέος σε οξικό οξύ και η αντίδραση φτάνει σε ισορροπία πολύ πιο γρήγορα. Επίσης με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται μεγαλύτερη απόδοση της αντίδρασης και η μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε υπεροξικό οξύ γίνεται σχεδόν ποσοτικά. Η μέθοδος αυτή παρά τη μεγαλύτερη απόδοση δεν έχει τύχει ευρείας εφαρμογής λόγω της επικινδυνότητας της ανάμιξης του υπεροξειδίου του υδρογόνου με τον οξικό ανυδρίτη.

Άλλη μέθοδος που έχει προταθεί στη βιβλιογραφία για την παρασκευή του υπεροξικού οξέος είναι η αζεοτροπική μέθοδος. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, στοιχειομετρικές ποσότητες οξικού οξέος και υπεροξειδίου του υδρογόνου αντιδρούν παρουσία καταλύτη (θειικού οξέος), ενός σταθεροποιητή και περίσσειας αδρανούς οργανικού διαλύτη. Ο διαλύτης χρησιμεύει για αραίωση αλλά και για την απομάκρυνση του νερού, μετατοπίζοντας έτσι την ισορροπία προς τα δεξιά. Το υπεροξικό οξύ παραμένει στο απόσταγμα μαζί με τον οργανικό διαλύτη, ο οποίος μπορεί να είναι οξικός αιθυλεστέρας, προπιονικός αιθυλεστέρας ή χλωροφόρμιο. Η αντίδραση γίνεται υπό ελαττωμένη πίεση (70-450 mm Hg) και σε θερμοκρασία από 40 έως 70°C.

Οι παραπάνω μέθοδοι παρασκευής υπεροξικού οξέος μειονεκτούν ως προς την ύπαρξη μικρών ποσοτήτων θειικού οξέος στο τελικό διάλυμα, το οποίο ευνοεί την αντίδραση υδρόλυσης του υπεροξικού οξέος. Τα διαλύματα αυτά πρέπει να διατηρούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες προς αποφυγή της μετατροπής του υπεροξικού οξέος σε υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Άλλη μέθοδος που έχει προταθεί για την παρασκευή του υπεροξικού οξέος είναι η



οξειδωση της ακεταλδεϋδης. Η αυτοοξειδωση της ακεταλδεϋδης είναι η καλύτερη μέθοδος παρασκευής του υπεροξικού οξέος απαλλαγμένου από προσμίξεις. Σύμφωνα με το μηχανισμό της αντίδρασης σε χαμηλές θερμοκρασίες σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο ασταθές προϊόν, η μονοϋπεροξική ακεταλδεϋδη (acetaldehyde monoperoxyacetate), το οποίο υπό κατάλληλες συνθήκες μετατρέπεται σε υπεροξικό οξύ.

1.7 Φυσικές και χημικές ιδιότητες του υπεροξικού οξέος

Το υπεροξικό οξύ είναι άχρωμο υγρό με έντονη ερεθιστική οσμή. Αποθηκεύεται καλύτερα σε γυάλινα σκεύη λόγω της αντίδρασής του με τα πλαστικά. Το σημείο τήξεώς του είναι περίπου 0°C ενώ το σημείο ζέσεως υπό κανονικές συνθήκες πίεσης είναι 110°C. Η σχέση ανάμεσα στην τάση ατμών και την απόλυτη θερμοκρασία για το υπεροξικό οξύ είναι $\log P(mm) = 8.911 - 2311/T$. Η τάση ατμών του υπεροξικού οξέος είναι υψηλότερη από αυτή του οξικού οξέος ενώ το σημείο ζέσεως είναι χαμηλότερο παρόλο ότι έχουμε ένα οξυγόνο παραπάνω. Αυτό εξηγεί την ύπαρξη ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου στο υπεροξικό οξύ ενώ στα καρβοξυλικά οξέα σχηματίζονται διμερή με δεσμούς υδρογόνου [43,44]. Ο δείκτης διάθλασης για το υπεροξικό οξύ είναι 1,3994 στους 15°C και 1,3964 στους 20°C. Η πυκνότητα του είναι 1,1037 στους 20°C.

Το υπεροξικό οξύ αναμειγνύεται πλήρως με το νερό, τον οξικό αιθυλεστέρα και άλλους εστέρες, το χλωροφόρμιο, την ακετόνη, το οξικό οξύ και πολλούς άλλους οργανικούς διαλύτες οι οποίοι δεν οξειδώνονται από τα υπεροξέα. Η θέρμανση του υπεροξικού οξέος πάνω από του 110°C συνοδεύεται από έκρηξη, ενώ τα πυκνά του διαλύματα όταν παγώνουν και η θερμοκρασία τους φτάσει τους -20°C, εκρήγνυνται ακόμα και με τριβή. Τα προϊόντα διάσπασής του είναι το διοξείδιο του άνθρακα, το μυρμηκικό οξύ και το γλυκολικό οξύ. Το υπεροξικό οξύ διασπάται παρουσία του μέλανος της Pt σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ τα βασικά του διαλύματα είναι ασταθή και υδρολύονται δίνοντας υπεροξειδίο του υδρογόνου και οξικό οξύ. Η υδρόλυση καταλύεται από τα άλατα του μαγνησίου. Άλλα μέταλλα μεταπτώσεως όπως ο χαλκός, ο σίδηρος και το κοβάλτιο καταλύουν τη διάσπασή του προς σχηματισμό μονοξειδίου και διοξειδίου του άνθρακα σε μια αντίδραση που συμμετέχουν ενδιάμεσες ρίζες. Γενικά, τα διαλύματα του υπεροξικού οξέος είναι ασταθή σε βασικό pH ενώ το όξινο περιβάλλον δεν επηρεάζει τη σταθερότητά του.



Τα διαλύματα του υπεροξικού οξέος σε οξικό οξύ θεωρούνται τα πιο σταθερά από όλα τα άλλα της ομόλογης σειράς των υπεροξέων. Έτσι, τα εμπορικά του διαλύματα είναι σταθερά σε θερμοκρασία 2-8°C για πάνω από δύο μήνες.

Η ενέργεια διάσπασης του δεσμού O-O είναι 34 kcal/mole, η οποία είναι μεγαλύτερη από την ενέργεια διάσπασης άλλων μελών της ομόλογης σειράς.

Το υπεροξικό οξύ είναι κατά 3000 φορές ασθενέστερο από το οξικό οξύ με $pK=8,2$. Τα υδατικά του διαλύματα σταθεροποιούνται με την προσθήκη συμπλεκτικών ενώσεων για τα μέταλλα μετάπτωσης όπως τα πυροφωσφορικά ή τα πολυφωσφορικά άλατα. Επίσης η πυριδίνη και το πικολινικό οξύ είναι αποτελεσματικοί σταθεροποιητές των διαλυμάτων που υπεροξικού οξέος.

1.8 Χρήσεις του υπεροξικού οξέος

Το υπεροξικό οξύ είναι μικροβιοκτόνο, βακτηριοκτόνο και μυκητοκτόνο [45,46]. Η χρήση του υπεροξικού οξέος στις διεργασίες απολύμανσης είναι αποτελεσματική διότι οξειδώνει τις πρωτεΐνες και πολλά άλλα συστατικά των κυττάρων, προκαλώντας την καταστροφή τους. Ο μηχανισμός της οξείδωσης βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων από τους μικροοργανισμούς στο οξειδωτικό μέσο [47]. Οι εφαρμογές απολύμανσης με υπεροξικό οξύ γίνονται και σε χαμηλές θερμοκρασίες και η αντιμικροβιακή του δράση δεν είναι εκλεκτική. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ανθεκτικότητας πολλών μικροοργανισμών λόγω της μακροχρόνιας χρήσης του υπεροξικού οξέος στις διεργασίες απολύμανσης [48]. Άλλα πλεονεκτήματα του υπεροξικού οξέος έναντι άλλων ουσιών που χρησιμοποιούνται για απολύμανση είναι ότι αφαιρεί τις οσμές, δεν προκαλεί αφρισμό κατά την χρήση του και τα προϊόντα διάσπασής του είναι μη-τοξικά [49-52].



Βιβλιογραφία

- [1] C.W. Jones, *Application of Hydrogen Peroxide and Derivatives*, RSC, Cambridge, 1999.
- [2] G.M.G.C. Renard, Y. Rohoy, C. Hubert, G.D. Valle, J.F. Thibault and J.P. Savina, *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 30 (1996) 398.
- [3] C.L. Schneider, *Low-temperature sterilization alternatives in the 1990s*, *Tappi J.* 77 (1994) 115.
- [4] P. Wurster, *Text. Prax. Int*, 47 (1992) 960.
- [5] C.L. Forber, *Pulp. Pap.*, 66 (1992) 90.
- [6] CEFIC, Conseil Européen de l'Industrie Chimique/European Chemical Industry Council, *Peroxygen Sector Group*, Brussels, Belgium, 1996.
- [7] L.J. Thenard, *Annal. Chim. Phys.*, 8 (1818) 306.
- [8] W.C. Schumb, C.N. Satterfield and R.L. Wentworth, in '*Hydrogen Peroxide*', Rheinhold Publ. Co., New York, 1955.
- [9] H. Meidinger, *Annal. Chem. Pharm.*, 88 (1853) 57.
- [10] H. Berthelot, *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, 86 (1878) 71.
- [11] W.M. Weigart, H. Delle and G. Kabish, *Chem.-Ztg.*, 99 (1975) 101.
- [12] W. Manchot, *Liebigs Ann. Chim.*, (a)1901, 314, 377; (b) 316 (1901) 331.
- [13] J.H. Walton and G.W. Filson, *J. Am. Chem. Soc.*, 54 (1932) 3228.
- [14] BASF, DRP 649234; Pfeiderer, DRP 6583767.
- [15] *Chemical Economics Handbook*, 1997.
- [16] BASF DE 801840.
- [17] Degussa, DE 1542089.
- [18] J.A. Williams, *Chem. Ind.*, (London), 76 (1959).
- [19] *Shell Development Corporation*, US 2871104.
- [20] A.C.Lee and T.C. Choi, *Chem. Eng. Commun.*, 123 (1993) 179.



- [21] P. Tatapudi and J.M. Fenton, *J. Electrochem. Soc.*, 140 (1993) 55.
- [22] CEFIC CEFIC, Conseil Européen de l'Industrie Chimique/European Chemical Industry Council, *Peroxygen Sector Group, Production Figures in European Union*, Brussels, Belgium, 1997.
- [23] Ι.Μ. Τσαγκάρη, *Ανόργανη Χημεία των Αντιπροσωπευτικών Στοιχείων*, Ιωάννινα, 1983.
- [24] Π.Π. Καραγιαννίδης, *Τα Χημικά Στοιχεία και οι Ενώσεις τους*, Θεσσαλονίκη, 1986.
- [25] V. Vacque, B. Sombert, J.P. Huvenne, P. Legrand and S. Suc, *Spectrochimica Acta*, Part A, 53 (1997) 55.
- [26] G. Scatchard, G.M. Kavanagh, L.B. Ticknor. *J. Amer. Chem. Soc.*, 74 (1952) 3715.
- [27] L.A. Beeman and J.S. Reichert, *The Bleaching and Pulp*, TAPPI Monograph, Series No. 10, NY 1953.
- [28] H.J. Fenton, *Proc. Chem. Soc. London*, 9 (1893) 113, H.J. Fenton, *J. Chem. Soc.*, 65 (1894) 899.
- [29] D.F. McMillen and D.M. Golden, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 33 (1982) 493.
- [30] H. Samani, D. Meisel and G. Czapski, *J. Chem. Soc. Dalton. Trans.*, 56 (1972) 1273.
- [31] L. Lu, E.W. Hughes and P. Gigure, *J. Am. Chem. Soc.*, 63 (1941) 1507.
- [32] M.S. Cooper, H. Heaney, A.J. Newbold and W.R. Sanderson, *Synlett.*, (1990) 553.
- [33] H. Newman and R.B. Angier, *Tetrahedron*, 26 (1970) 825.
- [34] J. Remound, *Rev. Prod. Chim.*, 57 (1954) 825.
- [35] T.K. Das, A.K. Mandavawalla and S.K. Datta, *Colourage*, 30 (1983) 15.
- [36] Manson, *Acta. Chem. Scand.*, 15 (1961) 934.
- [37] M.A.A.F. Corrondo, W.P. Griffith, W.P. Jones and D.P. Shapski, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (1977) 2323.
- [38] Kirk-Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology*, 3rd Ed., Wiley, New York, Vol. 17, 1982.
- [39] A.K. Galway and W.J. Hood, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 78 (1982) 2815.



- [40] G.W. Kabalka, T.M. Shoup and N.M. Goudgaon, *J. Org. Chem.*, 54 (1989) 5930.
- [41] M.L. Bianchi, R. Cristol and U. Schuchardt, *Bioresource Technology*, 68 (1999) 17.
- [42] B. Halliwell, Hydrogen Peroxide in the human body, *FEBS Letters*, 486 (2000) 1.
- [43] D. Swern, *Organic Peroxides*, Wiley-Interscience, New York, 1970.
- [44] G. Boullion, C. Lick and K. Schank, in *The Chemistry of Functional Groups, Peroxides*, S. Patai Ed., John & Wiley, London, 1983.
- [45] S.S. Block in: S.S. Block (Ed.) *Disinfection, Sterilization and Preservation*, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 2001.
- [46] R.J.W. Lambert, M.D. Johnston and E.A. Simons, *J. Applied Microb.*, 87 (1999) 782.
- [47] D.M. Davies and M.E. Deary, *J. Chem. Soc., Percins Trans.*, 2 (1991) 1549.
- [48] M.R. gen Klaas, K. Steffens and N. Patett, *J. Mol. Catal B: Enzymatic*, 19-20 (2002) 499.
- [49] K. Schliefer and G. Heidermann, *Melliand Textilberichte*, 70 (1989) 856.
- [50] M. Weck, *Textil International*, (1991) 144.
- [51] J. Dannacher and W. Schelenker, *Textile Colorist and Chemist*, 28 (1996) 24.
- [52] Y. Sawaki and Y. Ogata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 38 (1965) 2103



Χημικοί Αισθητήρες και Βιοαισθητήρες

Θεωρητικό Μέρος

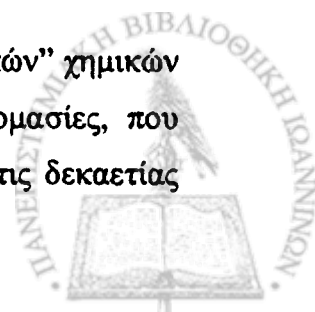
2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι χημικοί και βιοχημικοί αισθητήρες είναι διατάξεις που χρησιμοποιούνται ευρέως σε πολλές εφαρμογές της σύγχρονης επιστήμης.

Οι πρώτοι χημικοί και βιοχημικοί αισθητήρες εμφανίζονται στα τέλη του 19^{ου} αιώνα, ενώ μόλις τα τελευταία είκοσι χρόνια σημειώθηκε πραγματική έκρηξη στην έρευνα και την εφαρμογή τους. Αν επιχειρούσαμε μια ιστορική αναδρομή, θα έπρεπε οπωσδήποτε να αναφέρουμε το ηλεκτρόδιο που ανέπτυξε στα μέσα της δεκαετίας του 1950 ο Leland C. Clark από το ίδρυμα Ερευνών του Νοσοκομείου Παίδων του Cincinnati, το οποίο αρχικά μετρούσε το διαλυμένο στο αίμα οξυγόνο [1]. Η συσκευή αποτελείτο από ένα ηλεκτρόδιο Pt και ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς, περιβεβλημένα από μια πλαστική μεμβράνη, διαπερατή από τα αέρια. Η ένταση του ρεύματος που διέρρεε το κύκλωμα επηρεαζόταν άμεσα από το ρυθμό διάχυσης του οξυγόνου διαμέσου της μεμβράνης, που με τη σειρά του ήταν ευθέως ανάλογος προς την εξωτερική συγκέντρωση του οξυγόνου. Το 1962 η συσκευή τροποποιήθηκε (από το ίδιο τον Clark), ώστε να μετρά τις τιμές της γλυκόζης στο αίμα [2]. Γύρω από τη διάταξη τοποθετήθηκε ένα στρώμα πηκτώματος (gel) που περιείχε ακινητοποιημένη οξειδάση της γλυκόζης, και στη συνέχεια μια ημιπερατή μεμβράνη που επέτρεπε την είσοδο στη γλυκόζη, αλλά εμποδίζε την έξοδο του ενζύμου. Όσο περισσότερη γλυκόζη εισερχόταν στον αισθητήρα, τόσο πιο πολύ οξυγόνο καταναλωνόταν από το ένζυμο. Έτσι, οι μετρούμενες τιμές οξυγόνου ήταν αντιστρόφως ανάλογες προς τη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα.

Έχουν περάσει πάνω από 40 χρόνια από την εμφάνιση των “πραγματικών” χημικών αισθητήρων. Για την περιγραφή τους χρησιμοποιήθηκαν διάφορες ονομασίες, που αντικαταστάθηκαν τελικά από τον όρο *αισθητήρας* (sensor). Στις αρχές τις δεκαετίας

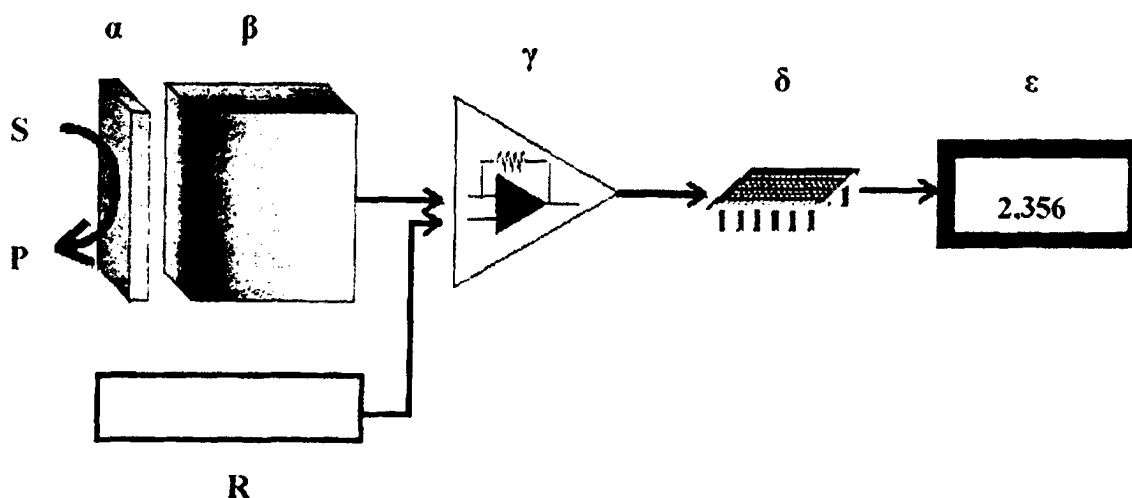


του 1960 προτάθηκαν αισθητήρες διαφόρων τύπων, πολλοί από τους οποίους κατά τη δεκαετία του 1970 χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά, με πρώτο αυτό της εταιρίας Yellow Springs Instruments Company (Ohio, USA) για τον προσδιορισμό της γλυκόζης [3]. Η περίοδος αυτή θεωρείται το πρώτο στάδιο ανάπτυξης των χημικών αισθητήρων, η οποία αποκορυφώθηκε με το 1^ο Παγκόσμιο Συνέδριο Χημικών Αισθητήρων, που πραγματοποιήθηκε στην Fukuoka της Ιαπωνίας το 1983 [4].

2.1 Χημικοί Αισθητήρες (Chemical sensors)

Για την περιγραφή των χημικών αισθητήρων χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι γενικοί ή περισσότερο ειδικοί ορισμοί. Σύμφωνα μ' ένα γενικά αποδεκτό ορισμό, “(βιο)-χημικός αισθητήρας είναι ένα σύστημα, στο οποίο ένα (βιο)-χημικό σωματίδιο αναγνώρισης βρίσκεται σε επαφή με έναν φυσικό μεταλλάκτη, ο οποίος μετατρέπει τη συγκέντρωση (ή την ενεργότητα ή τη μερική πίεση) του σωματιδίου σε ηλεκτρικό σήμα”. Τα σωματίδια είναι άτομα, μόρια, ιόντα ή βιολογικές ενώσεις (ένζυμα, πρωτεΐνες, αντισώματα κ.λ.π.) και μπορεί να βρίσκονται σε αέρια, υγρή ή στερεά φάση.

Η γενική αρχή λειτουργίας τους προσομοιάζει με εκείνη των κλασικών ηλεκτροδίων μέτρησης pH ή διαφοράς δυναμικού με μεγάλη εξειδίκευση και ευαισθησία, ενώ παράλληλα ο μεταλλάκτης, το κύριο μέρος του αισθητήρα, μετατρέπει μια χημική αντίδραση σε ηλεκτρικό σήμα, αξιοποιώντας μια φυσική μεταβολή που συνοδεύει την αντίδραση και είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης (Σχήμα 2.1).



Σχήμα 2.1: Απεικόνιση της λειτουργίας ενός τυπικού χημικού αισθητήρα. α) τμήμα αναγνώρισης όπου τα σωματίδια S μετατρέπονται σε προϊόντα P, β) ο μεταλλάκτης “μετατροπής” της συγκέντρωσης σε ηλεκτρικό σήμα, γ, δ) ενίσχυση και επεξεργασία του σήματος, ε) τμήμα εμφάνισης των αποτελεσμάτων, R) σύστημα αναφοράς



Η λειτουργία ενός χημικού αισθητήρα στηρίζεται στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των σωματιδίων ενός δείγματος, τα οποία συντελούν στη διάκρισή τους από τη μήτρα του δείγματος. Τα χαρακτηριστικά αυτά περιλαμβάνουν τη μάζα, τις οπτικές, θερμικές και τις ηλεκτρικές ιδιότητες. Με βάση αυτά οι χημικοί αισθητήρες διακρίνονται σε τέσσερις γενικές κατηγορίες: τους πιεζοηλεκτρικούς, οπτικούς, θερμικούς και ηλεκτροχημικούς αισθητήρες [5].

2.1.1 Πιεζοηλεκτρικοί ή Αισθητήρες μάζας (Piezoelectric or Mass Sensors)

Οι αισθητήρες αυτού του τύπου στηρίζονται στο φαινόμενο του πιεζοηλεκτρισμού, που ανακαλύφθηκε το 1880 από τους αδερφούς Curie, οι οποίοι παρατήρησαν, ότι κατά τη συμπίεση ενός κρυστάλλου χαλαζία (quartz crystal) αναπτύσσεται ηλεκτρικό δυναμικό, που προκαλεί μηχανικές παραμορφώσεις με αποτέλεσμα την παραγωγή κυμάτων. Η κυματική ταχύτητα και κατά συνέπεια η συχνότητα ενός κύματος επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους, που περιλαμβάνουν και τις μεταβολές μάζας, που συμβαίνουν στην επιφάνεια ενός πιεζοηλεκτρικού υλικού. Σύμφωνα με τη θεμελιώδη εξίσωση που διατυπώθηκε από τον G. Sauerbrey, η μεταβολή της συχνότητας είναι ανάλογη της μεταβολής της μάζας [6].

Η λειτουργία των πιεζοηλεκτρικών αισθητήρων στηρίζεται σ' αυτή την εξίσωση:

$$\Delta F = -2,3 \times 10^{-6} F^2 \Delta M / A$$

όπου ΔF , η μεταβολή της ιδιοσυχνότητας του επικαλυμμένου κρυστάλλου, F , η συχνότητα συντονισμού του κρυστάλλου, A , η επικαλυμμένη επιφάνεια και ΔM , το ποσό της μάζας που εναποτίθεται.

Ως φυσικοί μεταλλάκτες χρησιμοποιούνται κρύσταλλοι χαλαζία συχνότητας συντονισμού της τάξης των 10 MHz, χαμηλού θερμικού συντελεστή και υψηλής ευαισθησίας στις μεταβολές μάζας. Ως υλικά αναγνώρισης χρησιμοποιούνται επικαλύψεις διαφόρων οργανικών, ανόργανων ή βιολογικών υλικών [7].

Ο πρώτος πιεζοηλεκτρικός αισθητήρας αναφέρεται στη βιβλιογραφία το 1964 από τον Jr.W.H. King, ο οποίος χρησιμοποίησε επικαλύψεις οργανικών υλικών σε κρυστάλλους χαλαζία για την προσρόφηση αερίων. Από τότε σημειώθηκε ραγδαία εξέλιξη στους πιεζοηλεκτρικούς αισθητήρες, που επικεντρώνεται στους SAW (Surface Acoustic Wave), BAW (Bulk Acoustic Wave) και QCM (Quartz Crystal Microbalance) ανάλογα με την τεχνική που χρησιμοποιείται [8]. Τα τελευταία χρόνια οι



πιεζοηλεκτρικοί αισθητήρες βρίσκουν εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων [9], στη βιοτεχνολογία και στην κλινική διαγνωστική [10].

2.1.2 Θερμικοί Αισθητήρες (Thermal sensors)

Οι αισθητήρες αυτού του τύπου στηρίζονται γενικά στις μεταβολές της θερμοκρασίας, που προκαλούνται από την εξεταζόμενη ουσία. Οι μεταβολές της θερμοκρασίας μπορεί να οφείλονται σε μια ενδόθερμη ή εξώθερμη αντίδραση. Κλασικοί θερμικοί αισθητήρες είναι οι θερμοαντιστάσεις, τα θερμοζεύγη και τα θερμίστορ και στηρίζονται στις μεταβολές, που εμφανίζονται στον όγκο ή την αντίσταση τμημάτων τους λόγω της μεταβολής της θερμοκρασίας [4,5]. Τα τελευταία χρόνια η έρευνα επικεντρώθηκε σε τρεις τύπους θερμικών αισθητήρων, οι οποίοι διαφέρουν κυρίως στον τρόπο μετατροπής της θερμότητας που παράγεται [5,11], τους καταλυτικούς αισθητήρες ή πελίστορς (catalytic sensors ή pellistors) [12], τους πυροηλεκτρικούς αισθητήρες (pyroelectric sensors) [13] και τους αισθητήρες φαινομένου Seebeck [14].

2.1.3 Ηλεκτροχημικοί Αισθητήρες (Electrochemical sensors)

Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες χαρακτηρίζονται από την άμεση συσχέτιση του μετρούμενου ρεύματος ή της διαφοράς δυναμικού με τη συγκέντρωση, την ενεργότητα ή τη μερική πίεση του αναλύτη. Οι κύριοι εκπρόσωποι των ηλεκτροχημικών αισθητήρων είναι οι ποτενσιομετρικοί και οι αμπερομετρικοί (ή βολταμμετρικοί) αισθητήρες. Στους ηλεκτροχημικούς αισθητήρες εντάσσονται και οι *αγωγιμομετρικοί αισθητήρες* (conductimetric sensors), οι οποίοι στηρίζονται στις μεταβολές της ηλεκτρικής αγωγιμότητας, που προκαλούνται από την παρουσία του αναλύτη στο ηλεκτρολυτικό διάλυμα ή σε μια μεμβράνη, που καλύπτει το ηλεκτρόδιο εργασίας. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα ενός διαλύματος καθορίζεται από τη συγκέντρωση, την κινητικότητα και το φορτίο των ιόντων που βρίσκονται σ' αυτό, οπότε είναι προφανές, ότι είναι μια μη-εκλεκτική μέθοδος ανάλυσης, αφού η μετρούμενη αγωγιμότητα είναι το άθροισμα των μερικών αγωγιμοτήτων όλων των φορτισμένων σωματιδίων στο δείγμα. Η εκλεκτικότητα των αγωγιμομετρικών αισθητήρων επιτυγχάνεται με τη χρήση μεμβρανών εκλεκτικής διαπερατότητας και με την ακινητοποίηση κατάλληλων αντιδραστηρίων και ενζύμων [15]



Στους ποτενσιομετρικούς αισθητήρες (potentiometric sensors) το δυναμικό αναπτύσσεται μεταξύ των ηλεκτροδίων εργασίας και αναφοράς και μετρείται σε συνθήκες μηδενικού ρεύματος. Κλασικοί ποτενσιομετρικοί αισθητήρες είναι τα εκλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων (ion selective electrode, ISE), στα οποία μετρείται το δυναμικό που αναπτύσσεται στις επιφάνειες μιας εκλεκτικής ημιπερατής μεμβράνης, που χωρίζει δύο διαλύματα ηλεκτρολύτη. Το πιο γνωστό και σημαντικό ηλεκτρόδιο αυτής της κατηγορίας είναι το ηλεκτρόδιο υάλου για τις μετρήσεις pH, καθώς και ηλεκτρόδια για τον προσδιορισμό Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , F^- και πολλών άλλων ιόντων. Απόρροια των εκλεκτικών ηλεκτροδίων είναι οι εκλεκτικοί μεταλλάκτες ιόντων επίδρασης πεδίου (ion selective field effect transistor, ISFET), πάνω στους οποίους τοποθετείται η εκλεκτική μεμβράνη ιόντων (ion sensitive membrane) [16].

Η λειτουργία των αμπερομετρικών αισθητήρων (amperometric sensors) στηρίζεται στην εφαρμογή δυναμικού στο ηλεκτροχημικό στοιχείο και τη μέτρηση του ρεύματος διάχυσης, που οφείλεται σε μια αντίδραση οξειδώσης ή αναγωγής, που γίνεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η λειτουργία αυτών των αισθητήρων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η κινητική της αντίδρασης μεταφοράς φορτίου, η μεταφορά μάζας από και προς το ηλεκτρόδιο και η κινητική των ενδιάμεσων χημικών αντιδράσεων, που συνοδεύουν την αντίδραση μεταφοράς φορτίου. Με την αύξηση του δυναμικού εφαρμογής αυξάνεται η ταχύτητα της ηλεκτροδιακής αντίδρασης μεταφοράς φορτίου, ώστε το φαινόμενο να ελέγχεται από τη μεταφορά μάζας.

Το όριο ανίχνευσης των αμπερομετρικών αισθητήρων μπορεί να φθάνει μέχρι τα 10 nmol l^{-1} , ενώ η γραμμική περιοχή μέτρησης τις 3 ως 6 δεκάδες συγκεντρώσεων. Το δυναμικό εφαρμογής στην περίπτωση των αισθητήρων αυτών αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την εκλεκτικότητά τους. Γενικά, η ανάπτυξη των αμπερομετρικών αισθητήρων επικεντρώνεται στη συνεχή βελτίωση της ευαισθησίας και της εκλεκτικότητάς τους [17]. Σχετικά με το θέμα αυτό υπάρχει πληθώρα βιβλιογραφικών αναφορών για τη χημική τροποποίηση της επιφάνειας των ηλεκτροδίων [18] με τη χρήση διαμεσολαβητών φορτίου [19,20], μεμβρανών εκλεκτικής διαπερατότητας [21], αγώγιμων και μη αγώγιμων πολυμερικών μεμβρανών [22], ζεολίθων [23] κ.λ.π.

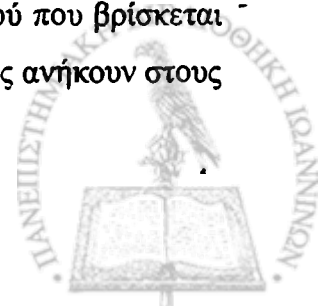
2.1.4 Οπτικοί Αισθητήρες ή Αισθητήρες Οπτικών Ινών (Optical or Fiber-Optic Sensors)



Η λειτουργία των οπτικών αισθητήρων στηρίζεται στη μέτρηση μιας οπτικής παραμέτρου, όπως η απορρόφηση, η ανάκλαση, η φωταύγεια ή ο φθορισμός ενός δείγματος, που βρίσκεται στη μία άκρη της οπτικής ίνας. Στην άλλη άκρη της ίνας (και σε απόσταση από το δείγμα) βρίσκονται ο ανιχνευτής και η πηγή ακτινοβολίας. Οι οπτικές ίνες που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι οπτικές ίνες απλής και διπλής δέσμης (single and dual optical fiber). Η σχετική οργανολογία είναι σχετικά απλή και η πρόοδος του κλάδου περιορίζεται μόνο από τις εξελίξεις στον τομέα του αισθητήρα. Στους οπτικούς αισθητήρες το “ενδεικτικό” σωματίδιο αναγνώρισης είναι ακινητοποιημένο (συνήθως στην άκρη της οπτικής ίνας) και οι μεταβολές των οπτικών του ιδιοτήτων εξαρτώνται από τη σύσταση του αναλυόμενου δείγματος.

Πλεονεκτήματα των οπτικών αισθητήρων είναι, ότι δεν επηρεάζονται από ηλεκτρικά πεδία, για τη λειτουργία τους δεν απαιτείται ηλεκτρόδιο αναφοράς, το δείγμα παραμένει αναλλοίωτο και είναι κατάλληλοι για συνεχή ανάλυση. Επίσης είναι συμβατοί με τα βιολογικά συστήματα και μπορούν να λειτουργήσουν σε πολλά μήκη κύματος, δίνοντας διαφορετικές πληροφορίες κάθε φορά. Το μειονέκτημά τους είναι, ότι πρέπει να λειτουργούν στο σκοτάδι, επειδή το φως του περιβάλλοντος παρεμποδίζει τις μετρήσεις, έχουν περιορισμένη δυναμική εμβέλεια και μεγάλους χρόνους απόκρισης [24].

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες αισθητήρων που χρησιμοποιούν τις οπτικές ίνες. Η πρώτη στηρίζεται στην ίδια αρχή λειτουργίας όπως και οι ποτενσιομετρικοί. Συνήθως η ίδια η ίνα που φωτίζει το δείγμα, επιστρέφει και το σήμα του δείγματος για ανάλυση. Οι αισθητήρες αυτοί ονομάζονται και *εξωγενείς αισθητήρες* (extrinsic sensors). Η δεύτερη κατηγορία στηρίζει τη λειτουργία της στα *αποσβενύμενα κύματα* (evanescent waves). Στις περιπτώσεις αυτές η οπτική ίνα “απογυμνώνεται” με απομάκρυνση της επένδυσης σε μια περιοχή και το “ενδεικτικό” σωματίδιο αναγνώρισης ακινητοποιείται στην επιφάνεια. Η τρίτη κατηγορία χρησιμοποιεί τα *επιφανειακά πλασμόνια* (surface plasmon), δηλαδή ενεργειακές ποσότητες που χαρακτηρίζουν τις διαφασικές επιφάνειες αγωγού - διηλεκτρικού. Η συσκευή επιφανειακών πλασμονίων αποτελείται από ένα λεπτό μεταλλικό φιλμ, που έχει αποθεθεί πάνω στην επιφάνεια ενός λεπτού γυαλιού, μέσα από το οποίο περνά το φως. Η φωτεινή ενέργεια περνά και μέσα από το φιλμ, με αποτέλεσμα να αλλάζει η κρίσιμη γωνία πρόσπτωσης με την οποία το φως παγιδεύεται μέσα στο φιλμ. Η νέα της τιμή εξαρτάται από την ποσότητα του υλικού που βρίσκεται προσροφημένο πάνω στο μεταλλικό φιλμ. Οι δύο τελευταίες κατηγορίες ανήκουν στους *ενδογενείς αισθητήρες* (intrinsic sensors).



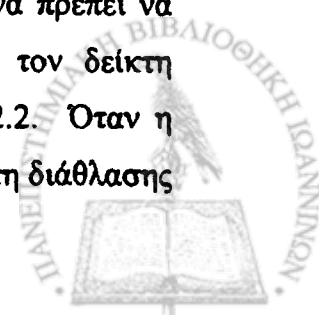
Στη βιβλιογραφία αναφέρονται οπτικοί αισθητήρες τροποποιημένοι με φθορίζοντες δείκτες για μετρήσεις pH, αισθητήρες για μετρήσεις αερίων π.χ. O_2 , CO_2 [25,26] καθώς και οπτικοί βιοαισθητήρες, που έχουν ακινητοποιημένα ένζυμα, όπως π.χ. υπεροξειδάση για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου [27].

Η χρήση των αισθητήρων οπτικών ινών στην ιατρική επιστήμη παρέχει τη δυνατότητα της συνεχούς παρακολούθησης των συγκεντρώσεων των κρίσιμων μεταβολιτών, γεγονός πολύ σημαντικό όταν ένας ασθενής βρίσκεται υπό εντατική παρακολούθηση. Στις τεχνολογίες του περιβάλλοντος μια από τις σημαντικότερες εφαρμογές των οπτικών βιοαισθητήρων είναι ο αισθητήρας που μετράει το βιολογικό απαιτούμενο οξυγόνο και έχει χρόνο απόκρισης 1 λεπτό [28]. Στο πεδίο της τεχνολογίας τροφίμων μια πολύ χρήσιμη εφαρμογή είναι ο βιοαισθητήρας που μετρά τα επίπεδα υποξανθίνης στα ψάρια, η οποία θεωρείται αξιόπιστο μέτρο της φρεσκάδας στα ψάρια. Άλλοι αισθητήρες που χρησιμοποιούνται στον ευαίσθητο κλάδο των τροφίμων είναι οι αισθητήρες γλυκόζης, ο ανιχνευτής πεπτιδίων, που εντοπίζει την υδρόλυση των πρωτεϊνών στο γάλα, κ.ά [29,30]. Παρά το πλήθος των δημοσιεύσεων, τις τεράστιες δυνατότητες και τις προοπτικές που ανοίγουν, οι οπτικοί αισθητήρες δεν έχουν επικρατήσει απόλυτα αλλά συνυπάρχουν με αυτούς των άλλων κατηγοριών.

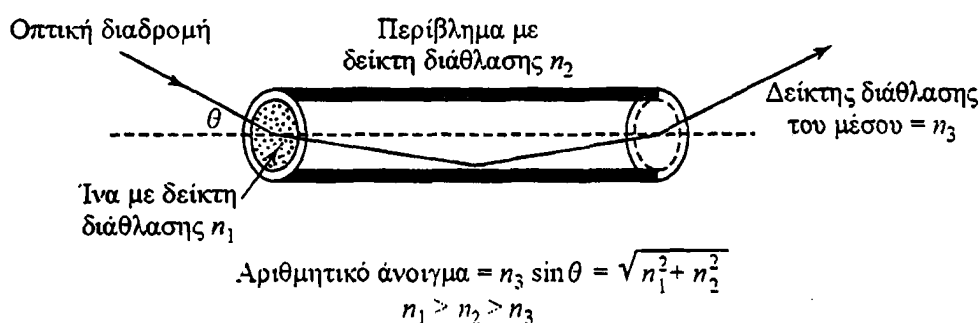
2.2 Οπτικές Ίνες (Fiber Optics)

Οι οπτικές ίνες (fiber optics) είναι εύκαμπτοι αγωγοί του φωτός που κατασκευάζονται από αμιγές υλικό, συνήθως γυαλί ή πλαστικό και διατάσσονται με τη μορφή δέσμης. Η διάμετρος των οπτικών ινών κυμαίνεται από 0,05 mm ως 0,6 cm. Όταν πρόκειται να μεταδοθούν είδωλα χρησιμοποιούνται δεσμίδες (bundles) ινών οι οποίες συντήκονται στα άκρα τους. Μια σπουδαία εφαρμογή αυτών των δεσμίδων είναι η χρήση τους στην ιατρική διαγνωστική, όπου η ευκαμψία τους επιτρέπει μεταφορά ειδώλων οργάνων μέσα από ελικοειδείς διαδρομές προς τον εξετάζοντα ιατρό. Οι οπτικές ίνες χρησιμοποιούνται όχι μόνο για παρατήρηση αλλά και για τον φωτισμό αντικειμένων, όπου επιτυγχάνεται φωτισμός χωρίς θέρμανση του αντικειμένου, πράγμα που είναι μεγάλης σημασίας σε πολλές περιπτώσεις.

Η αρχή της μετάδοσης του φωτός βασίζεται στο φαινόμενο της εσωτερικής ανάκλασης (total internal reflection). Για να συμβεί ολική ανάκλαση η ίνα πρέπει να καλυφθεί με υλικό, το οποίο έχει δείκτη διάθλασης μικρότερο από τον δείκτη διάθλασης του υλικού κατασκευής της ίνας όπως φαίνεται στο σχήμα 2.2. Όταν η ακτινοβολία προσπίπτει στην διεπιφάνεια των υλικών με διαφορετικό δείκτη διάθλασης



και η γωνία πρόσπτωσης είναι μεγαλύτερη από την κρίσιμη γωνία, η οποία ορίζεται σύμφωνα με το νόμο του Snell, τότε έχουμε ολική ανάκλαση και μετάδοση μέσω της ίνας. Μια οπτική ίνα όπως δείχνει και το σχήμα 2.2 μεταδίδει ακτινοβολία η οποία περικλείεται σε περιορισμένο κώνο που ονομάζεται κώνος αποδοχής (acceptance cone). Σε μια οπτική ίνα, η ενέργεια των φωτεινών κυμάτων που την διατρέχουν δεν περνά αποκλειστικά μέσα από το κέντρο της, αλλά ένα μέρος της απλώνεται σε μια ευρύτερη περιοχή πάχους περίπου 1000 \AA μέσα στο υλικό που περιβάλλει τον πυρήνα (στο περίβλημα). Το μαγνητικό αυτό πεδίο, που ονομάζεται αποσβενύμενο κύμα (evanescent wave), μειώνεται εκθετικά με την απόσταση. Το βάθος διείσδυσης εξαρτάται από το δείκτη διάθλασης του περιβλήματος, το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και την γωνία πρόσπτωσης.



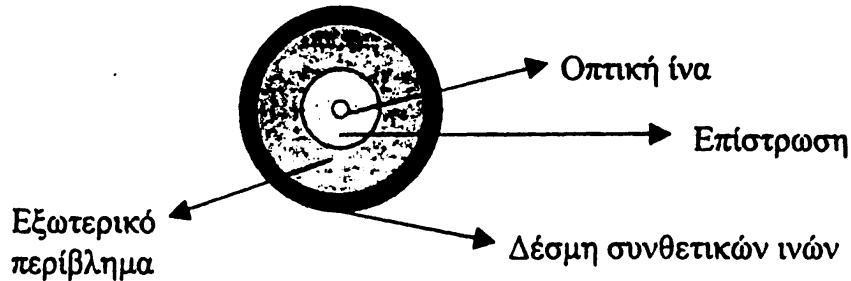
Σχήμα 2.2: Σχηματική παρουσίαση της οπτικής διαδρομής του φωτός μέσα από μια οπτική ίνα

Στα τέλη της δεκαετίας του 1960, άρχισαν να εμφανίζονται όργανα στην αγορά που περιείχαν οπτικές ίνες για μετάδοση ακτινοβολίας και ειδώλων από ένα μέρος του οργάνου στο άλλο [31]. Αυτά τα χρήσιμα οπτικά μέσα, που πολλές φορές ονομάζονται οπτικοί σωλήνες (light pipes), έδωσαν νέες προοπτικές στα οπτικά όργανα.

Πολλά παραδείγματα εφαρμογών τους σε συμβατικά αναλυτικά όργανα βρίσκονται σε διάφορα εγχειρίδια οργανολογίας. Η χρήση των οπτικών ινών στα συμβατικά φασματοφωτόμετρα επεκτείνει τη χρήση τους διότι πηγές και ανιχνευτές τοποθετούνται μακριά από το σημείο μέτρησης. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε περιπτώσεις όπου το δείγμα δεν μπορεί να τοποθετηθεί στο όργανο λόγω υψηλής θερμοκρασίας, υψηλών ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων ή όταν το μέγεθος του δείγματος καθιστά αδύνατη την τοποθέτησή του στο όργανο. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία πηγή ακτινοβολίας για περισσότερα δείγματα με αποτέλεσμα να μειώνεται ο χρόνος και το κόστος των μετρήσεων. Λιγότερο συμβατικές εφαρμογές των οπτικών ινών είναι η κατασκευή αισθητήρων που πολλές φορές καλούνται οπτρόδια (optrodes). Ο όρος "οπτρόδιο" χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Borman [32] το 1981 και

προέρχεται από το συνδυασμό των όρων οπτικό και ηλεκτρόδιο δείχνοντας τη λειτουργική ομοιότητα των οπτικών αισθητήρων με τα ηλεκτρόδια.

Η βασική κατασκευή μιας οπτικής ίνας φαίνεται στο σχήμα 2.3. Στο κέντρο του καλωδίου υπάρχει η οπτική ίνα, η οποία κατασκευάζεται από γυαλί ικανό να μεταφέρει φωτεινή δέσμη συγκεκριμένου μήκους κύματος με πολύ λίγες απώλειες.



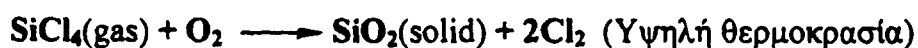
Σχήμα 2.3: Η τομή καλωδίου οπτικής ίνας

Για φασματοσκοπικές εφαρμογές, συνήθως χρησιμοποιούνται οπτικές ίνες από πυρίτιο. Η διάμετρος του πυρήνα (core) κυμαίνεται από 8 μm έως 1 mm. Υπάρχουν οπτικές ίνες, οι οποίες κατασκευάζονται από πλαστικό. Προς το παρόν δεν είναι μέσα στις προδιαγραφές, που καθορίζονται από τα διεθνή πρότυπα, όμως καταβάλλονται προσπάθειες για να βελτιωθούν τα χαρακτηριστικά τους και ειδικά η πολύτροπη (graded-index) πλαστική ίνα ενδέχεται να αποτελέσει αξιόπιστο μέσο μετάδοσης εφάμιλλο της γυάλινης ίνας

Διαφορές, όμως, υπάρχουν και στο πυρίτιο που χρησιμοποιείται. Για εφαρμογές στην περιοχή υπεριώδους-ορατού χρησιμοποιείται πυρίτιο με μεγάλη περιεκτικότητα υδροξυλίων (600-1000 ppm), λόγω της μικρής απορρόφησης στο UV. Για την περιοχή του υπεριώδους κενού (Deep-UV) χρησιμοποιούνται ειδικές ίνες που δεν επηρεάζονται από το διάχεόμενο φως του περιβάλλοντος (solarization resistant).

Οι ίνες που χρησιμοποιούνται για την περιοχή του εγγύς υπερέυθρου (NIR – Near Infrared) είναι χαμηλής περιεκτικότητας σε “νερό”, λόγω της απορρόφησης του νερού στην περιοχή αυτή. Για εφαρμογές στην περιοχή της εγγύς υπερέυθρου χρησιμοποιείται πυρίτιο με χαμηλή περιεκτικότητα υδροξυλίων (< 2 ppm), λόγω της μικρής απορρόφησης στην NIR [33].

Η βασική χημική αντίδραση από την οποία παράγεται το οπτικό γυαλί είναι:



Το διοξείδιο του γερμανίου εισάγεται ως πρόσμιξη στο καθαρό γυαλί για να αυξήσει το δείκτη διάθλασης του πυρήνιου το οποίο, στην εμπλουτισμένη αυτή μορφή, χρησιμοποιείται για την κατασκευή του πυρήνα των οπτικών ινών. Το φθόριο μειώνει το δείκτη διάθλασης του γυαλιού, έτσι η προσθήκη του στο καθαρό γυαλί γίνεται για την κατασκευή της εξωτερικής επίστρωσης της οπτικής ίνας στις περιπτώσεις όπου ως πυρήνας χρησιμοποιείται καθαρό γυαλί.

Η οπτική ίνα περιβάλλεται από ειδική επίστρωση υλικού με μικρότερο δείκτη διάθλασης από το υλικό της ίνας, το οποίο ονομάζεται *περίβλημα* (cladding ή buffer). Το υλικό αυτό βοηθά στη συνεχή ανάκλαση της φωτεινής δέσμης, η οποία θα πέσει μέσα στην οπτική ίνα, εφόσον η γωνία πρόσπτωσης είναι μεγαλύτερη της οριακής διότι σε άλλη περίπτωση θα έχουμε διάθλαση στην εξωτερική επίστρωση (Σχήμα 2.2). Με αυτό τον τρόπο η οπτική ίνα εγκλωβίζει τη δέσμη του φωτός και την οδηγεί στην άκρη της.

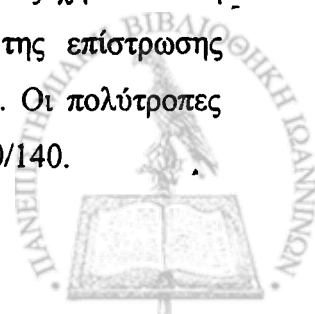
Η επίστρωση περιβάλλεται από δέσμη συνθετικών ινών, οι οποίες έχουν στόχο την προστασία της ίνας από πιθανά τραβήγματα, και κίνδυνο να σπάσει το γυαλί, το οποίο αποτελεί και τον πυρήνα της ίνας. Όλα τα παραπάνω περικλείονται σε εξωτερικό πλαστικό περίβλημα.

2.2.1 Τρόποι εκπομπής και μετάδοσης στις οπτικές ίνες

Η εκπομπή του οπτικού σήματος σε οπτική ίνα γίνεται συνήθως από πηγή LED (Light Emitting Diode – Δίοδο φωτοεκπομπής) ή LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) ή τις συμβατικές πηγές ακτινοβολίας που χρησιμοποιούνται στα κοινά φασματοφωτόμετρα, και τα μήκη κύματος του φωτός, που η οπτική ίνα είναι σχεδιασμένη να μεταφέρει, ποικίλουν από 200 nm μέχρι 1500 nm. Οι οπτικές ίνες διαφοροποιούνται, κατ' αρχήν, από τον τρόπο μετάδοσης του σήματος σε αυτές. Η πρώτη βασική διάκριση βρίσκεται μεταξύ των πολύτροπων και μονότροπων οπτικών ινών.

2.2.1.1 Πολύτροπες οπτικές ίνες (Multimode fiber optics)

Τα χαρακτηριστικά μεγέθους των οπτικών ινών δίνονται κατ' εξοχήν από τη διάμετρο του πυρήνα (γυαλιού) και στη συνέχεια τη διάμετρο της επίστρωσης (cladding). Οι μονάδες των παραπάνω μεγεθών είναι τα μικρόμετρα. Οι πολύτροπες οπτικές ίνες έχουν τυπικά μεγέθη 50μm/125μm, 62,5/125, 85/125 ή 100/140.



Ο συνηθέστερος τύπος, ο οποίος κυκλοφορεί, είναι ο 62,5/125. Η ολική διάμετρος της οπτικής ίνας συμπεριλαμβανομένων των ενισχυτικών συνθετικών ινών και του εξωτερικού περιβλήματος φτάνει τα 900μm. Η αρχή μετάδοσης στην πολύτροπη οπτική ίνα είναι ότι οι διάφορες ακτίνες του οπτικού σήματος ανάλογα με την γωνία πρόσπτωσής τους στην οπτική ίνα ταξιδεύουν ανακλώμενες υπό διαφορετικές γωνίες, όπως φαίνεται στα σχήματα. Αυτός ο τρόπος μετάδοσης ονομάζεται *πολύτροπος* (multimode), επειδή έχουμε πολλούς δρόμους μετάδοσης, που αντιστοιχούν στις διαφορετικές γωνίες ανάκλασης. Οι πολύτροπες οπτικές ίνες διακρίνονται σε δυο κατηγορίες: τις *διακριτού δείκτη* (step index) και τις *βαθμιαίου δείκτη* (graded index) [34,35].

2.2.1.2 Οπτική ίνα διακριτού δείκτη (step index)

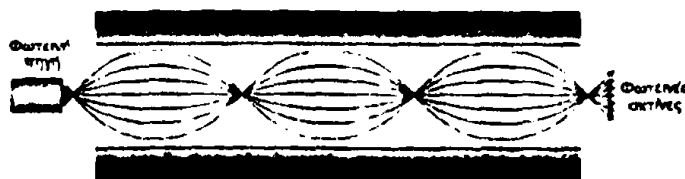
Στις ίνες αυτές συμβαίνει απότομη μεταβολή του δείκτη διάθλασης μεταξύ της κεντρικής ίνας και του υλικού επίστρωσης. Οι ίνες αυτής της κατηγορίας χρησιμοποιούνται για φασματοσκοπικές εφαρμογές. Στην περίπτωση αυτή, η πορεία των ακτινών είναι αυτή που εμφανίζεται στο σχήμα 2.4.



Σχήμα 2.4: Οπτική ίνα διακριτού δείκτη

2.2.1.3 Οπτική ίνα βαθμιαίου δείκτη (graded index)

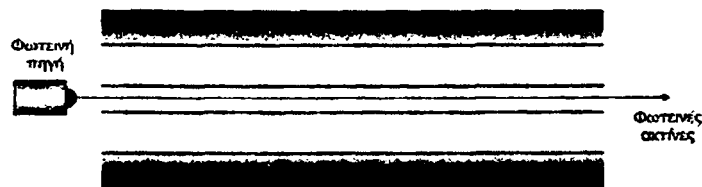
Οι ίνες αυτές χαρακτηρίζονται από βαθμιαία μεταβολή του δείκτη διάθλασης του υλικού της κεντρικής ίνας. Συμβαίνει βαθμιαία μείωση όσο απομακρυνόμαστε από το κέντρο προς την εξωτερική επιφάνεια του γυαλιού. Η πορεία των ακτινών σε μια τέτοια ίνα είναι αυτή που φαίνεται στο σχήμα 2.5.



Σχήμα 2.5: Οπτική ίνα βαθμιαίου δείκτη

2.2.1.4 Μονότροπες οπτικές ίνες (single mode fiber optics)

Στις μονότροπες οπτικές ίνες η διάμετρος της κεντρικής ίνας είναι πολύ μικρή και πλησιάζει περίπου το επίπεδο του μήκους κύματος του εκπεμπόμενου σήματος. Στην περίπτωση αυτή, έχουμε έναν μόνο δυνατό τρόπο μετάδοσης του οπτικού σήματος, τον αξονικό. Η πορεία των ακτίνων σε μια τέτοια οπτική ίνα είναι αυτή που φαίνεται στο σχήμα 2.7. Η κεντρική ίνα στις μονότροπες οπτικές ίνες έχει διάμετρο από 5μm έως 10μm με συνηθέστερη τιμή τα 8,3 μm.



Σχήμα 2.7: Μονότροπη οπτική ίνα

2.2.2 Χαρακτηριστικά και επιδόσεις

Οι επιδόσεις μιας οπτικής ίνας συνδέονται με τον τρόπο μετάδοσης του σήματος στην ίνα, με το αν, δηλαδή, η ίνα είναι πολύτροπη ή μονότροπη και με το μήκος κύματος του φωτός, που εκπέμπεται από την πηγή. Στις μονότροπες οπτικές ίνες χρησιμοποιούνται μήκη κύματος μεταξύ των 1310 nm και των 1550 nm. Στις πολύτροπες οπτικές ίνες έχουμε μήκη κύματος από 200 nm έως 1300 nm. Θα πρέπει να τονίσουμε, ότι για δεδομένο όργανο, θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο ένας τρόπος μετάδοσης.

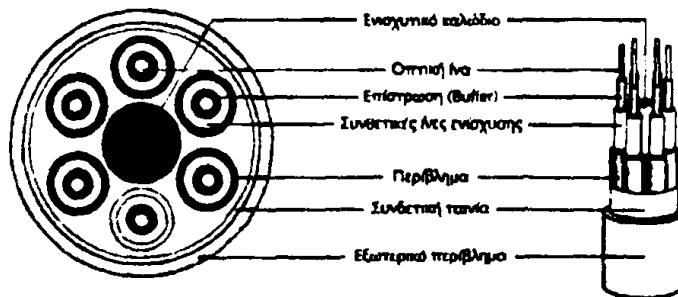
Οι οπτικές ίνες μπορούν να μεταφέρουν σήματα με πολύ μεγάλο εύρος μηκών κύματος σε μεγάλες αποστάσεις με πολύ μικρή εξασθένηση του σήματος. Υπάρχουν, όμως, και άλλοι παράγοντες, οι οποίοι περιορίζουν τις αποστάσεις μετάδοσης. Τέτοιοι παράγοντες είναι το εύρος ζώνης της πηγής και του δέκτη των σημάτων σε μια οπτική ίνα και η χρωματική διασπορά του μεταδιδόμενου σήματος μέσα στην οπτική ίνα, η οποία διασπορά αυξάνεται με την απόσταση και εξασθενίζει το σήμα. Επίσης, επιβαρυντικός παράγων είναι η χρήση συνδέσμων και διακλαδωτών στην πορεία των οπτικών ινών. Θα πρέπει να σημειώσουμε, ότι στις πολύτροπες οπτικές ίνες είναι πιο ανεκτό να χρησιμοποιήσουμε συνδετήρες και διακλαδωτές απ' ότι στις μονότροπες. Επίσης, στις πολύτροπες οπτικές ίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν χαμηλού κόστους πηγές LED, ενώ οι μονότροπες οδηγούνται συνήθως από πηγή LASER.



2.2.3 Καλώδια οπτικών ινών

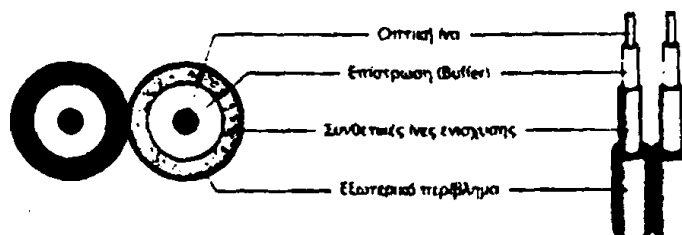
Τα καλώδια οπτικών ινών περιέχουν από 1 έως 36 οπτικές ίνες. Τα πιο συνηθισμένα είναι τα καλώδια με ζυγό αριθμό οπτικών ινών. Θα ξεχωρίσουμε δυο τύπους καλωδίων οπτικών ινών ως προς την κατασκευή τους.

Στην πρώτη περίπτωση, έχουμε σε κάθε οπτική ίνα και εξωτερικά από την επίστρωση συνθετικές ίνες και εξωτερικό μονωτικό περίβλημα. Μέσα στο καλώδιο υπάρχουν πολλές τέτοιες ίνες, όπου η κάθε ίνα αποτελεί και ένα ξεχωριστό καλώδιο. Μέσα στο καλώδιο, εκτός από καλώδια οπτικών ινών περιέχονται και καλώδια, τα οποία χρησιμεύουν για ενίσχυση και στρογγυλοποίηση του όλου σχήματος. Όλα αυτά τα καλώδια, τέλος, περικλείονται από εξωτερικό περίβλημα και η συνολική κατασκευή είναι γνωστή ως Σφιχτής Σχεδίασης (Περιτύλιξης, Tight Buffer). Στο σχήμα 2.8 εμφανίζεται ανάλογη κατασκευή καλωδίου οπτικών ινών.



Σχήμα 2.8: Καλώδιο οπτικών ινών (Tight Buffer)

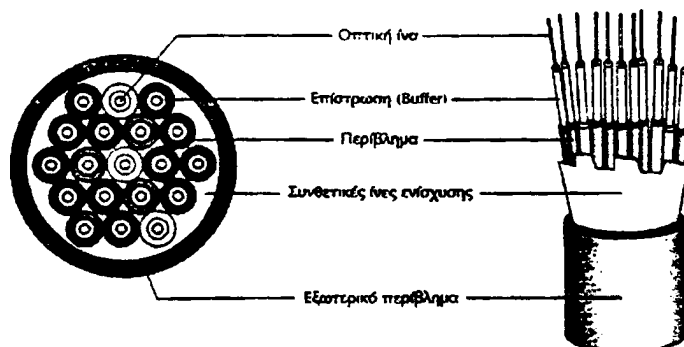
Παρόμοιας κατασκευής είναι τα εύκαμπτα καλώδια, που χρησιμοποιούνται για τη σύνδεση με τον ενεργό εξοπλισμό (Optical patch cords). Αυτά αποτελούνται από δυο καλώδια ενωμένα στο εξωτερικό τους, το κάθε ένα από τα οποία περιέχει οπτική ίνα από πλαστικό. Στο σχήμα 2.9 εμφανίζεται ένα οπτικό καλώδιο σύνδεσης.



Σχήμα 2.9: Οπτικό Patch cord

Στην δεύτερη περίπτωση, έχουμε τις οπτικές ίνες με την επίστρωσή τους να είναι τοποθετημένες ελεύθερα μέσα στο καλώδιο και περικλείονται από εξωτερικό περίβλημα, αφού έχει πρώτα τοποθετηθεί μέσα στο καλώδιο επίστρωση από συνθετικές

ίνες για την ανθεκτικότητα του καλωδίου. Αυτή η κατασκευή είναι γνωστή ως Χαλαρής Περιτύλιξης (Loose Buffer). Στο σχήμα 2.10 εμφανίζεται ανάλογη κατασκευή καλωδίου οπτικών ινών.



Σχήμα 2.10: Καλώδιο οπτικών ινών (Loose Buffer)

2.2.4 Χρήσεις – Παραδείγματα

Τα καλώδια οπτικών ινών, τα οποία, συνήθως περιέχουν δεσμίδες οπτικών ινών, χρησιμοποιούνται, κυρίως, από τους τηλεπικοινωνιακούς οργανισμούς για επίγειες και υποθαλάσσιες συνδέσεις μεγάλων αποστάσεων, αντικαθιστώντας τόσο τις γραμμές ομοαξονικών καλωδίων, όσο και τις επίγειες και δορυφορικές μικροκυματικές ζεύξεις. Τα τελευταία χρόνια, για τη διασύνδεση ηπείρων, έχουν ποντισθεί πολλά καλώδια οπτικών ινών, με χωρητικότητα, η οποία ξεπερνά τα 30.000 κυκλώματα φωνής. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν το καλώδιο BSFOCS, που εκτείνεται στην περιοχή της Μαύρης θάλασσας και συνδέει τη Βουλγαρία, Ουκρανία και Ρωσία, το καλωδιακό σύστημα SEA - ME - WE 3 (South East Asia - Middle East - West Europe), που ξεκινά από τη Δυτική Ευρώπη (Γερμανία, Μεγ. Βρετανία), περνά από τα στενά του Γιβραλτάρ στη Μεσόγειο (Ιταλία, Ελλάδα, Κύπρο) συνεχίζει από τα στενά του Σουέζ προς την Ασία (Ινδία, Σιγκαπούρη) και χωρίζεται σε δύο μέρη, με το ένα άκρο να καταλήγει στην Ιαπωνία και το άλλο στην Αυστραλία και το καλώδιο ADRIA-1, που συνδέει την Ελλάδα (Κέρκυρα), την Αλβανία (Duttes) και την Κροατία (Dubrovnik).

Οι οπτικές ίνες χρησιμοποιούνται, επίσης, από ιδιωτικές εταιρίες σε τοπικά δίκτυα, σε πανεπιστημιακά δίκτυα κορμού, σε δίκτυα ευρείας περιοχής, σε δίκτυα καλωδιακής τηλεόρασης, σε εφαρμογές με υψηλές απαιτήσεις σε ασφάλεια μετάδοσης, όπως οι στρατιωτικές και, τέλος, σε βιομηχανικές εφαρμογές, όπου υπάρχει υψηλός βιομηχανικός θόρυβος, στον οποίο οι οπτικές ίνες παρουσιάζουν ανοσία.



2.2.5 Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα

Οι οπτικές ίνες φαίνεται να είναι σήμερα η καλύτερη λύση στα μέσα μετάδοσης και αυτό γιατί τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν, σε σχέση με τα άλλα μέσα, είναι ιδιαίτερα σημαντικά.

1. Οι οπτικές ίνες διαθέτουν πολύ μεγάλο εύρος ζώνης συχνοτήτων, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνονται υψηλές ταχύτητες μετάδοσης (της τάξης των Gigabits-Gbps). Συνήθεις ταχύτητες μετάδοσης είναι αυτές των 2 και 10 Gbps, ενώ έχουν επίσης αναπτυχθεί συστήματα των 20, 40 και 50 Gbps. Σε περίπτωση πολυπλεξίας με διαίρεση μήκους κύματος, οι ταχύτητες φθάνουν στα μερικά Tbps.

2. Δεν επηρεάζονται από ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία, με αποτέλεσμα να συνιστάται η χρήση τους σε βιομηχανικό περιβάλλον και σε χώρους με υψηλό θόρυβο.

3. Η εξασθένηση των σημάτων είναι μικρότερη από ό,τι στα χάλκινα και ομοαξονικά καλώδια, με αποτέλεσμα οι αποστάσεις μεταξύ ενισχυτών ή άλλων ενεργών στοιχείων να κυμαίνονται από μερικά μέχρι και μερικές εκατοντάδες χιλιόμετρα, ανάλογα με τη τεχνική και το ρυθμό μετάδοσης.

4. Η υποκλοπή ή η παρεμβολή πληροφορίας είναι πολύ δύσκολο να επιτευχθούν, με αποτέλεσμα οι οπτικές ίνες να συνιστούν πολύ ασφαλές μέσο μετάδοσης.

5. Το βάρος και ο όγκος τους είναι σημαντικά μικρότερος από τα αντίστοιχα μεγέθη των άλλων αγωγών. Αξίζει να αναφερθεί, ως παράδειγμα, ότι χάλκινο καλώδιο με 1000 ζεύγη και μήκος 500 μέτρων ζυγίζει περίπου 4000 κιλά, ενώ οπτική ίνα του ίδιου μήκους, που περιέχει τον ίδιο αριθμό καναλιών, ζυγίζει μόνο 45 κιλά.

6. Δεν είναι ευαίσθητη σε υγρό περιβάλλον, όπου τα χάλκινα καλώδια μπορεί να δημιουργήσουν βραχυκυκλώματα.

7. Επειδή η οπτική ίνα δεν μεταφέρει ηλεκτρικό σήμα, προτιμάται σε περιοχές υψηλού κίνδυνου εκρήξεων από σπινθήρες (χώροι καυσίμων, εύφλεκτων αερίων κλπ.).

Συμπερασματικά, θα πρέπει να αναφέρουμε, ότι τα καλώδια οπτικών ινών παρουσιάζουν ίδιες μηχανικές ιδιότητες με τα ομοαξονικά, αλλά είναι ελαφρότερα σε βάρος, μικρότερα σε διάμετρο και οι αποστάσεις μεταξύ των επαναληπτών είναι μεγαλύτερες.

Ένα από τα βασικότερα μειονεκτήματα, που παρουσιάζουν οι οπτικές ίνες, είναι η δυσκολία υλοποίησης συνδέσεων, επειδή απαιτείται υψηλή προσαρμογή και ευθυγράμμιση της φωτεινής πηγής, για να μην υπάρχει διασπορά και να ελαχιστοποιηθούν οι απώλειες. Όμως, η πρόοδος της τεχνολογίας, που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στην περιοχή των οπτικών ινών, αντιμετώπισε με επιτυχία την



παραπάνω δυσκολία, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η χρήση τους και για συνδέσεις σημείου προς πολλά σημεία. Παρόλα αυτά, η χρήση τους σε τέτοιες συνδέσεις δεν έχει ακόμη ευρέως εξαπλωθεί, ιδιαίτερα λόγω του αυξημένου κόστους, που παρουσιάζουν τέτοια συστήματα.

2.2.6 Υλικά οπτικών ινών

Λειτουργικά οι οπτικές ίνες ανήκουν στους κυματοαγωγούς και η συμπεριφορά τους καθορίζεται από τους ίδιους φυσικούς νόμους.

Το κεντρικό τμήμα, ο πυρήνας (core), είναι το μέσον μέσα στο οποίο ταξιδεύει το φως. Ο πυρήνας αποτελείται από εμπλουτισμένο πυρίτιο. Το περίβλημα (cladding) που περιβάλλει τον πυρήνα αποτελείται από καθαρό πυρίτιο και έχει χαμηλότερο δείκτη διάθλασης από τον πυρήνα.

Αυτή η διαφορά στο δείκτη διάθλασης του συστήματος core/cladding υποχρεώνει το φως να ταξιδεύει κατά μήκος του πυρήνα διότι η διαχωριστική επιφάνεια λειτουργεί ως εξαιρετικής ποιότητας καθρέφτης και επιφέρει ολική ανάκλαση του φωτός προς το εσωτερικό του πυρήνα κάθε φορά που το φως προσπίπτει στην επιφάνεια.

Το εξωτερικό στρώμα (coating) αποτελείται συνήθως από ακρυλικό υλικό και δεν συμμετέχει στα οπτικά χαρακτηριστικά της ίνας. Το coating προστατεύει την ίνα από κακώσεις.

Οι μονότροπες ίνες είναι πιο φτηνές από τις πολύτροπες, αλλά τα όργανα με πηγές φωτός LASER με τα οποία συνεργάζονται είναι πολύ ακριβότερα από τα αντίστοιχα στα οποία χρησιμοποιούνται οι πολύτροπες ίνες.



2.3 Βιοαισθητήρες

Οι βιοαισθητήρες, όπως αναφέρεται και στο εισαγωγικό μέρος του κεφαλαίου, αποτελούνται από δύο τμήματα: το βιολογικό μέρος ή στοιχείο της μοριακής αναγνώρισης, που μπορεί να είναι ακόμα και ζωντανός οργανισμός και το “μεταγωγικό μέρος”, που παράγει το σήμα και το στέλνει μέχρι τις συσκευές μέτρησης. Έτσι, η τεχνολογία τους στηρίζεται αφενός στη μοριακή βιολογία και αφετέρου στην ηλεκτρονική και πληροφορική. Το είδος των μετρήσεων που μπορούν να εκτελέσουν δεν περιορίζεται, παρά μόνον από τη φαντασία των επιστημόνων. Ο “μεταγωγέας” ή μεταλλάκτης μπορεί να είναι οπτικός, ηλεκτροχημικός, θερμικός ή ένας πιεζοηλεκτρικός κρύσταλλος. Το βιολογικό μέρος μπορεί να είναι βιοκαταλύτης, χημειούποδοχέας ή αντίσωμα-αντιγόνο.

Παρακάτω, αναπτύσσονται οι βασικές ιδιότητες των ενζύμων και οι μέθοδοι ακινητοποίησής τους. Η διαδικασία ακινητοποίησης της υπεροξειδάσης και η παρασκευή ενζυμικών αντιδραστήρων περιγράφεται στο δεύτερο κεφάλαιο του πειραματικού μέρους της διατριβής.

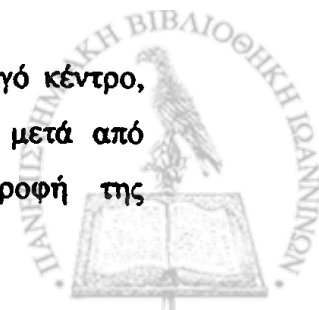
2.3.1 Βασικές ιδιότητες ενζύμων

Τα ένζυμα είναι πολύ σημαντικές ομάδες πρωτεϊνών και συντίθενται από όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Όλες οι χημικές αντιδράσεις στον οργανισμό (δηλαδή ο μεταβολισμός) είναι δυνατές μόνο διαμέσου της δράσης των βιοκαταλυτών, οι οποίοι ονομάζονται ένζυμα. Σήμερα είναι γνωστά πάνω από 2000 ένζυμα και σημαντικό ποσοστό αυτών διατίθεται εμπορικά από διάφορες εταιρείες.

Τα ένζυμα, το μοριακό βάρος των οποίων ποικίλλει από 10^4 ως 2×10^6 Daltons, αποτελούνται από την L-διαμόρφωση των είκοσι βασικών αμινοξέων [36] και τα βασικά χαρακτηριστικά της δράσης τους είναι τα εξής:

- Αυξάνουν την ταχύτητα των αντιδράσεων (μέχρι 10^{10} φορές),
- Παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση,
- Χρησιμοποιούνται σε μικρές ποσότητες και παραμένουν αμετάβλητα και μετά το τέλος της αντίδρασης,
- Αποφασιστικό βήμα για την κατάλυση δεν είναι η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας, αλλά η ελάττωση της ενέργειας ενεργοποίησης.

Ιδιαίτερη σημασία για την καταλυτική δράση του ενζύμου έχει το ενεργό κέντρο, που σχηματίζεται από ορισμένα τμήματα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας μετά από κατάλληλη διαμόρφωση στο χώρο. Κατά τη μετουσίωση (καταστροφή της



συγκεκριμένης διαμόρφωσης) των πρωτεϊνών, όπου παρατηρείται ολική απώλεια της καταλυτικής δράσης, η αλληλουχία των αμινοξέων δεν διαταράσσεται.

Τα ένζυμα είναι σχετικά ακριβά αντιδραστήρια αφού η χρήση τους με τη μορφή διαλύματος δεν δίνει τη δυνατότητα ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησης τους. Επιπλέον η απώλεια ενεργότητας, η αστάθειά τους σε υδατικά διαλύματα και η ευπάθειά τους σε υψηλές θερμοκρασίες περιορίζουν τη χρήση τους.

Τα μειονεκτήματα αυτά μπορούν να περιοριστούν με την τεχνική της ακινητοποίησης. Το ένζυμο καθλώνεται σε κάποιο αδρανές υλικό, για να διατηρεί τις καταλυτικές του ιδιότητες για περισσότερο χρόνο απ' ότι το διαλυτό. Έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί συνεχώς για πολλές μετρήσεις προσφέροντας μια σημαντική μείωση στο κόστος της ανάλυσης.

2.3.2 Βασικές αρχές ακινητοποιημένων ενζύμων

Η χρήση των ενζύμων ως αναλυτικών αντιδραστηρίων συνοδεύεται από ορισμένα μειονεκτήματα σχετικά με την ευαισθησία, το υψηλό κόστος, τη χαμηλή ακρίβεια και σε ορισμένες περιπτώσεις την περιορισμένη διαθεσιμότητα. Τα περισσότερα από αυτά τα μειονεκτήματα μπορούν να ξεπεραστούν ή να περιοριστούν με τη χρήση των ακινητοποιημένων ενζύμων. Ο όρος “ακινητοποίηση” αναφέρεται στην παγίδευση διαλυτού ενζύμου (φυσική ή χημική) σε ένα αδρανές υλικό (matrix), ώστε το ένζυμο να διατηρεί τις καταλυτικές του ιδιότητες για μεγάλο χρονικό διάστημα και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μεγάλο αριθμό αναλύσεων.

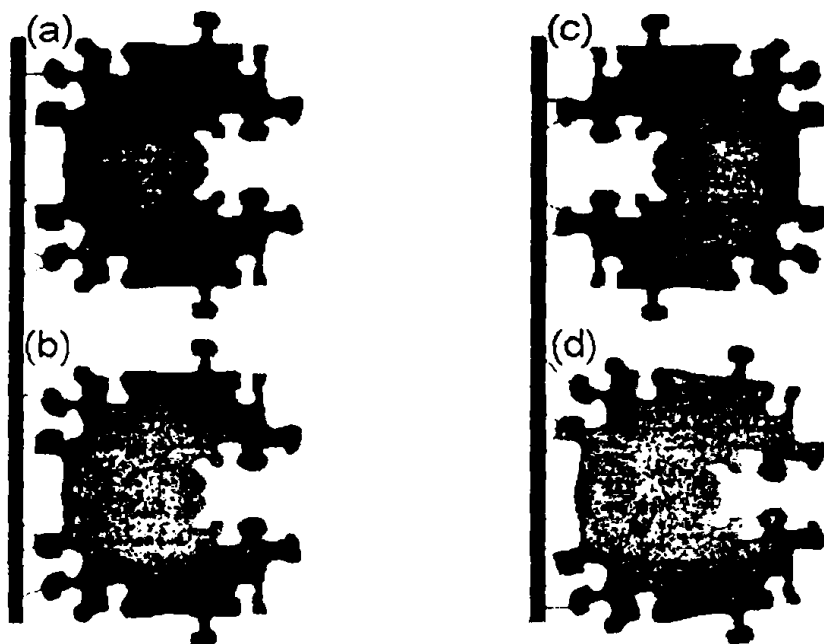
Τα βασικά πλεονεκτήματα των ακινητοποιημένων ενζύμων είναι η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησής τους και η αυξανόμενη σταθερότητά τους κατά το χρόνο αποθήκευσης, την αύξηση της θερμοκρασίας και την παρουσία διαφόρων ουσιών, που συνήθως ενεργοποιούν ή αναστέλλουν την καταλυτική δράση των διαλυτών ενζύμων.

2.3.2.1 Ιδιότητες των ακινητοποιημένων ενζύμων

Κατά κανόνα, οι ιδιότητες των ακινητοποιημένων ενζύμων διαφέρουν από αυτές των αντιστοιχών διαλυτών. Οι ιδιότητες των ενζύμων καθορίζονται από τη διαμόρφωση του πρωτεϊνικού μορίου στο χώρο συνεπώς οι παρατηρούμενες διαφορές εξαρτώνται από το ίδιο το ένζυμο, το υλικό στήριξης, τη μέθοδο και τις συνθήκες ακινητοποίησης. Η συνολική πορεία ακινητοποίησης μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στις κινητικές σταθερές, στη συμπεριφορά του ενζύμου ως προς το pH και τη θερμοκρασία, ακόμα και στην εξειδίκευσή του.



Κατά την ακινητοποίηση των ενζύμων παρατηρείται μείωση του βαθμού συγγένειας ενζύμου - υποστρώματος (αύξηση της σταθεράς Michaelis, K_m) και μερική ή ολική απενεργοποίηση του ενζυμικού μορίου (μείωση της μέγιστης ταχύτητας, V_{max}), λόγω των δομικών αλλαγών (steric orientation) που προκαλεί η διαδικασία της ακινητοποίησης. Όπως φαίνεται στο σχήμα 2.11, το ένζυμο μπορεί να δεσμευτεί στο φορέα με τέτοιο τρόπο, ώστε το πρωτεϊνικό μόριο να βρίσκεται σε μία ανενεργή διαμόρφωση (inactive conformation) χάνοντας ένα μέρος ή το σύνολο της καταλυτικής του ικανότητας ή προκαλώντας μερική ή ολική δέσμευση του ενεργού κέντρου και μείωση της ικανότητας πρόσβασης από το υπόστρωμα.



Σχήμα 2.11: Πιθανές διαμορφώσεις ακινητοποιημένων ενζύμων. (a, b) Ακινητοποιημένο ένζυμο με το ενεργό του κέντρο αμετάβλητο συνεπώς σχηματίζεται κανονικά το σύμπλοκο ένζυμο-υπόστρωμα. Οι τιμές των κινητικών παραμέτρων μπορούν να επηρεαστούν (c) από τον προσανατολισμό του πρωτεϊνικού μορίου και (d) από την ακαμψία σύνδεσης και την παραμόρφωση του ενεργού κέντρου.

Φαινόμενα διάχυσης κατά τη μεταφορά των προϊόντων ή των αντιδρώντων από ή προς το πρωτεϊνικό μόριο (ανομοιογενή κατανομή του υποστρώματος και/ή των προϊόντων μεταξύ του υλικού στήριξης και του περιβάλλοντος διαλύματος) μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τις παρατηρούμενες κινητικές παραμέτρους. Αλλαγές στις κινητικές παραμέτρους των ακινητοποιημένων ενζύμων μπορούν επίσης να προκληθούν από διάφορες ιοντικές, υδροφοβικές ή οποιουδήποτε τύπου αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενζύμων και του υλικού στήριξης (microenvironmental

effects). Το φορτίο των υποκαταστατών μπορεί επίσης να μεταβάλει τη σταθερά K_m , αν και γενικά οι παρατηρούμενες αλλαγές είναι αμελητέες.

Κατά τη μελέτη των κινητικών παραμέτρων σε αντιδράσεις με ακινητοποιημένα ένζυμα λαμβάνεται η “φαινομενική” (apparent) τιμή, γι’ αυτό πριν τον υπολογισμό των κινητικών σταθερών, συνιστάται η επαναδιάλυση του υλικού στήριξης.

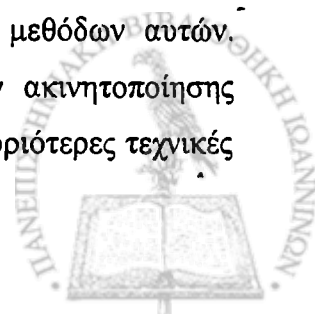
Η βέλτιστη τιμή pH στην οποία τα ακινητοποιημένα ένζυμα παρουσιάζουν τη μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης, μπορεί να λάβει διαφορετικές τιμές από αυτήν του διαλυτού ενζύμου. Η μεταβολή αυτή είναι ανάλογη με τη φύση του υλικού στήριξης, τη μέθοδο ακινητοποίησης, το περιβάλλον εργασίας και το ένζυμο που χρησιμοποιείται. Όπως όλες οι πρωτεΐνες, τα ένζυμα είναι ευαίσθητα στη θερμική αποικοδόμηση, είτε βρίσκονται σε διαλυτή μορφή είτε ακινητοποιημένα σε κάποιο υλικό στήριξης, λόγω των αλλαγών στην τεταρτοταγή δομή τους ή λόγω της οξείδωσης ορισμένων ομάδων σε υψηλές θερμοκρασίες. Στις περισσότερες περιπτώσεις έχει αποδειχτεί, ότι η ταχύτητα απενεργοποίησης και αποικοδόμησης των ακινητοποιημένων ενζύμων είναι μικρότερη από αυτή των διαλυτών, λόγω της αυξανόμενης ακαμψίας του μορίου, η οποία παρέχει αυξημένη αντοχή στις αλλαγές της τεταρτοταγούς δομής κατά τη θέρμανση.

2.3.2.2 Μέθοδοι ακινητοποίησης ενζύμων

Οι τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί για την ακινητοποίηση βιολογικά ενεργών ουσιών (ένζυμων, αντιγόνων/αντισωμάτων, βακτηρίων, μυκήτων, ιστών και λιποσωμάτων) βασίζονται σε φυσικές, χημικές μεθόδους ή σε συνδυασμούς αυτών. Γραφική απεικόνιση των μεθόδων ακινητοποίησης φαίνεται στο σχήμα 2.12.

Οι κύριες φυσικές μέθοδοι είναι η *προσρόφηση* (adsorption) σε μη υδατοδιαλυτό φορέα και η *παγίδευση* (gel entrapment) σε μη υδατοδιαλυτές πηκτές πολυμερών. Οι πιο διαδεδομένες τεχνικές χημικής ακινητοποίησης είναι η *διαμοριακή σύνδεση* (cross-linking) των ενζυμικών μορίων και η *ομοιοπολική* (covalent binding) σύνδεση σε ενεργοποιημένο φορέα. Η διαμοριακή σύνδεση μέσω *διλειτουργικών υποκαταστατών* (bifunctional agents) συνδυάζεται συνήθως με προσρόφηση ή παγίδευση των ενζύμων.

Η παραπάνω ομαδοποίηση των μεθόδων ακινητοποίησης είναι συμβατική αφού κάθε μία από αυτές έχει πολλές παραλλαγές και σε αρκετές περιπτώσεις η ακινητοποίηση ενός ενζύμου είναι αποτέλεσμα συνδυασμού των μεθόδων αυτών. Τεχνικές λεπτομέρειες και καταγραφή μεγάλου αριθμού μεθόδων ακινητοποίησης μπορούν να βρεθούν στη βιβλιογραφία. Παρακάτω αναφέρονται οι κυριότερες τεχνικές

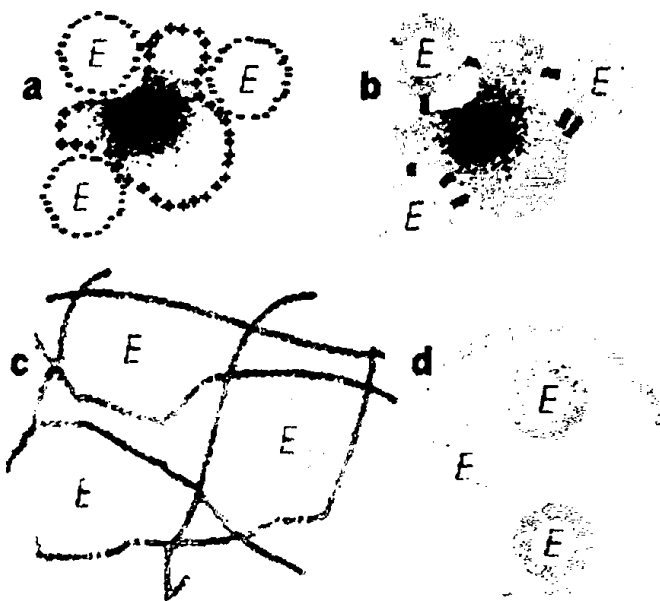


ακίνητοποίησης, οι αρχές στις οποίες στηρίζονται, τα πλεονεκτήματα και οι περιορισμοί κατά την εφαρμογή τους.

2.3.2.3 Προσρόφηση

Η προσρόφηση του ενζύμου πάνω σε μη υδατοδιαλυτά υλικά είναι η πιο απλή μέθοδος ακίνητοποίησης. Βασίζεται στην επαφή διαλύματος του ενζύμου με ενεργό προσροφητικό υλικό για κάποια χρονική περίοδο, μετά την πάροδο της οποίας η περίσσεια του ενζύμου αποβάλλεται. Για το σκοπό αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί πολυάριθμα υλικά, όπως ο χαλαζίας, ο ενεργός άνθρακας, η πηκτική διοξειδίου του πυριτίου (Silica gel), οι ιονοανταλλακτικές ρητίνες, η ύαλος ελεγχόμενου πορώδους και τα κεραμικά υλικά.

Η διαδικασία προσρόφησης είναι εξαιρετικά πολύπλοκη. Ανάλογα με τη φύση της επιφάνειας η σύνδεση του ενζύμου γίνεται με ιοντικές αλληλεπιδράσεις, φυσική προσρόφηση, υδρόφοβους δεσμούς (δεσμούς Van der Waals).



Σχήμα 2.12: Μέθοδοι ακίνητοποίησης ενζύμων: E-ένζυμο a) προσρόφηση σε μη υδατοδιαλυτό φορέα, b) ομοιοπολική σύνδεση σε ενεργοποιημένο φορέα, c, d) παγίδευση ενζύμου σε πηκτική πολυμερούς και ημιπερατή μεμβράνη.

Χαρακτηριστικό αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι, ότι εξαρτώνται ισχυρά από παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία, η ιοντική ισχύ, η συγκέντρωση του ενζύμου και του προσροφητικού υλικού και η παρουσία διαλύτη. Συνεπώς η

αποτελεσματικότητα της ακινητοποίησης επηρεάζεται σημαντικά από τις αλλαγές αυτών των παραγόντων.

Η ταχύτητα προσρόφησης της πρωτεΐνης σε μη υδατοδιαλυτά υλικά επηρεάζεται από δύο παραμέτρους. Η πρώτη είναι το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης, που αυξάνει την προσρόφηση, καθώς αυτό μετατοπίζεται σε υψηλότερα pH, ενώ η δεύτερη είναι το μοριακό βάρος του μακρομορίου, που όταν είναι μεγάλο μειώνεται η ταχύτητα διάχυσης του ενζύμου στους πόρους του υλικού.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου για τη δέσμευση ενζύμων πηγάζουν από την ευκολία της, τη μεγάλη ποικιλία προσροφητικών υλικών και την επαναχρησιμοποίηση τους. Οι χειρισμοί που απαιτούνται για την ακινητοποίηση είναι εντελώς απλοί αφού μελετηθούν οι κατάλληλες συνθήκες προσρόφησης.

Η επιλογή του προσροφητικού υλικού πρέπει να γίνεται με βάση τη συγγένεια μεταξύ αυτού και του ενζύμου, τη διατήρηση της ενεργότητας του ενζύμου και να μην προσροφά τα προϊόντα ή τους αναστολείς του ενζύμου.

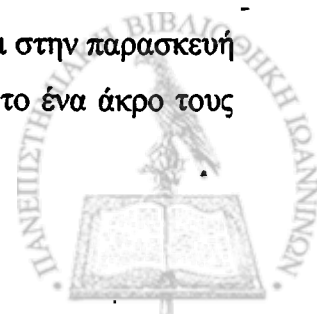
Η παγίδευση του ενζύμου στο χώρο ενός πολυμερούς παρουσιάζει επίσης μεγάλο ενδιαφέρον. Τα ένζυμα, που παγιδεύονται στο πλέγμα του συστήματος πολυμερές-πηκτή (gel), δεν πρέπει να διαχέονται προς τα έξω, ενώ τα προϊόντα και το υπόστρωμα πρέπει να διακινούνται ελεύθερα. Τα πιο διαδεδομένα υλικά για την παγίδευση ενζύμων είναι το πολυακρυλαμίδιο, η πολυβινυλική αλκοόλη, το άμυλο και η πηκτή διοξειδίου του πυριτίου.

Τα πλεονεκτήματα της παγίδευσης είναι η απλότητα και η ευκολία λόγω των ήπιων συνθηκών που εφαρμόζονται κατά την ακινητοποίηση και η μεγάλη ποικιλία των διαθέσιμων υλικών και παρασκευασμάτων. Τα μειονεκτήματα σχετίζονται με την ανάγκη ρύθμισης αρκετών πειραματικών παραγόντων, το απρόσιτο του ενζύμου από την παρουσία των ριζών, που απαιτούνται για το σχηματισμό πολυμερών και την απώλεια του ενζύμου στα στάδια της χρήσης λόγω ανομοιογενούς κατασκευής του πλέγματος.

2.3.2.4 Διαμοριακή σύνδεση ενζύμων

Η μέθοδος διαμοριακής σύνδεσης στηρίζεται στο σχηματισμό χημικών δεσμών απουσία μη υδατοδιαλυτών φορέων.

Η πιο διαδεδομένη χρήση της μεθόδου διαμοριακής σύνδεσης είναι στην παρασκευή ενζυμικών μεμβρανών με διλειτουργικά αντιδραστήρια, τα οποία με το ένα άκρο τους



δεσμεύουν το βιομόριο και με το άλλο μπορούν να συνδεθούν με την πηκτική πολυμερούς ή με άλλα βιομόρια ή με την επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου.

Το πιο δημοφιλές αντιδραστήριο είναι η γλουταραλδεύδη, ενώ άλλα αντιδραστήρια όπως το 2-ισοκυανο-4-ισοθειοκυανο-τολουόλιο και το 1,5-διφθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο έχουν χρησιμοποιηθεί σε μικρότερη έκταση. Σε πολλές περιπτώσεις η χρήση των παραπάνω αντιδραστηρίων συνδυάζεται με ένα φορέα πρωτεΐνης, όπως η αλβουμίνη. Έχει παρατηρηθεί ότι η παρουσία της αλβουμίνης αυξάνει την ενζυμική ενεργότητα και το χρόνο ζωής του προκύπτοντος παρασκευάσματος [37]. Τα πλεονεκτήματα της διαμοριακής σύνδεσης είναι η απλότητα και οι ισχυροί δεσμοί σύνδεσης του ενζύμου με το υλικό στήριξης. Σοβαρό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η ευαισθησία των ενζύμων στα αντιδραστήρια σύνδεσης. Συχνά παρατηρείται ελάττωση ή ολική απώλεια της ενζυμικής ενεργότητας λόγω των χημικών μεταβολών που υφίστανται τα ενεργά κέντρα των ενζύμων.

2.3.2.5 Ομοιοπολική σύνδεση

Η μέθοδος αυτή συνίσταται στην ακινητοποίηση του ενζύμου πάνω στην επιφάνεια ενεργοποιημένου μη υδατοδιαλυτού υλικού. Κατά την ομοιοπολική σύνδεση τα ένζυμα βρίσκονται σε μία κατάσταση, που μοιάζει με το φυσικό τους περιβάλλον με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν υψηλή ενεργότητα, μεγάλους χρόνους ημιζωής και έχουν το πρόσθετο πλεονέκτημα της μη αντιστρεπτής πορείας ακινητοποίησης κατά την μεταβολή διαφόρων παραμέτρων όπως το pH, η ιοντική ισχύς, η θερμοκρασία και ο διαλύτης. Η πορεία ακινητοποίησης με ομοιοπολική σύνδεση περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια:

- 1) Ενεργοποίηση της επιφάνειας του υλικού στήριξης,
- 2) Ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου και
- 3) Απομάκρυνση της μη ακινητοποιημένης ποσότητας του ενζύμου.

Η ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου γίνεται απ' ευθείας ή μέσω ενός διλειτουργικού αντιδραστηρίου (π.χ γλουταραλδεύδης), το οποίο έχει ήδη συνδεθεί στην επιφάνεια του υλικού στήριξης.

Οι ενεργές ομάδες των ενζύμων, που συμμετέχουν σε τέτοιες αντιδράσεις, είναι η ε-αμινομάδα της λυσίνης, το αμινο- και καρβοξυ- τελικό άκρο της πεπτιδικής αλυσίδας, η β- και γ- καρβοξυλομάδα του ασπαρτικού και του γλουταμινικού οξέος, η υδροξυλική ομάδα της σερίνης και της θρεονίνης, η φαινολική ομάδα της τυροσίνης, η



σουλφυδρυλική ομάδα της κυστεΐνης, η ινδολική ομάδα της τρυπτοφάνης, η ιμιδαζολική ομάδα της ιστιδίνης και η γουανιδική ομάδα της αργινίνης.

Τα υλικά στήριξης επιλέγονται ανάλογα με τη διαλυτότητά τους, το είδος των ενώσεων που φέρουν στην επιφάνεια τους, τη χωρητικότητα τους και το βαθμό διόγκωσής τους στον συγκεκριμένο διαλύτη. Τα πιο διαδεδομένα υλικά στήριξης είναι η πορώδης ύαλος [38], το Nylon [39], διάφορα παράγωγα της κυτταρίνης [40], η αγαρόζη [41] και το πολυακρυλαμίδιο [42].

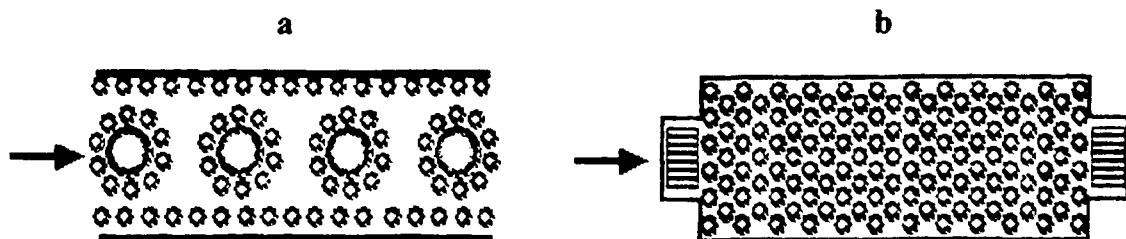
2.3.3 Αναλυτικές εφαρμογές των ακινητοποιημένων ενζύμων

Τα ακινητοποιημένα ένζυμα πλεονεκτούν έναντι των διαλυτών ενζύμων, γιατί παρέχουν τη δυνατότητα της επανειλημμένης χρήσης. Το γεγονός αυτό έπαιξε σημαντικό ρόλο στη ραγδαία εξέλιξη των μεθόδων ακινητοποίησης και την καθιέρωσή τους σε διάφορες αναλύσεις ρουτίνας.

Τα ακινητοποιημένα ένζυμα έχουν χρησιμοποιηθεί με τη μορφή αντιδραστήρων ή με τη μορφή μεμβρανών σε συνδυασμό με φωτομετρικά, φθορισμομετρικά, ποτενσιομετρικά, αμπερομετρικά, πιεζοηλεκτρικά και θερμικά συστήματα ανίχνευσης, για τον προσδιορισμό μεγάλου αριθμού ενώσεων με ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην κλινική και φαρμακευτική χημεία, στη χημεία τροφίμων και χημεία περιβάλλοντος. Οι αναλυτικές εφαρμογές των ακινητοποιημένων ενζύμων αναφέρονται εκτενέστερα σε διάφορα βιβλία [43,44] και άρθρα ανασκόπησης [45,46].

2.3.4 Ενζυμικοί αντιδραστήρες

Οι σημαντικότεροι τύποι ενζυμικών αντιδραστήρων είναι: του ανοιχτού σωλήνα (Open tubular και Whisker-walled open tubular), πακεταρισμένης κλίνης (packed-bed reactors) και απλής διάταξης σφαιριδίων (single bead string reactors) (Σχήμα 2.13).



Σχήμα 2.13: Ενζυμικοί αντιδραστήρες: α) απλής διάταξης σφαιριδίων, β) πακεταρισμένης κλίνης



Στους αντιδραστήρες ανοιχτού σωλήνα το ένζυμο ακινητοποιείται με ομοιοπολικούς δεσμούς στα εσωτερικά τοιχώματα υάλινων, πλαστικών ή Nylon σωλήνων. Οι αντιδραστήρες ανοιχτού σωλήνα έχουν χαμηλή ενεργότητα και ως εκ τούτου μεγάλο μήκος, προκειμένου να επιτευχθεί σε κάποιο ικανοποιητικό βαθμό μετατροπή του υποστρώματος. Αν και έχουν πολύ καλά χαρακτηριστικά ροής, η χρήση τους σε διατάξεις ανάλυσης ροής με έγχυση δείγματος (FIA-Flow Injection Analysis) είναι περιορισμένη.

Στους αντιδραστήρες πακεταρισμένης κλίνης το ένζυμο ακινητοποιείται πάνω σε διάφορα, μικρού μεγέθους, ενεργοποιημένα υλικά (όπως πορώδης ύαλος, πολυσακχαρίτες, Nylon) τα οποία πακετάρονται σε σωλήνες από ύαλο ή ανοξείδωτο χάλυβα. Λόγω της μεγάλης τους επιφάνειας μπορούν να δεσμεύσουν μεγάλη ποσότητα ενζύμου και παρουσιάζουν υψηλή ενεργότητα και μεγάλους χρόνους ζωής. Συγκριτικά με τους αντιδραστήρες ανοιχτού σωλήνα μειονεκτούν σε χαρακτηριστικά ροής, παρ' όλα αυτά η χρήση τους σε διατάξεις FIA είναι ευρέως διαδεδομένη.

Ενδιάμεση κατάσταση είναι οι αντιδραστήρες σφαιριδίων απλής διάταξης όπου το ένζυμο ακινητοποιείται πάνω σε ενεργοποιημένα σφαιρίδια. Λόγω όμως της μικρής τους επιφάνειας η ενεργότητα του προκύπτοντος αντιδραστήρα είναι περιορισμένη. Παρουσιάζουν πάντως καλά χαρακτηριστικά ροής και μπορούν να χρησιμοποιηθούν, απουσία ενζύμου, ως αντιδραστήρες ανάμειξης.

Οι αντιδραστήρες πακεταρισμένης κλίνης χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή για την ανάπτυξη μεθόδου ανάλυσης σε ροή με έγχυση δείγματος, οι βασικές αρχές της οποίας αναπτύσσονται στην επόμενη παράγραφο.



2.4 Ανάλυση ροής με έγχυση δείγματος (Flow Injection Analysis)

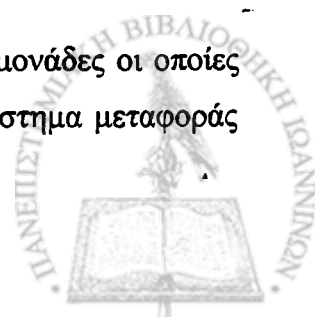
Η ανάλυση ροής με έγχυση δείγματος (Flow Injection Analysis – FIA) είναι μία σχετικά πρόσφατη τεχνική η οποία χαρακτηρίζεται από απλή φιλοσοφία, σχετικά φθηνή οργανολογία, εύκολη χρήση και μεγάλη ικανότητα για λήψη αποτελεσμάτων με εξαιρετική ταχύτητα, καλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της είναι η ευελιξία της, η οποία επιτρέπει στον αναλυτή να τροποποιήσει το σύστημα έτσι ώστε να καλύπτει κάθε αναλυτική ανάγκη υπό βέλτιστες συνθήκες μέτρησης.

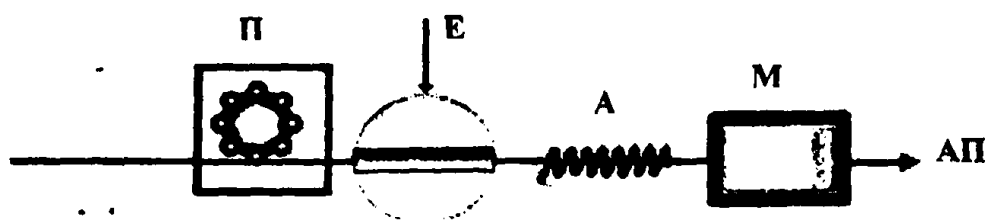
Ο όρος *Flow Injection Analysis* χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Ruzicka και Hansen [47] και τον Stewart και τους συνεργάτες του [48] στα μέσα της δεκαετίας του 1970 και σήμερα είναι αποδεκτός παγκοσμίως.

Τα βασικά χαρακτηριστικά ενός συστήματος FIA μπορούν να συνοψισθούν στα εξής:

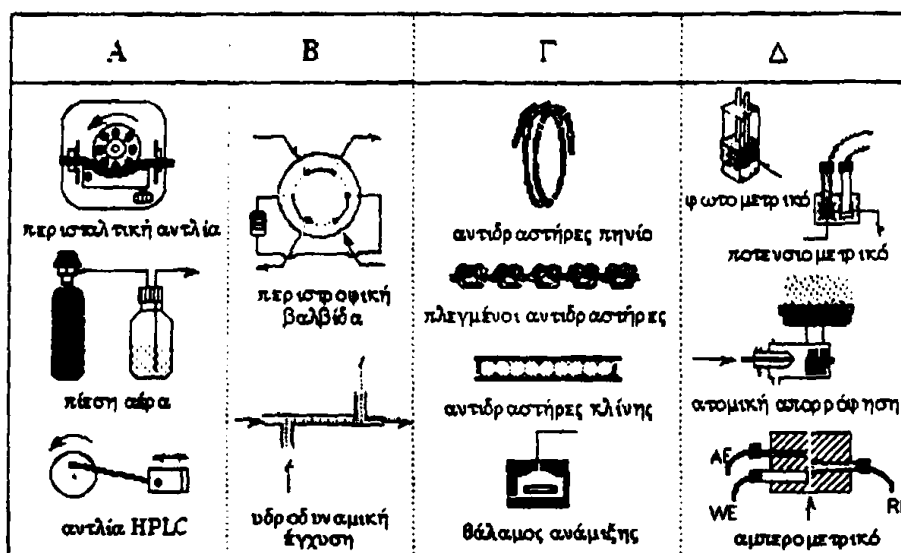
- Η ροή δεν είναι διακοπτόμενη με φυσαλίδες αέρα (non-segmented) και αυτό αποτελεί τη σημαντικότερη διαφορά της FIA από τις κλασικές μεθόδους διακοπτόμενης ροής (segmented-flow).
- Το δείγμα εισάγεται απ' ευθείας στη ροή του φέροντος υγρού και δεν αναρροφάται μηχανικά.
- Το εισαγόμενο έμβολο δείγματος παρασύρεται από το φέρον υγρό και μπορεί να υποστεί διάφορες φυσικοχημικές διεργασίες, όπως χημική αντίδραση, διαπίδυση, εκχύλιση, κλπ.
- Η μερική διάχυση και αραίωση της αναλυόμενης ουσίας κατά τη μεταφορά μπορεί να ελεγχθεί με κατάλληλη ρύθμιση των γεωμετρικών και υδροδυναμικών χαρακτηριστικών του συστήματος.
- Χρησιμοποιείται ανιχνευτής συνεχούς παρακολούθησης, ο οποίος παράγει ένα μεταβατικό σήμα με μορφή κορυφής.
- Δεν επιτυγχάνεται ούτε φυσική (ομογενοποίηση) ούτε χημική ισορροπία μέχρι τη στιγμή που γίνεται η μέτρηση του σήματος. Για το λόγο αυτό η FIA εντάσσεται στις τεχνικές σταθερού χρόνου (fixed-time).
- Το σύστημα παρουσιάζει πολύ καλή επαναληψιμότητα στους χρόνους μέτρησης (σταθερός χρόνος που μεσολαβεί από τη στιγμή έγχυσης του δείγματος μέχρι τη μεταφορά του στον ανιχνευτή).

Σε γενικές γραμμές ένα σύστημα FIA αποτελείται από τέσσερις μονάδες οι οποίες είναι το σύστημα προώθησης, το σύστημα έγχυσης δείγματος, το σύστημα μεταφοράς και αντίδρασης και ο ανιχνευτής (Σχήματα 2.14, 2.15).



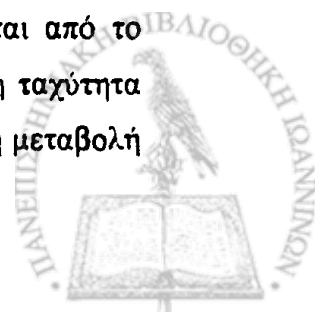


Σχήμα 2.14: Γενικό διάγραμμα FIA (Π: σύστημα προώθησης, Ε: σύστημα έγχυσης δείγματος, Α: χώρος αντίδρασης, Μ: ανιχνευτής, ΑΠ: απόβλητα)

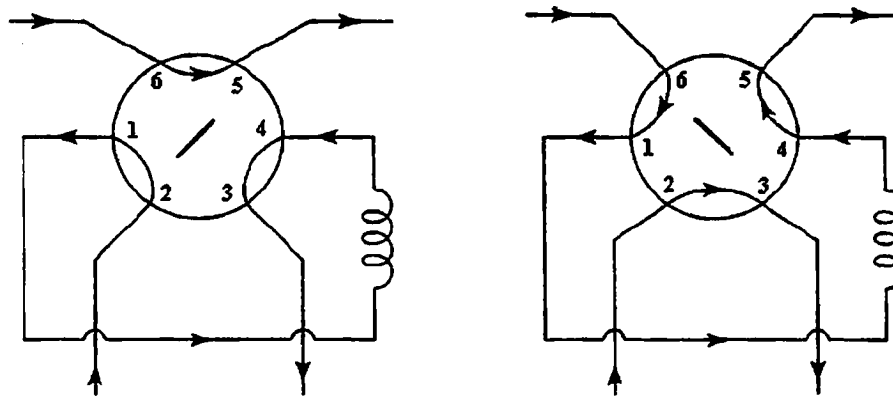


Σχήμα 2.15: Τυπική οργανολογία των επιμέρους συστημάτων που αποτελούν μια διάταξη FIA. (Α: σύστημα προώθησης, Β: σύστημα έγχυσης δείγματος, Γ: σύστημα μεταφοράς και αντίδρασης, και Δ: σύστημα ανίχνευσης)

Α) Η μονάδα προώθησης είναι υπεύθυνη για την παραγωγή ροής (με ταχύτητα όσο το δυνατόν σταθερή). Ως ροή νοούνται ένα ή περισσότερα διαλύματα τα οποία μπορούν να περιέχουν αντιδραστήρια ή απλά να δρουν ως φέρον υγρό. Η προώθηση μπορεί να επιτευχθεί είτε με περισταλτική αντλία ή αντλία HPLC, είτε με πίεση αέρα, είτε με την επίδραση της βαρύτητας. Η περισταλτική αντλία είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο σύστημα προώθησης και αποτελείται από μια σειρά περιστρεφόμενων κυλίνδρων τοποθετημένων περιφερειακά στον ίδιο άξονα. Πάνω σ' αυτούς τους κυλίνδρους συμπιέζονται εύκαμπτοι σωλήνες με αποτέλεσμα την κίνηση των υγρών που περιέχουν. Ο αριθμός των σωλήνων (καναλιών) μιας περισταλτικής αντλίας εξαρτάται από το μήκος των κυλίνδρων και συνήθως κυμαίνεται από 3 έως 16. Η επιθυμητή ταχύτητα ροής επιτυγχάνεται είτε με τη μεταβολή της ταχύτητας του τροχού είτε με τη μεταβολή της διαμέτρου των σωλήνων.



B) Το σύστημα έγχυσης επιτρέπει την προσθήκη του δείγματος κατά τρόπο αναπαραγωγίμο και υπό σταθερό όγκο χωρίς να επιβάλλεται η διακοπή της ροής. Η εισαγωγή μπορεί να επιτευχθεί με χρήση περιστροφικών βαλβίδων (Σχήμα 2.16), συριγγών και σωληνοειδών βαλβίδων [49].



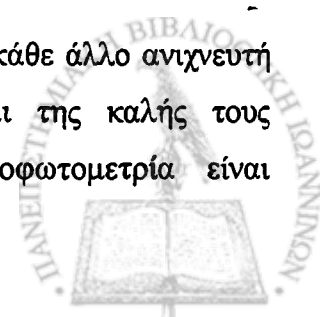
Σχήμα 2.16: Η λειτουργία βαλβίδας τεσσάρων διαδρομών με τις δύο δυνατές θέσεις: γέμισμα του βρόχου (αριστερά) και έγχυση του δείγματος (δεξιά)

Ο βρόχος του δείγματος ενώνεται στα σημεία 1 και 4. Στη θέση “γέμισμα” το δείγμα αναρροφάται και ο βρόχος γεμίζει, ενώ ο φορέας οδηγείται μέσω των σημείων 5 και 6 στο σύστημα. Στη θέση “έγχυση” οι συνδέσεις αλλάζουν αυτόματα και ο φορέας παρασύρει το δείγμα, που βρίσκεται στο βρόχο και το φέρνει στη ροή του συστήματος σαν ευδιάκριτο τμήμα του.

Γ) Ο χώρος αντίδρασης μπορεί να έχει πολλές μορφές, συνήθως όμως αποτελείται από σωληνώσεις στις οποίες γίνεται απλή μεταφορά του δείγματος ή λαμβάνουν χώρα διάφορες φυσικοχημικές διεργασίες. Οι σωληνώσεις αυτές μπορεί να έχουν τη μορφή ευθέων σωλήνων ή πηνίων, συνηθίζονται όμως και αντιδραστήρες κλίνης (σωλήνες πληρωμένοι με χημικά αδρανές ή μη-αδρανές υλικό). Ιδιαίτερη φροντίδα δίνεται στην κατασκευή των συνδέσεων για να αποφεύγονται οι διαρροές, οι φυσαλίδες και τα κενά, που λειτουργούν ως μικροί θάλαμοι ανάμιξης και αυξάνουν την “ουρά” της καμπύλης απόκρισης, κάνοντάς την ασύμμετρη.

Δ) Τέλος, το σύστημα ανίχνευσης χρησιμοποιεί μια κυψελίδα ροής κατάλληλα συνδυασμένη με κάποιο μεταλλάκτη (φωτομετρικό, φθορισμομετρικό, ποτενσιομετρικό, αμπερομετρικό, κλπ).

Οι οπτικοί ανιχνευτές έχουν χρησιμοποιηθεί περισσότερο από κάθε άλλο ανιχνευτή σε συστήματα FIA λόγω της σχετικής τους απλότητας και της καλής τους επαναληπτικότητας. Από τις οπτικές μεθόδους η φασματοφωτομετρία είναι



αναμφίβολα η πιο διαδεδομένη σήμερα λόγω του μεγάλου αριθμού αντιδράσεων που παράγουν έγχρωμα προϊόντα. Οι φασματοφωτομετρικές κυψελίδες είναι σχεδιασμένες έτσι, ώστε η φωτεινή δέσμη να τις διασχίζει κατά τον διαμήκη άξονα, αυξάνοντας την οπτική διαδρομή. Οι κυριότερες μορφές κυψελίδων είναι αυτές με διαμόρφωση 'Z' ή 'U'.

Σε φθορισμομετρικές μεθόδους, ο κλασικός σχεδιασμός μίας κυψελίδας περιλαμβάνει τη διέλευση της ακτινοβολίας διέγερσης από τη μία πλευρά της και την παρατήρηση του φθορισμού (ενέργεια εκπομπής) σε γωνία 90° .

Στις μεθόδους χημειοφωταύγειας η παραγωγή φωτός είναι πολύ γρήγορη (της τάξης των msec) και κατά συνέπεια η γρήγορη ανάμειξη του δείγματος, που προηγείται της ανίχνευσης, είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας για την αποτελεσματικότητα και την ευαισθησία του συστήματος. Γι' αυτό στους ανιχνευτές χημειοφωταύγειας ανάμειξη και ανίχνευση γίνονται ταυτόχρονα σε ένα περιστροφικό σωλήνα (coil tube), το μέγεθος του οποίου είναι ανάλογο του ύψους της κορυφής.

2.4.1 Σήματα που λαμβάνονται στα συστήματα FIA

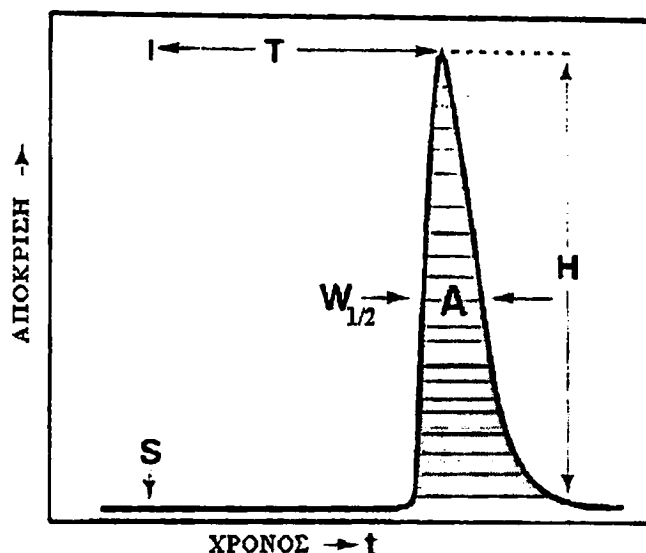
• Στις διατάξεις FIA η καταγραφή του παραγόμενου σήματος ως προς το χρόνο δίνει μία κορυφή της οποίας το ύψος H , το πλάτος $W_{1/2}$ στο μισό του ύψους και το εμβαδό A (όπως παραδοσιακά έχει επικρατήσει στη χρωματογραφία, HPLC) είναι ανάλογο της τιμής της μετρούμενης παραμέτρου και σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού (Σχήμα 2.17).

Το ύψος της κορυφής H σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού. Στην επιλογή του τρόπου επεξεργασίας των κορυφών, σημαντικό ρόλο παίζει η σταθερότητα (θόρυβος) της γραμμής βάσης. Σε περίπτωση που ο θόρυβος του σήματος είναι μεγάλος, ενδείκνυται η μέθοδος της ολοκλήρωσης.

Ο χρόνος κατακράτησης T είναι ο χρόνος που απαιτείται για να ληφθεί σήμα μέγιστης έντασης από τη στιγμή της έγχυσης του δείγματος. Δεν πρέπει να συγχέεται με το χρόνο διαδρομής, ο οποίος είναι ο χρόνος που απαιτείται για να εμφανισθεί σήμα από τη στιγμή της έγχυσης του δείγματος.

Πρέπει να αναφερθεί ότι τα σήματα που λαμβάνονται δεν είναι καμπύλες Gauss και συνεπώς οι παράμετροι που αναλύθηκαν παραπάνω δεν τα περιγράφουν πλήρως, ειδικά όσον αφορά την "ουρά" του σήματος που είναι χαρακτηριστική για μεταβατικά σήματα αυτού του είδους.



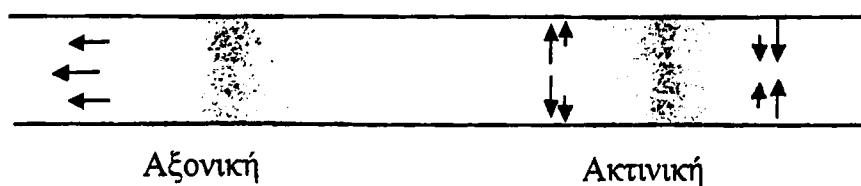


Σχήμα 2.17: Σήμα FIA (H : ύψος κορυφής, T : χρόνος κατακράτησης, A : εμβαδόν της κορυφής, $W_{1/2}$: το πλάτος στο μισό του ύψους, η έγχυση του δείγματος γίνεται στο σημείο S)

Ο χρόνος που μεσολαβεί από τη στιγμή εμφάνισης σήματος μέχρι την επιστροφή στη γραμμή βάσης αποτελεί μέτρο της διασποράς ή αραίωσης της αναλυόμενης ουσίας.

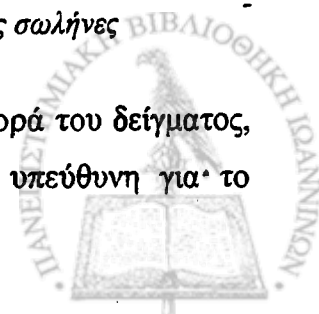
2.4.2 Διασπορά Δείγματος

Μία από τις σημαντικές παραμέτρους της FIA, που σχετίζεται με τα φυσικά της χαρακτηριστικά, είναι η διασπορά. Κατά την κίνηση του δείγματος στο σύστημα συμβαίνουν δύο επιμέρους φαινόμενα: Το κέντρο της ζώνης του δείγματος κινείται γρηγορότερα από ότι τα άκρα, που έρχονται σε επαφή με τα τοιχώματα του σωλήνα και επιβραδύνεται η κίνησή τους. Το φαινόμενο λέγεται *αξονική διασπορά*. Τα μόρια όμως που έρχονται σε επαφή με τα τοιχώματα κινούνται συγχρόνως και προς το κέντρο του σωλήνα, ενώ τα αντίστοιχα που βρίσκονται στο κέντρο της ζώνης τείνουν να κινηθούν προς τα τοιχώματα, δημιουργώντας έτσι την *ακτινική διασπορά* του συστήματος. Μια απλοποιημένη εικόνα αυτής της κατάστασης του δείγματος φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 2.18:



Σχήμα 2.18: Φαινόμενα διασποράς κατά τη μεταφορά υγρού σε κλειστούς σωλήνες

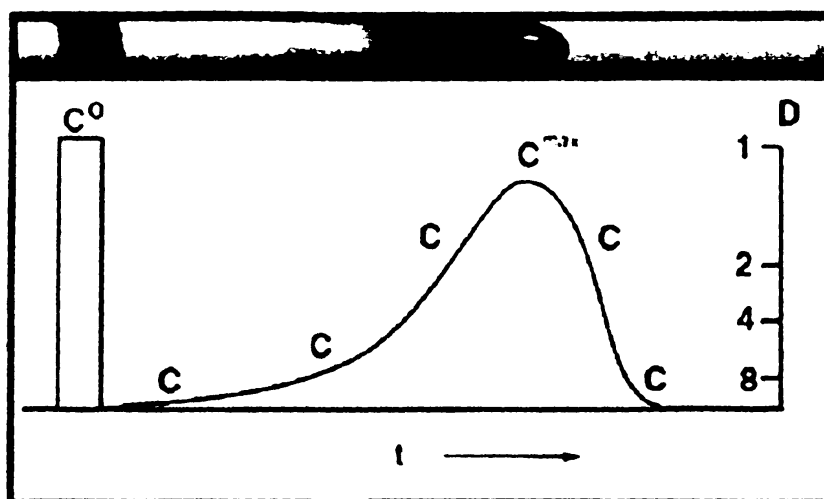
Η αξονική διασπορά δε συμμετέχει σημαντικά στην ολική διασπορά του δείγματος, ενώ αντίθετα η ακτινική διασπορά είναι σχεδόν ολοκληρωτικά υπεύθυνη για το



φαινόμενο της διαχυτικής μεταφοράς και τείνει να ομογενοποιήσει τη ζώνη του δείγματος με μετακίνηση των βραδύτερων στοιχείων της προς το κέντρο και των ταχύτερων προς την περιφέρεια.

2.4.3 Συντελεστής διασποράς Ruzicka

Επειδή η συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη στο κέντρο και στο μέτωπο της ζώνης, το σήμα παρουσιάζει ένα μέγιστο. Η διασπορά είναι πρακτικά η αραίωση, την οποία υφίσταται το δείγμα κατά τη διαδρομή του από το σημείο έγχυσης μέχρι τον ανιχνευτή



Σχήμα 2.19: Διασπορά δείγματος σε διάταξη FIA

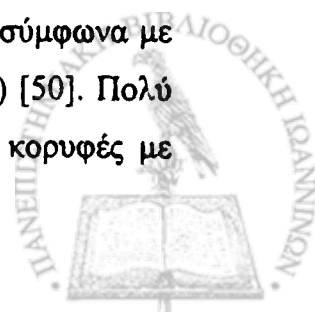
και ορίζεται μαθηματικά με την εξίσωση:

$$D = C^0/C_{\max} = H^0/H_{\max}$$

όπου D είναι ο συντελεστής διασποράς στο μέγιστο του σήματος και είναι ίσος με το λόγο των συγκεντρώσεων C^0/C του αρχικού δείγματος και του ίδιου δείγματος μετά την έγχυσή του στο σύστημα. Αν C^0 και C βρίσκονται στη γραμμική περιοχή του ανιχνευτή (το ύψος H είναι ανάλογο της συγκέντρωσης), ο συντελεστής διασποράς μπορεί να εκφραστεί και με το λόγο των υψών (H^0/H) των σημάτων (Σχήμα 2.19).

Ο πειραματικός προσδιορισμός της διασποράς γίνεται με μέτρηση του H^0 όταν στη ροή του φέροντος υγρού κυκλοφορεί καθαρό διάλυμα δείγματος και του H_{\max} όταν το δείγμα εισάγεται κανονικά στη ροή.

Εξ ορισμού η διασπορά είναι μεγαλύτερη της μονάδας και διακρίνεται σύμφωνα με τον Ruzicka σε περιορισμένη ($D < 3$), μέτρια ($3 < D < 10$) και μεγάλη ($D > 10$) [50]. Πολύ μεγάλες τιμές του D αντιστοιχούν σε πεπλατυσμένες και μικρού ύψους κορυφές με

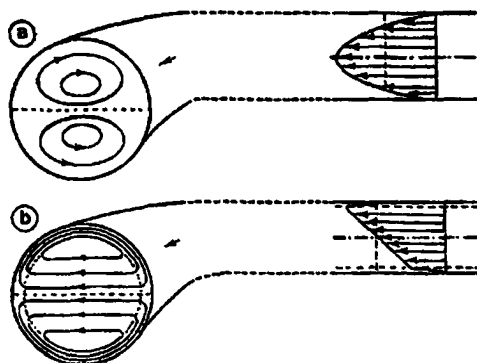


αποτέλεσμα να μειώνεται ο αριθμός των αναλυόμενων δειγμάτων στη μονάδα του χρόνου.

Σε ένα σύστημα FIA, η ολική διασπορά που υφίσταται το δείγμα μπορεί να δοθεί με τους επί μέρους όρους που αφορούν την εισαγωγή του δείγματος, τη μεταφορά και την ανίχνευση. Δηλαδή:

$$D = D_{\text{εγχυσης}} + D_{\text{μεταφοράς}} + D_{\text{ανιχνευτή}}$$

Ο πρώτος όρος του δεξιού σκέλους της εξίσωσης αφορά τη διασπορά που οφείλεται στον όγκο του δείγματος και τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του συστήματος εισαγωγής. Ο δεύτερος όρος αντιπροσωπεύει τη διασπορά λόγω της μεταφοράς του δείγματος προς τον ανιχνευτή και η οποία είναι η σημαντικότερη συνιστώσα στα φαινόμενα διασποράς που παρατηρούνται στα συστήματα FIA. Ο τελευταίος όρος εκφράζει την αραίωση που παρατηρείται στο δείγμα λόγω της γεωμετρίας της κυψελίδας μέτρησης. Ο συντελεστής διασποράς εξαρτάται από το μήκος του αντιδραστήρα και τη διάμετρο των σωλήνων. Ειδική περίπτωση αποτελούν οι σωλήνες με μορφή πηνίου στους οποίους εμφανίζονται νέα πρότυπα ροής (Σχήμα 2.20). Στις διατάξεις αυτές η διασπορά ελαττώνεται όσο ελαττώνεται η διάμετρος της σπείρας στο πηνίο.



Σχήμα 2.20: Εγκάρσια τομή σωλήνα με μορφή πηνίου και πρότυπα ροής: a) χαμηλές ταχύτητες, b) υψηλές ταχύτητες ροής

Βιβλιογραφία

- [1] L.C. Clark, *J. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 2 (1956) 41.
- [2] L.C. Clark, *J. Ann. NY Acad. Sci.*, 102 (1962) 29.
- [3] A.P.F. Turner, I. Karube and G.S. Wilson, *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, New York, 1987.
- [4] W. Gopel, J. Hesse and J.N. Zemel, *Sensors. A Comprehensive Survey: Chemical and Biochemical Sensors, Part I*, Vol. 2, VHC, Weinheim, 1991.
- [5] R.W. Murray, R.E. Dessy, W.R. Heineman, J. Janata and W.R. Seitz, *Chemical Sensors and Microinstrumentation*, ACS, Washington, USA, 1989.
- [6] G. Sauerbrey, *Z. Phys.*, 155 (1959) 206.
- [7] J.F. Tressler, S. Alkoy and R.E. Newnham, *J. Electroceramics*, 2 (1998) 257.
- [8] J. Janata, M. Josowicz, P. Vanysek and D.M. DeVaney, *Analytical Chemistry*, 70 (1998) 179R.
- [9] G. Barko and J. Hlavay, *Talanta*, 44 (1997) 2237.
- [10] Y. Long, W. Li, L. Nie and S. Yao, *J. Pharm. Biom Anal.*, 24 (2001) 361.
- [11] J. Zemel, *Sensors and Actuators*, 56 (1996) 57.
- [12] R. Aigner, M. Deitl, R. Katterloher and V. Klee, *Sens. Actuators*, 33 (1996) 151.
- [13] J.T. Stuckless, N.A. Frei and C.T. Campbell, *Sens. Actuators*, 62 (2000) 13.
- [14] C.A. Papadopoulos, D.S. Vlachos and J.N. Avaritsiotis, *Sens. Actuators*, 34 (1996) 524.
- [15] F.H. Arnold, W. Zheng and A.S. Michaelis, *J. Membr. Science*, 167 (2000) 227.
- [16] R. W. Murray in A.J. Bard (Ed), *Electroanalytical Chemistry*, Vol. 13, Marcel Dekker, New York, 1984, pp. 191.
- [17] F. Scheller and F. Schubert, *Biosensors*, Elsevier, New York, 1992.
- [18] P.T. Kissinger and W.R. Heinemann, *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1996.



- [19] S.A. Wring, J.P. Hart and B.J. Brich, *Analyst*, 116 (1991) 123.
- [20] J.L. Anderson, L.A. Coury and Jr Johna Leddy, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 519R.
- [21] J. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 234 (1990) 41.
- [22] A.P.F. Turner, *Advances in Biosensors*, vol 2, JAI Press Ltd, London, England, 1992.
- [23] A. Walcarius, *Anal. Chim. Acta*, 384 (1999) 1.
- [24] M.D. Marazuela and M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Bioanal. Chem.*, 372 (2002) 664.
- [25] W.R. Seitz, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 16A.
- [26] J.I. Peterson, R.V. Fitzgerald and D.K. Buckhold, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 62.
- [27] X. Zhou and M.A. Arnold, *Anal. Chim. Acta*, 304 (1995) 147.
- [28] C. Preininger, I. Klimant and O.S. Wolfbeis, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1841.
- [29] J. Janata, M. Josowics, P. Vanysek and D.M. DeVaney, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 179R.
- [30] J. Cordek, X. Wang and W. Tan, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 1529.
- [31] J.K. Crum, *Anal. Chem.*, 41 (1969) 26A.
- [32] S.A. Borman, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1616A.
- [33] OceanOptics, Inc., *Fiber-optics Manual*, Dunedin, FL, USA.
- [34] L. Desmarais, *Applied Electro-Optics*, Prentice Hall PTR, New Jersey, 1998.
- [35] J. Hecht, *Understanding Fiber Optics*, Prentice Hall PTR, New Jersey, 1999.
- [36] L. Strayer, *Biochemistry*, W.H.Freeman, San Francisco, 1971.
- [37] M.F. Cocquempot, B. Thomasset, J.N. Barbotin, G. Gelff and D. Thomas, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 11 (1981)193.
- [38] H.H. Weetall, *Nature*, 223 (1969) 959.
- [39] D.J. Inman and W.E. Hornby, *J. Biochem.*, 129 (1972) 255.
- [40] K.P. Wheller, B.A. Edwards and R. Whittam, *Biochim. Biophys. Acta*, 191 (1969) - 187.
- [41] D. Gabel and B. Hofsten, *Eur. J. Biochem.*, 15 (1970) 410.



- [42] J.K. Inman and H.M. Dintzis, *Biochemistry*, 8 (1969) 4074.
- [43] G.G. Guilbault and M. Mascini, (Eds.), *Analytical Uses of Immobilized Biological Compounds for Detection, Medical and Industrial Uses*, NATO ASI Series, D.Reidel Publishing Company, Dordrecht, 1988, pp.7
- [44] F. Šcheller and F. Schubert, *Biosensors*, Elsevier, NY, 1992.
- [45] L. Gordon, E. Csoregi, E. Dominquez, J. Emeneus, G. Jonsson-Petersson, G. Marko-Varga and B. Persson, *Anal. Chim. Acta*, 250 (1991) 203.
- [46] L. Gorton, *Electroanalysis*, 7 (1995) 23.
- [47] J. Ruzicka and E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, 145 (1975) 78.
- [48] K.K. Stewart, G.R. Beecher and P.E. Hare, *Anal. Biochem.*, 167 (1976) 70.
- [49] J. Ruzicka and E.H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, John Wiley and Sons, NY, 1988.
- [50] J. Ruzicka and E.H. Hansen and A. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 88 (1977) 1.



Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

Θεωρητικό Μέρος

3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography–HPLC) είναι η πιο διαδεδομένη απ' όλες τις αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού. Οι λόγοι αυτής της αποδοχής της τεχνικής είναι η ευαισθησία της, η εύκολη προσαρμογή της σε ποσοτικούς προσδιορισμούς ακριβείας, η καταλληλότητα της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και κυρίως, η εφαρμοσιμότητά της σε προσδιορισμούς ουσιών πρωτίστου ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία, το δημόσιο και πολλά επιστημονικά πεδία.

Οι βασικές αρχές της HPLC διαπιστώθηκαν από τους Martin και Sygne [1,2,3], οι οποίοι στις αρχές της δεκαετίας του 1940 χρησιμοποίησαν στήλες χρωματογραφίας στις οποίες τοποθέτησαν χονδρόκοκκα υλικά και εφαρμόζοντας χαμηλές πιέσεις και μικρές ταχύτητες της κινητής φάσης κατόρθωσαν να πετύχουν ικανοποιητικούς διαχωρισμούς για διάφορες κατηγορίες ενώσεων. Στη συνέχεια άρχισαν να χρησιμοποιούνται στήλες από χάλυβα οι οποίες άντεχαν σε υψηλές πιέσεις με αποτέλεσμα να αναπτυχθεί η τεχνολογία των αντλιών υψηλής πίεσης με σταθερή παροχή.

Η θεωρητική κάλυψη της HPLC ολοκληρώθηκε με τη συμβολή των Gidding το 1965, Snyder το 1967 και Dore το 1974 [4]. Τη δεκαετία του 1970 αναπτύχθηκαν τα υλικά πλήρωσης της στήλης και οι ανιχνευτές ροής. Το κορύφωμα έφτασε στα τέλη της δεκαετίας του 1970 με την ανάπτυξη της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης [5,6].

Στην HPLC το δείγμα εισάγεται σε μια στήλη με τη βοήθεια ειδικών βαλβίδων. Η στήλη, η οποία πρέπει να είναι υψηλής πιστότητας, περιέχει κατάλληλο υλικό, τη *στατική φάση* (stationary phase), το οποίο είναι χαρακτηριστικό για την ομάδα των συστατικών που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Από τη στήλη διέρχεται συνεχώς με την



αντλία υψηλής πίεσης η *κινητή φάση* (mobile phase), η οποία συμπαρασύρει το δείγμα μέσα στη στατική φάση διαχωρίζοντάς το στα συστατικά του. Οι δύο φάσεις επιλέγονται έτσι, ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα, τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενώς από τη στατική φάση, κινούνται ταχύτερα. Ως αποτέλεσμα αυτών των διαφορών στην ευκινησία, τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται καταλαμβάνοντας το καθένα ξεχωριστές ταινίες ή ζώνες, που στη συνέχεια μπορούν να ταυτοποιηθούν και προσδιορισθούν ποιοτικά ή/και ποσοτικά [7].

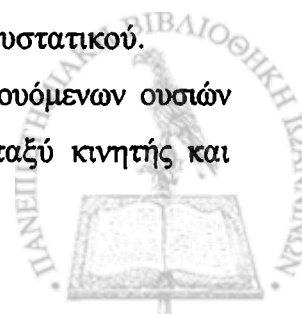
Τα συστατικά αυτά εξέρχονται από τη στήλη ανάλογα με την πολικότητά τους σε σχέση με το σύστημα έκλουσης. Λαμβάνοντας υπόψη τις σχέσεις πολικότητας μεταξύ στατικής και κινητής φάσης διακρίνονται δύο είδη υγρής χρωματογραφίας.

- 1) Η *χρωματογραφία κανονικής φάσης* (Normal Phase Chromatography), στην οποία η στατική φάση είναι πιο πολική από την κινητή με αποτέλεσμα τα λιγότερο πολικά συστατικά του δείγματος να κατακρατούνται για λιγότερο χρόνο στη στήλη και η έκλουση μιας ένωσης να γίνεται ευκολότερα με αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης.
- 2) Η *χρωματογραφία αντίστροφης φάσης* (Reverse Phase Chromatography), στην οποία η στατική φάση είναι λιγότερο πολική από την κινητή φάση με αποτέλεσμα τα πιο πολικά συστατικά του δείγματος να εκλούνται πρώτα και η έκλουση μιας ένωσης να γίνεται ευκολότερα όταν μειώνεται η πολικότητα της κινητής φάσης.

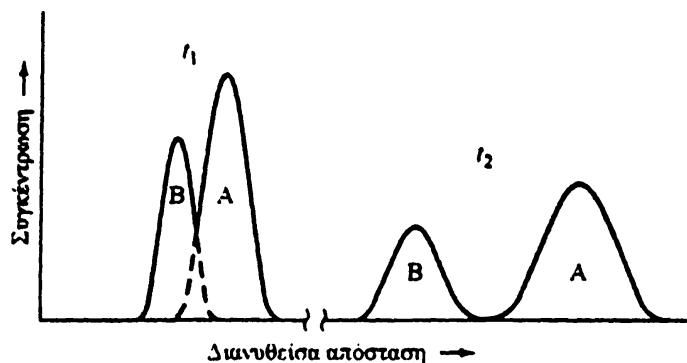
3.1 Χρωματογραφήματα

Εάν ένας ανιχνευτής, ο οποίος αποκρίνεται στη συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών, τοποθετηθεί στην έξοδο της στήλης και το σήμα του καταγραφεί ως συνάρτηση του χρόνου (ή όγκου της προστιθέμενης κινητής φάσης), λαμβάνεται μια σειρά κορυφών, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 3.1. Το διάγραμμα αυτό ονομάζεται *χρωματογράφημα* (chromatogram) και είναι χρήσιμο, τόσο για ποιοτική όσο και για ποσοτική ανάλυση. Οι θέσεις των κορυφών ως προς τον άξονα του χρόνου (χρόνοι κατακράτησης) εξυπηρετούν στην ταυτοποίηση των συστατικών του δείγματος, ενώ το-εμβαδόν ή το ύψος της κάθε κορυφής αποτελεί ποσοτικό μέτρο κάθε συστατικού.

Συνεχιζόμενες προσθήκες διαλύτη μετακινούν τα μόρια των εκλούμενων ουσιών προς την έξοδο της στήλης με μια σειρά συνεχών μεταφορών μεταξύ κινητής και



στατικής φάσης. Επειδή η κίνηση κάθε ουσίας πραγματοποιείται μόνο στην κινητή φάση, η μέση ταχύτητα μετακίνησης της αντίστοιχης ζώνης προς την έξοδο, εξαρτάται από το χρονικό κλάσμα παραμονής της ουσίας στη φάση αυτή.



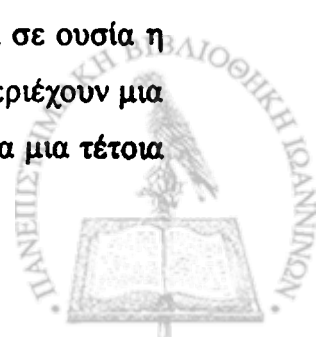
Σχήμα 3.1: Κατατομές συγκέντρωσης των ζωνών των ουσιών A και B σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά τη μετανάστευσή τους προς το κάτω μέρος (έξοδο) της στήλης.

Το κλάσμα αυτό είναι μικρό για τις ενώσεις οι οποίες κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση (το συστατικό B στο σχήμα 3.1) και είναι μεγάλο στην περίπτωση που η κατακράτηση στην κινητή φάση είναι μεγάλη (συστατικό A). Στην ιδανική περίπτωση οι διαφορές ταχύτητας διαχωρίζουν τα συστατικά σε ζώνες κατά μήκος της στήλης. Απομόνωση των ουσιών επιτυγχάνεται με το πέρασμα αρκετής ποσότητας κινητής φάσης μέσω της στήλης, ώστε να βγει η κάθε ζώνη από την έξοδο της στήλης, όπου μπορεί να ανιχνευθεί και να συλλεχθεί.

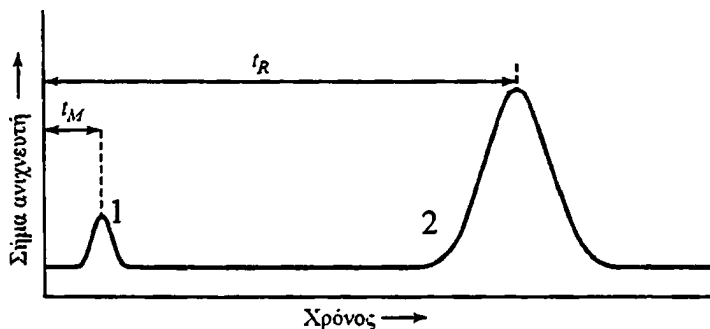
Στο σχήμα 3.1 απεικονίζεται επίσης ένα άλλο σημαντικό γενικό χαρακτηριστικό της διαδικασίας διαχωρισμού, το ότι ο διαχωρισμός των αναλυτών συνοδεύεται σχεδόν πάντοτε και από την αραίωσή τους. Έτσι, το εύρος της αρχικής ζώνης, η οποία περιέχει τους αναλύτες, είναι σημαντικά στενότερο από το εύρος και των δύο ζωνών κατά τη στιγμή που φθάνουν στον ανιχνευτή. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει σημαντική αραίωση των αναλυτών κατά τη διαδικασία του διαχωρισμού. Συνεπώς, οι χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές πρέπει να είναι πολύ πιο ευαίσθητοι απ' όσο θα χρειαζόταν, εάν η διαδικασία του διαχωρισμού δεν ήταν απαραίτητη [8].

3.1.1 Χρόνος κατακράτησης

Ο χρόνος από τη στιγμή έγχυσης του δείγματος μέχρι τη στιγμή που η κορυφή της ουσίας φθάνει στον ανιχνευτή, ονομάζεται *χρόνος κατακράτησης* (retention time) και συμβολίζεται ως t_R (Σχήμα 3.2). Η μικρή κορυφή στα αριστερά οφείλεται σε ουσία η οποία δεν κατακρατείται από τη στήλη. Συχνά το δείγμα ή η κινητή φάση περιέχουν μια ουσία η οποία δεν κατακρατείται. Εάν δεν περιέχουν, τότε εισάγεται σκόπιμα μια τέτοια



ουσία, η οποία διευκολύνει την ταυτοποίηση των κορυφών. Ο χρόνος t_M που χρειάζεται για να φθάσει η μη κατακρατούμενη ουσία στον ανιχνευτή συχνά αναφέρεται ως νεκρός χρόνος (dead time) ενώ ο αντίστοιχος όγκος, νεκρός όγκος (dead volume). Η ταχύτητα μετανάστευσης της μη κατακρατούμενης ουσίας είναι ίση προς τη μέση ταχύτητα των μορίων της κινητής φάσης.



Σχήμα 3.2: Τυπικό χρωματογράφημα μίγματος δύο ουσιών. Ενός αναλύτη (2) και μιας ουσίας που δεν κατακρατείται (1)

3.1.2 Μέθοδοι για την περιγραφή της αποδοτικότητας της στήλης

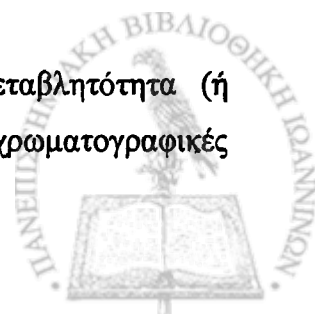
Δύο συγγενείς όροι που χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως ποσοτικά μέτρα της αποδοτικότητας μιας χρωματογραφικής στήλης είναι: (1) το ύψος της θεωρητικής πλάκας H και (2) ο αριθμός των θεωρητικών πλακών N . Οι δύο όροι συνδέονται με την εξίσωση 1:

$$N = L / H \quad (1)$$

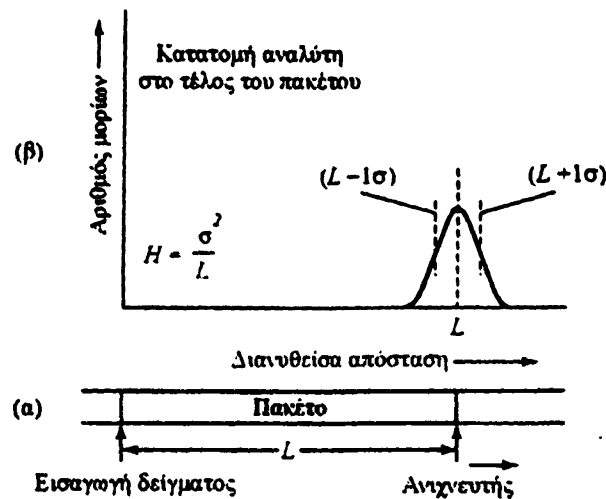
όπου L είναι το μήκος της πληρωμένης στήλης (συνήθως σε cm). Η αποδοτικότητα των χρωματογραφικών στηλών αυξάνει με τον αριθμό των πλακών και όσο το ύψος της πλάκας γίνεται μικρότερο. Συναντούμε τεράστιες διαφορές στην αποδοτικότητα των χρωματογραφικών στηλών ως αποτέλεσμα των διαφορών από στήλη σε στήλη και των διαφόρων ειδών των στατικών και των κινητών φάσεων. Οι αποδοτικότητες σε αριθμούς πλακών κυμαίνονται από μερικές εκατοντάδες έως αρκετές εκατοντάδες χιλιάδες. Τα ύψη των πλακών κυμαίνονται από μερικά δέκατα έως και μερικά χιλιοστά του cm και μπορεί να υπάρξουν και ακόμη μικρότερα ύψη πλακών. Η θεωρία των πλακών εξηγεί με επιτυχία τη μορφή Gauss των χρωματογραφικών κορυφών και την ταχύτητα της κίνησής τους προς την έξοδο της στήλης [9].

3.1.3 Ο ορισμός του ύψους μιας θεωρητικής πλάκας

Το εύρος μιας καμπύλης Gauss συνδέεται άμεσα με τη μεταβλητότητα (ή διακύμανση) σ^2 ή την τυπική απόκλιση των μετρήσεων. Επειδή οι χρωματογραφικές



ζώνες υποτίθεται πως γενικά έχουν τη μορφή μιας καμπύλης Gauss, εξυπηρετεί ο ορισμός της αποδοτικότητας της στήλης ως μεταβλητότητα ανά μονάδα μήκους της στήλης.



Σχήμα 3.3: Ορισμός του ύψους πλάκας $H = \sigma^2/L$

Έτσι, το ύψος που ισοδυναμεί με μια θεωρητική πλάκα H , παρέχεται από την εξίσωση 2:

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (2)$$

Ο ορισμός αυτός του ύψους πλάκας απεικονίζεται στο σχήμα 3.3, στο οποίο δείχνεται μια στήλη πληρωμένη (ή "πακεταρισμένη") με μήκος L cm. Πάνω από τη στήλη υπάρχει ένα διάγραμμα στο οποίο φαίνεται η κατανομή των μορίων κατά μήκος της στήλης, τη στιγμή που η κορυφή του αναλύτη φθάνει στο τέλος του πληρωμένου τμήματος (δηλαδή τη χρονική στιγμή που αντιστοιχεί στο χρόνο κατακράτησης, t_R). Η καμπύλη έχει μορφή κατανομής Gauss και οι θέσεις των $L - 1\sigma$ και $L + 1\sigma$ σημειώνονται με τις διακεκομμένες κατακόρυφες γραμμές. Σημειώνεται ότι το μήκος L μετρείται σε cm και οι μονάδες της σ^2 είναι cm^2 , οπότε το H εκπροσωπεί μια γραμμική απόσταση σε cm. Στην πραγματικότητα το ύψος της πλάκας μπορεί να θεωρηθεί ως το μήκος της στήλης (στην έξοδο της στήλης), το οποίο περιέχει κλάσμα του αναλύτη που βρίσκεται μεταξύ των θέσεων $L - \sigma$ και L . Επειδή το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη κανονικού σφάλματος μεταξύ των θέσεων $\pm \sigma$ είναι περίπου το 68% του ολικού εμβαδού, το ύψος της πλάκας (με βάση τον ορισμό) περιέχει περίπου το 34% της ποσότητας του αναλύτη.

3.1.4 Σχέση μεταξύ του ύψους πλάκας και των μεταβλητών της στήλης

Η επιρροή της ταχύτητας διέλευσης της κινητής φάσης από τη στατική φάση δίνεται από τη μαθηματική εξίσωση *van Deemter*, η οποία αναφέρει ότι στην ουσία το ύψος



των θεωρητικών πλακών επηρεάζεται από τρία φαινόμενα [10]: τη δυνατότητα της κινητής φάσης να ακολουθήσει διαφορετικές πορείες μέσα στη στατική φάση, τη διάχυση της προς ανάλυση ουσίας μέσα στην κινητή φάση και την κατανομή μάζας της προς ανάλυση ουσίας στην κινητή και στατική φάση.

Η εξίσωση van Deemter (3) γράφεται με την ακόλουθη μορφή:

$$H = A + B/u + Cu = A + B/u + (C_S + C_M)u \quad (3)$$

όπου H είναι το ύψος της πλάκας σε cm, u η γραμμική ταχύτητα της κινητής φάσης σε cm/s και οι ποσότητες A , B και C είναι συντελεστές που σχετίζονται με τα φαινόμενα πολλαπλότητας διαδρομών ροής, διαμήκους διάχυσης και μεταφοράς μάζας μεταξύ φάσεων, αντίστοιχα. Όπως δείχνεται στο δεξιό μέρος της εξίσωσης, ο συντελεστής C μπορεί να χωριστεί σε δύο συντελεστές, έναν που σχετίζεται με τη στατική φάση (C_S) και ένα που σχετίζεται με την κινητή φάση (C_M).

Οι όροι αυτοί ταυτοποιούνται στον πίνακα 3.1

Πίνακας 3.1: Τεχνικές διεργασίες που συνεισφέρουν στη διεύρυνση των κορυφών

Διεργασία	Όρος στην Εξίσωση van Deemter	Σχέση μεταξύ ιδιοτήτων στήλης και αναλύτη
Πολλαπλότητα διαδρομών ροής	A	$A = 2\lambda d_p$
Διαμήκης διάχυση	B/u	$\frac{B}{u} = \frac{2\gamma D_M}{u}$
Μεταφορά μάζας μεταξύ υγρής και στατικής φάσης	$C_S u$	$C_S u = \frac{f_S (k') d_f^2}{D_S} u$
Μεταφορά μάζας στην κινητή φάση	$C_M u$	$C_M u = \frac{f_M (k') d_p^2}{D_M} u$

u : γραμμική ταχύτητα κινητής φάσης, D_S : συντελεστής διάχυσης στη στατική φάση, D_M : συντελεστής διάχυσης στην κινητή φάση, d_f : πάχος της υγρής επικάλυψης της στατικής φάσης, d_p : διάμετρος του υλικού πλήρωσης, k' : παράγοντας κατακράτησης.

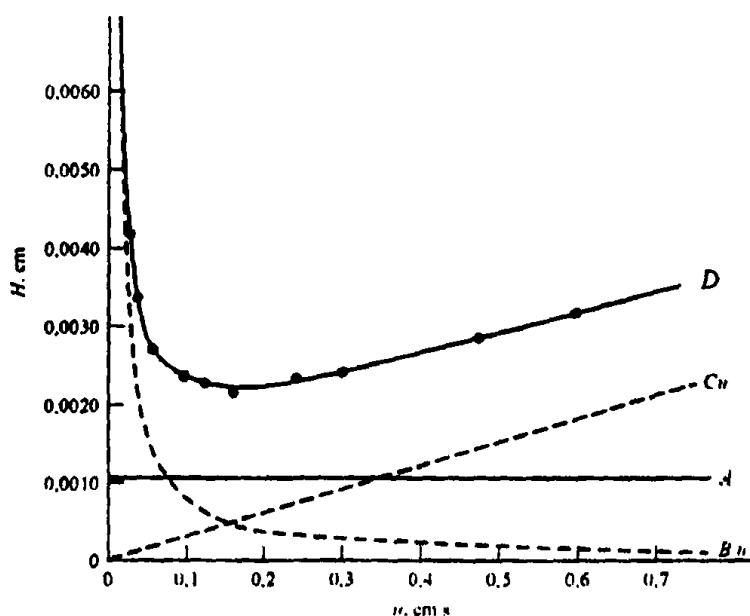
λ , γ : σταθερές που εξαρτώνται από την ποιότητα της πλήρωσης, B : συντελεστής διαμήκους διάχυσης.

C_S , C_M : συντελεστές μεταφοράς μάζας στη στατική και στην κινητή φάση, αντίστοιχα.

3.1.5 Επίδραση της ταχύτητας της κινητής φάσης στους όρους της εξίσωσης van Deemter

Στο σχήμα 3.4 παρουσιάζεται μια προσαρμογή τυπικών πειραματικών δεδομένων στην εξίσωση van Deemter. Το A δείχνει την εξάρτηση του ύψους των θεωρητικών πλακών από τη δυνατότητα της κινητής φάσης να ακολουθεί πολλαπλές πορείες μέσα στη στήλη. Το υλικό πλήρωσης της στατικής φάσης αποτελείται από σωματίδια

διαφορετικής διαμέτρου, τα οποία είναι κατανεμημένα με διαφορετικό τρόπο κατά μήκος της στήλης. Αυτή η ανομοιομορφία των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης επιτρέπει στα μόρια μιας ουσίας που διέρχεται από τη στήλη να βρίσκουν διαφορετικές διόδους μέσα από το υλικό πλήρωσης. Έτσι το A είναι ανάλογο με τη διάμετρο των σωματιδίων και η επιρροή του στο H είναι σταθερή για κάθε ταχύτητα ροής της κινητής φάσης. Το B/u δείχνει την εξάρτηση από το φαινόμενο της διάχυσης της κινητής φάσης μέσα στη στήλη και η επιρροή του στο H είναι μικρότερη όσο μεγαλύτερη είναι η ταχύτητα διέλευσης της κινητής φάσης εξαιτίας του μικρότερου χρόνου παραμονής της ουσίας στη στήλη. Το Cu είναι η εξάρτηση από το φαινόμενο της μεταφοράς ποσότητας μιας ένωσης από την κινητή στη στατική φάση και αντίστροφα. Όσο πιο μικρή είναι η ταχύτητα διέλευσης της κινητής φάσης τόσο η στήλη λειτουργεί πιο κοντά στις συνθήκες ισορροπίας. Η καμπύλη D του σχήματος 3.4 δίνει τη συνολική εξάρτηση του ύψους των θεωρητικών πλακών από τη ροή της κινητής φάσης σύμφωνα με τις πειραματικές τιμές.



Σχήμα 3.4: Διάγραμμα van Deemter για μια πληρωμένη στήλη υγρής χρωματογραφίας. Η συνεισφορά των επιμέρους όρων δείχνεται στις κάτω καμπύλες. A : επίδραση πολλαπλότητας διαδρομών, B/u : διάχυση της κινητής φάσης μέσα στη στήλη, Cu : μεταφορά μάζας στις δύο φάσεις και D : συνολική εξάρτηση του ύψους των θεωρητικών πλακών από τη ροή της κινητής φάσης σύμφωνα με τις πειραματικές τιμές.

Όπως φαίνεται και στο σχήμα 3.5 τα βασικά τμήματα μιας διάταξης HPLC είναι:

- η μονάδα διαλυτών με σύστημα απαέρωσης και διήθησής τους,
- το σύστημα προώθησης (αντλία μεταφοράς διαλυτών),
- το σύστημα ανάμιξης διαλυτών (στην περίπτωση βαθμωτής έκλυσης),
- το τμήμα έγχυσης του δείγματος,



διεύρυνση των κορυφών. Επιπλέον, εμποδίζουν συχνά τη σωστή λειτουργία του ανιχνευτή.

Συνήθως, τα σύγχρονα συστήματα HPLC διαθέτουν συνδεσμολογία απαέρωσης των διαλυτών με διοχέτευση ηλίου. Άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την απαέρωση βασίζονται στη θέρμανση, στην έκθεση σε υπέρηχους και στην εφαρμογή κενού [11].

3.1.7 Σύστημα άντλησης

Ο ρόλος των αντλιών στην HPLC είναι να προωθήσουν την κινητή φάση προς τη στήλη, υπό υψηλή πίεση και με απόλυτα ελεγχόμενη ροή. Οι προδιαγραφές του συστήματος άντλησης στην HPLC είναι αυστηρές και περιλαμβάνουν (1) εφαρμογή πιέσεων μέχρι και 6.000 psi, (2) εξασφάλιση μη παλμικής ροής, (3) ταχύτητες ροής που κυμαίνονται από 0,1 έως 10 ml/min, (4) έλεγχο ροής και επαναληψιμότητα ροής καλύτερη από 0,5%, (5) τμήματα ανθεκτικά στη διάβρωση (φλάντζες από ανοξείδωτο ατσάλι ή Teflon). Πρέπει να τονιστεί ότι οι υψηλές πιέσεις, που προκαλούνται από τις αντλίες της HPLC, δεν αποτελούν κίνδυνο έκρηξης μιας και τα υγρά είναι πολύ συμπιεστικά. Συνεπώς ρήξη ενός τμήματος του συστήματος μπορεί να οδηγήσει μόνο σε διαρροή του διαλύτη [12].

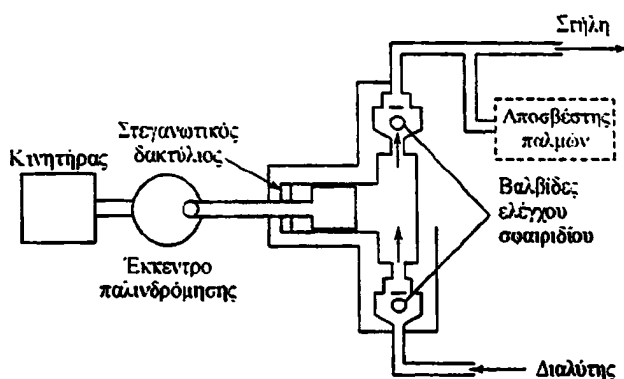
Συναντούμε τρεις τύπους αντλιών, καθένας με τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα του: αντλίες παλινδρόμησης, αντλίες σύριγγας ή εκτόπισης και αντλίες πνευματικές ή σταθερής πίεσης.

3.1.7.1 Αντλίες παλινδρόμησης

Οι αντλίες παλινδρόμησης αποτελούνται συνήθως από ένα μικρό θάλαμο στον οποίο ο διαλύτης αντλείται παλινδρομικά με ένα μηχανικά κινούμενο έμβολο (Σχήμα 3.6). Δυο σφαιρικές βαλβίδες, που ανοίγουν και κλείνουν εκ περιτροπής, ελέγχουν τη ροή του διαλύτη μέσα και έξω από ένα κύλινδρο. Ο διαλύτης βρίσκεται σε άμεση επαφή με το έμβολο. Το έμβολο μετακινείται μέσα ή έξω από το θάλαμο του διαλύτη ανάλογα με την κίνηση του κινητήρα. Κατά τη μπροστινή κίνηση η βαλβίδα ελέγχου κλείνει στην είσοδο και ανοίγει στην έξοδο έτσι ώστε η κινητή φάση να οθείται προς τη στήλη. Στην επιστροφή του εμβόλου οι βαλβίδες λειτουργούν αντίθετα και ο θάλαμος του διαλύτη επανατροφοδοτείται. Η ροή του διαλύτη μπορεί να μεταβληθεί αυξομειώνοντας τη διαδρομή που διανύει το έμβολο ή αλλάζοντας την ταχύτητα του κινητήρα. Οι αντλίες παλινδρόμησης έχουν το μειονέκτημα ότι παράγουν παλμούς ροής και η παρουσία τους



γίνεται εμφανής ως θόρυβος της γραμμής βάσης στο χρωματογράφημα. Τα πλεονεκτήματα των αντλιών παλινδρόμησης περιλαμβάνουν μικρούς εσωτερικούς όγκους (35 έως 400 μL), υψηλές πιέσεις (μέχρι 10.000 psi), εύκολη προσαρμογή σε βαθμωτή έκλυση και σταθερές ταχύτητες ροής, οι οποίες είναι ανεξάρτητες από την οπισθοπίεση της στήλης και το ιξώδες του διαλύτη.



Σχήμα 3.6: Αντλία σταθερής ροής, παλινδρομικής κίνησης για HPLC

3.1.7.2 Αντλίες Εκτόπισης

Οι αντλίες εκτόπισης συνήθως αποτελούνται από μεγάλους θαλάμους τύπου συριγγών εφοδιασμένων με ένα έμβολο που ενεργοποιείται από ένα κοχλιωτό μηχανισμό ο οποίος αντλεί ενέργεια από ένα βηματικό κινητήρα. Οι αντλίες εκτόπισης παράγουν επίσης ροή που τείνει να είναι ανεξάρτητη από το ιξώδες και την οπισθοπίεση. Επιπλέον η ροή είναι απαλλαγμένη από παλμικές διακυμάνσεις. Τα μειονεκτήματά τους περιλαμβάνουν περιορισμένη χωρητικότητα διαλύτη (250 mL) και σημαντική δυσκολία κατά την αλλαγή διαλυτών.

3.1.7.3 Πνευματικές αντλίες

Στις απλούστερες πνευματικές αντλίες, η κινητή φάση περιέχεται σε ένα πτυσσόμενο δοχείο που βρίσκεται σε ένα σκεύος που μπορεί να συμπιέζεται με ένα πεπιεσμένο αέριο. Αντλίες αυτού του τύπου είναι φτηνές και απαλλαγμένες από παλμικές ροές. Έχουν όμως μικρή χωρητικότητα και χαμηλή παρεχόμενη πίεση όπως και εξάρτηση ταχύτητας ροής από το ιξώδες και την οπισθοπίεση της στήλης. Επίσης δεν προσαρμόζονται σε βαθμωτή έκλυση και περιορίζονται σε πιέσεις μικρότερες από 2.000 psi.



3.1.8 Το σύστημα ανάμιξης των διαλυτών

Η διαδικασία διαχωρισμού που χρησιμοποιεί έναν διαλύτη σταθερής σύστασης καλείται *ισοκρατική έκλουση* (isocratic elution). Συχνά, η απόδοση διαχωρισμού βελτιώνεται σημαντικά με τη *βαθμωτή έκλουση* (gradient elution) [13]. Εδώ χρησιμοποιούνται δύο ή τρία συστήματα διαλυτών που διαφέρουν σημαντικά ως προς την πολικότητα. Αφού έχει αρχίσει η έκλουση ο λόγος των διαλυτών μεταβάλλεται με τρόπο προγραμματισμένο άλλες φορές συνεχώς και άλλες με μια σειρά βημάτων. Στη βαθμωτή έκλουση η μίξη των διαλυτών γίνεται πριν την είσοδο του μίγματος στην αντλία υψηλής πίεσης, σε ένα θάλαμο υπό χαμηλή πίεση (low-pressure gradient), όπου η σύσταση ως προς το χρόνο καθορίζεται από μια ρυθμιστική αντλία. Εναλλακτικά, η μίξη στο θάλαμο μπορεί να γίνει, πάλι υπό χαμηλή πίεση, με χρήση βαλβίδων, οι οποίες μεταβάλλουν το άνοιγμά τους με την πάροδο του χρόνου, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η επιθυμητή αναλογία διαλυτών καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης.

3.1.9 Το σύστημα έγχυσης

Τα πρώτα συστήματα έγχυσης που χρησιμοποιήθηκαν στην HPLC ήταν παρόμοια με αυτά της αέριας χρωματογραφίας. Δηλαδή, η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με μία μικροσύριγγα η οποία διαπερνά ένα ειδικό ελαστικό περίβλημα (septum), που είναι προσαρμοσμένο στην είσοδο της αναλυτικής στήλης [14].

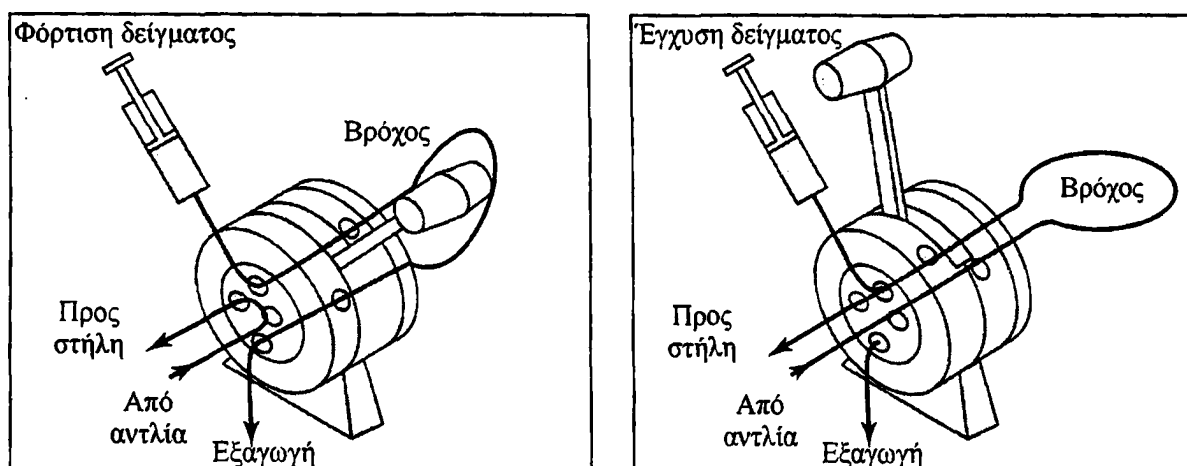
Μια άλλη μέθοδος εισαγωγής απαιτεί το σταμάτημα της ροής της κινητής φάσης και την εισαγωγή του δείγματος στην κορυφή της στήλης αμέσως μετά την επαναφορά της πίεσης του συστήματος σε φυσιολογικές συνθήκες.

Τα σύγχρονα συστήματα έγχυσης επιτυγχάνουν την εισαγωγή του δείγματος υπό πίεση χωρίς το σταμάτημα της ροής με τη βοήθεια περιστροφικών βαλβίδων διακλάδωσης οι οποίες διαθέτουν βρόχους δειγμάτων. Το δείγμα εισάγεται με τη βοήθεια μικροσύριγγας πριν γίνει η έγχυση του στην αναλυτική στήλη. Υπάρχουν βαλβίδες εξωτερικού βρόχου με χωρητικότητα η οποία κυμαίνεται από 5μL - 2mL και βαλβίδες εσωτερικού βρόχου με χωρητικότητα 0,05μL - 5μL.

Η καλύτερη τεχνική έγχυσης με τις βαλβίδες αυτές είναι αυτή κατά την οποία ο βρόχος πληρώνεται εντελώς με το δείγμα (μεγαλύτερη επαναληπτικότητα). Αν δεν έχουμε ολική πλήρωση του βρόχου τότε η καλή επαναληπτικότητα του όγκου εξασφαλίζεται μόνο με τη χρήση αυτοματοποιημένου συστήματος το οποίο διαθέτει υψηλή ακρίβεια στη μέτρηση του όγκου δείγματος (autosampler).



Στο σχήμα 3.7 φαίνεται ο τρόπος λειτουργίας μιας περιστροφικής βαλβίδας διακλάδωσης εισαγωγής δείγματος, έξι καναλιών – δύο θέσεων.



Σχήμα 3.7: Περιστροφική βαλβίδα έγχυσης υγρής χρωματογραφίας. Με τη χειρολαβή της βαλβίδας, όπως δείχνεται στα αριστερά του σχήματος, ο βρόχος γεμίζει από τη σύριγγα και η κινητή φάση ρέει από την αντλία προς τη στήλη. Όταν η βαλβίδα τοποθετηθεί στη θέση που δείχνεται στα δεξιά του σχήματος, ο βρόχος παρεμβάλλεται μεταξύ αντλίας και στήλης, οπότε η κινητή φάση μεταφέρει το δείγμα προς τη στήλη

3.1.10 Στήλες Υγρής Χρωματογραφίας

3.1.10.1 Προστήλες

Λόγω του υψηλού κόστους των στηλών που χρησιμοποιούνται στην HPLC, είναι χρήσιμο να τοποθετούνται μετά από το σύστημα έγχυσης του δείγματος και πριν από τη στήλη μικρές στήλες. Οι στήλες αυτές λέγονται *προστήλες* ή *προστατευτικές στήλες* (guard columns), είναι σχετικά μικρού κόστους και χρησιμοποιούνται για την προφύλαξη της κύριας στήλης από πιθανές παρεμποδίσεις και από το φράξιμό της λόγω ύπαρξης σωματιδίων στο σύστημα, που θα είχαν ως αποτέλεσμα την ταχύτερη καταστροφή της επαναληψιμότητας της στήλης [15].

Όπως και η στήλη, κατασκευάζονται και αυτές συνήθως από ανοξείδωτο χάλυβα και τις περισσότερες φορές το υλικό πλήρωσής τους είναι το ίδιο με αυτό της κύριας στήλης. Επίσης το μέγεθος τους είναι πολύ μικρότερο από αυτό της κύριας στήλης, για να μην προκαλείται διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών.

3.1.10.2 Αναλυτικές Στήλες

Οι χρησιμοποιούμενες στήλες είναι συνήθως από ανοξείδωτο χάλυβα, ίσιες, έχουν μήκος 10-30 cm (ανάλογα με τις απαιτήσεις της ανάλυσης) και εσωτερικής διαμέτρου



2-9 mm. Η πλήρωση τους με τα ειδικά ομοιόμορφα σφαιρικά ή ασύμμετρα πορώδη σωματίδια, γίνεται συνήθως από τις κατασκευαστικές εταιρίες. Εναλλακτικά σήμερα, προσφέρονται και στήλες υγρής χρωματογραφίας υψηλής ταχύτητας, με μικρότερες διαστάσεις από αυτές που ήδη περιγράφηκαν. Τέτοιες στήλες ισοδυναμούν με 100.000 πλάκες/μέτρο και προσφέρουν το πλεονέκτημα της ταχύτητας, της ελάχιστης κατανάλωσης διαλύτη και της επαναληψιμότητας [16].

Οι διαχωρισμοί που γίνονται με τη χρήση της HPLC συνήθως επιτυγχάνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η χρησιμοποίηση σταθερής θερμοκρασίας του συστήματος είναι απαραίτητη για την επίτευξη επαναλήψιμων αποτελεσμάτων καθότι τόσο η διαλυτότητα, όσο και οι συντελεστές κατανομής των διαλυμένων ουσιών εξαρτώνται από τη θερμοκρασία.

Το βασικότερο σημείο της διάταξης το οποίο πρέπει να έχει σταθερή θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της ανάλυσης είναι η στήλη. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ειδικοί φούρνοι, στους οποίους μπορούν να τοποθετηθούν πλην της στήλης οι σωληνώσεις του συστήματος και το σύστημα έγχυσης.

3.1.11 Συστήματα μεταφοράς και σύνδεσης

Τα συστήματα αυτά χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά της κινητής φάσης κατά μήκος της διάταξης και για τη σύνδεση των σωλήνων μεταφοράς μεταξύ τους ή με άλλα τμήματα της διάταξης.

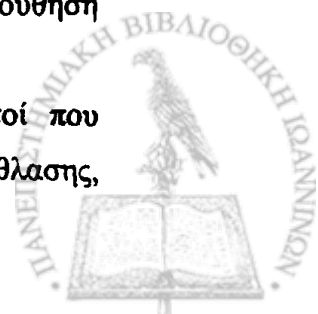
Συνήθως οι σωληνώσεις και οι συνδέσεις τους είναι από ανοξείδωτο χάλυβα πολύ μικρής εσωτερικής διαμέτρου (<0,25 mm), για να αντέχουν στις υψηλές πιέσεις που αναπτύσσονται. Κατά τη σύνδεση των σωλήνων μεταξύ τους πρέπει να αποφεύγονται οι διαρροές, οι φυσαλίδες και τα κενά (dead volumes), προκειμένου να αποφευχθεί η διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών.

Σε περίπτωση που η κινητή φάση είναι δυνατό να προκαλεί διάβρωση στον ανοξείδωτο χάλυβα, όπως π.χ. όταν χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα (ιδιαίτερα αυτά που περιέχουν άλατα αλογόνων), τότε χρησιμοποιούνται σωληνώσεις και συνδέσεις από πολυμερή φθορανθράκων ή από τιτάνιο.

3.1.12 Σύστημα ανίχνευσης

Ο ρόλος του συστήματος ανίχνευσης στην HPLC είναι η διαρκής παρακολούθηση της κινητής φάσης μετά την έξοδό της από τη στήλη.

Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι ανιχνευτών υγρής χρωματογραφίας. Αυτοί που ανταποκρίνονται σε μια βασική ιδιότητα της κινητής φάσης όπως, ο δείκτης διάθλασης,



η διηλεκτρική σταθερά ή η πυκνότητα, οι τιμές των οποίων επηρεάζονται από την παρουσία των εκλουόμενων συστατικών. Αντίθετα, οι ανιχνευτές που ανταποκρίνονται σε ιδιότητα του εκλουόμενου συστατικού, όπως η απορρόφηση στο UV, ο φθορισμός, το ρεύμα διάχυσης ή η αγωγιμότητα, δεν ανταποκρίνονται στην κινητή φάση [17].

Για την επιλογή ενός ανιχνευτή στην HPLC, εκτός από την ιδιότητα των διαλυμένων ουσιών στην οποία θα βασίζεται η ανίχνευση, πρέπει να ελέγχονται και κάποια βασικά χαρακτηριστικά του, τα οποία είναι:

- α) η ευαισθησία,
- β) η γραμμικότητα,
- γ) η εκλεκτικότητα,
- δ) ο θόρυβος και η διολίσθηση (drift) της γραμμής βάσης,
- ε) ο νεκρός όγκος του ανιχνευτή,
- στ) η ταχύτητα απόκρισης,
- ζ) η ικανότητά του να μην καταστρέφει το δείγμα και
- η) η αξιοπιστία, το κόστος και η ευχρηστία του.

Στον πίνακα 3.2 παρουσιάζονται οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές στην HPLC και ορισμένα χαρακτηριστικά τους.

Πίνακας 3.2: Χαρακτηριστικά των κυριότερων ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στην HPLC

<i>Ανιχνευτής Υγρής Χρωματογραφίας</i>	<i>Επίπεδο θορύβου (μονάδες μετρούμενης ιδιότητας)</i>	<i>Όριο ανίχνευσης μάζας (g/mL)</i>	<i>Γραμμική περιοχή (δεκάδες)</i>	<i>Όγκος κυψελίδας συνεχούς ροής (μL)</i>
Απορρόφησης υπεριώδους-ορατού	10^{-4}	10^{-8}	10^4-10^5	1-8
Φθορισμομετρικός	10^{-7}	10^{-12}	10^3-10^4	8-25
Ηλεκτροχημικός	10^{-2}	10^{-7}	10^3-10^4	1-5
Αγωγιμότητας	10^{-1}	10^{-10}	10^4-10^5	0,5-5
Σκέδασης φωτός	10^{-7}	10^{-6}	10^3-10^4	5-15

Η πλειονότητα των χημικών ενώσεων αναλύονται με ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού. Στο 70% των δημοσιευμένων άρθρων με χρήση της HPLC, χρησιμοποιήθηκαν ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού [18]. Στην επόμενη παράγραφο αναπτύσσεται η βασική θεωρία της φασματοφωτομετρίας υπεριώδους-ορατού.



3.2 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η φασματοφωτομετρία απορρόφησης είναι μία αναλυτική τεχνική πολύ χρήσιμη όχι μόνο για ποσοτική ανάλυση (στην οποία η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού κατέχει την πρώτη θέση στις επίσημες και αποδεκτές μεθόδους ανάλυσης) αλλά και για τη λήψη βασικών πληροφοριών που αφορούν στη δομή των μορίων. Με τη βοήθεια κατάλληλου οργάνου και τεχνικής είναι δυνατή η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός ενώσεων που απορροφούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (ιδιαίτερα στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος). Οι μέθοδοι μοριακής απορρόφησης στο ορατό και το υπεριώδες είναι οι πλέον χρησιμοποιούμενες από όλες τις άλλες τεχνικές ποσοτικής ανάλυσης τόσο στα χημικά όσο και στα κλινικά εργαστήρια.

Οι ομάδες του μορίου που είναι υπεύθυνες για την απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ονομάζονται χρωμοφόρα. Η εμφάνιση χαρακτηριστικών ταινιών απορρόφησης των διαφόρων χρωμοφόρων ομάδων σε ένα φάσμα απορρόφησης είναι ενδεικτική της ύπαρξης των ομάδων αυτών στο μόριο και επιτρέπει την ταυτοποίησή τους. Η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού αξιοποιεί μήκη κύματος από 200 έως 800 nm και χρησιμοποιείται κυρίως για τον ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων, επειδή το ποσοστό απορρόφησης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας συσχετίζεται με τη συγκέντρωση της ένωσης που την απορροφά.

Βασικό πλεονέκτημα των φασματοφωτομετρικών μεθόδων είναι η μεγάλη εναισθησία τους. Μπορούν να προσδιοριστούν συγκεντρώσεις 10^{-7} - 10^{-6} M, γεγονός που επιτρέπει τον προσδιορισμό ιχνοστοιχείων, τα οποία απαντούν στο δείγμα σε περιεκτικότητες της τάξης του 10^{-4} % (ppm), ή κύριων συστατικών του δείγματος σε εξαιρετικά μικρή ποσότητα δείγματος. Σε σύγκριση με τις σταθμικές και τις ογκομετρικές μεθόδους ανάλυσης οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι παρουσιάζουν εκλεκτικότητα και δυνατότητα αυτοματοποίησης της ανάλυσης από την εισαγωγή του δείγματος μέχρι τον τελικό υπολογισμό των συγκεντρώσεων πολλών συστατικών ενός δείγματος. Οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι όμως υστερούν έναντι των σταθμικών και ογκομετρικών μεθόδων ως προς την ακρίβεια, με εξαίρεση τη διαφορική φασματοφωτομετρία. Επιπροσθέτως, απαιτούνται πρότυπα διαλύματα για την βαθμονόμηση των οργάνων.



3.2.1 Δομές σωματιδίων που απορροφούν

Η απορρόφηση ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας από ένα μοριακό σωματίδιο, μπορεί να θεωρηθεί σαν μια διαδικασία δύο σταδίων, το πρώτο από τα οποία περιλαμβάνει την ηλεκτρονιακή διέγερση του μορίου, το οποίο στη συνέχεια αποδιεγείρεται με έκλυση θερμότητας.

Συνήθως η απορρόφηση της ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας οφείλεται στη διέγερση δεσμικών ηλεκτρονίων και κατά συνέπεια τα μήκη κύματος των απορροφήσεων μπορούν να συσχετισθούν με τους τύπους των δεσμών στα εξεταζόμενα σωματίδια. Αυτό αποτελεί ένα χρήσιμο μέσο ταυτοποίησης των χαρακτηριστικών ομάδων ενός μορίου και ποσοτικού προσδιορισμού των ενώσεων που περιέχουν τις ομάδες αυτές.

Η απορρόφηση ακτινοβολίας στην ορατή και υπεριώδη περιοχή οφείλεται σε έναν περιορισμένο αριθμό χαρακτηριστικών ομάδων, που καλούνται χρωμοφόρα και περιέχουν ηλεκτρόνια σθένους με σχετικά χαμηλές ενέργειες διέγερσης.

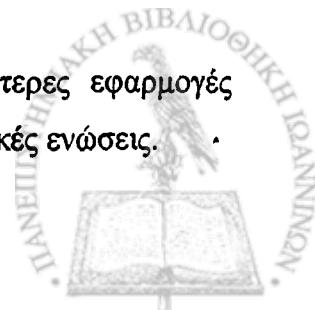
Τα ηλεκτρόνια που συνεισφέρουν στην απορρόφηση των οργανικών μορίων είναι τα δεσμικά ηλεκτρόνια, δηλαδή αυτά που συμμετέχουν απευθείας στο σχηματισμό δεσμών και τα μη δεσμικά ή μονήρη εξωτερικά ηλεκτρόνια, που συνήθως εντοπίζονται γύρω από τα άτομα. Τα πρώτα συμβολίζονται σ (για τους απλούς δεσμούς) και π (για το δεύτερο δεσμό του διπλού δεσμού). Τα μη δεσμικά ηλεκτρόνια συμβολίζονται με n . Τα αντιδεσμικά ηλεκτρόνια συμβολίζονται με σ^* και π^* , αντίστοιχα. Τα δεσμικά ηλεκτρόνια είναι χαμηλής ενέργειας ενώ τα αντιδεσμικά υψηλής ενέργειας [7].

Κατά την απορρόφηση της ακτινοβολίας από ένα μόριο συμβαίνουν μια σειρά από μεταπτώσεις οι οποίες συνεισφέρουν στο φάσμα απορρόφησης και το οποίο συνίσταται από μια σειρά πυκνά στοιβαγμένων κορυφών που συνιστούν μια ταινία απορρόφησης. Οι μεταπτώσεις αυτές είναι $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ και $\pi \rightarrow \pi^*$.

Στις μεταπτώσεις $\sigma \rightarrow \sigma^*$ έχουμε διέγερση ηλεκτρονίου από ένα δεσμικό τροχιακό προς το αντίστοιχο αντιδεσμικό. Οι μεταπτώσεις αυτές απαιτούν μεγάλη ενέργεια και συνεπώς εμφανίζονται σε πολύ χαμηλά μήκη κύματος.

Οι μεταπτώσεις $n \rightarrow \sigma^*$ οφείλονται στα ελεύθερα ζεύγη ηλεκτρονίων (μη δεσμικά) των κορεσμένων ενώσεων. Ο αριθμός των χαρακτηριστικών ομάδων των οργανικών ενώσεων που δίνουν κορυφές μεταπτώσεων $n \rightarrow \sigma^*$ στην περιοχή του προσιτού υπεριώδους είναι σχετικά μικρός.

Στις μεταπτώσεις $n \rightarrow \pi^*$ και $\pi \rightarrow \pi^*$ οφείλονται οι περισσότερες εφαρμογές φασματοφωτομετρίας μοριακής απορρόφησης, όσον αφορά τις οργανικές ενώσεις.



Ο λόγος είναι ότι οι ενέργειες που απαιτούνται για τις μεταπτώσεις αυτές βρίσκονται στη φασματική περιοχή των 200-700 nm όπου λειτουργούν τα περισσότερα εμπορικά φασματοφωτόμετρα και έτσι δεν παρουσιάζονται πειραματικές δυσκολίες κατά τις μετρήσεις. Η παρουσία ακόρεστων δεσμών, οι οποίοι περιέχουν τροχιακά π, είναι η βασική προϋπόθεση για να συμβούν τέτοιου είδους μεταπτώσεις. Οι μεταπτώσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ δίνουν κορυφές απορρόφησης με πολύ μεγαλύτερες τιμές μοριακής απορροφητικότητας από τις μεταπτώσεις $n \rightarrow \pi^*$. Επίσης, οι μεταπτώσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ επηρεάζονται περισσότερο από τις μεταπτώσεις $n \rightarrow \pi^*$ από το διαλύτη εργασίας, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση των κορυφών απορρόφησης των οργανικών ενώσεων. Στην περίπτωση που ο διαλύτης είναι πολικός, οι κορυφές των μεταπτώσεων $n \rightarrow \pi^*$ μετατοπίζονται προς μικρότερα μήκη κύματος (υψοχρωμική ή κυανή μετατόπιση) ενώ οι κορυφές των μεταπτώσεων $\pi \rightarrow \pi^*$ μετατοπίζονται προς μεγαλύτερα μήκη κύματος (βαθοχρωμική ή ερυθρά μετατόπιση).

Ένα άλλο σημαντικό φαινόμενο που επηρεάζει την απορρόφηση των οργανικών ενώσεων είναι η συζυγία των χρωμοφώρων. Σύμφωνα με τη θεωρία των μοριακών τροχιακών, τα π ηλεκτρόνια απεντοπίζονται ακόμη περισσότερο λόγω του συζυγιακού φαινομένου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το τροχιακό να περιλαμβάνει τέσσερα ή και περισσότερα ατομικά κέντρα. Συνέπεια του απεντοπισμού αυτού είναι να ελαττωθεί η ενέργεια των π^* τροχιακών και να αποκτήσουν αυτά λιγότερο αντιδεσμικό χαρακτήρα. Έτσι τα μέγιστα της απορρόφησης μετατοπίζονται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Η έκταση του συζυγιακού συστήματος και η ύπαρξη αυξόχρωμων ομάδων στις οργανικές ενώσεις επιδρούν εκτός από το μήκος κύματος και στην ένταση της απορρόφησης. Ως αυξόχρωμη ορίζεται κάθε χαρακτηριστική ομάδα, η οποία δεν απορροφά από μόνη της, αλλά έχει την ικανότητα να μετατοπίσει τις κορυφές των χρωμοφώρων σε μεγαλύτερα μήκη κύματος καθώς και να τις ενισχύει. Αυτό εξηγείται με την ύπαρξη ζευγών n ηλεκτρονίων, τα οποία είναι δυνατόν να αλληλεπιδράσουν με τα π ηλεκτρόνια (κυρίως των συζυγιακών δεσμών) προς σταθεροποίηση της διεγερμένης κατάστασης π^* . Έτσι μειώνεται η ενέργειά της και προκαλείται βαθοχρωμική μετατόπιση [19].

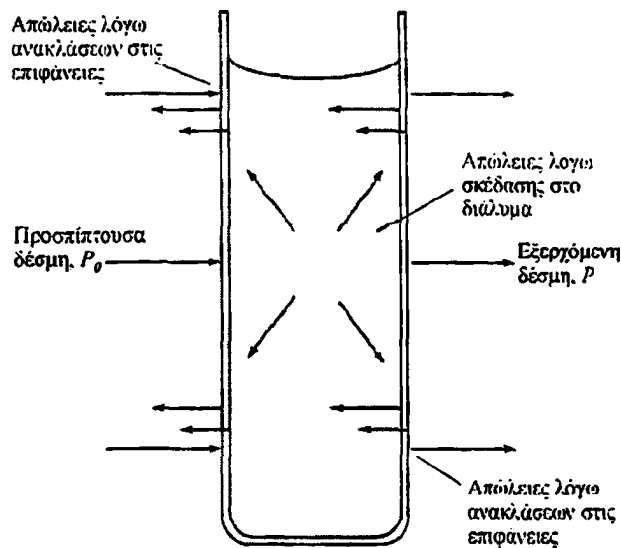
3.2.2 Βασικά στάδια φασματοφωτομετρικών μετρήσεων

3.2.2.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός μίας ένωσης

Όταν διέρχεται μονοχρωματική ακτινοβολία από διάλυμα που περιέχει μία ένωση που απορροφά, η ισχύς της ακτινοβολίας ελαττώνεται προοδευτικά κατά μήκος της



διαδρομής, λόγω απορρόφησης της από την ένωση, ανάκλασης στις επιφάνειες καθώς και σκέδασης στο διάλυμα (Σχήμα 3.8).



Σχήμα 3.8: Η ισχύς της εξερχόμενης ακτινοβολίας ελαττώνεται λόγω απορρόφησης, ανάκλασης και σκέδασης.

Η ελάττωση της ισχύος ($P < P_0$) εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ένωσης αυτής και από την απόσταση που διανύει η δέσμη μέσα στο διάλυμα. Οι σχέσεις αυτές εκφράζονται με το νόμο των Lambert-Beer, που συνήθως αναφέρεται ως νόμος του Beer και διατυπώνεται με τη μορφή:

$$A = -\log T = \log(P_0/P) = abc_{g/L} = \epsilon bc_{mol/L} \quad (4)$$

όπου:

- A = απορρόφηση (absorbance). Παλαιότερα αναφερόταν και ως οπτική πυκνότητα (optical density, OD) ή απόσβεση (extinction, E). Είναι καθαρός αριθμός γιατί εξαρτάται από το λόγο ομοίων μεγεθών.
- P_0 = η ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.
- P = η ισχύς της εξερχόμενης ακτινοβολίας μετά τη διέλευση από το διάλυμα.
- T = διαπερατότητα (transmittance), ίση με P/P_0 , που εκφράζεται και ως ποσοστό % (%T) και είναι καθαρός αριθμός.
- c = η συγκέντρωση της ένωσης που απορροφά, σε g/L ή mol/L.
- a = σταθερά αναλογίας, όταν η c εκφράζεται σε g/L. Ονομάζεται απορροφητικότητα (absorptivity) (ενώ παλαιότερα αναφερόταν ως “συντελεστής απόσβεσης”) και έχει μονάδες $cm^{-1} \cdot g^{-1} \cdot L$.
- b = το μήκος της διαδρομής που διανύθηκε μέσα στο διάλυμα και εκφράζεται συνήθως σε cm. Αναφέρεται και ως πάχος στοιβάδας ή εσωτερικό πάχος κυψελίδας και παλαιότερα συμβολιζόταν με L ή d .



- ϵ = σταθερά αναλογίας, όταν η c εκφράζεται σε mol/L. Ονομάζεται *μοριακή απορροφητικότητα* (molar absorptivity). Παλαιότερα αναφερόταν και ως “μοριακός συντελεστής απόσβεσης”. Έχει μονάδες $\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ ή $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. Συνδέεται με την απορροφητικότητα a με τη σχέση $\epsilon = a \cdot \text{MB}$, όπου MB = μοριακό βάρος ουσίας που απορροφεί.

Η απορροφητικότητα a χρησιμοποιείται όταν είναι άγνωστη η φύση της ένωσης που απορροφεί και επομένως και το μοριακό βάρος της, ενώ η μοριακή απορροφητικότητα ϵ προτιμάται όταν θέλουμε να συγκρίνουμε ποσοτικά την απορρόφηση διαφόρων ενώσεων γνωστού μοριακού βάρους. Στην πράξη η συγκέντρωση εκφράζεται και σε άλλες μονάδες π.χ. $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ppm), οπότε όμως η σταθερά αναλογίας στον τύπο του Beer (εξίσωση 4) έχει διαφορετική τιμή από την a ή την ϵ . Όταν η συγκέντρωση εκφράζεται ως ποσοστό % κατά βάρος προς όγκο (%w/v), η σταθερά αναλογίας παριστάνεται με τον όρο $A^{1\%}_{1\text{cm}}$, ο οποίος ονομάζεται ειδικός συντελεστής απορρόφησης (ή ειδική απορρόφηση) και ισούται με την απορρόφηση διαλύματος 1% (w/v) της ένωσης σε κυψελίδα 1 cm. Ο συντελεστής $A^{1\%}_{1\text{cm}}$ χρησιμοποιείται κυρίως όταν το μοριακό βάρος της ένωσης δεν είναι γνωστό ή όταν πρόκειται για μέτρηση μίγματος. Η σταθερά αναλογίας a ή ϵ εξαρτάται από το μήκος κύματος, το διαλύτη, τη μοριακή δομή της ένωσης και σε μικρό βαθμό από τη θερμοκρασία.

Απεικόνιση της A ή της T ως συνάρτηση του μήκους κύματος λ ή του κυματηριθμού παρέχει το φάσμα απορρόφησης, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαπίστωση της ύπαρξης χαρακτηριστικών ομάδων, για τη διευκρίνιση της δομής της ουσίας που απορροφεί και για την ταυτοποίησή της. Τα χαρακτηριστικά ενός φάσματος είναι το λ_{max} και το αντίστοιχο ϵ_{max} . Από την απορρόφηση A μπορεί να προσδιοριστεί η συγκέντρωση c της ουσίας που απορροφεί με βάση την εξίσωση 4.

Θεωρητικά είναι δυνατός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης c με βάση τα A και b που μετρήθηκαν και την τιμή της ϵ από τη βιβλιογραφία. Αυτό όμως είναι πρακτικά ανεφάρμοστο (διαφορά της ϵ με διάφορα φασματοφωτόμετρα και σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες) και γι' αυτό στην πράξη χρησιμοποιείται πάντοτε καμπύλη αναφοράς A ως συνάρτηση της c , που λαμβάνεται με σειρά πρότυπων διαλυμάτων. Όλες οι μετρήσεις της απορρόφησης γίνονται με τις ίδιες ακριβώς συνθήκες. Η κλίση της καμπύλης αναφοράς που αναφέρεται και ως διάγραμμα του νόμου του Beer, ισούται με ϵb ή $a b$, και από αυτή μπορεί να υπολογιστεί η τιμή της ϵ ή a , αφού το b είναι γνωστό.

Η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται στο λ_{max} , για δύο λόγους: 1) την επίτευξη μέγιστης ευαισθησίας, αφού δεδομένη συγκέντρωση θα δώσει τη μέγιστη απορρόφηση



σε αυτό το μήκος κύματος και επομένως μεγαλύτερη κλίση της καμπύλης αναφοράς και 2) την ελαχιστοποίηση της μεταβολής της απορρόφησης, λόγω μικρών μεταβολών στην επιλογή του μήκους κύματος κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, αφού στο λ_{\max} υπάρχει συνήθως “πλατώ” του φάσματος απορρόφησης.

Όταν δεν απαιτείται μεγάλη ακρίβεια ή όταν η επαναληψιμότητα των μετρήσεων είναι πολύ καλή, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης αγνώστου διαλύματος στην περιοχή ισχύος του νόμου του Beer, μπορεί να γίνει και με την απλουστευμένη “τεχνική του ενός σημείου” με μέτρηση της απορρόφησης ενός μόνο διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης [20-25].

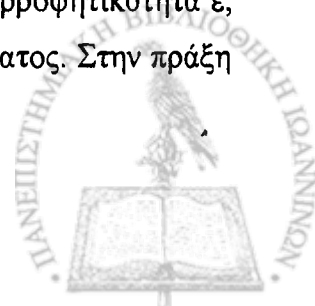
3.2.2.2 Αποκλίσεις από το νόμο του Beer

Ο νόμος του Beer προϋποθέτει ότι (1) ο μόνος μηχανισμός αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και της διαλυμένης ουσίας είναι η απορρόφηση, (2) η προσπίπτουσα ακτινοβολία είναι μονοχρωματική, (3) η απορρόφηση γίνεται σε ένα όγκο διαλύματος ομοιόμορφης διατομής και (4) ότι τα σωματίδια που απορροφούν δρουν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο και άσχετα προς τον αριθμό και το είδος τους.

Η γραμμική σχέση μεταξύ απορρόφησης A και μήκους διαδρομής b για δεδομένη συγκέντρωση c αποτελεί κανόνα χωρίς εξαίρεση (νόμος Lambert). Αντίθετα, σε πολλές περιπτώσεις παρατηρείται απόκλιση από τη γραμμική σχέση μεταξύ A και c στις υψηλές συγκεντρώσεις. Οι αποκλίσεις μπορεί να είναι θετικές ή αρνητικές και περιορίζουν τη δυναμική περιοχή συγκεντρώσεων για την οποία “ισχύει” ο νόμος του Beer. Μερικές από τις αποκλίσεις αυτές είναι πραγματικές και καθορίζουν τους πραγματικούς περιορισμούς κατά τη χρησιμοποίηση του νόμου του Beer, ενώ άλλες είναι φαινομενικές και οφείλονται, είτε στα χρησιμοποιούμενα όργανα και τον τρόπο διεξαγωγής των μετρήσεων της απορρόφησης (αποκλίσεις των οργάνων) είτε σε χημικούς παράγοντες (χημικές αποκλίσεις).

3.2.2.3 Πραγματικές αποκλίσεις

Ο νόμος του Beer δεν ισχύει για πυκνά διαλύματα ($c > 0,01M$), διότι σε αυτά οι αποστάσεις μεταξύ των σωματιδίων που απορροφούν γίνονται τόσο μικρές, ώστε καθένα από αυτά να επηρεάζει την κατανομή φορτίου στα γειτονικά σωματίδια και συνεπώς και την ικανότητά τους να απορροφούν ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος. Σε πυκνά διαλύματα δεν παραμένει σταθερή η μοριακή απορροφητικότητα ϵ , αλλά ο όρος $\epsilon n / (n^2 + 2)^2$, όπου n είναι ο δείκτης διάθλασης του διαλύματος. Στην πράξη



το είδος αυτό της απόκλισης από τον νόμο του Beer σπανίως δημιουργεί πρόβλημα, γιατί συνήθως μετρείται η απορρόφηση αραιών διαλυμάτων.

3.2.2.4 Φαινομενικές αποκλίσεις

3.2.2.4.1 Αποκλίσεις των οργάνων

Μη γραμμική σχέση μεταξύ λαμβανομένου σήματος και ισχύος ακτινοβολίας, συνεπάγεται απόκλιση από το νόμο του Beer που ελαχιστοποιείται με τη χρησιμοποίηση φασματοφωτομέτρου διπλής δέσμης. Αποκλίσεις είναι δυνατόν να προκύψουν και από τους εξής παράγοντες:

Πολυχρωματική ακτινοβολία: Ο νόμος του Beer ισχύει αυστηρά μόνο για μονοχρωματική ακτινοβολία. Τέτοια όμως ακτινοβολία δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί με τις συνήθως χρησιμοποιούμενες μονοχρωματικές διατάξεις, διότι οι πηγές εκπέμπουν πολυχρωματική ακτινοβολία, ο δε μονοχρωμάτορας μπορεί να διακρίνει ορισμένο εύρος ταινίας από το συνεχές φάσμα της πηγής. Η χρησιμοποίηση πολυχρωματικής δέσμης ακτινοβολιών συνεπάγεται αρνητική απόκλιση από το νόμο του Beer, εκτός από τη μοναδική περίπτωση, στην οποία οι μοριακές απορροφητικότητες όλων των ακτινοβολιών της δέσμης είναι ίσες. Γι' αυτό κατά τις φασματοφωτομετρικές μετρήσεις επιδιώκεται η χρησιμοποίηση στενής δέσμης ακτινοβολιών (π.χ. με ελάττωση του εύρους σχισμής του μονοχρωμάτορα). Απεριόριστη όμως ελάττωση του ονομαστικού εύρους ταινίας δεν είναι δυνατή, διότι συνεπάγεται μείωση της ισχύος της χρησιμοποιούμενης ακτινοβολίας, ενώ απαιτείται ισχύς μεγαλύτερη από μία ελάχιστη τιμή για να αποκρίνεται ο ανιχνευτής. Επιπλέον οι μετρήσεις εκτελούνται στο λ_{max} , όπου παρατηρείται "πλατώ" στο φάσμα απορρόφησης και η ϵ για την περιοχή αυτή είναι σχετικά σταθερή [6,10].

Παράσιτη ακτινοβολία: Ως παράσιτη ακτινοβολία (stray light) χαρακτηρίζεται το (ανεπιθύμητο) σύνολο των ακτινοβολιών, που φθάνουν στον ανιχνευτή χωρίς να ανήκουν στην επιλεγμένη από τον μονοχρωμάτορα δέσμη. Αν P_0 , P και P_s είναι οι ισχείς της προσπίπτουσας, της διερχόμενης και της παράσιτης ακτινοβολίας αντίστοιχα, η πραγματική απορρόφηση είναι $A_{\pi\rho} = \log(P_0/P)$, ενώ η πειραματικά μετρούμενη απορρόφηση είναι $A_{\pi\epsilon\rho} = \log[(P_0+P_s)/(P+P_s)]$ [10]. Επειδή $A_{\pi\epsilon\rho} < A_{\pi\rho}$ παρατηρείται αρνητική απόκλιση από το νόμο του Beer. Φαινομενικές αποκλίσεις μπορεί να προκαλέσει και ανακλώμενη ακτινοβολία, που διέρχεται από το διάλυμα πολλές φορές και συνεπώς απορροφείται ισχυρότερα, καθώς και ακτινοβολία σκεδαζόμενη από θολά διαλύματα ή εκπεμπόμενη από φθορίζοντα δείγματα.



3.2.2.4.2 Χημικές αποκλίσεις

Η καμπύλη αναφοράς είναι ευθεία γραμμή, όταν το σύνολο της ουσίας που απορροφεί βρίσκεται στην ίδια χημική μορφή ή όταν η σχετική αναλογία δύο ή περισσότερων χημικών σωματιδίων της δεν μεταβάλλεται με την αναλυτική συγκέντρωση της ουσίας. Στην εξίσωση 4 η συγκέντρωση c παριστάνει την αληθινή συγκέντρωση των σωματιδίων που απορροφούν η οποία συμπίπτει με την αναλυτική συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας, μόνο όταν τα σωματίδια που απορροφούν δεν συμμετέχουν σε χημικές ισορροπίες. Αν όμως αυτά συμμετέχουν σε χημικές ισορροπίες, όπως π.χ. ισορροπίες διάστασης ασθενών οξέων ή βάσεων, πολυμερισμού, σχηματισμού συμπλόκων κ.λπ., οποιαδήποτε μετατόπιση στη θέση ισορροπίας κατά τη μεταβολή της αναλυτικής συγκέντρωσης συνεπάγεται φαινομενική απόκλιση από το νόμο του Beer [26-28].

3.2.3 Η πορεία της ποσοτικής φασματοφωτομετρικής ανάλυσης

Τα βασικά στάδια μιας φασματοφωτομετρικής ανάλυσης είναι:

- η επιλογή της απορροφούσας ουσίας και η λήψη του φάσματος απορρόφησής της (αν δεν είναι ήδη γνωστό),
- η επιλογή του καταλληλότερου μήκους κύματος,
- η χάραξη της καμπύλης αναφοράς και
- η μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος του αγνώστου δείγματος και ο υπολογισμός της συγκέντρωσής του από την καμπύλη αναφοράς, τα οποία περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

3.2.3.1 Η επιλογή της ένωσης που θα απορροφήσει και λήψη του φάσματος απορρόφησης

Εάν η ένωση που θα προσδιοριστεί απορροφεί επαρκώς στις χρησιμοποιούμενες περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, προσδιορίζεται ως έχει. Αν όχι, επιχειρούμε με κατάλληλα αντιδραστήρια τη μετατροπή της σε άλλη παράγωγη ένωση, η οποία να απορροφεί ισχυρά. Για το σκοπό αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν όλα τα είδη των χημικών αντιδράσεων (συμπλοκομετρικές, οξειδοαναγωγής, οργανικές αντιδράσεις κλπ.). Κατά την επιλογή και τη χρησιμοποίηση της αντίδρασης σχηματισμού παραγώγων πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα παρακάτω:

1. Το σχηματιζόμενο παράγωγο πρέπει να είναι σταθερό, η αντίδραση να είναι κατά το δυνατόν εκλεκτική, ποσοτική και κατά προτίμηση καθορισμένης στοιχειομετρίας, τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια να μην απορροφούν στην περιοχή απορρόφησης του



προϊόντος και να μη σχηματίζονται παρεμποδίζουσες απορροφούσες ουσίες από τυχόν συνυπάρχουσες ξένες ουσίες.

2. Πρέπει να επιλεγούν οι άριστες συνθήκες. Οι σπουδαιότεροι από τους παράγοντες, που είναι κρίσιμοι για την ακρίβεια και την ευαισθησία της αναλύσεως είναι οι εξής:

3.2.3.2 pH

Με έλεγχο του pH αποφεύγονται ανεπιθύμητες δευτερεύουσες πρωτολυτικές ή άλλες αντιδράσεις. Κατά την ανάπτυξη μιας νέας φασματοφωτομετρικής μεθόδου ή κατά τον έλεγχο μιας πρότυπης μεθόδου είναι προτιμότερο να μετρηθεί η απορρόφηση, A , διαλυμάτων του παραγώγου σε διάφορα pH . Γραφική απεικόνιση της A σε συνάρτηση με το pH πολλές φορές καθορίζει μία βέλτιστη περιοχή τιμών pH όπου η A είναι πρακτικώς ανεξάρτητη του pH .

3.2.3.3 Συγκέντρωση αντιδραστηρίων

Προσδιορίζεται η βέλτιστη συγκέντρωση αντιδραστηρίων, διότι ανεπάρκεια ή περίσσεια τους είναι δυνατόν να προκαλέσει αποκλίσεις από το νόμο του Beer και να μειώσει την ευαισθησία του προσδιορισμού.

3.2.3.4 Διαλύτης

Ο διαλύτης επηρεάζει το φάσμα απορρόφησης και την απορροφητικότητα της απορροφούσας ουσίας και επίσης τη διαλυτότητα των προσδιοριζόμενων ουσιών και των αντιδραστηρίων. Πολλά οργανικά αντιδραστήρια ή απορροφούντα προϊόντα είναι δυσδιάλυτα στο νερό. Στις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες αναμίξιμοι με το νερό, για την αποφυγή καθίζησης και διευκόλυνση της αντίδρασης σχηματισμού της απορροφούσας ένωσης. Σε πολλές περιπτώσεις είναι δυνατόν να γίνει και εκχύλιση της απορροφούσας ένωσης με οργανικό διαλύτη, για το διαχωρισμό της από την περίσσεια των αντιδραστηρίων ή από παρεμποδίζουσες ουσίες. Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται πολλές φορές η ευαισθησία της μεθόδου, μερικές φορές μάλιστα και η εκλεκτικότητα, διότι υπεισέρχεται ένα πρόσθετο στάδιο στην ανάλυση.

3.2.3.5 Σειρά προσθήκης αντιδραστηρίων

Σε πολλές περιπτώσεις η προσθήκη των αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται με καθορισμένη σειρά, είτε διότι απαιτούνται συγκεκριμένα διαδοχικά στάδια αντίδρασης είτε διότι αλλαγή στη σειρά είναι δυνατόν να προκαλέσει δευτερεύουσες αντιδράσεις ή ατελή σχηματισμό της απορροφούσας ουσίας.



3.2.3.6 Χρόνος

Η απορροφούσα ουσία πρέπει να παράγεται γρήγορα και να είναι σταθερή για μακρό χρονικό διάστημα, ώστε η μέτρηση της απορρόφησης να γίνεται με χρονική άνεση. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις είναι δυνατόν να απαιτηθεί αρκετός χρόνος για την αποπεράτωση της αντίδρασης σχηματισμού της απορροφούσας ουσίας. Στις περιπτώσεις αυτές μπορεί να χρησιμοποιηθεί κινητική μέθοδος ανάλυσης ή ανάλυση ροής.

3.2.3.7 Σταθερότητα

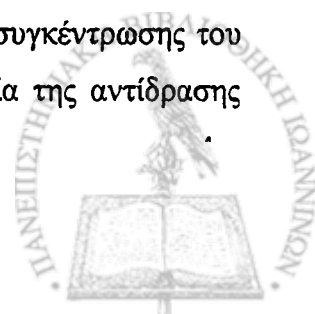
Αν η απορροφούσα ουσία δεν είναι σταθερή για μακρό χρονικό διάστημα οι μετρήσεις της απορρόφησης πρέπει να γίνονται το ταχύτερο δυνατό. Για την εύρεση του βέλτιστου χρόνου μέτρησης μετά την ανάμειξη των αντιδραστηρίων, λαμβάνεται η γραφική παράσταση της A ως συνάρτηση του χρόνου t και επιλέγεται ως βέλτιστη περιοχή τιμών αυτή που αντιστοιχεί στο “πλατώ” της παράστασης. Αν δεν υπάρχει “πλατώ” οι μετρήσεις της A πρέπει να γίνονται σε μία αυστηρά καθορισμένη χρονική στιγμή, η ακρίβεια όμως τέτοιων μεθόδων είναι μικρή, διότι η A μπορεί να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της μέτρησης. Λύση στο πρόβλημα αυτό αποτελεί η χρησιμοποίηση αυτοματοποιημένου φασματοφωτομετρικού συστήματος. Σε περιπτώσεις φωτοευπαθών ουσιών, πρέπει να αποφεύγεται η έκθεσή τους στο άμεσο ηλιακό φως.

3.2.3.8 Θερμοκρασία

Η βέλτιστη θερμοκρασία προσδιορίζεται πειραματικά. Μερικές φορές απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες για την επιτάχυνση της αποπεράτωσης της αντίδρασης σχηματισμού της ένωσης που απορροφεί, ενώ άλλοτε απαιτούνται χαμηλές θερμοκρασίες για την αύξηση της σταθερότητάς της. Στην περίπτωση αυτή απαιτείται καλή γνώση και μελέτη της συμπεριφοράς του χημικού συστήματος.

3.2.3.9 Μοριακή απορροφητικότητα της παράγωγης ένωσης

Η μοριακή απορροφητικότητα της παράγωγης ένωσης πρέπει να είναι αρκετά υψηλή, ώστε η ευαισθησία της μεθόδου να είναι μεγάλη και η προσδιοριζόμενη ένωση να μπορεί να προσδιοριστεί στην περιοχή συγκέντρωσης των δειγμάτων. Η ιδανική απορροφούσα ουσία έχει μία ταινία απορρόφησης με εκτεταμένη περιοχή μέγιστης απορρόφησης, “πλατώ”, στο μέγιστο και μεγάλη απορροφητικότητα σε αυτό, ώστε η ευαισθησία της ανάλυσης να είναι υψηλή. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αρχικού αναλύτη πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και η στοιχειομετρία της αντίδρασης τροποποίησής του.



3.2.4 Η επιλογή του μήκους κύματος

Το μήκος κύματος στο οποίο γίνονται οι μετρήσεις ονομάζεται αναλυτικό μήκος κύματος. Προτιμάται το μήκος κύματος στο οποίο απορροφά μόνο η προσδιοριζόμενη ένωση ή το προϊόν της αντίδρασης της και δεν απορροφούν συνυπάρχουσες ουσίες, διότι τότε η μέθοδος δεν έχει εκλεκτικότητα. Κατά κανόνα αποφεύγεται μήκος κύματος, στο οποίο το αντιδραστήριο απορροφεί ισχυρά και επιλέγεται μήκος κύματος λ_{\max} στο "πλατώ" μέγιστης απορρόφησης για να επιτευχθεί μέγιστη ευαισθησία και καλύτερη εφαρμογή του νόμου του Beer. Αν όμως το δείγμα περιέχει προσμίξεις που απορροφούν στο λ_{\max} ή αν η απορρόφηση στο λ_{\max} είναι πολύ μεγάλη και δεν είναι δυνατόν να μειωθεί με αραιώση των διαλυμάτων, λόγω μετατόπισης της θέσης ισορροπίας ενός συστήματος, επιλέγεται μήκος κύματος σε περιοχή "πλατώ" ελάχιστης απορρόφησης ή στην ανάγκη και στις πλευρές μιας ταινίας απορρόφησης.

Πρέπει να αποφεύγονται μήκη κύματος που βρίσκονται στο απότομα ανερχόμενο ή κατερχόμενο τμήμα μιας κορυφής του φάσματος απορρόφησης, γιατί στο τμήμα αυτό μικρή μετακίνηση του λ συνεπάγεται μεγάλο σφάλμα στη μετρούμενη απορρόφηση.

Κατά την φασματοφωτομετρική ανάλυση ουσιών στο υπεριώδες, παρουσία παρεμποδιστών, προτιμάται η μέτρηση απορρόφησης σε δύο μήκη κύματος που να μην απέχουν πολύ μεταξύ τους και αν είναι δυνατόν να βρίσκονται σε "πλατώ" μέγιστης και ελάχιστης απορρόφησης. Στην περίπτωση αυτή η καμπύλη αναφοράς χαράζεται ως γραφική παράσταση ΔA ως προς c και έτσι αίρεται η παρεμποδιστική δράση, διότι αν $\epsilon_{x,1}$, $\epsilon_{x,2}$, $\epsilon_{z,1}$ και $\epsilon_{z,2}$ είναι οι μοριακές απορροφητικότητες της μετρούμενης ουσίας E και της παρεμποδίζουσας ουσίας στα δύο μήκη κύματος, επειδή $\epsilon_{z,1} = \epsilon_{z,2}$ (λόγω της ασθενούς πλατιάς ζώνης), έχουμε:

$$\Delta A = [\epsilon_{x,1}bc_x + \epsilon_{z,1}bc_z] - [\epsilon_{x,2}bc_x + \epsilon_{z,2}bc_z] = (\epsilon_{x,1} - \epsilon_{x,2})bc_x$$

Για συστήματα που επηρεάζονται από το pH και για τα οποία υπάρχει ισοσβεστικό σημείο επιλέγεται το λ_{is} αν δεν είναι δυνατός ο έλεγχος του pH.

3.2.5 Χάραξη καμπύλης αναφοράς και μέτρηση απορρόφησης αγνώστου διαλύματος και υπολογισμοί

Αν για ένα χημικό σύστημα ισχύει ο νόμος του Beer και υπάρχει καλή επαναληψιμότητα των μετρήσεων αρκεί ένα και μόνο πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης c_x για την εκτέλεση της ανάλυσης, με σύγκριση της απορρόφησης A_a του αγνώστου



διαλύματος συγκέντρωσης c_a μέσα σε κυψελίδα b cm, προς την απορρόφηση A_a , του πρότυπου διαλύματος, μέσα στην ίδια κυψελίδα, οπότε έχουμε

$$A_a/A_a = \epsilon b c_a / \epsilon b c_a$$

$$\text{ή } c_a = (A_a/A_a) c_a$$

Στην πράξη κατά κανόνα η συγκέντρωση c_a βρίσκεται από καμπύλη αναφοράς, που χαράσσεται με σειρά προτύπων διαλυμάτων, για να επιτευχθεί μεγαλύτερη ακρίβεια. Μετρείται η απορρόφηση των προτύπων διαλυμάτων στο μήκος κύματος που επιλέχθηκε και χαράσσεται καμπύλη αναφοράς $A=f(c)$ είτε γραφικά, είτε χρησιμοποιείται υπολογιστική μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων για την χάραξή της.

Η σύσταση των προτύπων διαλυμάτων πρέπει να προσομοιάζει με τη σύσταση του δείγματος όσο το δυνατόν περισσότερο. Αν τούτο είναι ανέφικτο, χρησιμοποιείται η μέθοδος προσθήκης γνωστής ποσότητας. Η συγκέντρωση όλων των διαλυμάτων (προτύπων και αγνώστου) πρέπει να βρίσκεται στην περιοχή ισχύος του νόμου του Beer, η δε απορρόφησή τους να κυμαίνεται μεταξύ 0,1 και 1,0 (0,1-1,5 για ειδικά φασματοφωτόμετρα ακριβείας) για μείωση του φωτομετρικού σφάλματος [29,30].

3.2.6 Προετοιμασία δείγματος

Στη φασματοφωτομετρία υπεριώδους και ορατού χρησιμοποιούνται άραια διαλύματα του δείγματος. Ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης για την παρασκευή του δείγματος δεν πρέπει να απορροφεί στην περιοχή του φάσματος, όπου μετρείται η απορρόφηση του δείγματος.

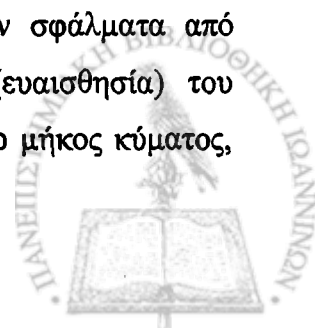
Ο διαλύτης είναι δυνατόν να επιδράσει στη διαλυμένη ουσία και να μεταβάλλει το φάσμα απορρόφησής της. Οι πολικοί διαλύτες αυξάνουν το εύρος των κορυφών απορρόφησης και μετατοπίζουν τη θέση του λ_{max} . Η οξύτητα επίσης του διαλύτη (που ρυθμίζεται με την προσθήκη ισχυρού οξέος ή βάσης) είναι δυνατόν να επηρεάσει δραστικά το φάσμα απορρόφησης πολλών ουσιών.

3.2.7 Σφάλματα φασματοφωτομετρίας

Οι συνηθέστερες πηγές σφαλμάτων στη φασματοφωτομετρία είναι:

3.2.7.1 Όργανα

Στα φασματοφωτόμετρα απλής δέσμης μπορούν να προκύψουν σφάλματα από μεταβολές στην ισχύ της πηγής ακτινοβολίας, την απόκριση (ευαισθησία) του ανιχνευτή, τον ηλεκτρικό θόρυβο, την τοποθέτηση της κυψελίδας, το μήκος κύματος,



κλπ. Αν και πολλά από τα σφάλματα αυτά ελαχιστοποιούνται και ορισμένα εξαλείφονται πλήρως, με τη χρησιμοποίηση φασματοφωτομέτρου διπλής δέσμης και τη βαθμονόμηση των οργάνων (είναι ευνόητο ότι χρησιμοποιείται το ίδιο όργανο για τα πρότυπα και τα άγνωστα διαλύματα), το αθροιστικό σφάλμα (σφάλμα ανάλυσης) απ' όλες τις πηγές συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 0,3 και 1%. Για την ελαχιστοποίηση του σφάλματος ανάλυσης πρέπει να ελέγχονται περιοδικά τόσο η βαθμονόμηση των οργάνων, όσο και η καμπύλη αναφοράς (ή η μέτρηση ενός προτύπου), ιδίως όταν αυτή πρόκειται να χρησιμοποιηθεί επί μακρόν για πολυάριθμα δείγματα, για να εξακριβωθεί μήπως με την πάροδο του χρόνου έχουν υπεισέλθει σφάλματα που προκαλούνται από μεταβολές στα αντιδραστήρια ή στο περιβάλλον. Μεταβολές θερμοκρασίας συνεπάγονται μεταβολή του όγκου του διαλύματος, ιδίως οργανικών διαλυτών επομένως και της συγκέντρωσης. Παρατεταμένη παραμονή του δείγματος στην κυψελίδα πρέπει να αποφεύγεται, διότι είναι δυνατόν να προκαλέσει σχηματισμό φυσαλίδων (συνήθως αέρα) ή φωτοδιάσπαση ευαίσθητων ουσιών και μεγάλα σφάλματα.

Τα περισσότερα από τα παλαιότερα αναλογικά φασματοφωτόμετρα παρέχουν τη διαπερατότητα στην κλίμακα του οργάνου ή σ' ένα καταγραφέα. Σε αυτά τα όργανα υπεισέρχεται το φωτομετρικό σφάλμα, δηλαδή το σφάλμα στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης που οφείλεται στο σφάλμα ανάγνωσης της κλίμακας διαπερατότητας του φασματοφωτομέτρου, το οποίο συνήθως είναι σταθερό και ίσο με το εύρος της βελόνας του οργάνου ή το πάχος της γραμμής του καταγραφήματος.

Στα φασματοφωτόμετρα με ψηφιακή ένδειξη διαπερατότητας ή απορρόφησης υπεισέρχεται επιπλέον και το σφάλμα του αναλογικού-ψηφιακού μετατροπέα σήματος.

3.2.7.2 Προσωπικά σφάλματα

Τα συνηθέστερα προσωπικά σφάλματα προέρχονται από κακό χειρισμό των οργάνων. Το εσωτερικό και το εξωτερικό των κυψελίδων πρέπει να διατηρείται απόλυτα καθαρό και αυτές να τοποθετούνται στην ίδια ακριβώς θέση κάθετα προς την φωτεινή δέσμη, ενώ τα διαλύματα πρέπει να είναι απαλλαγμένα από αιωρήματα, τα οποία είναι δυνατόν να προκαλέσουν σκέδαση της ακτινοβολίας.

3.2.7.3 Προσμείξεις

Λόγω της μικρής συγκέντρωσης των φασματοφωτομετρικά προσδιοριζομένων ουσιών, οι ακαθαρσίες των αντιδραστηρίων και του διαλύτη είναι δυνατόν να είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτές και να προκαλέσουν μεγάλα σχετικά σφάλματα. Για την



άρση τέτοιων σφαλμάτων χρησιμοποιείται το τυφλό πείραμα για την αρχική ρύθμιση του 100% T της κλίμακας του φασματοφωτομέτρου. Το τυφλό πείραμα υφίσταται την ίδια επεξεργασία με το διάλυμα του δείγματος και έχει την ίδια σύσταση με αυτό, δεν περιέχει όμως δείγμα. Τέτοιο τυφλό πείραμα δεν εξουδετερώνει το σφάλμα που είναι δυνατόν να προκύψει, αν το άγνωστο δείγμα περιέχει και άλλα συστατικά, τα οποία (ή τα προϊόντα τους προκειμένου για χρησιμοποίηση σχηματισμού παραγώγων) απορροφούν στο χρησιμοποιούμενο μήκος κύματος. Σε τέτοιες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται πρότυπα δείγματα της ίδιας κατά το δυνατόν σύστασης προς το άγνωστο δείγμα ή χρησιμοποιείται η μέθοδος προσθήκης γνωστής ποσότητας.

3.2.7.4 Απορροφούσες παρεμποδίζουσες ουσίες

Αν στο δείγμα συνυπάρχουν και άλλες ουσίες εκτός από την προσδιοριζόμενη, οι οποίες απορροφούν στην ίδια περιοχή μηκών κύματος με αυτή, αυτές απομακρύνονται πριν από τη μέτρηση της απορρόφησης ή δεσμεύονται με καλυπτικά αντιδραστήρια.

3.2.7.5 Χημικές παρεμποδίσεις

Αυτές είναι δυνατόν να οφείλονται είτε σε δευτερεύουσες αντιδράσεις (υδρόλυση ή διάσπαση της προσδιοριζόμενης ουσίας, αντίδραση αυτής με τον αέρα, κλπ), είτε σε συμμετοχή της προσδιοριζόμενης ουσίας σε χημικές ισορροπίες. Στην τελευταία περίπτωση, όλοι οι παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν την ισορροπία (θερμοκρασία, ιοντική ισχύς, κλπ) πρέπει να διατηρούνται σταθεροί, για να αποφευχθεί απόκλιση από το νόμο του Beer [31,32].

3.2.8 Οργανολογία

Τα όργανα για τη μέτρηση της απορρόφησης συμπεριλαμβάνονται στο βασικό εξοπλισμό των χημικών εργαστηρίων. Αποτελούνται από τα ακόλουθα τμήματα:

(1) πηγές ακτινοβολίας, (2) επιλογείς μήκους κύματος, (3) υποδοχείς δειγμάτων, (4) μεταλλάκτες ακτινοβολίας και (5) επεξεργαστές σημάτων και διατάξεις ανάγνωσης και αποθήκευσης των μετρήσεων.

Τα τμήματα των οργάνων διαφέρουν στις λεπτομέρειες, ανάλογα με την περιοχή μήκους κύματος λειτουργίας.

Τα όργανα που χρησιμοποιούνται για μετρήσεις στην υπεριώδη και ορατή περιοχή του φάσματος είναι αρκετά απλά και χρησιμοποιούνται για πολλές δεκαετίες για ερευνητικούς σκοπούς. Η μεγαλύτερη εξέλιξη στην ανάπτυξη των φασματοφωτομέτρων αφορά τους μεταλλάκτες ακτινοβολίας. Η κατασκευή των



πολυδιαυλικών μεταλλακτών φωτονίων έδωσε ώθηση στην ανάπτυξη μιας νέας γενιάς οργάνων, τα οποία όλο και περισσότερο βρίσκουν ανταπόκριση στις απαιτήσεις των σύγχρονων τεχνικών ανάλυσης. Παρακάτω αναπτύσσονται τα βασικότερα χαρακτηριστικά των πολυδιαυλικών μεταλλακτών φωτονίων και ιδιαίτερα του ανιχνευτή σύζευξης φορτίου το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.

3.2.8.1 Πολυδιαυλικοί μεταλλάκτες φωτονίων

Οι πολυδιαυλικοί μεταλλάκτες φωτονίων (multichannel photon transducers) αποτελούνται από μια συστοιχία μικρών φωτοευαίσθητων στοιχείων, τα οποία είναι τοποθετημένα, είτε γραμμικά, είτε σε σχηματισμό δύο διαστάσεων, επάνω σε μια ψηφίδα ημιαγωγού πυριτίου. Η ψηφίδα έχει τυπικές διαστάσεις μερικών mm και περιλαμβάνει το ηλεκτρονικό κύκλωμα, το οποίο καθιστά δυνατή τη μέτρηση του ηλεκτρικού σήματος από το κάθε στοιχείο, είτε διαδοχικά, είτε συγχρόνως. Για φασματοσκοπικές μελέτες, τοποθετείται στο εστιακό επίπεδο ενός φασματομέτρου ένας πολυδιαυλικός μεταλλάκτης έτσι ώστε τα διάφορα στοιχεία του αναλυθέντος φάσματος να μπορούν να μεταλλαχθούν σε ηλεκτρικό σήμα και να μετρηθούν συγχρόνως [33]. Τα σύγχρονα φασματομέτρα που κυκλοφορούν στην αγορά έχουν διαστάσεις μιας παλάμης και ονομάζονται και μικροσκοποποιημένα φασματομέτρα (miniaturized spectrometers).

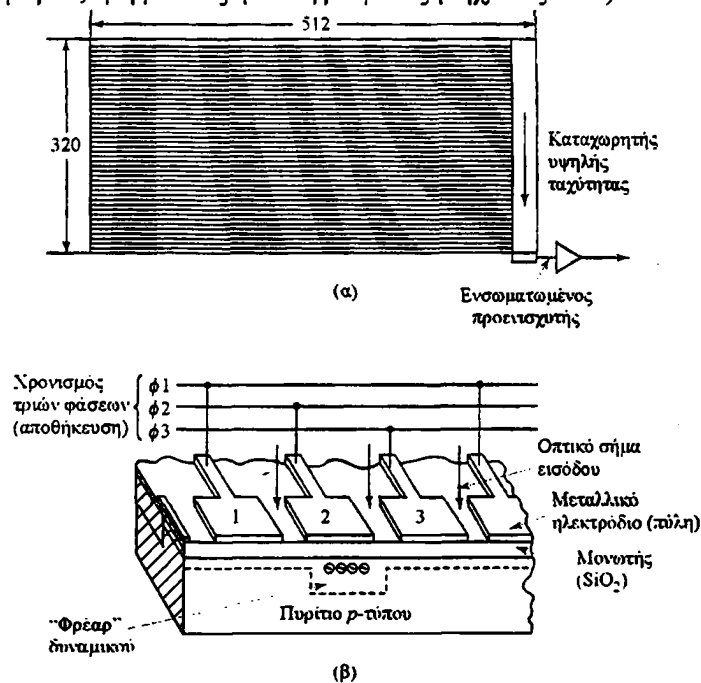
Προς το παρόν υπάρχουν τρεις τύποι πολυδιαυλικών μεταλλακτών οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε φασματοσκοπικά όργανα: οι συστοιχίες φωτοδιόδων (photodiode arrays, PDA), τα στοιχεία έκχυσης φορτίου (charge-injection devices, CID) και τα στοιχεία σύζευξης φορτίου (charge-coupled devices, CCD). Οι συστοιχίες φωτοδιόδων είναι μονοδιάστατοι μεταλλάκτες, των οποίων τα φωτοευαίσθητα στοιχεία διατάσσονται σε μια ευθεία στην επιφάνεια του μεταλλάκτη. Αντίθετα, τα επιμέρους φωτοευαίσθητα στοιχεία έκχυσης φορτίου και σύζευξης φορτίου σχηματίζουν διδιάστατες συστοιχίες. Η λειτουργία και των δύο τύπων μεταλλακτών βασίζεται στη συλλογή φωτοπαραγόμενων φορτίων σε διάφορες περιοχές της επιφάνειας του μεταλλάκτη και στη μέτρηση της ποσότητας φορτίου, το οποίο συσσωρεύεται μετά από ένα σύντομο χρονικό διάστημα [7].

Τα χαρακτηριστικά συμπεριφοράς των μεταλλακτών μεταφοράς φορτίου πλησιάζουν αυτά του φωτοπολλαπλασιαστή και επιπλέον έχουν το πλεονέκτημα του πολυδιαυλικού χαρακτήρα.



3.2.8.2 Ανιχνευτής σύζευξης φορτίου

Ο ανιχνευτής CCD ανήκει στη γενικότερη κατηγορία των συσκευών μεταφοράς ηλεκτρικού φορτίου. Οι συσκευές μεταφοράς ηλεκτρικού φορτίου (Charge Transfer Devices, CTD) περιλαμβάνουν δύο παρόμοια, ολοκληρωμένα κυκλώματα: τη συσκευή σύζευξης φορτίου (Charge-Coupled Device, CCD) και τη συσκευή έγχυσης φορτίου (Charge Injection Device, CID). Αυτές οι συσκευές έχουν βρει εφαρμογή σε πολλά πεδία της φυσικής, της ρομποτικής, της αστρονομίας και της χημείας [34-36]. Η μεγαλύτερη εφαρμογή τους είναι η κατασκευή οπτικών ανιχνευτών (Video, οπτικά τηλεσκόπια, δορυφόροι, ψηφιακές φωτογραφικές μηχανές κ.ά.).



Σχήμα 3.9: Συστοιχία στοιχείων σύζευξης φορτίου: (α) διάταξη των 512×320 εικονο-στοιχείων και (β) σχηματική παράσταση τεσσάρων από τα ανιχνευτικά στοιχεία της.

Η υψηλή ευαισθησία των ανιχνευτών CCD που έχει ως αποτέλεσμα την ανάλυση σε πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης και ο μικρός χρόνος συλλογής των φασματικών δεδομένων, τους κάνει ιδανικές συσκευές για την παρατήρηση χημικών αντιδράσεων. Σε ένα φασματόμετρο τύπου CCD, το φως συλλέγεται με μια κατάλληλη οπτική διάταξη, αναλύεται και προσπίπτει σε ένα ανιχνευτή CCD.

Πριν την πρόσπτωση του φωτός ο ανιχνευτής αποφορτίζεται και τα προσπίπτοντα φωτόνια απορροφούνται και μετατρέπονται σε μια σειρά ηλεκτρονίων. Για τη μέτρηση του συσσωρευμένου φορτίου χρησιμοποιείται ένα ρολόι χρονισμού τριών φάσεων για τη σταδιακή ολίσθηση του φορτίου προς την είσοδο ενός ολισθαίνοντος καταχωρητή, όπως δείχνεται στο σχήμα 3.9 [7].



Κατόπιν, εξάγεται ένα ηλεκτρικό, αναλογικό σήμα αποτελούμενο από μια σειρά από τιμές ηλεκτρικού φορτίου, ανάλογο με την πρόσπτωση του φωτός στο κάθε εικονοστοιχείο του ανιχνευτή, στο κάθε μήκος κύματος της παρατηρούμενης φασματικής περιοχής [37,38].

3.2.8.3 Πηγές θορύβου σε ένα ανιχνευτή CCD

Τέσσερις πηγές θορύβου σχετίζονται με ένα ανιχνευτή σύζευξης φορτίου (CCD): 1) ο θόρυβος ανάγνωσης, 2) ο σκοτεινός θόρυβος, ο οποίος προκαλείται από την φόρτιση των εικονοστοιχείων που οφείλεται σε αιτίες διαφορετικές από αυτές των διεσπαρμένων φωτοηλεκτρονίων, 3) οι τυχαίοι θόρυβοι, οι οποίοι παράγονται από την τυχαία κίνηση μεμονωμένων ηλεκτρικών φορτίων [33,37] και 4) οι θόρυβοι κατασκευαστικής προέλευσης, που δημιουργούνται εξαιτίας της διακύμανσης του σήματος ανάλογα με την ευαισθησία του κάθε εικονοστοιχείου. Το μέγεθος του κάθε θορύβου μπορεί να διαφέρει από ανιχνευτή σε ανιχνευτή. Συνήθως η κύρια πηγή θορύβου είναι ο τυχαίος θόρυβος, ο οποίος είναι ανάλογος της τετραγωνικής ρίζας του αριθμού των φωτονίων και γι' αυτό ο λόγος σήματος προς θόρυβο αυξάνεται γραμμικά με την τετραγωνική ρίζα του χρόνου συσσώρευσης φορτίου ή χρόνου έκθεσης του ανιχνευτή στην πηγή φωτός.

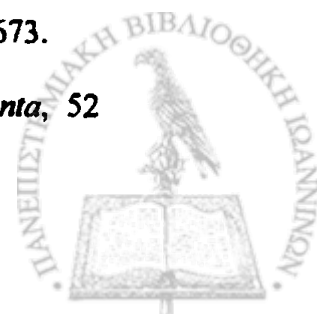


Βιβλιογραφία

- [1] J. H. Knox, J. N. Done, A. F. Fell, M. T. Gilbert, A. Pryde and R. A. Wall, *High-Performance Liquid Chromatography*, Edinburgh University Press, Edinburgh, 1978.
- [2] M. T. Gilbert, *High Performance Liquid Chromatography*, Wright, Bristol, 1987.
- [3] E. L. Johnson and R. Stevenson, *Basic Liquid Chromatography*, Varian, Palo Alto, 1978.
- [4] L.R. Snyder, J.L. Glajch, J.J. Kirkland, *Practical HPLC Method Development*, Wiley, 1988.
- [5] A. M. Krstulovic and P. R. Brown, *Reversed-Phase HPLC: Theory, Practice and Biomedical Applications*, Wiley-Interscience, New York, 1982.
- [6] R. J. Hamilton and P. A. Sewell, *Introduction to High-Performance Liquid Chromatography*, Chapman and Hall, London, 2nd ed., 1982.
- [7] D. A. Skoog, F. James Holler, T. A. Nieman, Μετάφραση: Μ. Ι. Καραγιάννης, Κ. Η. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης, *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, Αθήνα, 2003.
- [8] J.L. Glajch, and J.J. Kirkland, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 319.
- [9] R.P.W. Scott, *Liquid Chromatography Column Theory*, Wiley, New York, 1992.
- [10] Μ.Ι. Καραγιάννης, *Χημική Οργανολογία (Εισαγωγικά Μαθήματα)*, Ιωάννινα, 1992.
- [11] M.C. McMaster, *HPLC: A Practical User's Guide*, VCH Publishers, Inc., 1994.
- [12] G. Wood Ewing (ed), *Analytical Instrumentation Handbook*, 2nd Ed, Marcel Dekker, Inc., 1997.
- [13] C.F. Simpson (Ed.), *Techniques in Liquid Chromatography*, Wiley, Chichester, 1982.
- [14] R.M. Cassidy and R.W. Frei, *Anal. Chem.*, 44 (1972) 2250.
- [15] Ι.Ν. Παπαδογιάννης, *Διαχωριστικές Τεχνικές στην Ενόργανη Χημική Ανάλυση*, Θεσσαλονίκη, 1992.
- [16] R.C. Simpson and P.R. Brown, *J. Chromatogr.*, 400 (1987) 297.
- [17] M. Novotny, *Anal. Chem.*, 60 (1989) 500.



- [18] E.S. Yeung (Ed.), *Detectors for Liquid Chromatography*, Wiley, Chichester, 1996.
- [19] J.B. Lambert, H.F. Shurvell, D.A. Lightner and R.G. Cooks, *Organic Structural Spectroscopy*, Prentice-Hall Inc, New Jersey, 1998.
- [20] C.N. Banwell and E.M. McCash, *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*, 4th ed., McGraw-Hill, 1994.
- [21] J. M. Hollas, *Modern Spectroscopy*, 3rd ed., J. Wiley & Sons, 1996.
- [22] J. L. McHale, *Molecular Spectroscopy*, Prentice-Hall, 1999.
- [23] J.D. Graybeal, *Molecular Spectroscopy*, McGraw-Hill, New York, 1988.
- [24] J.I. Steinfeld, *Molecules and Radiation: An Introduction to Modern Molecular Spectroscopy*, MIT Press, Cambridge, MA, 2nd ed., 1985.
- [25] G.W. King, *Spectroscopy and Molecular Structure*, Rinehart and Winston, 1964.
- [26] W.S. Struve, *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*, Wiley Interscience, 1989.
- [27] J.D. Ingle and S.R. Crouch, *Spectro-chemical analysis*, Prentice-Hall, 1988.
- [28] *A Dictionary of Spectroscopy*, 2nd ed., Wiley, New York, 1982.
- [29] H.H. Perkampus, *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*, Springer-Verlag, Berlin, New York, 1992.
- [30] F.M. Mirabella, *Modern Techniques in Applied Molecular Spectroscopy*, J. Wiley & Sons, Inc., New York, 1998.
- [31] H. Willard, L. Merritt, J.A. Dean, F.A. Settle, *Instrumental Methods of Analysis*, 7th ed., Wadsworth Publishing Co., 1988.
- [32] K. Rubinson and J. Rubinson, *Contemporary Instrumental Analysis*, Prentice-Hall, 2000.
- [33] P.M. Epperson, J.V. Sweedler, M.B. Denton, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 327A.
- [34] S. Hanna, A.M.E. Baker, A.H. Windle, *Polymer*, 39 (1998) 2409.
- [35] L. Songcan, M.A. Neifeld, *Opt. Commun.*, 178 (2000) 283.
- [36] I.B. Brenner, S. Vats, A.T. Zander, *J. Anal. Atom. Spectr.*, 14 (1999) 1231.
- [37] C.T. Williams, M.J. Weaver, C.G. Takoudis, *Chem. Eng. Sci.*, 51 (1996) 1673.
- [38] R.Y. Wang, J.A. Jarratt, P.J. Keay, J.J. Hawkes, W.T. Coakley, *Talanta*, 52 (2000) 129.



**Αξιοπιστία Αναλύσεων και
Επεξεργασία Πειραματικών
Δεδομένων**

Για την αξιολόγηση και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων μιας μεθόδου ανάλυσης που προτείνεται, καθορίζονται συνήθως η σχετική τυπική απόκλιση των μετρήσεων, η επαναληψιμότητα της μεθόδου, χαράζεται η καμπύλη αναφοράς και υπολογίζεται το όριο ανίχνευσης.

Η *τυπική απόκλιση* (*standard deviation*, SD) των μετρήσεων είναι το μέτρο της διασποράς μεμονωμένων μετρήσεων και δίνεται από τη σχέση:

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

Επαναληψιμότητα (*repeatability*) μιας μεθόδου (ή μιας σειράς μετρήσεων) είναι το στατιστικό μέγεθος, που δίνει το μέτρο της διασποράς μιας σειράς μετρήσεων γύρω από το μέσο όρο \bar{x} . Η επαναληψιμότητα μιας μεθόδου εκφράζεται ποσοτικά με τη *σχετική τυπική απόκλιση* (*relative standard deviation*, RSD), που είναι

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$$

Η *καμπύλη αναφοράς* αντιστοιχεί στην εξίσωση, που περιγράφει τα πειραματικά αποτελέσματα. Η εξίσωση αυτή συσχετίζει συνήθως τη συγκέντρωση x με το μετρούμενο μέγεθος y π.χ. την απορρόφηση. Όταν η σχέση του μεγέθους y και συγκέντρωσης x είναι γραμμική, η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς είναι:

$$y = a + \beta x$$

Η κλίση β εκφράζει την ευαισθησία της μεθόδου, ενώ η σταθερά a παριστάνει το σταθερό σφάλμα.



Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου C_L (detection limit) είναι η μικρότερη συγκέντρωση, που μπορεί να προσδιοριστεί με βάση την εφαρμοζόμενη μέθοδο και την καμπύλη αναφοράς. Μια απλή μαθηματική έκφραση του ορίου ανίχνευσης, που προκύπτει, αν ληφθεί υπ' όψη η εξίσωση, που περιγράφει τα όρια εμπιστοσύνης για την καμπύλη αναφοράς, είναι:

$$C_L = \frac{k \sqrt{S_{bl}^2 + S_a^2 + \left(\frac{a}{\beta}\right)^2 S_\beta^2}}{\beta}$$

Όπου k είναι ο συντελεστής, που παίρνει τιμές 1,2,3 κ.λ.π. ανάλογα με την αξιοπιστία, με την οποία υπολογίζεται το όριο ανίχνευσης, S_{bl} είναι η τυπική απόκλιση του τυφλού, S_a η τυπική απόκλιση του a και S_β η τυπική απόκλιση του β , όπως αυτά προκύπτουν από την καμπύλη αναφοράς¹.

Όριο ποσοτικοποίησης (*quantitation limit*) είναι η συγκέντρωση, που αντιστοιχεί στο σήμα του τυφλού, αν προστεθεί το δεκαπλάσιο της τυπικής απόκλισης και είναι το μέγεθος που πρακτικά έχει αξία για κάθε αναλυτική μέθοδο.

Η ακρίβεια μιας μεθόδου (*accuracy*) αναφέρεται στην ορθότητα των αποτελεσμάτων, που προκύπτουν με την εφαρμογή της και δείχνει πόσο κοντά βρίσκονται οι τιμές μιας σειράς μετρήσεων ή ο μέσος όρος τους \bar{x} στην πραγματική τιμή. Η καλή ή κακή ακρίβεια μιας μεθόδου σχετίζεται με την ύπαρξη συστηματικών σφαλμάτων και ελέγχεται με πρότυπα διαλύματα. Τα συστηματικά σφάλματα οφείλονται σε φαινόμενα που είναι γνωστά, αλλά δεν είναι δυνατό να αποφεύγονται, επειδή δεν ελέγχονται πάντοτε με το πείραμα. Κύριες αιτίες είναι: τα σφάλματα από τα όργανα που χρησιμοποιούνται, τα προσωπικά σφάλματα, τα σφάλματα ειδικών ιδιοτήτων της ύλης, η ύπαρξη χημικών ισορροπιών, κ.ά.

¹Μ.Ι. Καραγιάννης, *Επεξεργασία Αξιολόγηση και Παρουσίαση Αναλυτικών Δεδομένων*, Αθήνα, 1987.



**ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΗΣ
4-ΑΜΙΝΟΑΝΤΙΠΥΡΙΝΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΝΖΥΜΙΚΟ
ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ
ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΓΛΥΚΟΖΗΣ**

1.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο κεφάλαιο αυτό μελετάται η τροποποίηση μιας ενζυμικής φασματοφωτομετρικής μεθόδου, που είναι γνωστή στη βιβλιογραφία και ως "μέθοδος Trinder", για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της γλυκόζης.

Για το σκοπό αυτό έγινε μια συγκριτική μελέτη επτά παραγώγων της 4-αμινοαντιπυρίνης τα οποία, υπό καθορισμένες συνθήκες, αντιδρούν με παράγωγα της φαινόλης (3,5-διχλωρο-2-υδροξυβενζυλο-σουλφονικό οξύ - DCPS) ή αρωματικές αμίνες ((N-αιθυλο-N-(3-σουλφοπροπυλο))-ανιλίνη - ALPS), παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου, προς σχηματισμό έγχρωμων ενώσεων. Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται σε σημαντικό βαθμό από την υπεροξειδάση. Τα προϊόντα των αντιδράσεων απορροφούν έντονα στην ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και η απορρόφησή τους, στο μέγιστο του φάσματος, είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Η αντικατάσταση της 4-αμινοαντιπυρίνης στην κλασσική αντίδραση Trinder, με παράγωγά της, αυξάνει τη συζυγία και τη βαθυχρωμία των προϊόντων της αντίδρασης με αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου λόγω της αύξησης της απορρόφησης σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Άλλο πλεονέκτημα είναι ότι τα φαινόμενα συζυγίας που εμφανίζουν τα

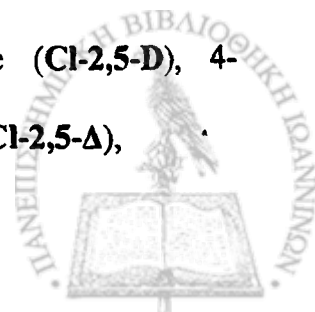


χρωμοφόρα που σχηματίζονται από τα παράγωγα της 4-αμινοαντιπυρίνης με τις φαινολικές ενώσεις ή τις αρωματικές αμίνες, δημιουργούν το φαινόμενο της βαθυχρωμικής μετατόπισης του μήκους κύματος στο μέγιστο της απορρόφησης. Η μετατόπιση αυτή αίρει σε σημαντικό βαθμό τα προβλήματα παρεμποδίσεων στη μέτρηση της γλυκόζης σε πραγματικές συνθήκες μέτρησης και κυρίως σε βιολογικά δείγματα.

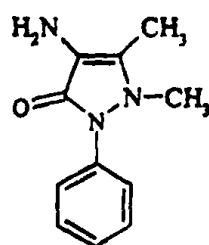
Για την εύρεση των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών μελετήθηκαν διάφορες αναλυτικές παράμετροι, οι οποίες επηρεάζουν τόσο το υπό μελέτη σύστημα όσο και τις εφαρμογές των αντιδράσεων στον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της γλυκόζης. Έτσι μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης των αντιδραστηρίων, της υπεροξειδάσης και της γλυκόζης οξειδάσης, η επίδραση του pH και η σύσταση των ρυθμιστικών διαλυμάτων, η θερμοκρασία και η παρεμποδιστική δράση διαφόρων ουσιών.

Οι οκτώ πυραζολονικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν μαζί με τις αγγλικές και ελληνικές συντομογραφίες τους καθώς και τους συντακτικούς τους τύπους δίνονται παρακάτω:

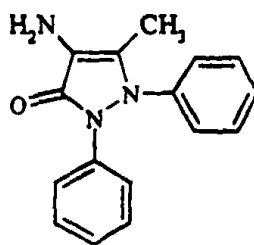
1. 4-aminoantipyrine (**4-AAP**), 4-αμινοαντιπυρίνη (**4-ΑΑΠ**),
2. 4-amino-1,2-diphenyl-5-methylpyrazol-3-one (**1,2-D**), 4-αμινο-1,2-διφαινυλο-5-μεθυλοπυραζολ-3-όνη (**1,2-Δ**),
3. 4-amino-2,5-diphenyl-1-methylpyrazol-3-one (**2,5-D**), 4-αμινο-2,5-διφαινυλο-1-μεθυλοπυραζολ-3-όνη (**2,5-Δ**),
4. 4-amino-2-(*p*-aminophenyl)-1-methylpyrazol-3-one (**DAA**), 4-αμινο-2-(*p*-αμινοφαινυλο)-1-μεθυλοπυραζολ-3-όνη (**ΔΑΑ**),
5. 4-amino-1-ethyl-5-methyl-2-phenylpyrazol-3-one (**4-AEP**), 4-αμινο-1-αιθυλο-5-μεθυλο-2-φαινυλοπυραζολόνη (**4-ΑΕΠ**),
6. 4-amino-1-methyl-2-phenyl-5-(*p*-chlorophenyl) pyrazol-3-one (**Cl-2,5-D**), 4-αμινο-1-μεθυλο-2-φαινυλο-5-(*p*-χλωροφαινυλο)πυραζολόνη (**Cl-2,5-Δ**),



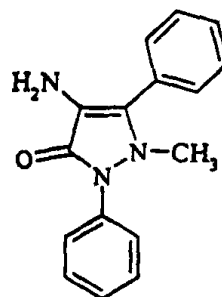
7. 4-amino-5-(*p*-aminophenyl)-1-methyl-2-phenylpyrazol-3-one (DAP), 4-αμινο-5-(*p*-αμινοφαινυλο)-1-μεθυλο-2-φαινυλοπυραζολόνη (ΔΑΠ),
8. 4-amino-2-(*p*-aminophenyl)-1-methyl-5-phenylpyrazol-3-one (DADP), 4-αμινο-2-(*p*-αμινοφαινυλο)-1-μεθυλο-5-φαινυλοπυραζολόνη (ΔΑΔΦ).



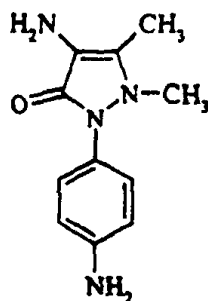
4-AAP



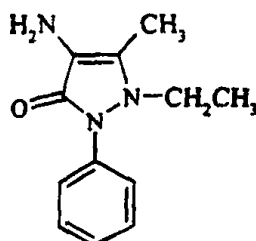
1,2-D



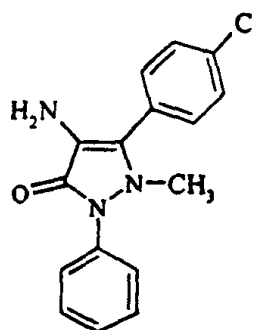
2,5-D



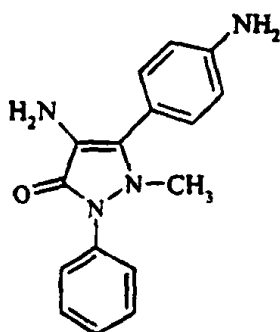
DAA



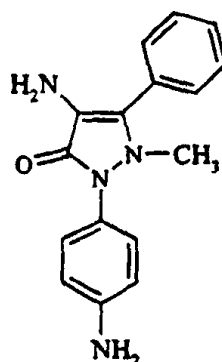
4-AEP



Cl-2,5-D



DAP



DADP

Συντακτικοί τύποι των οκτώ πυραζολονικών ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν.

Από τη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι δύο από τα επτά παράγωγα της 4-αμινοαντιπυρίνης (το DAP και το DAA) βελτιώνουν σημαντικά τα χαρακτηριστικά της κλασσικής



μεθόδου Trinder ως προς την ευαισθησία και τη δυνατότητα εφαρμογής της σε πραγματικά δείγματα κλινικού ενδιαφέροντος. Το DAP δίνει καλύτερα αποτελέσματα κατά την αντίδραση με το ALPS και το DAA με το DCPS σε σύγκριση με τις αντίστοιχες αντιδράσεις σύμπλεξης με την 4-αμινοαντιπυρίνη.

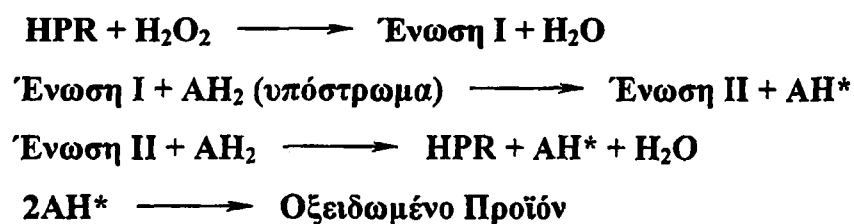
1.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου βρίσκεται όλο και περισσότερο εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, ποτών, πολτού, χαρτιού και στην κλωστοϋφαντουργία ως λευκαντικό και απολυμαντικό μέσο [1-7]. Η αυξημένη χρήση του σχετίζεται με τη φιλικότητά του προς το περιβάλλον αφού τα μοναδικά προϊόντα διάσπασής του είναι το νερό και το οξυγόνο.

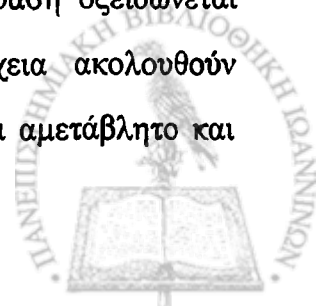
Λόγω της αυξημένης χρήσης του, η ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον όχι μόνο στα αναλυτικά εργαστήρια αλλά και στην κλινική χημεία όπου ο προσδιορισμός του είναι αναγκαίο βήμα για τον προσδιορισμό αναλυτών κλινικού ενδιαφέροντος [8-10].

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου παράγεται ή καταστρέφεται σε διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις όπου συμμετέχουν οξειδάσες όπως η γλυκόζη οξειδάση και η υπεροξειδάση.

Η υπεροξειδάση (HPR) είναι μια αιμοπρωτεΐνη που καταλύει την οξείδωση από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, πολλών υποστρωμάτων σύμφωνα με τον παρακάτω μηχανισμό:



Όπως φαίνεται από το μηχανισμό της αντίδρασης, η υπεροξειδάση οξειδώνεται εκλεκτικά από το υπεροξείδιο του υδρογόνου και στη συνέχεια ακολουθούν αντιδράσεις οξείδωσης οργανικών μορίων ενώ το ένζυμο παραμένει αμετάβλητο και



έτοιμο να επαναντιδράσει με νέο υπόστρωμα [11-13]. Οι τελευταίες αντιδράσεις είναι μη εκλεκτικές και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός οργανικών ενώσεων, μερικές δίνοντας κατευθείαν έγχρωμα προϊόντα, ενώ άλλες μετά από αντίδραση σύζευξης με κάποιο δεύτερο οργανικό μόριο [14].

Η υπεροξειδάση καταλύει την οξείδωση πολλών ενώσεων, που λειτουργούν ως δότες υδρογόνου από το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Οι αντιδράσεις αυτές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

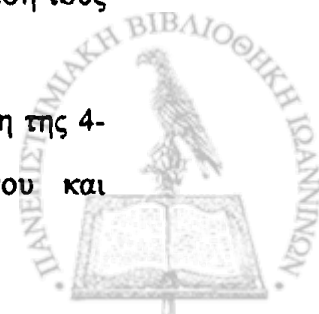
1. Ενδεικτικές αντιδράσεις στις οποίες παράγεται μια έγχρωμη ένωση από την οξείδωση ενός χρωμογόνου (chromogen) από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, παρουσία υπεροξειδάσης (π.χ. λευκό χρώμα – leuco dye) [15].
2. Ενδεικτικές αντιδράσεις στις οποίες παράγεται μια έγχρωμη ένωση από την οξειδωτική σύμπλεξη (oxidative coupling) δύο χρωμογόνων (συνήθως διαφορετικών), με τη βοήθεια του συστήματος υπεροξείδιο του υδρογόνου/υπεροξειδάση [16].

Στη δεύτερη κατηγορία υπάγονται και οι αντιδράσεις των παραγώγων της 4-αμινοαντιπυρίνης που μελετήθηκαν στην εργασία αυτή. Ο μηχανισμός των αντιδράσεων αυτών δίνεται παρακάτω.

Η αντίδραση Trinder (Trinder Reaction-RT) [17] είναι μια τροποποίηση της αντίδρασης που ανέπτυξε ο Emerson τη δεκαετία του 1940 για τον προσδιορισμό των φαιολών [18], η οποία χρησιμοποιείται σήμερα ως πρότυπη μέθοδος για τον προσδιορισμό του φαιολικού δείκτη [19].

Η αντίδραση Emerson παρουσιάζει τα παρακάτω χαρακτηριστικά: i) Λαμβάνει χώρα σε βασικό περιβάλλον. ii) Η σύμπλεξη της 4-αμινοαντιπυρίνης με τη φαινόλη γίνεται στην *p*-θέση του φαινολικού δακτυλίου. iii) Υποκαταστάτες σε *p*-θέση ως προς την υδροξυλική ομάδα παρεμποδίζουν την αντίδραση, εκτός αν πρόκειται για αλογόνο, καρβοξύλιο, σουλφονικό οξύ, υδροξύλιο και μεθύλυ ομάδα. iv) Διαφορετικά φαινολικά παράγωγα παρέχουν διαφορετική βαθυχρωμία των προϊόντων κατά την αντίδρασή τους με την 4-αμινοαντιπυρίνη και επομένως διαφορετική ευαισθησία της μεθόδου.

Το πρώτο σύστημα που χρησιμοποίησε ο Trinder βασιζόταν στην αντίδραση της 4-αμινοαντιπυρίνης με τη φαινόλη παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου και



υπεροξειδάσης. Η αντίδραση αυτή σε συνδυασμό με την οξειδάση της γλυκόζης χρησιμοποιήθηκε για το φωτομετρικό προσδιορισμό της γλυκόζης σε δείγματα ορού αίματος από παιδιά. Η αντίδραση που προτάθηκε αρχικά περιελάμβανε την οξειδωση της γλυκόζης παρουσία της οξειδάσης της γλυκόζης για το σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με την 4-αμινοαντιπυρίνη (4-AAP) και τη φαινόλη παρουσία υπεροξειδάσης (HRP). Το έγχρωμο προϊόν απορροφεί στα 505 nm. Το σύστημα Trinder-Emerson εμφανίζει μερικά μειονεκτήματα που προέρχονται από τη χρήση της φαινόλης, όπως η αστάθεια της και ο πιθανός πολυμερισμός της παρουσία οξυγόνου που επηρεάζει τη μετουσίωση των ενζύμων και την εμφάνιση περιορισμένης σταθερότητας του έγχρωμου προϊόντος που σχηματίζεται. Ο ίδιος ο Trinder αντικατέστησε αργότερα τη φαινόλη με 3,5-διχλωρο-2-υδροξυβενζυλοσουλφονικό οξύ (DCPS), με αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης του έγχρωμου προϊόντος, δηλαδή της ευαισθησίας της μεθόδου ενώ το μέγιστο του φάσματος απορρόφησης μετατοπίστηκε στα 515 nm [20]. Ωστόσο, η 4-αμινοαντιπυρίνη παρέμεινε το αντιδραστήριο της επιλογής και η αντίδραση Trinder η μέθοδος αναφοράς για τον προσδιορισμό της γλυκόζης και πολλών μεταβολιτών κλινικής σημασίας. Βασικό πρόβλημα στη μέθοδο αυτή είναι ότι η μέτρηση της απορρόφησης του έγχρωμου προϊόντος παρεμποδίζεται από την παρουσία της χολερυθρίνης στον ορό, η οποία εμφανίζει μια ταινία απορρόφησης στα 390-520 nm.

Η σύνθεση υδατοδιαλυτών αρωματικών αμινών (μεταξύ τους και το ALPS) και η εφαρμογή τους στον ενζυμικό προσδιορισμό του H_2O_2 αύξησε την ευαισθησία της προηγούμενης μεθόδου (DCPS) και βοήθησε στην άρση των παρεμποδίσεων από την χολερυθρίνη επειδή τα μέγιστα απορρόφησης μετατοπίστηκαν πάνω από τα 540 nm [21].

Η σύνθεση παραγώγων της 4-αμινοαντιπυρίνης και η αναλυτική τους εφαρμογή για τον προσδιορισμό των φαινολών σε περιβαλλοντικά δείγματα ήταν η αφορμή για την παρούσα μελέτη, τα αποτελέσματα της οποίας αναπτύσσονται στη συνέχεια [22].



1.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.3.1 Αντιδραστήρια

Όλα τα εμπορικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν, είτε αναλυτικού είτε του μεγίστου, διαθέσιμου, βαθμού καθαρότητας. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε διπλά απεσταγμένο ύδωρ.

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η υπεροξειδάση από αγριοραφανίδα (E.C. 1.11.1.7, Sigma type VI-A, ενεργότητας 1310 U/mg) και η γλυκόζη οξειδάση (E.C. 1.1.3.4, Sigma type VII, ενεργότητας 195.000 U/g).

Διάλυμα ALPS, το μετά νατρίου άλας της (N-αιθυλο-N-(3-σουλφοπροπυλο)-ανιλίνης παρασκευάζεται με διάλυση 0,0265 g του άλατος (Dojindo, Japan, 99%) σε 100 mL νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται σε ψυγείο εντός ογκομετρικής φιάλης και είναι σταθερό για ένα μήνα.

Πρότυπο διάλυμα H_2O_2 : παρασκευάζεται με διαδοχικές αραιώσεις του εμπορικού διαλύματος 30% (Merck, Germany), το οποίο τιτλοδοτήθηκε με υπερμαγγανικό κάλιο (δευτερογενής πρότυπη ουσία). Τα αραιά διαλύματα του υπεροξειδίου του υδρογόνου παρασκευάζονται καθημερινά από το πρότυπο διάλυμα.

Πρότυπο διάλυμα γλυκόζης: παρασκευάζεται με διάλυση γλυκόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα σε pH 7,0.

Ρυθμιστικά διαλύματα: παρασκευάστηκαν διαλύματα φωσφορικών (pH 5,5-10,0), οξικών (pH 4,4-5,6), MOPS (pH 6,5-7,9), HEPES (pH 6,8-8,2) και Tris-HCl (pH 7,5-9,0), σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Τα παράγωγα της 4-αμινοαντιπυρίνης συντέθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων με την ακόλουθη επιγραμματική διαδικασία [22]:

1. Συμπύκνωση μεταξύ της πρωτοταγούς αμινομάδας της υδραζίνης ($X-C_6H_4NHNH_2$) και της καρβονυλικής ομάδας του β-κετοεστέρα ($EtOCOCH_3COR$) προς σχηματισμό της ενδιάμεσης υδραζόνης.
2. Ύδραζινόλυση του εστέρα προς σχηματισμό του πυραζολονικού δακτυλίου

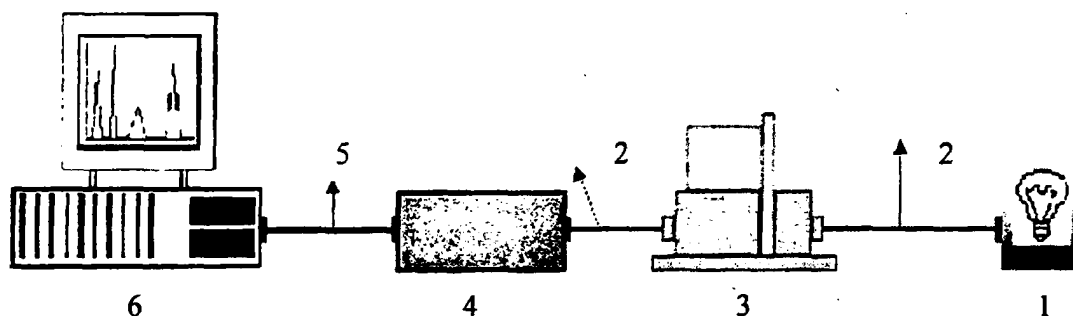


3. Ν-αλκυλίωση
4. Νίτρωση ή νιτρώδωση
5. Αναγωγή νιτροομάδας προς σχηματισμό 4-αμινο ενώσεων.

Τα διαλύματα των παραγώγων της 4-αμινοαντιπυρίνης παρασκευάζονται με διάλυση της αντίστοιχης ένωσης σε δισαπεσταγμένο ύδωρ.

1.3.2 Πειραματική διάταξη

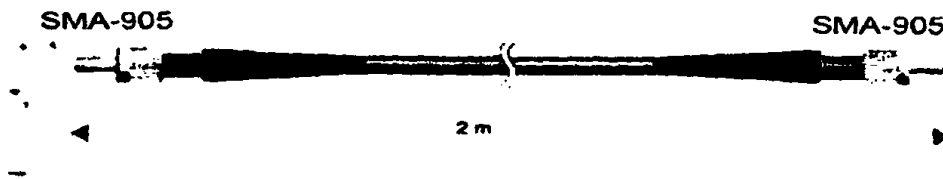
Οι μετρήσεις απορρόφησης έγιναν με το φασματοφωτόμετρο τύπου SD2000, δύο καναλιών, της εταιρίας OceanOptics (Florida, USA) (Σχήμα 1.1). Το φασματοφωτόμετρο αυτό ανήκει στην κατηγορία των οργάνων με πολυδιαυλικούς ανιχνευτές φωτονίων και ο συγκεκριμένος ανιχνευτής είναι τύπου ζεύξης φορτίου (Charge Coupled Device - CCD), 2048 εικονοστοιχείων, η λειτουργία του οποίου περιγράφεται στο θεωρητικό μέρος της διατριβής. Η πηγή ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν τύπου LS-1 (360-900 nm, OceanOptics Inc., USA).



Σχήμα 1.1: Πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της γλυκόζης. 1. πηγή LS-1, 2. οπτικές ίνες, 3. κυψελίδα, 4. φασματόμετρο SD2000, 5, καλώδιο διασύνδεσης, 6. ηλεκτρονικός υπολογιστής.

Το διαμέρισμα κυψελίδων είναι τεσσάρων διαδρομών, με δυνατότητα χρήσης και για μετρήσεις φθορισμού, και δέχεται κυψελίδες με οπτική διαδρομή 1 cm. Η μετρητική κυψελίδα είναι θερμοστατούμενη με ανακύκλωση νερού στη βάση της. Η συνδέσεις ανάμεσα στην πηγή, το διαμέρισμα κυψελίδων και το φασματόμετρο CCD γίνονται με πολύτροπες οπτικές ίνες μήκους 2 m και διαφόρων διαμέτρων. Η δύο άκρες

κάθε ίνας τερματίζουν με συνδετήρες τύπου "SMA-905" (με βιδωτό περίβλημα και μεγάλη φέρουλα, Σχήμα 1.2).



Σχήμα 1.2: Οπτική ίνα που χρησιμοποιείται για τη μετάδοση του φωτός στη πειραματική διάταξη

Το φασματόμετρο συνδέεται με την κάρτα μετατροπής αναλογικών-ψηφιακών σημάτων (ADC500) με καλώδιο διασύνδεσης (interface cable) 25 και 37 ακίδων (pins) τύπου SBL-2. Ο Α/Ψ μετατροπέας των 32 bit έχει ρυθμιστεί για τη λήψη αναλογικού δυναμικού εισόδου από 0 έως +10 V, δυνατότητα ελέγχου 8 φασματόμετρων ταυτόχρονα και συχνότητα συλλογής πληροφοριών έως 500 kHz που αντιστοιχεί σε ελάχιστο χρόνο λήψης φάσματος 8 msec (integration time (ms)= 4096/Sample Frequency (kHz)). Ο μέγιστος χρόνος ολοκλήρωσης φθάνει τα 60 sec. Ο Α/Ψ μετατροπέας είναι ενσωματωμένος στον ηλεκτρονικό υπολογιστή, μέσω του οποίου πραγματοποιείται η λειτουργία του φασματοφωτομέτρου με χρήση του λογισμικού Spectra Win 4.2 (Top Sensors System, The Netherlands). Η ανάλυση της Α/Ψ μετατροπής είναι των 32 bit με μέγιστο σήμα 4.096 counts. Το πρόγραμμα λήψης φασμάτων από τον ανιχνευτή CCD διορθώνει την τιμή της απορρόφησης (διαπερατότητας) αφαιρώντας μέσω αλγορίθμου το σκοτεινό θόρυβο, ο οποίος προκαλείται από την φόρτιση των εικονοστοιχείων που οφείλεται σε αιτίες διαφορετικές από αυτές των διεσπαρμένων φωτοηλεκτρονίων και κυρίως στην θερμοευαισθησία των εικονοστοιχείων. Έτσι οι τιμές της απορρόφησης και της διαπερατότητας δίνονται από τις παρακάτω σχέσεις:

$$A = -\log\left(\frac{\text{sample} - \text{dark}}{\text{reference} - \text{dark}}\right)$$

$$T = 100 * \left(\frac{\text{sample} - \text{dark}}{\text{reference} - \text{dark}}\right)$$



όπου το *sample* αντιστοιχεί στον αριθμό των φωτονίων που προσπίπτουν στον ανιχνευτή όταν στην κυψελίδα τοποθετείται το δείγμα, το *reference* αντιστοιχεί στον αριθμό των φωτονίων που προσπίπτουν στον ανιχνευτή όταν στην κυψελίδα τοποθετείται το τυφλό και το *dark* αντιστοιχεί στο σκοτεινό θόρυβό του, δηλαδή το σήμα που δίνει όταν ο ανιχνευτής δεν “βλέπει” την πηγή ακτινοβολίας και προέρχεται από τη θερμοευαισθησία των εικονοστοιχείων. Η ένταση της εξερχόμενης από την κυψελίδα ακτινοβολίας μετατρέπεται από το λογισμικό σε *counts*, όπου σε κάθε *count* αντιστοιχούν 86 φωτόνια.

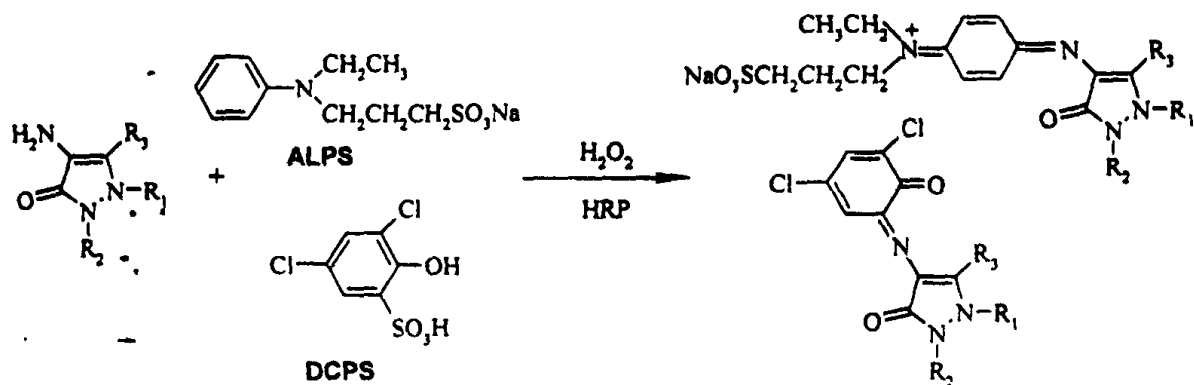
Το λογισμικό παρέχει τη δυνατότητα μέτρησης, αποθήκευσης και παρακολούθησης του φάσματος απορρόφησης για συγκεκριμένο χρόνο ολοκλήρωσης, καθώς και εξομάλυνση θορύβου μέσω του αλγορίθμου Savitzky-Golay. Τα αποθηκευμένα φάσματα μετατρέπονται σε αρχεία ASCII για περαιτέρω επεξεργασία με στατιστικά προγράμματα.

1.3.3 Η χημική αντίδραση

Η αντίδραση οξειδωτικής συμπύκνωσης των παραγώγων της 4-αμινοαντιπυρίνης με το ALPS και το DCPS φαίνεται στο σχήμα 1.3. Και στις δύο περιπτώσεις έχουμε σχηματισμό κινουιδών προϊόντων με δομές εκτεταμένης συζυγίας, η οποία ενισχύεται στην περίπτωση του DAP και του DAA, όπως δείχνουν και τα πειραματικά αποτελέσματα της παρακάτω μελέτης.

Σε όλες τις περιπτώσεις οι αντιδράσεις προχωρούν μέσω σχηματισμού του συμπλόκου I της λανθάνουσας μορφής της υπεροξειδάσης με το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο στη συνέχεια οξειδώνει το τριτοταγές άζωτο στη θέση 1 του πυραζολονικού δακτυλίου με απώλεια ενός ηλεκτρονίου. Στη συνέχεια το πυραζολονικό κατιόν που έχει σχηματιστεί προσβάλλει ηλεκτρονιόφιλα το DCPS ή το ALPS, σχηματίζοντας ένα κινουιδές παράγωγο, το οποίο σταθεροποιείται με αρωματικοποίηση ακολουθούμενο από δεύτερο στάδιο οξείδωσης [23-26].





1,2-D: $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = \text{Ph}$, $R_3 = \text{CH}_3$, 2,5-D: $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{Ph}$, $R_3 = \text{Ph}$, Cl-2,5-D: $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{Ph}$, $R_3 = p\text{-ClC}_6\text{H}_4$
 DAP: $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{Ph}$, $R_3 = p\text{-NH}_2\text{C}_6\text{H}_4$, 4-AEP: $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{Ph}$, $R_3 = \text{CH}_3$, DADP: $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = p\text{-NH}_2\text{C}_6\text{H}_4$,
 $R_3 = \text{CH}_3$, DAA: $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = p\text{-NH}_2\text{C}_6\text{H}_4$, $R_3 = \text{CH}_3$, 4-AAP: $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{Ph}$, $R_3 = \text{CH}_3$

Σχήμα 1.3: Γενικευμένος μηχανισμός των αντιδράσεων των παραγώγων της 4-αμινοαντιπιρίνης με το ALPS και το DCPS, παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου/υπεροξειδάσης.

1.3.4 ΠΟΡΕΙΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1.3.4.1 Προσδιορισμός υπεροξειδίου του υδρογόνου

Η μέτρηση της απορρόφησης για τα έγχρωμα προϊόντα που σχηματίζονται κατά την αντίδραση της κάθε πυραζολόνης με το ALPS ή το DCPS, αντίστοιχα, γίνεται με το φασματοφωτόμετρο που περιγράφηκε παραπάνω. Σε κυψελίδα όγκου 4 mL και οπτικής διαδρομής 10 mm προστίθενται διαδοχικά: 2,8 mL ρυθμιστικό διάλυμα, 30 μL διάλυμα πυραζολονών, 30 μL διάλυμα ALPS ή DCPS και 100 μL διάλυμα υπεροξειδάσης. Το μίγμα αναδεύεται για 30 sec και στη συνέχεια προστίθενται υπό ανάδευση 40 μL προτύπου διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η λήψη των φασμάτων απορρόφησης γίνεται αφού αφαιρεθεί το σήμα που λαμβάνεται κάθε φορά από το τυφλό πείραμα για κάθε ένα από τα υπό μελέτη συστήματα. Η αντίδραση γίνεται σε σταθερή θερμοκρασία με ανακύκλωση νερού στη βάση της κυψελίδας.

Το ALPS και το DCPS σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M και pH 7,0 παρουσιάζουν μέγιστα απορρόφησης στα 254 και 290 nm αντίστοιχα, ενώ από τις οκτώ πυραζολονικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, η 4-AAP παρουσιάζει μέγιστο στα 280 nm και τα υπόλοιπα επτά στην περιοχή από 280 έως 310 nm. Πρέπει να σημειωθεί ότι όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια δεν απορροφούν στην ορατή περιοχή του φάσματος



(οι μετρούμενες τιμές απορρόφησης κυμαίνονται από 0,03 έως 0,004 στην περιοχή από 400 έως 650 nm).

Η ενεργότητα της υπεροξειδάσης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Trinder, με μέτρηση της μεταβολής της απορρόφησης στα 510 nm του έγχρωμου προϊόντος που σχηματίζεται κατά της αντίδραση της 4-αμινοαντιπυρίνης με τη φαινόλη παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου/υπεροξειδάσης [27]. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, μια μονάδα ενεργότητας της υπεροξειδάσης αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου που διασπά 1 μmol υπεροξειδίου του υδρογόνου στους 25°C σε pH 7,0. Έτσι η ενεργότητα του ενζύμου στο εμπορικό παρασκεύασμα βρέθηκε ίση με 1318 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (1300 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ είναι η ενδεικτική τιμή της συσκευασίας).

Ο προσδιορισμός της γλυκόζης σε ορό αίματος, στο εργαστήριο Βιοχημείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, γίνεται με το εμπορικό kit της Olympus (Olympus Diagnostika GmbH, Clare, Ireland), το οποίο βασίζεται στη φωσφοριλίωση της γλυκόζης από το ATP παρουσία εξοκινάσης [28]. Η φωσφοριλιωμένη γλυκόζη αντιδρά με το NAD^+ , παρουσία αφυδρογονάσης (glucose-6-phosphate dehydrogenase), δίνοντας NADH και την φωσφοριλιωμένη λακτόνη. Το παραγόμενο NADH απορροφεί στα 340 nm και η αύξηση της απορρόφησης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης. Το παραπάνω kit παρουσιάζει γραμμικότητα στην περιοχή 10-800 mg/dL (0,6-45,0 mmol/L) για την γλυκόζη που περιέχεται στον ορό ανθρώπινου αίματος.

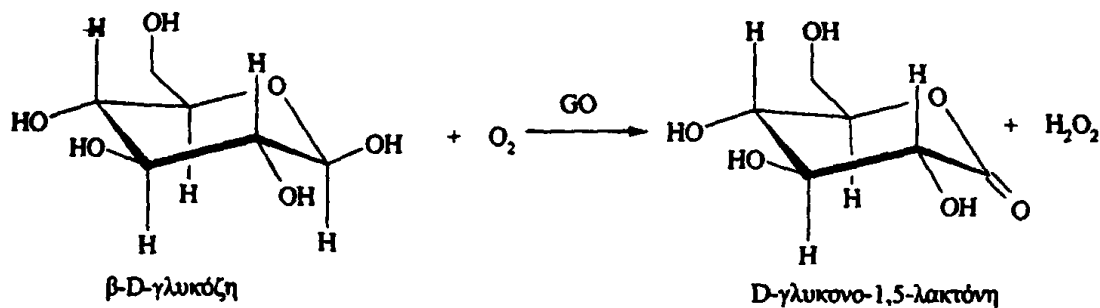
1.3.4.2 Προσδιορισμός γλυκόζης

Η γλυκόζη προσδιορίστηκε με τα συστήματα DAP/ALPS και DAA/DCPS με την ακόλουθη διαδικασία:

Σε κυψελίδα όγκου 4 mL και οπτικής διαδρομής 10 mm προστίθενται διαδοχικά: 2,7 mL ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7,0), 40 μL προτύπου διαλύματος γλυκόζης, 100 μL διάλυμα γλυκόζης οξειδάσης, 30 μL διάλυμα DAP ή DAA, 30 μL διάλυμα ALPS ή DCPS και 100 μL διάλυμα υπεροξειδάσης. Το μίγμα αναδεύεται συνεχώς και η λήψη των φασμάτων απορρόφησης γίνεται αφού αφαιρεθεί το σήμα που λαμβάνεται κάθε φορά από το τυφλό πείραμα για κάθε ένα από τα υπό μελέτη συστήματα.



Όπως φαίνεται και στην παρακάτω αντίδραση (Σχήμα 1.4), η β-D-γλυκόζη οξειδώνεται παρουσία της γλυκόζης οξειδάσης σε D-γλυκονο-1,5-λακτόνη [29] και το υπεροξειδίο του υδρογόνου που παράγεται προσδιορίζεται με τα προτεινόμενα συστήματα. Η συγκέντρωση του παραγόμενου υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης.



Σχήμα 1.4: Οξείδωση της β-D-γλυκόζης από την γλυκόζη οξειδάση.

1.3.5 Πραγματικά δείγματα

1.3.5.1 Δείγματα για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε εκπλύματα ζυθοποιίας

Τα δείγματα προς ανάλυση ήταν εκπλύματα από ζυθοποιία (KÖNIG BRAUEREI, Duisburg, Germany). Τα δείγματα αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλό pH και δύσκολη μήτρα. Γι' αυτό είναι απαραίτητη η αραίωση των δειγμάτων με έναν υψηλό συντελεστή αραίωσης πριν την ανάλυση. Η διαδικασία καθαρισμού κλειστών κυκλωμάτων, γνωστή και ως επιτόπια διαδικασία καθαρισμού (cleaning-in-place process, CIP), εφαρμόζεται με επιτυχία τα τελευταία χρόνια στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει δύο στάδια: το πρώτο στάδιο είναι το στάδιο της διάσπασης «cracking» των πρωτεϊνών, φαινολικών ενώσεων, σακχάρων μεγάλου μοριακού βάρους, κ.ά. από τα δοχεία ζύμωσης με υπεροξειδίο του υδρογόνου και το δεύτερο στάδιο είναι αυτό της απολύμανσης των δοχείων μετά το τέλος του κύκλου παραγωγής. Και στα δύο στάδια διατηρείται υψηλό pH (11-13) λόγω του καυστικού νατρίου συγκέντρωσης 2-4% που χρησιμοποιείται. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε αλκαλικές συνθήκες σχηματίζει το υπερυδροξυλικό ανιόν το οποίο είναι πολύ δραστήριο και σ' αυτό οφείλονται οι λευκαντικές και απολυμαντικές του ιδιότητες [30].



Το στάδιο της διάσπασης γίνεται σε θερμοκρασίες 75-85°C και σε ατμοσφαιρική πίεση, ενώ το στάδιο της απολύμανσης περιλαμβάνει έξι βήματα, τα οποία είναι:

1. έκπλυση με χρησιμοποιημένο νερό για την απομάκρυνση των στερεών σωματιδίων από τα τοιχώματα των δοχείων,
2. προσθήκη καυστικού νατρίου 1% σε θερμοκρασία περιβάλλοντος,
3. προσθήκη καυστικού νατρίου 2-3% και υπεροξειδίου του υδρογόνου (1-3%) σε θερμοκρασία 70-80°C, το οποίο αφήνεται να αντιδράσει για 90 min,
4. έκπλυση με καθαρό νερό για την απομάκρυνση του καυστικού νατρίου,
5. προσθήκη νιτρικού οξέος 0,5% και υπεροξικού οξέος (250-350 ppm) για την εξουδετέρωση του υπολειμματικού καυστικού νατρίου και απολύμανση,
6. τελική έκπλυση με καθαρό νερό.

Τα δείγματα που αναλύθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο ελήφθησαν κατά τη διάρκεια και των δύο σταδίων, δηλαδή διάσπασης και καθαρισμού/απολύμανσης των δοχείων.

1.3.5.2 Δείγματα για τον προσδιορισμό της γλυκόζης

Ο προσδιορισμός της γλυκόζης έγινε σε δείγματα ορού ανθρώπινου αίματος τυχαίων ασθενών, 6 ώρες μετά την κατεργασία τους στο βιοχημικό εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Τα δείγματα παρέμειναν στο ψυγείο μέχρι την έναρξη των μετρήσεων. Η κατεργασία τους περιλαμβάνει τον διαχωρισμό με φυγοκέντριση του ορού από το θρόμβο (clot), εντός ημίωρου από τη δειγματοληψία, για να αποφευχθεί η γλυκόλυση της γλυκόζης. Μετά το διαχωρισμό του ορού από το θρόμβο, τα επίπεδα της γλυκόζης παραμένουν σταθερά για 24 ώρες [31-33].

Η σύσταση των φυσιολογικών δειγμάτων ορού σε γλυκόζη κυμαίνεται από 60 ως 120 mg·dL⁻¹ [34] και ο προσδιορισμός της αποτελεί διαγνωστική δοκιμή ρουτίνας στα κλινικά εργαστήρια. Αυξομειώσεις των συγκεντρώσεων γλυκόζης στο αίμα είναι δείκτες ύπαρξης υπογλυκαιμίας ή υπεργλυκαιμίας [35,36].



1.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1.4.1 Χρήση των παραγώγων της 4-αμινοαντιπυρίνης στον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Κατά την αντίδραση των επτά παραγώγων της 4-αμινοαντιπυρίνης με την επιλεγμένη αμίνη ή φαινόλη (ALPS ή DCPS) προκύπτει, σε διαφορετική απόδοση, ένα έγχρωμο προϊόν με εκτεταμένη συζυγία που έχει διαφορετική ένταση χρώματος και διαφορετικά φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά. Στον πίνακα 1.1 φαίνονται τα μέγιστα απορρόφησης για το καθένα από τα συστήματα που μελετήθηκαν και ο χρόνος ολοκλήρωσης της αντίδρασης για τα συγκεκριμένα πειράματα, που βρέθηκε με τη μέτρηση της μεταβολής της απορρόφησης στο μέγιστο του φάσματος απορρόφησης. Οι αντιδράσεις αυτές είναι ταχείες και τα έγχρωμα προϊόντα που σχηματίζονται είναι σταθερά για μεγάλο χρονικό διάστημα, πράγμα που καθιστά δυνατή τη χρήση τους για ταυτόχρονο προσδιορισμό μεγάλου αριθμού δειγμάτων υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Πίνακας 1.1: Φασματοσκοπικά και κινητικά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη συστημάτων

Αντ/τήρια σύζευξης	Δότες υδρογόνων		λ _{max} (nm)		Χρόνος αντίδρασης (min)		Απορρόφηση*	
	DCPS	ALPS	DCPS	ALPS	DCPS	ALPS	DCPS	ALPS
4-AAP	+	+	510	562	2	1	0,45	0,60
1,2-D	+	+	512	560	5	3	0,21	0,23
2,5-D	+	+	527	576	5	3	0,20	0,35
DAA	+	+	515	562	2	1	0,71	0,50
4-AEP	+	+	520	560	5	2	0,20	0,25
Cl-2,5-D	+	+	527	570	5	3	0,15	0,34
DAP	+	+	550	590	3	0,5	0,40	0,94
DADP	+	+	530	575	2	1	0,20	0,36

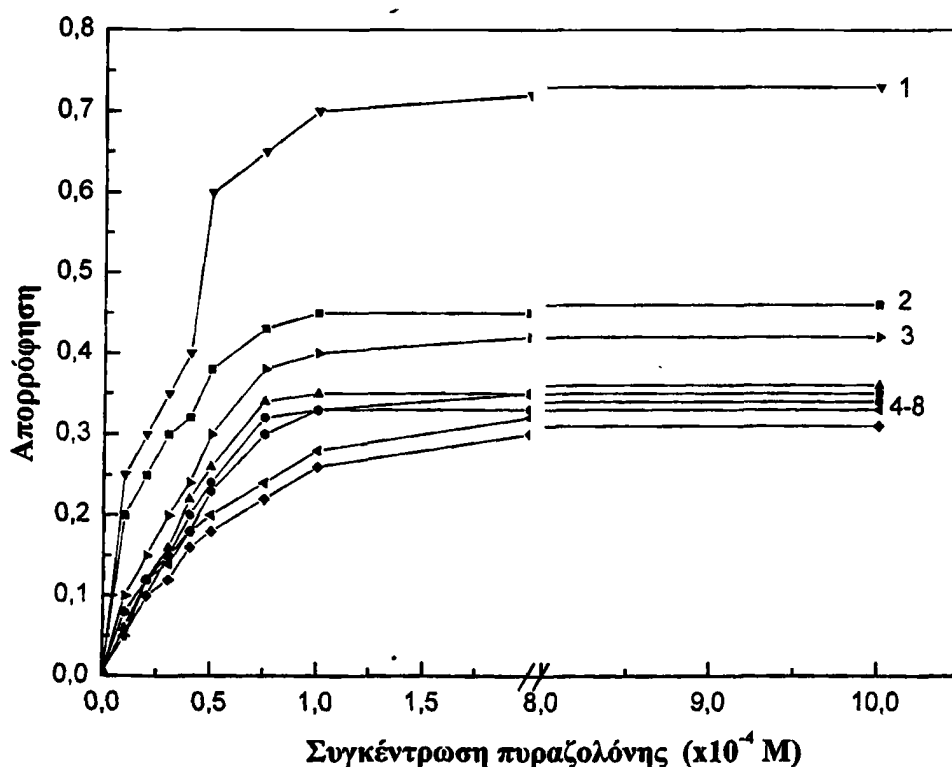
+ πραγματοποιείται αντίδραση

* Για συγκέντρωση H_2O_2 1×10^{-5} M, συγκέντρωση υπεροξειδάσης 10 U/mL, pH 7,0 σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M. Η συγκέντρωση των πυραζολονικών ενώσεων ήταν 0,1 mM σε κάθε περίπτωση. Η συγκεντρώσεις των DCPS και ALPS ήταν 0,3 mM.

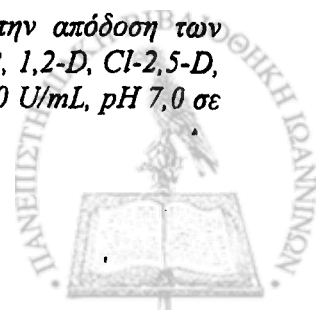
1.4.2 Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης των πυραζολονικών παραγώγων

Ο προσδιορισμός της απαιτούμενης συγκέντρωσης πυραζολόνης για την πληρέστερη αντίδρασή της με το ALPS ή το DCPS γίνεται με τη μεταβολή της συγκέντρωσής τους, ενώ οι άλλοι παράγοντες παραμένουν σταθεροί (univariate method). Η συγκέντρωσή τους είναι σημαντικός παράγοντας των αντιδράσεων σύμπλεξης λόγω και των επιδιωκόμενων χαμηλών συγκεντρώσεων υπεροξειδίου του υδρογόνου. Στα διαγράμματα των σχημάτων 1.5 και 1.6 φαίνεται η επίδραση της συγκέντρωσης των οκτώ πυραζολονών που μελετήθηκαν στην τιμή της απορρόφησης για τα έγχρωμα προϊόντα που σχηματίζουν με το ALPS και το DCPS.

Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M και pH 7,0. Η συγκέντρωση των πυραζολονικών ενώσεων μελετήθηκε σε περιοχή από 0,01 mM έως 1,00 mM, για τις αντιδράσεις με το DCPS και το ALPS και ως βέλτιστες συγκεντρώσεις βρέθηκαν 0,15 και 0,20 mM αντίστοιχα.

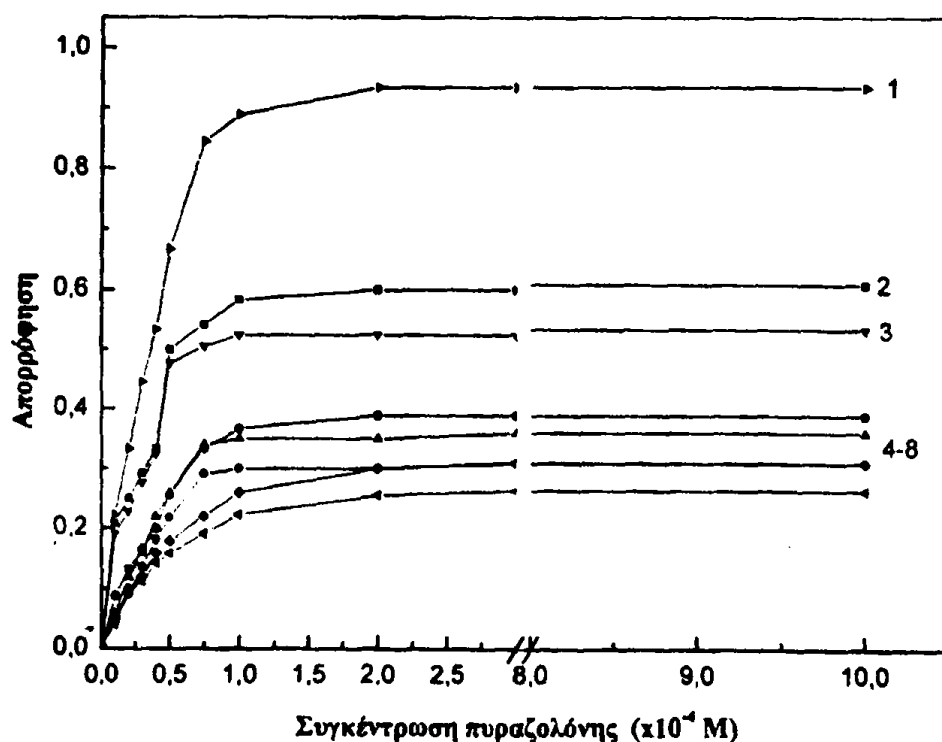


Σχήμα 1.5: Επίδραση της συγκέντρωσης των πυραζολονικών ενώσεων στην απόδοση των αντιδράσεών τους με το DCPS: 1. DAA, 2. 4-AAP, 3. DAP, 4-8. 2,5-D, DADP, 1,2-D, Cl-2,5-D, 4-AEP. Συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου 1×10^{-5} M, υπεροξειδάση 10 U/mL, pH 7,0 σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M

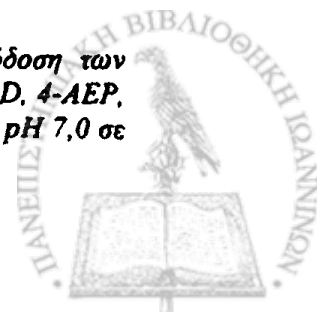


Συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 1,0 mM μειώνουν τη μετρούμενη τιμή της απορρόφησης, πιθανόν λόγω σχηματισμού παραπροϊόντων με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ανάπτυξη του χρώματος. Η αναλογία DCPS/πυραζολόνη και ALPS/πυραζολόνη για κάθε ένα από τα συστήματα που μελετήθηκαν κυμάνθηκε από 1,5:1 έως 3:1.

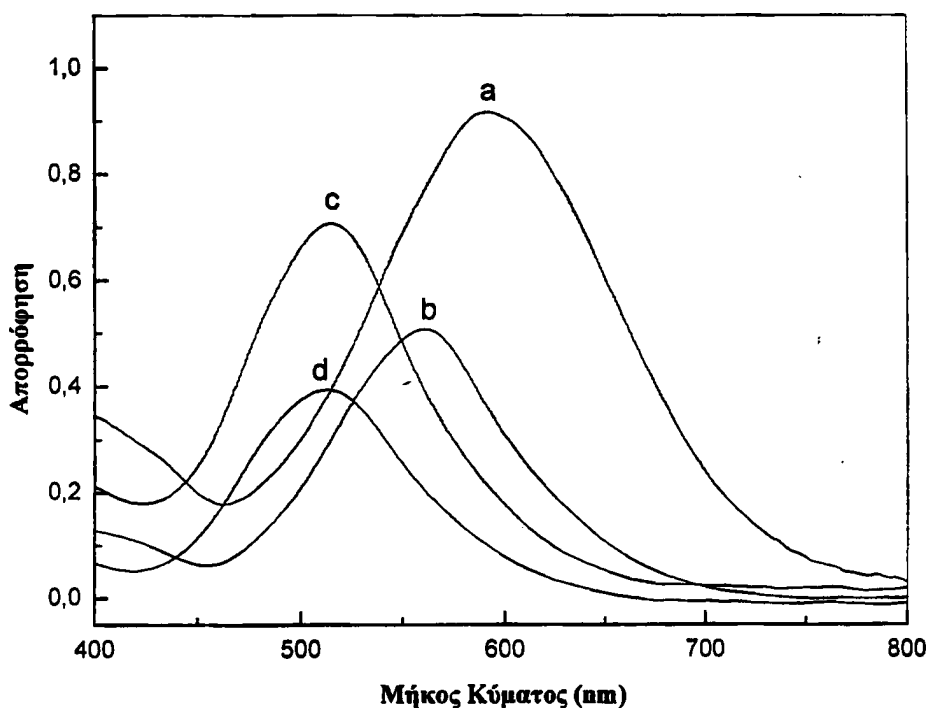
Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα βελτιστοποίησης των συγκεντρώσεων των πυραζολονικών ενώσεων, δύο από τα συνολικά 16 συστήματα που μελετήθηκαν δείχνουν αυξημένη ευαισθησία για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Τα συστήματα αυτά είναι: DAA/DCPS συγκριτικά με το 4-AAP/DCPS και DAP/ALPS σε σύγκριση με το 4-AAP/ALPS. Τα συστήματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν στον προσδιορισμό της γλυκόζης σε ορό ανθρώπινου αίματος. Τα υπόλοιπα εμφανίζουν χαμηλότερη ευαισθησία ή σε μερικές περιπτώσεις ίδια με την 4-αμινοαντιπυρίνη. Η επίδραση της συγκέντρωσης της υπεροξειδάσης μελετήθηκε επίσης και βρέθηκε 10 U/mL.



Σχήμα 1.6: Επίδραση της συγκέντρωσης των πυραζολονικών ενώσεων στην απόδοση των αντιδράσεών τους με το ALPS: 1. DAP, 2. 4-AAP, 3. DAA, 4-8. DADP, 2,5-D, Cl-2,5-D, 4-AEP, 1,2-D. Συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου 1×10^{-5} M, υπεροξειδάση 10 U/mL, pH 7,0 σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M



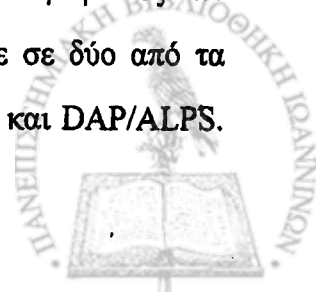
Τα φάσματα του σχήματος 1.7 δείχνουν της επίδραση που έχει η επέκταση της συζυγίας των χρωμοφόρων στην αύξηση της απορρόφησης σε συγκεκριμένο μήκος κύματος καθώς και στο φαινόμενο της βαθοχρωμικής μετατόπισης του φάσματος. Και τα δύο φαινόμενα είναι πολύ σημαντικά στις αναλυτικές εφαρμογές τους διότι η αύξηση της απορρόφησης συνεπάγεται αύξηση της ευαισθησίας της αναλυτικής μεθόδου ενώ το φαινόμενο της βαθοχρωμικής μετατόπισης συνεισφέρει στην άρση παρεμποδιστικής δράσης πολλών αναγωγικών ενώσεων, π.χ. της χολερυθρίνης στον ορό αίματος [37,38].



Σχήμα 1.7: Φάσματα απορρόφησης των έγχρωμων προϊόντων που σχηματίζονται από τις αντιδράσεις των a) DAP/ALPS, b) 4-AAP/ALPS, c) DAA/DCPS, d) 4-AAP/DCPS παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου/υπεροξειδάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M, pH 7,0. Συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου 1×10^{-5} M, υπεροξειδάση 10 U/mL

1.4.3 Επίδραση του pH και της θερμοκρασίας

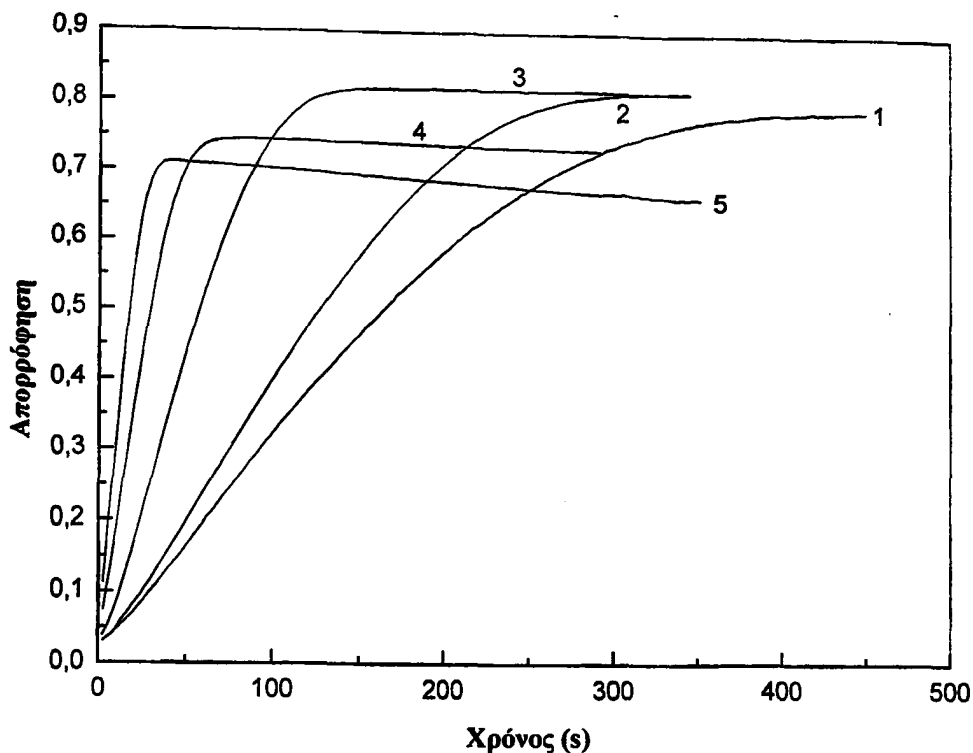
Το pH αποδεικνύεται ότι αποτελεί από τους πλέον καθοριστικούς παράγοντες των ενζυμικών αντιδράσεων [39]. Η μελέτη της επίδρασης του pH έγινε σε δύο από τα παραπάνω συστήματα και συγκεκριμένα στα συστήματα DAA/DCPS και DAP/ALPS.



Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών, οξικών, MOPS, HEPES και Tris-HCl σε διάφορες συγκεντρώσεις και ευρεία περιοχή pH. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι οι αντιδράσεις αυτές επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από το pH του ρυθμιστικού συστήματος δίνοντας μέγιστα απορρόφησης σε pH 7,0 για το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 Μ. Από τα υπόλοιπα ρυθμιστικά συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν, τα MOPS και HEPES παρουσιάζουν ενδιαφέρον σε περιοχές pH από 6,5 έως 7,5 αλλά σε μικρότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τα φωσφορικά. Σε πυκνότερα διαλύματά τους παρατηρείται μείωση της απορρόφησης πιθανόν λόγω κάποιων παράπλευρων αντιδράσεων που πραγματοποιούνται στις συνθήκες αυτές ή λόγω αύξησης της ιοντικής ισχύος.

Η θερμοκρασία επηρεάζει τόσο τη δραστηριότητα των ενζύμων όσο και την ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων [40]. Η επίδραση της θερμοκρασίας μελετήθηκε στο σύστημα DAP/ALPS και τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 1.8. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ταχύτητα και η απόδοση της αντίδρασης αυξάνονται ταυτόχρονα με την αύξηση της θερμοκρασίας έως 40°C, ενώ σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες η αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης δεν συμβαδίζει με την αύξηση της απορρόφησης του προϊόντος, πράγμα που πιθανόν να οφείλεται στη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε αυξημένες θερμοκρασίες ή σε μείωση της ενεργότητας του ενζύμου.





Σχήμα 1.8: Επίδραση θερμοκρασίας στην οξειδωτική σύμπλεξη του DAP με το ALPS:
 1. 20°C, 2. 30°C, 3. 40°C, 4. 50°C, 5. 60°C, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M, pH 7,0.
 Συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου 1×10^{-5} M, υπεροξειδάση 10 U/mL

1.4.4 Βαθμονόμηση του Συστήματος Ανίχνευσης του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου

Υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες χαράχθηκαν καμπύλες αναφοράς για τα συστήματα που μελετήθηκαν και για τις αντιδράσεις με το ALPS. Για τρία από τα συστήματα, 4-AAP, DAA και DAP, χαράχθηκαν καμπύλες αναφοράς και για τις αντιδράσεις τους με το DCPS. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 1.2 οι καμπύλες αναφοράς των οκτώ αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν ακολουθούν το νόμο του Beer για συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου μέχρι 250 $\mu\text{mol/L}$ με ιδιαίτερα χαμηλά όρια ανίχνευσης.



Πίνακας 1.2: Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου προσδιορισμού του H_2O_2

Αναλυτικό σύστημα	Εξίσωση καμπύλης αναφοράς*	r	Περιοχή γραμμικότητας ($\mu\text{mol/L}$)	LOD ($\mu\text{mol/L}$)
4-AAP/ALPS	$A = 0,006 + 0,054C$	$r = 0,9992$	5-250	0,5
4-AAP/DCPS	$A = 0,004 + 0,042C$	$r = 0,9994$	3-170	1,0
1,2-D	$A = -0,007 + 0,035C$	$r = 0,9984$	5-150	1,0
2,5-D	$A = 0,001 + 0,026C$	$r = 0,9988$	5-150	1,0
DAA/ALPS	$A = 0,003 + 0,038C$	$r = 0,9991$	5-180	1,0
DAA/DCPS	$A = 0,0022 + 0,058C$	$r = 0,9996$	1-250	0,3
4-AEP	$A = 0,0037 + 0,044C$	$r = 0,9995$	5-180	1,0
Cl-2,5-D	$A = 0,080 + 0,027C$	$r = 0,9971$	5-150	2,0
DAP/ALPS	$A = 0,001 + 0,122C$	$r = 0,9997$	2,5-200	0,1
DAP/DCPS	$A = 0,003 + 0,037C$	$r = 0,9992$	5-200	0,8
DADP	$A = 0,023 + 0,038C$	$r = 0,9995$	5-150	2,0

*A: απορρόφηση, C: συγκέντρωση H_2O_2 σε $\mu\text{mol/L}$

LOD: όριο ανίχνευσης (αναλογία σήματος προς θόρυβο = 3)

r - Συντελεστής συσχέτισης

1.4.5 Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της γλυκόζης

Για τον προσδιορισμό της γλυκόζης χαράχθηκαν δύο καμπύλες αναφοράς, η μία με το σύστημα ανίχνευσης υπεροξειδίου του υδρογόνου DAA/DCPS και η άλλη με το σύστημα DAP/ALPS (Πίνακας 1.3). Στα πειράματα βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό της γλυκόζης μελετήθηκε και η επίδραση της συγκέντρωσης της γλυκόζης οξειδάσης στην απόδοση των συστημάτων που χρησιμοποιήθηκαν. Από τη μελέτη αυτή βρέθηκε ως βέλτιστη συγκέντρωση γλυκόζης οξειδάσης 20 U/mL. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δεν προσφέρουν στην περαιτέρω απόδοση της αντίδρασης.



Πίνακας 1.3: Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου προσδιορισμού γλυκόζης

Αναλυτικό σύστημα	Εξίσωση καμπύλης αναφοράς*	r	Περιοχή γραμμικότητας (μmol/L)	LOD (μmol/L)
DAA/DCPS	A= 0,008+ 0,038C	r=0,9992	3-170	1
DAP/ALPS	A= 0,006 + 0,074C	r=0,9995	1-170	0,5

*A: απορρόφηση, C: συγκέντρωση γλυκόζης σε μmol/L

LOD: όριο ανίχνευσης (αναλογία σήματος προς θόρυβο = 3)

r - Συντελεστής συσχέτισης

1.4.6 Σταθερότητα των προϊόντων των αντιδράσεων

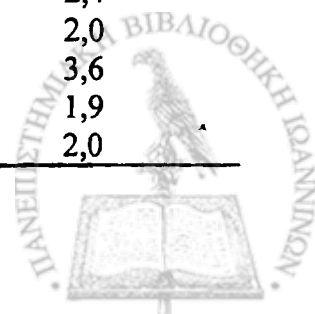
Η σταθερότητα των έγχρωμων προϊόντων που σχηματίζονται από τις αντιδράσεις σύμπλεξης των πυραζολονικών ενώσεων και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων είναι δύο σημαντικοί παράγοντες για την εφαρμογή του σε πραγματικά δείγματα. Τα αποτελέσματα των πινάκων 1.4 και 1.5 δείχνουν ικανοποιητική ακρίβεια της μεθόδου.

Πίνακας 1.4: Επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων της ίδιας ημέρας (εντός 8 ωρών)

Πυραζολόνη (ALPS)	Σχετική Τυπική Απόκλιση (%) μεταξύ αποτελεσμάτων της ίδιας ημέρας			
4-AAP	1,3	1,2	1,4	1,1
1,2-D	1,2	1,4	0,8	0,9
2,5-D	1,9	2,4	2,8	2,4
DAA	1,4	0,7	2,3	3,5
4-AEP	2,6	0,9	0,9	1,9
Cl-2,5-D	2,8	2,3	2,8	2,4
DAP	2,3	1,7	2,3	1,8
DADP	2,3	2,6	2,1	2,9

Πίνακας 1.5: Επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ ημερών

Πυραζολόνη (ALPS)	Σχετική Τυπική Απόκλιση (%) αποτελεσμάτων μεταξύ τριών διαφορετικών συνεχόμενων ημερών		
4-AAP	2,1	2,2	2,5
1,2-D	2,2	2,7	2,9
2,5-D	3,1	1,4	0,5
DAA	2,3	1,9	2,4
4-AEP	2,7	1,5	2,0
Cl-2,5-D	1,3	2,8	3,6
DAP	1,5	1,8	1,9
DADP	2,5	2,1	2,0



1.4.7 Παρεμποδίσεις

Η μελέτη της παρεμποδιστικής δράσης διαφόρων πιθανών παρεμποδιστών, όπως οξειδωτικών ενώσεων περοξειδικής φύσεως, κατιόντων, ανιόντων, ασκορβικού οξέος, χολερυθρίνης και πρωτεϊνών, έγινε με τη μέθοδο των μεικτών διαλυμάτων, παρουσία προτύπου διαλύματος 0,01mM υπεροξειδίου του υδρογόνου με συγκεντρώσεις των παρεμποδιζόντων όπως αυτές του πίνακα 1.6. Όπως φαίνεται στον πίνακα 1.6, παρεμποδιστική δράση παρατηρήθηκε μόνο σε συγκεντρώσεις που πρακτικά δεν υπάρχουν στα πραγματικά δείγματα. Κατά τον προσδιορισμό της γλυκόζης, η παρεμπόδιση από το ασκορβικό οξύ, τις πρωτεΐνες (αλβουμίνη ορού βοοειδούς) και τη χολερυθρίνη αίρεται από τη μεγάλη αραιώση των δειγμάτων πριν την ανάλυση με τα προτεινόμενα συστήματα.

Πίνακας 1.6: Παρεμποδιστική δράση διαφόρων ουσιών στον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου (για το σύστημα DAP/ALPS). Απόκλιση 5% από την τιμή του A_{max} που δίνει το H_2O_2 .

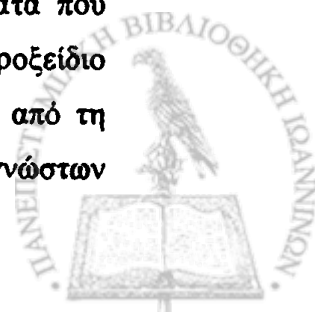
Παρεμποδίζουσα ουσία ^a	Μέγιστη επιτρεπόμενη πολλαπλάσια συγκέντρωση παρεμποδιστή έναντι H_2O_2
K^+ , Na^+ , NO_3^- , SO_4^{2-} , NH_4^+ , Cl^- , F^- , PO_4^{3-}	500
Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+}	100
Fe^{3+} , Cr(VI), Co^{2+}	50
Fe^{2+} , Hg^{2+}	10
Υπεροξικό οξύ	200
Ασκορβικό οξύ	50
Χολερυθρίνη	100
BSA ^b	50

^a Τα κατιόντα προστέθηκαν παρουσία 0,01 M EDTA.

^b Αλβουμίνη ορού βοοειδούς

1.4.8 Εφαρμογές στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων

Η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού υπεροξειδίου του υδρογόνου και γλυκόζης εφαρμόστηκε στον προσδιορισμό τους σε πραγματικά δείγματα. Στα δείγματα που προέρχονται από εκπλύματα ζυθοποιίας δεν ανιχνεύτηκε υπολειμματικό υπεροξείδιο του υδρογόνου διότι η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μετά από μια εβδομάδα από τη δειγματοληψία. Έτσι για τη μελέτη της επίδρασης της μήτρας (matrix) των αγνώστων



δειγμάτων έγιναν πειράματα ανάκτησης στα δείγματα με την προσθήκη προτύπων διαλυμάτων υπεροξειδίου του υδρογόνου. Μετά από αραιώση έως 1000 φορές, τα αποτελέσματα που ελήφθησαν φαίνονται και στον πίνακα 1.7. Η ανάκτηση της μεθόδου κυμαίνεται στην περιοχή 96-101 %.

Πίνακας 1.7: Ανάκτηση προτύπων διαλυμάτων υπεροξειδίου του υδρογόνου

Δείγμα	Προστιθέμενη ($\times 10^{-4}$ M)		Μετρούμενη ($\times 10^{-4}$ M)*		Ανάκτηση (%)	
	DAA/ DCPS	DAP/ ALPS	DAA/ DCPS	DAP/ ALPS	DAA/ DCPS	DAP/ ALPS
1	0,100	0,100	0,095	0,096	95	96
2	0,300	0,300	0,290	0,295	97	98
3	0,500	0,500	0,505	0,505	101	101

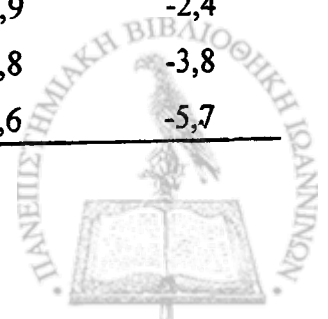
* μέσος όρος τριών μετρήσεων

Στον πίνακα 1.8 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τον προσδιορισμό της γλυκόζης σε ορό ανθρώπινου αίματος. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με την προτεινόμενη μέθοδο εμφανίζουν στις περισσότερες των περιπτώσεων μικρές αρνητικές αποκλίσεις σε σύγκριση με τη μέθοδο της εξοκινάσης.

Πίνακας 1.8: Προσδιορισμός γλυκόζης σε ορό ανθρώπινου αίματος

Δείγμα	Προτεινόμενη μέθοδος* (mg/dL)		Μέθοδος αναφοράς (mg/dL)	Σχετικό σφάλμα (%)	
	DAA/DCPS	DAP/ALPS	Εμπορικό kit**	DAA/DCPS	DAP/ALPS
1	117±0,85	118±0,90	122	-4,1	-3,3
2	108±0,65	107±0,55	111	-2,7	-3,6
3	260±0,60	260±0,65	262	-0,8	-0,8
4	71±0,50	74±0,85	74	-4,0	0
5	109±0,30	108±0,30	110	-0,9	-1,8
6	99±0,45	100±0,95	102	-2,9	-1,9
7	115±0,20	115±0,10	117	-1,7	-1,7
8	164±0,90	165±0,50	169	-2,9	-2,4
9	102±0,35	102±0,65	106	-3,8	-3,8
10	83±0,95	82±0,50	87	-4,6	-5,7

*Μέσος όρος τριών μετρήσεων \pm SD, **Μέθοδος της εξοκινάσης



1.5 Συμπεράσματα

Τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των συστημάτων που μελετήθηκαν είναι:

- Η σταθερότητα των αντιδραστηρίων και των προϊόντων των αντιδράσεων,
- Δεν σχηματίζουν προϊόντα απουσία υπεροξειδάσης,
- Είναι ευδιάλυτα στο νερό,
- Από τις ενζυμικές αντιδράσεις παράγονται υδατοδιαλυτά κινουειδή προϊόντα τα οποία πιθανόν να είναι και τα μοναδικά προϊόντα των αντιδράσεων αυτών,
- Τα έγχρωμα προϊόντα απορροφούν έντονα στην ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, οδηγώντας σε πιο ευαίσθητες μεθόδους,
- Οι αντιδράσεις είναι ταχείες, αποδεικνύοντας ότι η ανάπτυξη των χρωμάτων οφείλεται στις ενζυμικές αντιδράσεις και η έντασή τους σχετίζεται με το υπόστρωμα που προσδιορίζεται.



Βιβλιογραφία

- [1] A. Moody, S. Setford and S. Saini, *Analyst*, 126 (2001) 173.
- [2] U. Sansal and G. Somer, *Food Chem.*, 65 (1999) 259.
- [3] K. Kosaka, H. Yamada, S. Matsui, S. Ecigo and K. Shishida, *Environ. Sci. Technol.*, 32 (1998) 3821.
- [4] P. Westbroek, E. Temmerman and P. Kiekens, *Anal. Chim. Acta*, 385 (1999) 423.
- [5] J. Peinado, F. Toribio and D. Perez-Bendito, *Talanta*, 33 (1986) 914.
- [6] G. Boullion, C. Lick and K. Schank, in *The Chemistry of Functional Groups, Peroxides*, S. Patai Ed., John & Wiley, London, 1983.
- [7] J. Meyer and U. Karst, *Anal. Chim. Acta*, 401 (1999) 191.
- [8] P. Fossati, L. Prencipe and G. Berti, *Clin. Chem.*, 26 (1980) 227.
- [9] M. Zhou, Z. Diwu, N.P. Voloshina and R.P. Haugland, *Anal. Biochem.*, 253 (1997) 162.
- [10] K. Zaitsou and Y. Ohkura, *Anal. Biochem.*, 109 (1980) 109.
- [11] A.N.P. Hiner, E.L. Raven, R.H.F. Thorneley, F. Garcia-Canovas, J.N. Rodrigues-Lopez, *J. Inorg. Chem.*, 91 (2002) 27.
- [12] G.N. La Mar, J.S. de Ropp, K.M. Smith and K.C. Langry, *J. Biol. Chem.*, 256 (1981) 237.
- [13] R.W. Noble and Q.H. Gibson, *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 2409.
- [14] Deerfield Bach, *Methods of Enzymatic Analysis, Fundamentals*, Vol. I, 3rd Edition, Verlag Chemie, Weinheim, 1983.
- [15] H.A. Mottola, B.E. Simpson and G. Gorin, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 410.
- [16] S. Conyers and D. Kidwell, *Anal. Biochem.*, 192 (1991) 207.
- [17] P. Trinder, *Ann. Clin. Biochem.*, 6 (1969) 24.
- [18] E. Emerson, *J. Org. Chem.*, 13 (1948) 532.



- [19] *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 17th Ed., American Public Health Association, New York, 1989, 5-51.
- [20] D. Barham and P. Trinder. *Analyst*, 97 (1972) 142.
- [21] K. Famaoku, Y. Murao and K. Akiura, *Anal. Chim. Acta*, 136 (1982) 113.
- [22] Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, G.A. Pilidis and M.I. Karayannis, *Anal. Chim. Acta*, 403 (2000) 315.
- [23] T.H. Moss, A. Ehrenberg and A.J. Bearden, *Biochemistry*, 8 (1969) 4159.
- [24] P.C. Andrews and N.I. Krinsky, *Anal. Biochem.*, 127 (1982) 346.
- [25] R.J. Barton, K.E. Johnson, B.E. Robertson, F.W. Yerhoff and S. Hu, *Can. J. Chem.*, 65 (1987) 2082.
- [26] S.S. Razola, E. Aktas, J.C. Vire and J.M. Kauffmann, *Analyst*, 125 (2000) 79.
- [27] Worthington Biochemical Corporation, *Enzymes & Biochemicals Catalogue*, Lakewood, NJ, 1995.
- [28] M.W. Stein, *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York, 1963, p 117.
- [29] A. Williams, *Introduction to the Chemistry of Enzyme Action*, McGraw-Hill, London, 1969, p1-25.
- [30] F. Nitzsche, *Personal Communication*, König Brauerei, Duisburg, Germany, 1998.
- [31] H. Tolonen, K. Kuulasmaa, T. Laatikainen, H. Wolf, *European Health Risk Monitoring*, Finnish National Public Health Institute, Helsinki, 2002.
- [32] R.J.L. Bonder and D.C. Mead, *Clin. Chem.*, 20 (1974) 586.
- [33] International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Recommendation on reporting results for blood glucose, *Clin. Chim. Acta*, 307 (2001) 205.
- [34] Merck, *Clinical Laboratory*, 11th Edition, E. Merck, Darmstadt, F.R.G. 1974.
- [35] J.B. Henry, *Clinical Chemistry, Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, 15th Edition, I. Davidson and J.B. Henry, Edit., Saunders, Philadelphia, 1974.
- [36] N.W. Caraway, *Fundamentals of Clinical Chemistry*, N.W. Tietz, Edit., Saunders, Philadelphia, 1974.
- [37] P.A. Clapp, D.E. Evans and T.S.S Sheriff, *Anal. Chim. Acta*, 218 (1989) 331.



- [38] M. Zhu, X. Huang, L. Liu and H. Shen, *Talanta* 44 (1997) 1407.
- [39] G.G. Guilbault, P.J. Brignac and M. Juneau, *Anal. Chem.*, 40 (1968) 1256.
- [40] A.L. Lazrus, G.L. Kok, S.N. Gitlin and J.A. Lind, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 917.



**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ
ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑ F.I.A ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ ΜΕ
ΤΡΙΧΟΕΙΔΗ ΚΥΨΕΛΙΔΑ ΜΕΓΑΛΗΣ ΟΠΤΙΚΗΣ
ΔΙΑΔΡΟΜΗΣ. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ
ΕΚΠΛΥΜΑΤΩΝ ΖΥΘΟΠΟΙΑΣ.**

2.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

• Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η ανάπτυξη μιας μεθόδου για τον ενζυμικό προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου με ανάλυση δια εγχύσεως δείγματος σε συνεχή ροή (F.I.A). Η μέθοδος βασίζεται σε μια τροποποιημένη αντίδραση Trinder, στην οποία η 4-αμινοαντιπυρίνη (4-AAP) αντικαθίσταται με μια διαμινοπυραζολόνη (DAP: 4-αμινο-5-(4-αμινοφαινυλο)-1-μεθυλο-2-φαινυλο-1,2-διϋδρο-3H-πυραζολ-3-όνη), ενώ η υπεροξειδάση (HRP) ακινητοποιείται πάνω σε υάλινα σφαιρίδια ελεγχόμενου πορώδους τροποποιημένα με προπυλοαμίνη για την κατασκευή ενός ενζυμικού αντιδραστήρα πακεταρισμένης κλίνης. Ως μέθοδος ακινητοποίησης της υπεροξειδάσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ομοιοπολικής σύνδεσης μετά από την οξείδωσή της με υπεριοξικό νάτριο.

Στο τμήμα αυτό της διατριβής περιγράφεται για πρώτη φορά ένα σύστημα ανάλυσης με έγχυση σε συνεχή ροή, με ενζυμικό αντιδραστήρα, εφοδιασμένο με τριχοειδή κυψελίδα μεγάλης οπτικής διαδρομής (Liquid Waveguide Capillary Cell – LWCC).

Κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας, το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι 4 nmol/L υπεροξείδιο του υδρογόνου (σήμα/θόρυβο=3). Η καμπύλη αναφοράς καλύπτει την περιοχή 20-700 nmol/L υπεροξείδιο του υδρογόνου, ενώ η σχετική τυπική

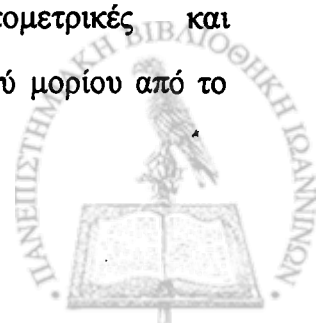


απόκλιση, για συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου 300 nmol/L, είναι 1,7% (n=7). Η μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία στον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε δείγματα από επιτόπια διαδικασία καθαρισμού κλειστών κυκλωμάτων (cleaning-in-place process - CIP).

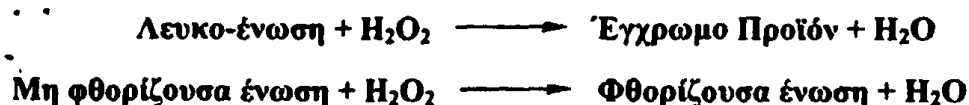
2.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Την τελευταία εικοσαετία το υπεροξείδιο του υδρογόνου χρησιμοποιείται ευρύτατα στις διεργασίες λεύκανσης και απολύμανσης σε βιομηχανική κλίμακα [1]. Η καλύτερη εξήγηση σε μια τέτοια αναγέννηση στη χρήση του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι οι πλεονεκτικές οικολογικές του ιδιότητες (ελευθερώνεται οξυγόνο και νερό από αντιδράσεις όπου συμμετέχει) σε σύγκριση με τα κοινώς χρησιμοποιούμενα προϊόντα, όπως τα χλωριωμένα παράγωγα (NaOCl και NaOCl_2), τα οποία παράγουν χλωριωμένες ενώσεις στις διεργασίες όπου συμμετέχουν [2]. Επίσης, μεγάλο είναι το ενδιαφέρον πάνω στην έρευνα για την ανάπτυξη αξιόπιστων μεθόδων για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου με άμεση εφαρμογή σε πολλούς τομείς, όπως τα τρόφιμα, τα φαρμακευτικά παρασκευάσματα και το περιβάλλον.

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου παράγεται ή καταστρέφεται σε διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις, όπου συμμετέχουν οξειδάσες, όπως η υπεροξειδάση. Έτσι ο προσδιορισμός του παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον στην κλινική χημεία ως αναγκαίο βήμα για τον προσδιορισμό αναλυτών κλινικού ενδιαφέροντος. Λόγω της αυξανόμενης χρήσης του, έχουν αναπτυχθεί πολλές αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό του. Οι σημαντικότερες περιλαμβάνουν τις φασματοφωτομετρικές, φθορισμομετρικές, αμπερομετρικές, ποτενσιομετρικές τεχνικές, καθώς και μεθόδους που στηρίζονται στην χημειοφωταύγεια και βιοφωταύγεια [3-17]. Οι πλέον χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι οι φασματοφωτομετρικές λόγω της πληθώρας των αντιδράσεων και της απλότητας του ανιχνευτικού συστήματος. Οι περισσότερες φασματοφωτομετρικές και φθορισμομετρικές μέθοδοι βασίζονται στην οξείδωση ενός οργανικού μορίου από το



υπεροξειδίου του υδρογόνου, παρουσία υπεροξειδάσης, σε προϊόντα που απορροφούν ή φθορίζουν σύμφωνα με τους παρακάτω γενικότερους μηχανισμούς:



Η υπεροξειδάση είναι μια αιμοπρωτεΐνη που καταλύει την οξείδωση από το υπεροξειδίου του υδρογόνου πολλών οργανικών ενώσεων σύμφωνα με τον μηχανισμό που έχει δοθεί στο πρώτο κεφάλαιο του πειραματικού μέρους.

Τα ένζυμα στην Αναλυτική Χημεία χρησιμοποιούνται σε διαλυτή μορφή και ακινητοποιημένα πάνω σε στερεό φορέα [18-22]. Ακινητοποίηση ή καθήλωση ενζύμου ονομάζεται ο περιορισμός του σε τεχνητή στερεά φάση (υλικό), η οποία διακρίνεται από την κύρια υγρή φάση.

Η υπεροξειδάση παρουσιάζει εκτεταμένη χρήση στην κατασκευή βιοαισθητήρων λόγω της ευκολίας στην ακινητοποίηση και της σταθερότητας που εμφανίζει σε ακινητοποιημένη μορφή. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται πολλές μέθοδοι ακινητοποίησης της υπεροξειδάσης, όπως η προσρόφηση στην επιφάνεια μεμβρανών ή στα εσωτερικά τοιχώματα πλαστικών σωλήνων, η ομοιοπολική σύνδεση σε τροποποιημένα πορώδη υλικά (γυάλινα σφαιρίδια, χυτοσάνη, κ.ά), και ο εγκλωβισμός σε sol-gel (sol-gel entrapment) [21].

Σε πολλές περιπτώσεις, απαιτείται ο προσδιορισμός πολύ μικρών ποσοτήτων υπεροξειδίου του υδρογόνου, όπως στο πόσιμο νερό, στον αέρα, τα θαλάσσια οικοσυστήματα, σε βιομηχανικές εφαρμογές, στην ανάλυση τροφίμων και σε ανοσοχημικούς προσδιορισμούς [22-28]. Εξαιτίας της αστάθειάς του και της πολυπλοκότητας των δειγμάτων, οι αναλυτικές τεχνικές για τον ακριβή και γρήγορο προσδιορισμό χαμηλών συγκεντρώσεων του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι λίγες.

Η τεχνική της ανάλυσης δια εγχύσεως σε συνεχή ροή (F.I.A) με φωτομετρικό ανιχνευτή είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε αρκετά μεγάλη περιοχή συγκεντρώσεων, καθώς και για επιτόπιες μετρήσεις. Ωστόσο,



με τέτοια συστήματα, ο προσδιορισμός πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων επιτυγχάνεται δύσκολα [29].

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε οπτικός μεταλλάκτης μεγάλης οπτικής διαδρομής, ο οποίος καθιστά δυνατό τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε επίπεδα μmol . Το σύστημα ροής με έγχυση δείγματος που χρησιμοποιείται είναι εφοδιασμένο με τριχοειδή κυψελίδα οπτικής διαδρομής 50 cm. Τα υλικά κατασκευής της κυψελίδας αυτής επιτρέπουν τη διάδοση του φωτός χωρίς άλλες απώλειες από αυτές που προκαλεί η απορρόφηση του δείγματος. Ο δείκτης διάθλασης του υλικού κατασκευής της κυψελίδας είναι μικρότερος απ' αυτόν των συνηθισμένων διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση. Σύμφωνα με το βασικό νόμο της φασματοφωτομετρίας, η οπτική διαδρομή της μετρητικής κυψελίδας είναι μια σημαντική παράμετρος ευαισθησίας που επιτρέπει την ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων χωρίς τη συνδρομή μεθόδων προσυγκέντρωσης [30,31].

Αντικαθιστώντας την 4-αμινοαντιπυρίνη (4-AAP) με την 4-αμινο-5-(4-αμινοφαινυλο)-1-μεθυλο-2-φαινυλο-1,2-διδυδρο-3H-πυραζολ-3-όνη (DAP), και το 3,5-διχλωρο-2-υδροξυφαινυλοσουλφονικό οξύ (DCPS) με το μετά νατρίου άλας της (N-αιθυλο-N-(3-σουλφοπροπυλο))-ανιλίνης (ALPS) στην αντίδραση Grinder επιτυγχάνεται ο σχηματισμός ενός εκτεταμένου συζυγιακού συστήματος με αυξημένη βαθυχρωμία, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας της αναλυτικής μεθόδου [32].

Η μελέτη της αντίδρασης αυτής εκτίθεται στο πρώτο κεφάλαιο του πειραματικού μέρους και οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης αυτής με τα συμπεράσματα της μελέτης μεταφέρονται και προσαρμόζονται στο σύστημα ροής με σκοπό την ανάπτυξη μιας μεθόδου με έγχυση δείγματος σε ροή για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε πραγματικά δείγματα.



2.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.3.1 Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν, είτε αναλυτικού είτε του μέγιστου διαθέσιμου βαθμού καθαρότητας. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε διπλά απεσταγμένο ύδωρ.

Πρότυπο διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου: παρασκευάζεται με διαδοχικές αραιώσεις του εμπορικού διαλύματος 30% (Merck, Germany), το οποίο τιτλοδοτήθηκε με υπερμαγγανικό κάλιο (δευτερογενής πρότυπη ουσία).

Διάλυμα ALPS: το μετά νατρίου άλας της (N-αιθυλο-N-(3-σουλφοπροπυλο)-ανιλίνης παρασκευάζεται με διάλυση 0,0265 g του άλατος (Dojindo, Japan, 99%) σε 100 mL νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται σε ψυγείο εντός ογκομετρικής φιάλης και είναι σταθερό για ένα μήνα.

Διάλυμα DAP (διαμινοπυραζολόνη), 4-αμινο-5-(4-αμινοφαινυλο)-1-μεθυλο-2φαινυλο-1,2-διυδρο-3H-πυραζολ-3-όνη: παρασκευάζεται με διάλυση 0,0282 g της ουσίας σε 100 mL δισαπεσταγμένο νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται σε ψυγείο εντός ογκομετρικής φιάλης και είναι σταθερό για ένα μήνα.

Υπεροξειδάση από αγριοραφανίδα, (HRP-horseradish peroxidase), (E.C. 1.11.1.7, Sigma Type VI-A, ενεργότητας 1300 U/mg).

Ρυθμιστικά διαλύματα: παρασκευάζονται διαλύματα φωσφορικών, MOPS (3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid): 3-(N-μορφολινο)-προπανοσουλφονικό οξύ, HEPES (N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid): N-2-υδροξυαιθυλοπιπεραζινο-N'-αιθανο-σουλφονικό οξύ και Tris-HCl (tris-(hydroxy-methyl)aminomethane): τρις(υδροξυ-μεθυλο)-αμινομεθάνιο σε διάφορες συγκεντρώσεις και ευρεία περιοχή pH (όπως περιγράφονται στο πρώτο κεφάλαιο του πειραματικού μέρους).



2.3.2 Πραγματικά δείγματα

Τα δείγματα προς ανάλυση ήταν εκπλύματα από ζυθοποιία (KÖNIG BRAUEREI, Duisburg, Germany). Τα δείγματα αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλό pH και δύσκολη μήτρα. Έτσι, αραίωση των δειγμάτων έως και χίλιες φορές είναι απαραίτητη πριν την ανάλυση. Η αραίωση αυτή μπορεί να γίνει και κατά την διάρκεια της ανάλυσης προσθέτοντας στη διάταξη ένα επιπλέον κανάλι.

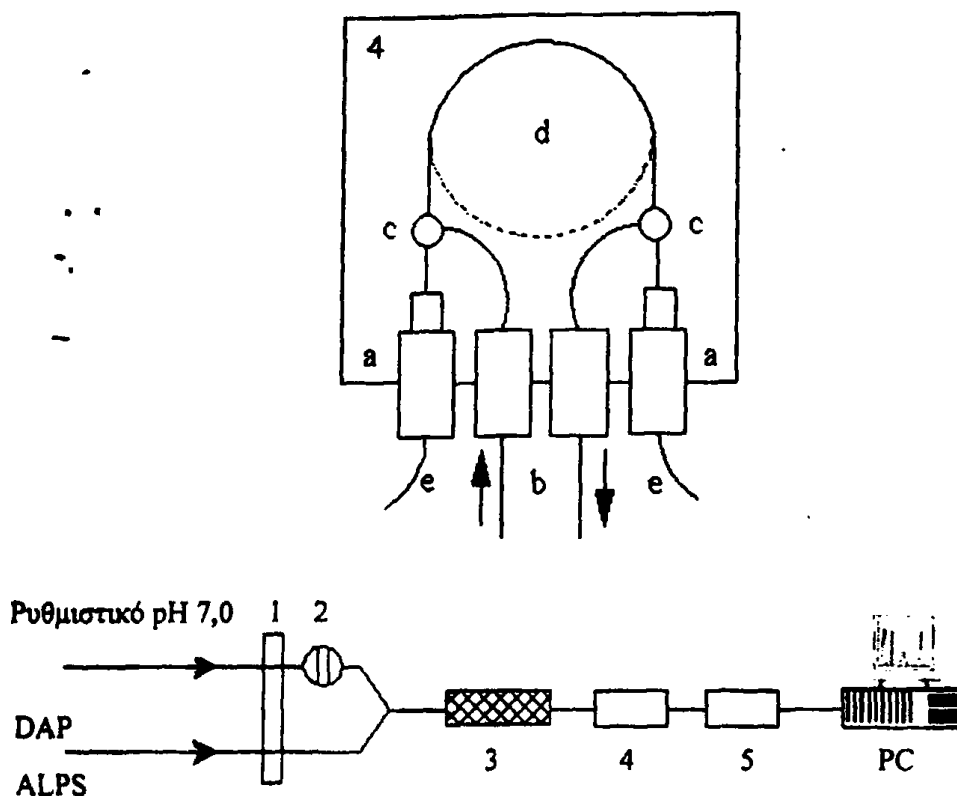
Η διαδικασία καθαρισμού κλειστών κυκλωμάτων γνωστή και ως επιτόπια διαδικασία καθαρισμού (cleaning-in-place process, CIP) εφαρμόζεται με επιτυχία τα τελευταία χρόνια στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει δύο στάδια: το πρώτο στάδιο είναι το στάδιο της διάσπασης «cracking» των πρωτεϊνών, φαινολικών ενώσεων, σακχάρων μεγάλου μοριακού βάρους, κ.ά., από τα δοχεία ζύμωσης, με υπεροξείδιο του υδρογόνου, και το δεύτερο στάδιο είναι αυτό της απολύμανσης των δοχείων μετά το τέλος του κύκλου παραγωγής. Και στα δύο στάδια διατηρείται υψηλό pH (11-13) λόγω του καυστικού νατρίου, συγκέντρωσης 2-4%, που χρησιμοποιείται. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε αλκαλικές συνθήκες σχηματίζει το υπερυδροξυλικό ανιόν, το οποίο είναι πολύ δραστικό, και σ' αυτό οφείλονται οι λευκαντικές και απολυμαντικές του ιδιότητες [33].

Τα δείγματα που αναλύθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο ελήφθησαν κατά τη διάρκεια και των δύο σταδίων, δηλαδή διάσπασης και καθαρισμού/απολύμανσης των δοχείων.

2.3.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ

Η διάταξη F.I.A που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου απεικονίζεται στο Σχήμα 2.1. Τα πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα εγχέονται στο φορέα μέσω μιας περιστροφικής βαλβίδας τεσσάρων κατευθύνσεων Rheodyne Type 50 Teflon (Cotati, CA, USA), με βρόχο μεταβαλλόμενου όγκου.





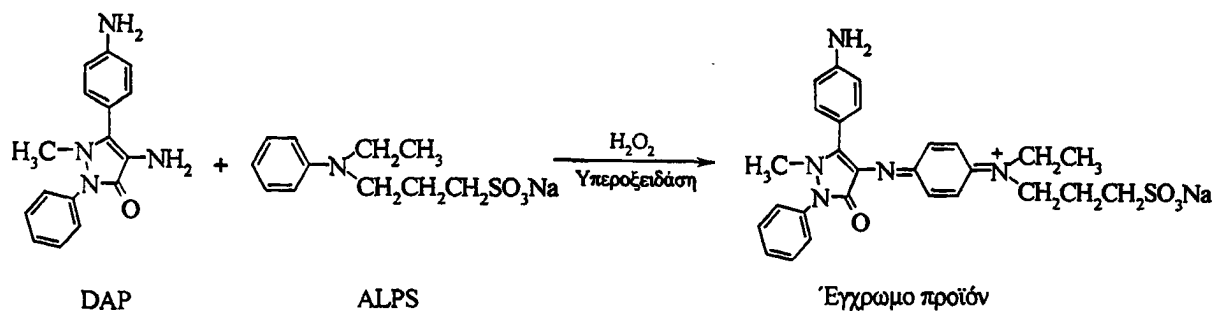
Σχήμα 2.1: Πειραματική διάταξη για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

1. Περισταλτική αντλία, 2. Βαλβίδα έγχυσης του δείγματος, 3. Ενζυμικός αντιδραστήρας,
4. LWCC-τριχοειδής κυψελίδα μεγάλης οπτικής διαδρομής (a. συνδέσεις οπτικών ινών, b. σημεία εισόδου-εξόδου διαλυμάτων, c. συνδετήρες τύπου "T", d. τριχοειδής κυψελίδα, e. οπτικές ίνες 400 μm), 5. φασματοφωτόμετρο με ανιχνευτή CCD.

Ο φορέας, ο οποίος παραλαμβάνει το δείγμα και το οδηγεί στην κυρίως ροή, προωθείται μέσω μιας περισταλτικής αντλίας τεσσάρων καναλιών Gilson Miniplus 3 (Middleton, USA).

Ο φορέας μαζί με τα πρότυπα διαλύματα ή τα δείγματα συναντούν στη συνέχεια τα διαλύματα του ALPS και DAP και προωθούνται στον ενζυμικό αντιδραστήρα (Σχήμα 2.1 (3)) όπου λαμβάνει χώρα η αντίδραση σχηματισμού του έγχρωμου προϊόντος (Σχήμα 2.2).





Σχήμα 2.2: Ενζυμική οξειδωτική συμπύκνωση του ALPS με το DAP παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Οι σωλήνες που χρησιμοποιούνται στην αντλία και τις συνδέσεις για τα αντιδραστήρια και τον εκάστοτε φορέα, είναι από υλικά PVC και Teflon και έχουν διάφορες διαμέτρους.

Η όλη διάταξη συνδέεται με το φωτομετρικό σύστημα το οποίο είναι εφοδιασμένο με κυψελίδα ροής μεγάλης οπτικής διαδρομής, όγκου 127 μL (World Precision Instruments, USA) και η μεταφορά του φωτός από την πηγή προς την κυψελίδα και από την κυψελίδα στον ανιχνευτή γίνεται μέσω οπτικών ινών.

Η κυψελίδα που χρησιμοποιήθηκε κατασκευάζεται από συνθετικό πυρίτιο, έχει εσωτερική διάμετρο 550 μm και καλύπτεται με πλαστικό υλικό (PEEK-PolyEtherEther Ketone) χαμηλού δείκτη διάθλασης και μια επιπλέον στρώση προστατευτικού υλικού. Η κυψελίδα είναι τοποθετημένη εντός μεταλλικού κουτιού διαστάσεων 30 x 30 cm σε σχήμα βρόχου. Στο μπροστινό μέρος του κουτιού βρίσκονται η είσοδος και η έξοδος του υγρού καθώς και οι συνδέσεις των οπτικών ινών. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία συναντά το διάλυμα μέσω συνδετήρων τύπου "T". Η πραγματική οπτική διαδρομή της κυψελίδας που χρησιμοποιήθηκε είναι 49,1 cm, σύμφωνα με τον κατασκευαστή.

Ο ανιχνευτής αποτελείται από μια μονάδα CCD (συσκευή ζεύξης φορτίου, OceanOptics, Inc, USA), 2048 εικονοστοιχείων (pixels), που επιτρέπει την παρακολούθηση της μεταβολής της απορρόφησης με το χρόνο σε διαφορετικές περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.

Η προώθηση των διαλυμάτων του φορέα (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M, pH 7,0), του ALPS (1,0 mM) και του DAP (0,5 mM) στο ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας, είναι συνεχής με ροή 0,6 mL/min, αντίστοιχα. Το διάλυμα του υπεροξειδίου του

υδρογόνου συναντά τα παραπάνω διαλύματα μέσω ενός συνδετήρα μικρού νεκρού όγκου τριών θέσεων (T-connector) και η αντίδραση, όπως περιγράφεται από την χημική εξίσωση του σχήματος 2.2, γίνεται στον ενζυμικό αντιδραστήρα, όπου έχει ακινητοποιηθεί η υπεροξειδάση (Σχήμα 2.1(3)).

Η εισαγωγή των προτύπων διαλυμάτων και των αγνώστων δειγμάτων, όγκου 120 μL, πραγματοποιείται με πνευματική αντλία. Η πλήρωση του βρόχου και η εισαγωγή του δείγματος στο ρεύμα του φορέα επιτυγχάνεται με την χειροκίνητη αλλαγή της θέσης βαλβίδας (θέση πλήρωσης ή έγχυσης αντίστοιχα).

Για τη συλλογή των δεδομένων από τον ανιχνευτή χρησιμοποιείται αναλογικοψηφιακός μετατροπέας (analog-to-digital converter) δώδεκα ψηφίων (bits) ADC500 (OceanOptics Inc., USA), ο οποίος συνδέεται μέσω καλωδίου διασύνδεσης (interface cable), και ελέγχεται από λογισμικό (SpectraWin 4.2, Topsensors, NL). Περισσότερες λεπτομέρειες του συστήματος ανίχνευσης δίνονται στο πρώτο κεφάλαιο του πειραματικού μέρους.

Το ύψος των κορυφών του μετρούμενου σήματος (απορρόφηση) επλέχτηκε ως μέτρο της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η συγκεκριμένη παράμετρος προτιμήθηκε λόγω της απουσίας θορύβων στο μετρούμενο σήμα.

Μετά την επιλογή της διάταξης αυτής, ακολούθησε η περαιτέρω βελτίωση των συνθηκών λειτουργίας της, με βάση την επίδραση την οποία έχουν οι διάφορες υδροδυναμικές, αλλά και χημικές παράμετροι, στο ύψος της λαμβανόμενης κορυφής, στο σχήμα και την επαναληψιμότητα των καμπυλών F.I.A.

2.3.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ

Για την ακινητοποίηση του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ομοιοπολικής σύνδεσης, παρουσία υπεριοδικών ιόντων, πάνω σε υάλινα σφαιρίδια ελεγχόμενου πορώδους τροποποιημένα με προπυλοαμίνη [34]. Η διαδικασία ακινητοποίησης του ενζύμου περιλαμβάνει τα εξής στάδια:



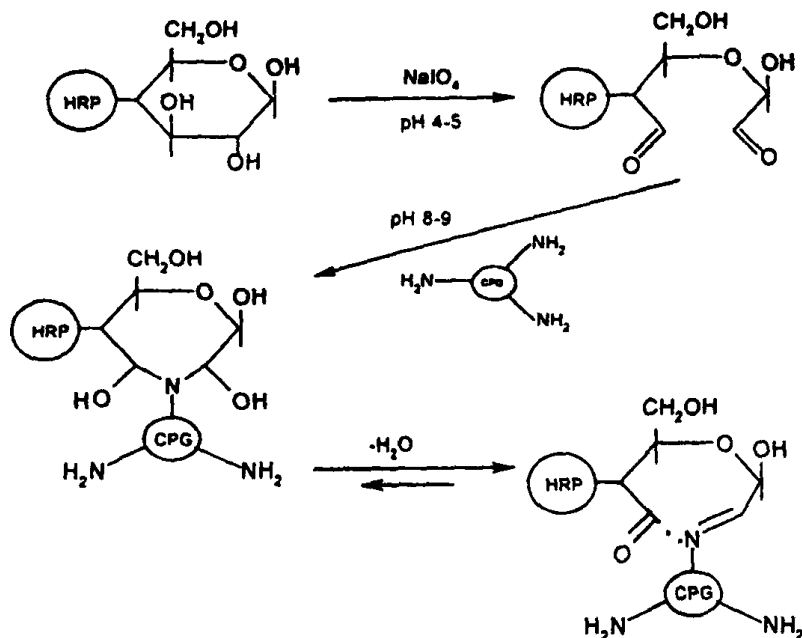
1. Οξείδωση του διαλύματος της υπεροξειδάσης από το υπεριωδικό νάτριο: Για το σκοπό αυτό 12 mg υπεροξειδάσης (ενεργότητας 1300 U/mg) διαλύονται σε 3 mL διπλά απεσταγμένο νερό και προστίθενται σε 0,6 mL διαλύματος 0,1 M υπεριωδικού νατρίου. Παρατηρείται μια μεταβολή χρώματος από χρυσο-καφέ σε πράσινο και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για περίπου 20 min.
2. Το διάλυμα της οξειδωμένης πλέον υπεροξειδάσης υφίσταται διαπίδυση έναντι δύο αλλαγών ρυθμιστικού διαλύματος (οξικού νατρίου-οξικού οξέος, pH 4,4) για 8 ώρες στους +4°C. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται μεμβράνες κυτταρίνης οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με EDTA. Η διαδικασία κατεργασίας περιλαμβάνει τον τεμαχισμό των μεμβρανών σε μεγάλα κομμάτια, τα οποία στη συνέχεια βυθίζονται σε διάλυμα EDTA 10 mM (pH 8,0) και το διάλυμα θερμαίνεται για 5 min στο 60 °C. Το διάλυμα του EDTA απορρίπτεται και οι μεμβράνες εκπλένονται με απονισμένο ύδωρ. Στη συνέχεια το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού, αφήνεται να κρυώσει, καλύπτεται με ύαλο ωρολογίου και διατηρείται στο ψυγείο [35].

Για την διαπίδυση χρησιμοποιούνται κομμάτια από τις κατεργασμένες μεμβράνες (3 cm κάθε μια) και ειδικοί πλαστικοί συνδετήρες.

Παράλληλα, τα υάλινα σφαιρίδια ελεγχόμενου πορώδους (pore size 500 Å, 200-400 mesh) τροποποιημένα με προπυλοαμίνη, αιωρούνται σε 1,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος βορικού νατρίου (0,2 mM, pH 8,6), και αμέσως μετά τη διαπίδυση το διάλυμα της οξειδωμένης υπεροξειδάσης προστίθεται στο αιώρημα και η αντίδραση ακινητοποίησης αφήνεται να πραγματοποιηθεί για 24 ώρες στους +4°C.

Η ακινητοποιημένη υπεροξειδάση εκπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M (pH 7,0) και διατηρείται εντός ψυγείου στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι την χρήση της. Τα σφαιρίδια με το ακινητοποιημένο ένζυμο έχουν μπεζ χρώμα. Η ακολουθία των αντιδράσεων που πραγματοποιούνται στη διαδικασία ακινητοποίησης φαίνεται στο σχήμα 2.3.





Σχήμα 2.3: Αλληλουχία αντιδράσεων κατά τη διαδικασία ακινητοποίησης της υπεροξειδάσης σε υάλινα σφαιρίδια τροποποιημένα με προπυλοαμίνη.

Για την ακινητοποίηση της υπεροξειδάσης έχουν χρησιμοποιηθεί όλες οι γνωστές μέθοδοι ακινητοποίησης κυρίως η ομοιοπολική σύνδεση με διάζω παράγωγα, ισοθειοκυανιούχα παράγωγα και γλουταραλδεύδη [36].

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πληθώρα εργασιών με ακινητοποιημένη υπεροξειδάση σε ύαλο ελεγχόμενου πορώδους με τη μέθοδο της γλουταραλδεύδης. Η χωρητικότητα της μεθόδου της γλουταραλδεύδης φθάνει τα 3,20 mg ενζύμου για κάθε g του φορέα ακινητοποίησης. Η σχετικά χαμηλή χωρητικότητα οφείλεται στο μικρό αριθμό ενεργών αμινοομάδων που υπάρχουν στο πρωτεϊνικό μέρος του ενζύμου. Η υπεροξειδάση από αγριοραφανίδα (HRP) περιέχει 6 αμινοομάδες που προέρχονται από τη λυσίνη, από τις οποίες μόνο οι δύο συμμετέχουν σε αντιδράσεις ακινητοποίησης [34,36,37].

Η μέθοδος των υπεριοδικών που χρησιμοποιήθηκε πλεονεκτεί στο ότι τα μόρια που συμμετέχουν στην αντίδραση ακινητοποίησης είναι υδατάνθρακες που περιέχονται σε ποσοστό 18% (w/w) στην υπεροξειδάση. Έτσι, η οξείδωση με υπεριοδικά παράγει 18 αλδεύδομάδες, οι οποίες συμμετέχουν στην αντίδραση ακινητοποίησης [38]. Χωρητικότητα των αντιδραστών που κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο αυτή ήταν 16,8 mg υπεροξειδάσης ανά g ύαλου.



2.3.5 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

Για την κατασκευή των αντιδραστήρων χρησιμοποιήθηκαν σωλήνες από PVC μήκους 5 cm και εσωτερικής διαμέτρου 1 mm. Για το γέμισμα των αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκε η περισταλτική αντλία, η οποία προωθεί το αιώρημα του φορέα ακινητοποίησης με το ένζυμο.

Το ενζυμικό διάλυμα προωθήθηκε στους αντιδραστήρες με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας για διάστημα 8 ωρών με ροή 0,4 mL/min, στους +4°C. Η κατεύθυνση ροής της αντλίας άλλαζε περιοδικά κάθε μια ώρα. Στην συνέχεια τα υλικά εκπλύνονται, προωθώντας διαδοχικά απεσταγμένο νερό, διάλυμα 0,5 M NaCl, απεσταγμένο νερό και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 mM (pH 7,0) για διάστημα 5, 60, 60 και 30 λεπτών αντίστοιχα.

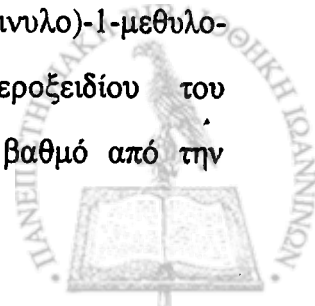
Μετά την παρασκευή τους οι αντιδραστήρες σφραγίζονται με parafilm στις δύο άκρες και φυλάσσονται στους +4°C, εντός του ρυθμιστικού διαλύματος ακινητοποίησης.

Και τα δύο άκρα του πακεταρισμένου αντιδραστήρα σφραγίζονται με υαλοβάμβακα και συνδέονται με σωλήνες Teflon. Το μήκος των αντιδραστήρων είναι περίπου 35 mm. Με τέτοιο μήκος αντιδραστήρα εξασφαλίζονται ικανοποιητικές τιμές απορροφήσεων, εκμηδενίζεται η πιθανότητα παρεμπόδισης της ροής (back – pressure) και γίνεται οικονομία στην κατανάλωση του ενζύμου.

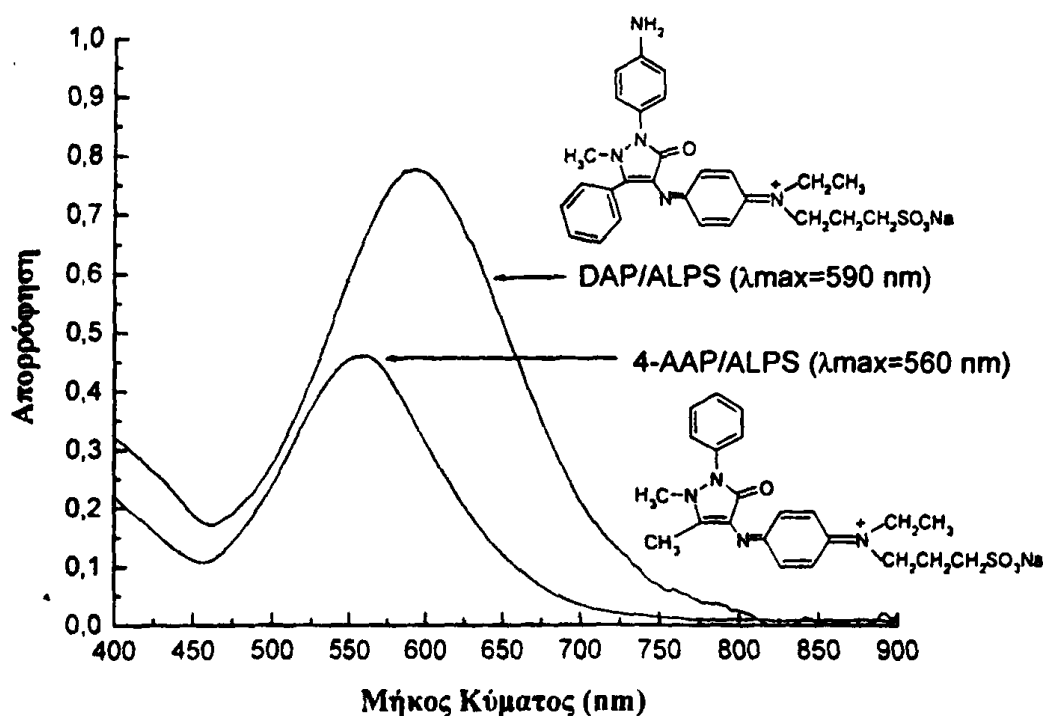
2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

2.4.1 Η χημική αντίδραση

Η χημική αντίδραση στην οποία βασίστηκε η ανάπτυξη της μεθόδου είναι μια αντίδραση οξειδωτικής συμπύκνωσης μεταξύ του μετά νατρίου άλατος της (N-αιθυλο-N-(3-σουλφοπροπυλο)-ανιλίνης (ALPS) και της 4-αμινο-5-(4-αμινοφαινυλο)-1-μεθυλο-2-φαινυλο-1,2-διϋδρο-3H-πυραζολ-3-όνης (DAP), παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (Σχήμα 2.2). Η αντίδραση καταλύεται σε σημαντικό βαθμό από την



υπεροξειδάση. Και τα δύο οργανικά μόρια που συμμετέχουν στην αντίδραση έχουν αμελητέα απορρόφηση στην ορατή περιοχή του φάσματος. Οι Madsen και Kromis χρησιμοποίησαν την αντίδραση της ALPS με την 4-αμινοαντιπυρίνη παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου και υπεροξειδάσης σε ένα συμβατικό σύστημα FIA για να προσδιορίσουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε όμβρια ύδατα [6]. Το όριο ανίχνευσης με τη μέθοδο αυτή ήταν 1×10^{-7} M υπεροξείδιο του υδρογόνου. Στην παρούσα μελέτη η χρήση της DAP βελτιώνει σημαντικά την ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου (Σχήμα 2.4) και σε συνδυασμό με το αναβαθμισμένο ανιχνευτικό σύστημα αποτελούν μια αναλυτική διάταξη για το γρήγορο και ακριβή προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου.



Σχήμα 2.4: Φάσματα απορρόφησης των προϊόντων της ενζυμικής οξείδωσης του ALPS με DAP και 4- AAP, αντίστοιχα.

2.4.2 Βελτιστοποίηση της πειραματικής διάταξης και των παραμέτρων των πειραμάτων

Οι παράμετροι οι οποίες μελετήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν είναι: το pH λειτουργίας, η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος, η συνολική ροή, οι επιμέρους



ροές, ο όγκος του εγχυομένου δείγματος, το μήκος των αντιδραστήρων, οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων και η θερμοκρασία.

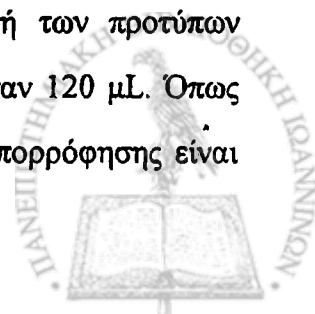
Όλα τα αντιδραστήρια παρασκευάστηκαν σε διπλά απεσταγμένο ύδωρ. Για τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων του συστήματος χρησιμοποιήθηκε μονοπαραμετρική μέθοδος: η μια από τις μελετούμενες παραμέτρους μεταβάλλεται, ενώ όλες οι άλλες μένουν σταθερές. Η περιοχή των μελετούμενων παραμέτρων και οι βέλτιστες τιμές φαίνονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 2.1. Βελτιστοποίηση πειραματικών παραμέτρων

Εξεταζόμενη παράμετρος (μονάδες)	Περιοχή μελέτης	Επιλεχθείσα τιμή
• Συνολική ροή (mL/min)	0,4–1,4	1,2
• Μήκος αντιδραστήρα ανάμειξης (m)	0,2–3,0	0,5
• Θερμοκρασία (°C)	20-40	25
• Συγκέντρωση φορέα (mol/L)	0,05-0,20	0,1
• Συγκέντρωση αντιδραστηρίων (mmol/L)		
ALPS	0,2-2,0	1,0
DAP	0,2-2,0	0,5
• Όγκος έγχυσης δείγματος (μL)	70-180	120 (σχήμα 2.5)
• pH	4,5-9,0	7,0

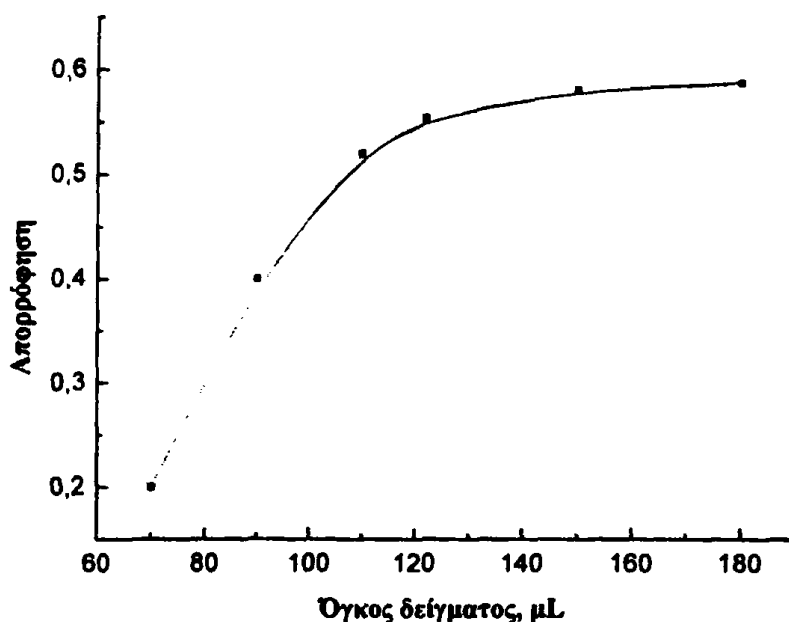
Οι επιμέρους και η συνολική ροή του συστήματος επηρεάζουν σημαντικά την απόδοση του συστήματος καθώς η επαφή του ενζύμου με το υπόστρωμα και η συνολική αντίδραση εξαρτάται άμεσα από αυτή τη δυναμική παράμετρο. Η βέλτιστη ταχύτητα ροής ήταν 1,2 mL/min και ικανοποιεί την ευαισθησία της μεθόδου (υψηλές κορυφές) καθώς και την απόδοσή της (35 δείγματα/ώρα). Χαμηλότερες ροές δίνουν ευρύτερες κορυφές λόγω της διασποράς του συστήματος.

Ο όγκος του βρόχου που χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή των προτύπων διαλυμάτων και των αγνώστων δειγμάτων στο ρεύμα του φορέα ήταν 120 μL. Όπως φαίνεται στο σχήμα 2.5, για μεγαλύτερους όγκους η αύξηση της απορρόφησης είναι



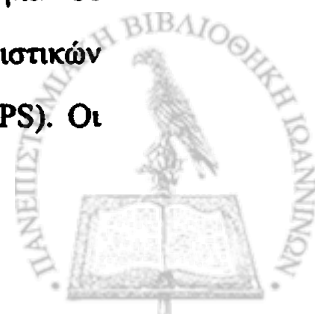
αμελητέα, ενώ παρατηρείται διαπλάτυνση των κορυφών. Για όγκους μικρότερους από 120 μL η παρατηρούμενη μείωση στην απόκριση του συστήματος οφείλεται στην μεγαλύτερη αραιώση του δείγματος από το φορέα. Κριτήριο για την επιλογή του κατάλληλου όγκου δεν είναι μόνο η ευαισθησία, αλλά και η ταχύτητα των μετρήσεων. Έτσι, η τελική επιλογή του όγκου του δείγματος έγινε με τη θεώρηση αυτών των παραμέτρων.

Η διασπορά του συστήματος υπολογίστηκε ως ο λόγος της μέγιστης απορρόφησης που λαμβάνεται όταν το υπεροξειδίο του υδρογόνου εισάγεται στο σύστημα μαζί με το φορέα και του ύψους της κορυφής προτύπου διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου το οποίο εγχέεται μέσω της περιστροφικής βαλβίδας. Η διασπορά του συστήματος κυμαίνεται από 1,15 ως 1,25.



Σχήμα 2.5: Επίδραση του όγκου του δείγματος στην απόκριση του συστήματος. Συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου 200 nM.

Ο αυστηρός έλεγχος του pH είναι σημαντικός για την ευαισθησία και την επαναληψιμότητα της μεθόδου. Διάφορα ρυθμιστικά συστήματα χρησιμοποιήθηκαν σε μια ευρεία περιοχή τιμών pH. Μελετήθηκε η επίδραση των παρακάτω ρυθμιστικών διαλυμάτων: TRISMA, φωσφορικά, οξικά, και Good's buffers (HEPES, MOPS). Οι



συγκεντρώσεις κυμάνθηκαν στην περιοχή από 0,10 έως 0,25 M και η περιοχή του pH κυμάνθηκε από 4,5 έως 9,0 για τα διάφορα ρυθμιστικά συστήματα. Η οξειδωτική συμπύκνωση του ALPS με το DAP επηρεάζεται από τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος όχι όμως από την περιοχή του pH στο ίδιο ρυθμιστικό σύστημα το οποίο κάλυπτε στενή περιοχή pH (5,5-7,5 για το ρυθμιστικό σύστημα των φωσφορικών). Ως ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα φωσφορικών 0,1 M με pH 7,0.

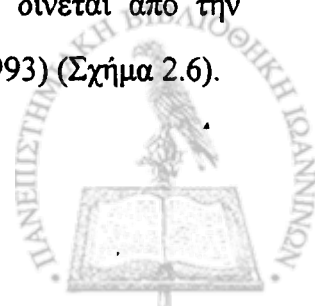
Η συγκέντρωση των ALPS και DAP μελετήθηκε επίσης και τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 2.1.

Η θερμοκρασία του συστήματος επηρεάζει την ενζυμική αντίδραση και την απόδοση της μεθόδου. Σε σχετικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, σε συνθήκες θερμικής κάθε φορά ισορροπίας, παρατηρήθηκε αύξηση της ευαισθησίας στην περιοχή 30°C έως 40°C και ελάττωση σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες, πιθανόν λόγω της αποικοδόμησης του πρωτεϊνικού τμήματος του ενζύμου. Παρόλο ότι ως βέλτιστη θερμοκρασία για τις περισσότερες ενζυμικές αντιδράσεις, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, προτείνεται η θερμοκρασία 37°C, στην περίπτωση μας συνιστούμε χαμηλότερη θερμοκρασία (25°C) για να έχουμε σταθερότερη γραμμή βάσης (baseline).

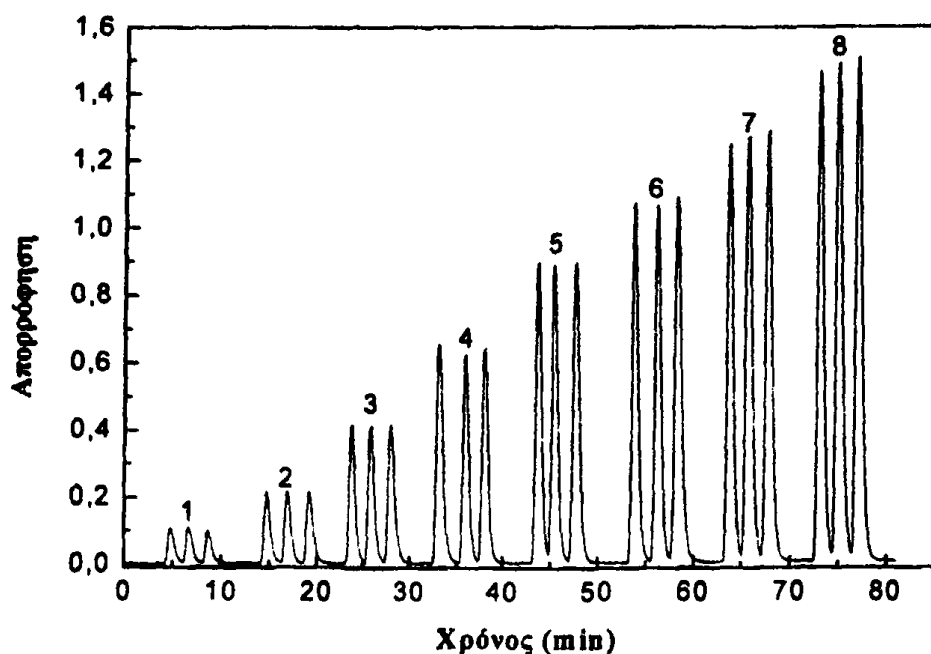
Από τη συνεκτίμηση των αποτελεσμάτων, που προέκυψαν από όλα των πειράματα βελτιστοποίησης, προκύπτει ότι πρέπει να επιλεχθούν κάποιες συμβιβαστικές τιμές, ώστε να εξασφαλιστεί, αφενός αποτελεσματική συμπλήρωση των αντιδράσεων και αφετέρου ικανοποιητική ταχύτητα και μέγιστα καμπυλών F.I.A.

2.5 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου

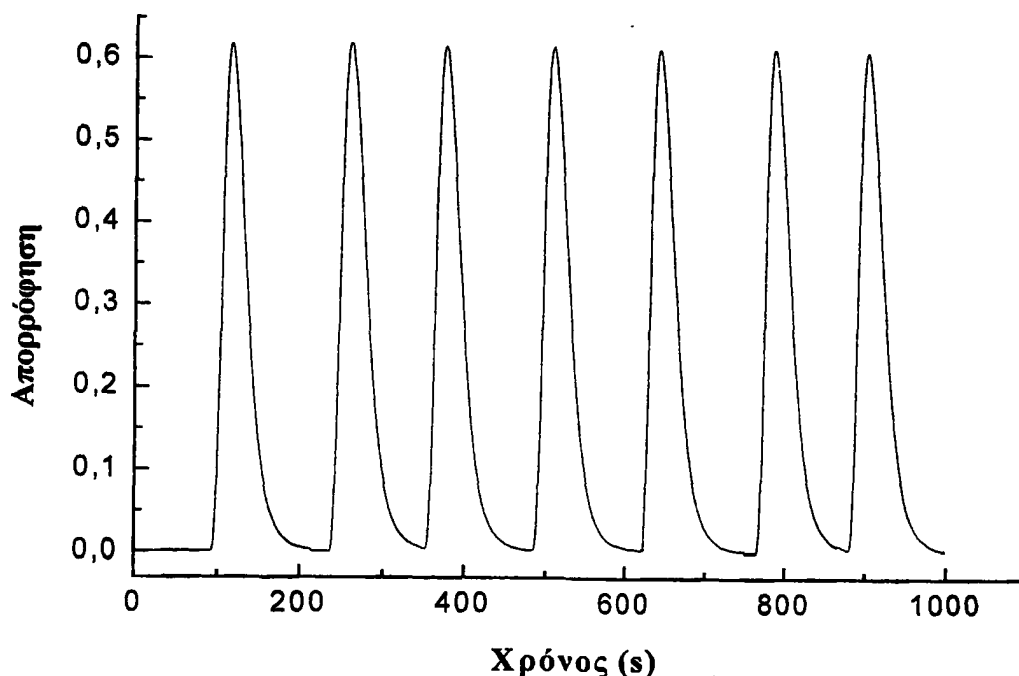
Η καμπύλη αναφοράς χαράχθηκε με τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες όπως περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο. Πρότυπα διαλύματα υπεροξειδίου του υδρογόνου που περιείχαν από 20 έως 700 nmol/L H₂O₂ χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, η οποία είναι γραμμική και δίνεται από την εξίσωση: $A_{\max} = 0,0095(\pm 0,002) + 0,0021(\pm 0,0002)[H_2O_2]$ ($r^2 = 0,9993$) (Σχήμα 2.6).



Το όριο ανίχνευσης ήταν 4 nmol/L υπεροξειδίου του υδρογόνου για $S/N = 3$. Η σχετική τυπική απόκλιση (επαναληψιμότητα της μεθόδου), για 7 επαναληπτικές μετρήσεις 300 nmol/L υπεροξειδίου του υδρογόνου, ήταν 1,7% (Σχήμα 2.7). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί επιτυχώς για τον προσδιορισμό χαμηλών συγκεντρώσεων υπεροξειδίου του υδρογόνου.



Σχήμα 2.6: Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου. 1) 50, 2) 100, 3) 200, 4) 300, 5) 400, 6) 500, 7) 600, 8) 700 nmol/L υπεροξειδίου του υδρογόνου. Οι άλλες συνθήκες όπως περιγράφονται στο κείμενο.



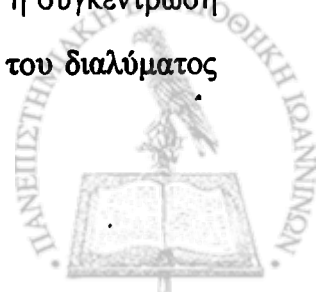
Σχήμα 2.7: Τυπικές καμπύλες απόκρισης της διάταξης FIA για τον υπολογισμό της σχετικής τυπικής απόκλισης της μεθόδου. Συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου 300 nmol/L. Οι άλλες συνθήκες όπως περιγράφονται στο πειραματικό μέρος.

2.6 Παρεμποδίζουσες ενώσεις και ανάλυση πραγματικών δειγμάτων

Η ενζυμική αντίδραση στην οποία βασίζεται η μέθοδος είναι εκλεκτική ως προς την επίδραση των οργανικών υπεροξέων, όπως το υπεροξικό οξύ, επειδή το ενεργό κέντρο της υπεροξειδάσης διακρίνει ανάμεσα σ' αυτό και το υπεροξείδιο του υδρογόνου λόγω ηλεκτροστατικών ή/και στερικών παραγόντων [39]. Έτσι, συγκεντρώσεις υπεροξικού οξέως 100 φορές μεγαλύτερες από αυτήν του υπεροξειδίου του υδρογόνου δεν αυξάνουν το μετρούμενο σήμα πάνω από 5%.

Στον Πίνακα 2.2 παρουσιάζονται οι διάφορες παρεμποδίζουσες ουσίες (κατιόντα και ανιόντα) που μελετήθηκαν για την επίδρασή τους κατά τον προσδιορισμό 500 nmol/L υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Η απόκλιση υπολογίστηκε συγκρίνοντας την κορυφή του σήματος F.I.A πριν και μετά την προσθήκη του παρεμποδιστικού. Ως παρεμπόδιση θεωρήθηκε η συγκέντρωση εκείνη η οποία παρήγαγε σήμα που απέκλινε κατά 5% από το σήμα του διαλύματος του υπεροξειδίου του υδρογόνου.



Πίνακας 2.2. Παρεμποδιστική δράση διαφόρων ιόντων στη λειτουργία του συστήματος

Παρεμποδίζουσα ουσία ^a	Μέγιστη επιτρεπόμενη πολλαπλάσια συγκέντρωση ιόντων έναντι H ₂ O ₂
K ⁺ , Na ⁺ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , NH ₄ ⁺ , Cl ⁻ , F ⁻ , PO ₄ ³⁻	>2000
Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Zn ²⁺ , Al ³⁺	100
Fe ³⁺ , Cr(VI), Co ²⁺	50
Fe ²⁺ , Hg ²⁺	10

^aΤα κατιόντα προστέθηκαν παρουσία 0,01 M EDTA.

Η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια της μεθόδου αποδεικνύονται με την εφαρμογή της στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων από μια επιτόπια διαδικασία καθαρισμού (cleaning-in-place process). Τα δείγματα αραιώθηκαν 1000 φορές πριν την ανάλυση.

Έχοντας υπ' όψη την αστάθεια του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε χαμηλές συγκεντρώσεις, έγιναν πειράματα ανάκτησης για περιοχή συγκεντρώσεων του υπεροξειδίου του υδρογόνου από 100 έως 500 nM/L. Κατά τη διάρκεια της λειτουργίας του αντιδραστήρα πραγματοποιούνται τακτικές μετρήσεις πρότυπου διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου με συγκέντρωση, που βρίσκεται στη γραμμική περιοχή της καμπύλης αναφοράς, ώστε να βελτιώνεται η ακρίβεια των αναλύσεων και να ελέγχεται η σταθερότητα του συστήματος.

Πίνακας 2.3. Ανάκτηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου από πραγματικά δείγματα εκπλυμάτων ζυθοποιίας

Δείγμα	Συγκέντρωση προστιθέμενου H ₂ O ₂ (nM)	Μετρούμενη συγκέντρωση H ₂ O ₂ (nM)	Ανάκτηση (%)
1	100	94	94,0
	300	295	98,3
	500	497	99,4
2	100	96	96,0
	300	297	99,0
	500	497	99,4
3	100	103	103,0
	300	302	100,7
	500	498	99,6



Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.3, οι ανακτήσεις της μεθόδου κυμαίνονται από 94 έως 103%. Πρέπει να αναφέρουμε ότι τα τρία δείγματα που αναλύθηκαν με τη μέθοδο που περιγράφεται ελήφθησαν σε διαφορετικά στάδια της διεργασίας καθαρισμού της προαναφερόμενης εταιρίας και το πρώτο δείγμα είχε μεγαλύτερη θολερότητα από τα άλλα δείγματα. Αυτό εξηγεί και τις μεγαλύτερες σχετικές αποκλίσεις στα πειράματα ανάκτησης.

2.7 Χρόνος ζωής των αντιδραστήρων

Οι αντιδραστήρες έχουν μεγάλο χρόνο ζωής και μπορούν να διατηρηθούν στους +4°C μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα ακινητοποίησης, για διάστημα μεγαλύτερο από έξι μήνες, όταν δεν χρησιμοποιούνται. Μετά από κάθε χρήση οι αντιδραστήρες ξεπλένονται με το ρυθμιστικό διάλυμα ακινητοποίησης για περίπου 10 min. Όταν χρησιμοποιούνται κάτω από τις συνθήκες που περιγράφονται παραπάνω, διατηρούν το 80-85% της ενεργότητάς τους για διάστημα μεγαλύτερο από τρεις μήνες (20-25 ενέσεις προτύπων διαλυμάτων κατά μέσο όρο ημερησίως), ενώ τις δύο πρώτες ημέρες της λειτουργίας χάνουν το 5-10% της αρχικής τους ενεργότητας. Η μείωση αυτή πιθανόν οφείλεται στην απομάκρυνση του ενζύμου το οποίο δεν έχει συνδεθεί με ισχυρούς (χημικούς) δεσμούς πάνω στο υλικό στήριξης ή έχει εγκλωβιστεί κατά την πορεία ακινητοποίησης.

Οι αντιδραστήρες που χρησιμοποιήθηκαν στην βελτιστοποίηση των διαφόρων παραμέτρων παρουσίασαν μικρότερο χρόνο ζωής. Μείωση του χρόνου ζωής των αντιδραστήρων παρατηρείται επίσης κατά την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων. Στη συγκεκριμένη εφαρμογή, λόγω της υψηλής αραίωσης των δειγμάτων δεν παρατηρήθηκε κάποια αισθητή μείωση.



2.8 Συμπεράσματα

Η επέκταση της οπτικής διαδρομής της κυψελίδας ροής που χρησιμοποιήθηκε στην μέθοδο αυτή πλεονεκτεί των κλασικών κυψελίδων ως προς την ευαισθησία χωρίς να επηρεαστεί η απλότητα της φωτομετρικής τεχνικής.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αποδεικνύουν ότι η μέθοδος που περιγράψαμε είναι εφαρμόσιμη στην ανάλυση δειγμάτων που περιέχουν χαμηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι το χαμηλό όριο ανίχνευσης, η πολύ καλή επαναληψιμότητα και η δυνατότητα αυτοματοποίησης της διάταξης για την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων.



Βιβλιογραφία

- [1] C.W. Jones, *Applications of Hydrogen Peroxide and Derivatives*, (ed. J.H. Clark), Royal Society of Chemistry, RSC Clean Technology Monographs, 1999.
- [2] M. Weck, *Textil Praxis International*, (1991) 144.
- [3] D. Barham and P. Trinder, *Analyst*, 97 (1972) 142.
- [4] B. Olson, *Microchi. Acta II*, (1985) 211.
- [5] K. Tamaoku, Y. Murao and K. Akiura, *Anal. Chim. Acta*, 136 (1982) 121.
- [6] B.C. Madsen and M.S. Kromis, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 2849.
- [7] D. Harms, B. Than, B. Krebs and U. Karst, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 364 (1999) 184.
- [8] W. Miller and D. Kester, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 2711.
- [9] Y. Li and A. Townshend, *Anal. Chim. Acta*, 359 (1998) 149.
- [10] I. Vieira and O. Fatibello-Fihlo, *Analyst*, 123 (1998) 1809.
- [11] A.N. Diaz, F.G. Sanchez and J.A. Garsia, *Anal. Chim. Acta*, 327 (1996) 161.
- [12] J. Hlavay and G. Guilbault, *Acta. Chim. Hungarica*, 130(1) (1993) 83.
- [13] D. Price, R. Fauzi, C. Mantoura and P. Worsfold, *Anal. Chim. Acta*, 371 (1998) 205.
- [14] K. Schachl, H. Alemu, K. Kalcher, J. Ježkova, I. Švancara and K. Vytřas, *Analyst*, 122 (1997) 985.
- [15] J. Li, S. Tan and H. Ge, *Anal. Chim. Acta*, 335 (1996) 137.
- [16] Shi Lin Chut, Juan Li and Swee Ngim Tan, *Analyst*, 122 (1997) 1431.
- [17] K. Yamamoto, T. Ohgaru, M. Torimura, H. Kinoshita, K. Kano and T. Ikeda., *Anal. Chim. Acta*, 406 (2000) 201.
- [18] H.B. Dunford and J.S. Stillman, *Coord. Chem. Rev.*, 19 (1976) 187.
- [19] T.T. Ngo and H.M. Lenhoff, *Anal. Biochem.*, 105 (1980) 389.



- [20] A. Krug, R. Göbel and R. Kellner, *Anal. Chim. Acta*, 287 (1994) 59.
- [21] P.W. Carr and L.D. Bowers, *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry (Fundamentals and Applications)*, John Wiley & Sons, 1980 (USA).
- [22] R. Schick, I. Strasser, H. Stabel, *Wat. Res.*, 31(6) (1997) 1371.
- [23] T. Taniai, A. Sakuragawa and T. Okutani., *Anal. Sciences*, 15 (1999) 1077.
- [24] G. Zhang and P. Dasgupta, *Anal. Chim. Acta*, 260 (1992) 57.
- [25] J. Meyer and U. Karst, *Anal. Chim. Acta*, 401, (1999) 191.
- [26] M. Uchida and M. Ono, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 57(4) (1999) 145.
- [27] S.T. Test, S.J. Weiss, *J. Biol. Chem.*, 259 (1984) 399.
- [28] C. Rabaud, H. Tronel, S. Fremont, T. May, P. Canton, J.P. Nicolas, *Ann. Biol. Clin.*, 55 (1997) 565.
- [29] R.A. Leach, J. Růžička and J.M. Harris, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 1669.
- [30] C. Gooijer, G. Hoornweg, T. de Beer, A. Bader, D. van Iperen and U. Brinkman, *J. of Chromatogr. A*, 824 (1998) 1.
- [31] W. Yao, R. Byrne and R. Waterbury, *Environ. Sci. Technol.*, 32 (1998) 2646.
- [32] Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, G.A. Pilidis and M.I. Karayannis, *Anal. Chim. Acta*, 403 (2000) 315.
- [33] F. Nitzsche, Personal Communication, König Brauerei, Duisburg, Germany, 1998.
- [34] M.B. Wilson and P.K. Nakane. in W. Knapp, K. Holubar and G. Wick (Eds.), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1978) p-216.
- [35] Αφένδρα Αμαλία-Σοφία. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα 1992, σελ. 80.
- [36] K. Hool and T.A. Nieman, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 834.
- [37] K.G. Welinder, L.B. Smillie and G.R. Schonbaum, *Can. J. Biochem.*, 50 (1972) 44.
- [38] Robert W. Marshall and Timothy D. Gibson, *Anal. Chim. Acta.*, 266 (1992) 309.
- [39] D.M. Davies, P. Jones and D. Mantle, *Biochem. J.*, 157 (1976) 247.

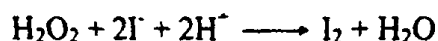


**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ
(HPLC) ΜΕ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑ ΤΗ ΣΤΗΛΗ ΓΙΑ
ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ
ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ
ΥΠΕΡΟΞΕΩΝ**

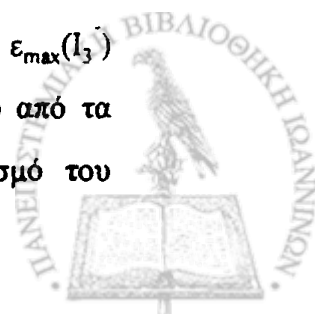
3.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η ανάπτυξη μιας υγροχρωματογραφικής μεθόδου με παραγωγοποίηση μετά τη στήλη (HPLC/post-column derivatization method) για το διαχωρισμό και ανάλυση μείγματος υπεροξειδίου του υδρογόνου και οργανικών υπεροξέων, (υπεροξικό οξύ - PAA και *m*-χλωρο-υπερβενζοϊκό οξύ - MCPBA) και εφαρμογή της σε πραγματικά δείγματα.

Η προτεινόμενη μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και οργανικών υπεροξέων με οξιτισμένο διάλυμα KI, παρουσία μολυβδαινικών ιόντων, σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις (για την περίπτωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου):



Ο προσδιορισμός του I_2 επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους. Σε υψηλές συγκεντρώσεις του KI η χημική ισορροπία ανάμεσα στα I_2 , I^- , και I_3^- είναι μετατοπισμένη προς τα I_3^- . Η μέτρηση της απορρόφησης των I_3^- στα 352 nm καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό των προαναφερόμενων ουσιών. Οι υψηλές τιμές $\epsilon_{\text{max}}(\text{I}_3^-)$ ($26.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), καθώς και η μεγάλη ταχύτητα της αντίδρασης είναι δυο από τα βασικότερα χαρακτηριστικά της μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του



υπεροξειδίου του υδρογόνου και οργανικών υπεροξέων μετά από διαχωρισμό τους με HPLC.

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Ανεστραμμένης Φάσης, με μεταβαλλόμενη ροή διαλυτών, ενώ η ανίχνευση και ο προσδιορισμός των υπεροξειδίων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της παραγωγοποίησης μετά τη στήλη. Ως μέθοδος παραγωγοποίησης χρησιμοποιήθηκε η ιωδομετρική, η οποία είναι μια απλή, ευαίσθητη και άμεσα εφαρμόσιμη για τον προσδιορισμό ενώσεων που περιέχουν υπεροξειδικές ομάδες. Επιπλέον, ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των τριωδικών ιόντων, που σχηματίζονται από την επίδραση οξινισμένου διαλύματος ιωδιούχων με τα υπεροξείδια, επιτρέπει τον προσδιορισμό τους σε πολύπλοκα δείγματα μετά από διαχωρισμό με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

Οι χρόνοι κατακράτησης για το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το υπεροξικό οξύ και το *m*-χλωρο-υπερβενζοϊκό οξύ ήταν 2,1, 4,3 και 13,2 min υπό τις βέλτιστες συνθήκες της HPLC. Οι καμπύλες αναφοράς καλύπτουν τη γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων από 1 έως 100 μM . Τα όρια ανίχνευσης ήταν 0,5, 0,5 και 0,6 μM για το H_2O_2 , PAA και MCPBA αντίστοιχα.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία για την παρακολούθηση της μεταβολής των συγκεντρώσεων των H_2O_2 και PAA κατά τη διάλυση στο νερό του εμπορικού απορρυπαντικού PERSIL.



3.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου και τα οργανικά υπεροξεία (υπεροξικό οξύ και *m*-χλωρο-υπερβενζοϊκό οξύ) βρίσκουν εφαρμογές στη σύνθεση άλλων χημικών ενώσεων και στη βιομηχανία για διεργασίες λεύκανσης και απολύμανσης [1]. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου και το υπεροξικό οξύ χρησιμοποιούνται ευρέως και στα εμπορικά απορρυπαντικά, όπου το υπεροξειδίο του υδρογόνου προστίθεται ως στερεό σύμπλοκο με ανθρακικό νάτριο ή βορικό νάτριο. Τα δύο τελευταία σύμπλοκα είναι σχετικά φθηνά προϊόντα και χρησιμοποιούνται ευρέως στα απορρυπαντικά ως πηγές υπεροξειδίου του υδρογόνου το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με τους ενεργοποιητές λεύκανσης όπως η τετραακέτυλοαιθυλενοδιαμίνη (TAED-tetraacetylenediamine) και το 1,5-διακετυλο-2,4-διοξω-εξαυδρο-1,3,5-τριαζίνη (DADHT-1,5-diacetyl-2,4-dioxo-hexahydro-1,3,5-triazine) και ελευθερώνουν υπεροξικό οξύ το οποίο είναι ισχυρότερο απολύμαντικό μέσο από το υπεροξειδίο του υδρογόνου [2,3]. Στα ευρωπαϊκά απορρυπαντικά χρησιμοποιείται κυρίως το TAED.

Το υπεροξικό οξύ είναι πολύ ισχυρό μικροβιοκτόνο και αποστειρωτικό και η χρήση του αυξάνεται συνεχώς στις διεργασίες απολύμανσης σε βιομηχανική κλίμακα, καθώς και στην αποστείρωση ιατρικών σκευών. Η αυξημένη χρήση του βασίζεται στην ευκολία παρασκευής του και στις οικολογικές του ιδιότητες (τα προϊόντα των αντιδράσεων όπου συμμετέχει είναι οξυγόνο, νερό και οξικό οξύ). Τα προϊόντα αυτά, λόγω και της πτητικότητας δεν αφήνουν υπολείμματα μετά το πέρας της διαδικασίας απολύμανσης. Ανάλογα με τις εφαρμογές, τα εμπορικά του προϊόντα για απολύμανση χρησιμοποιούνται σε όξινο ή ελαφρώς βασικό περιβάλλον. Για παράδειγμα για την απολύμανση των μηχανημάτων αιμοκάθαρσης χρησιμοποιούνται όξινα διαλύματα του υπεροξικού οξέος λόγω των υψηλών επιπέδων κίτρου, ενώ για την απολύμανση ενδοσκοπίων χρησιμοποιείται ελαφρώς αλκαλικό διάλυμα διότι σε τέτοιο περιβάλλον η απομάκρυνση των πρωτεϊνών γίνεται πιο εύκολα [4].

Το *m*-χλωρο υπερβενζοϊκό οξύ χρησιμοποιείται λιγότερο για απολύμανση και κυρίως στην οργανική σύνθεση ως οξειδωτικό μέσο λόγω της δραστηρότητας της στερεοεκλεκτικότητάς του και του υψηλότερου βαθμού καθαρότητας και απόδοσης των



προϊόντων που σχηματίζονται από τις αντιδράσεις όπου συμμετέχει, σε σύγκριση με το υπεροξειδίο του υδρογόνου και άλλα υπεροξεία [5].

Η σύνθεση των οργανικών υπεροξείων γίνεται με επίδραση υπεροξειδίου του υδρογόνου στα αντίστοιχα οξεία με καταλύτη το θειικό οξύ. Έτσι, τα εμπορικά παρασκευάσματα των οργανικών υπεροξείων περιέχουν σημαντικές ποσότητες υπεροξειδίου του υδρογόνου [6,7].

Ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των παραπάνω υπεροξειδικών ενώσεων γίνεται με βάση τις οξειδωτικές τους ιδιότητες. Τα υπεροξείδια είναι ισχυρές οξειδωτικές ενώσεις και οι εφαρμογές τους βασίζονται στις ιδιότητες αυτές. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου δρα και ως αναγωγικό σε αντιδράσεις, όπου συμμετέχουν ισχυρότερες οξειδωτικές ενώσεις και κυρίως σε όξινα διαλύματα.

Ο κλασικός προσδιορισμός των υπεροξειδικών ενώσεων βασίζεται στις διαφορετικές τους οξειδωτικές ιδιότητες και γίνεται με ογκομέτρηση των μιγμάτων σε δύο στάδια: στο πρώτο στάδιο προσδιορίζεται το υπεροξειδίο του υδρογόνου με υπερμαγγανικό κάλιο σε όξινο pH και στο δεύτερο στάδιο το οργανικό υπεροξύ μετατρέπει τα ιωδιούχα σε ελεύθερο ιώδιο το οποίο στη συνέχεια ογκομετρείται μεθειοθειικό νάτριο [8]. Η μέθοδος αυτή είναι ακριβής και επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό μείγματος δύο υπεροξειδικών ενώσεων.

Η ογκομέτρηση του δεύτερου συστατικού πρέπει να γίνεται το ταχύτερο δυνατό μετά το πρώτο στάδιο, επειδή τα ιόντα $Mn(II)$ που σχηματίζονται στο πρώτο στάδιο της ογκομέτρησης καταλύουν τη διάσπαση των οργανικών υπεροξείων, όπως είναι το υπεροξικό οξύ. Ως εναλλακτική λύση προτείνεται η δημητριομετρία για το πρώτο στάδιο της τιτλοδότησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου [9].

Παρόλα τα μειονεκτήματα, η παραπάνω μέθοδος εφαρμόζεται εκτενώς στις βιομηχανικές μονάδες για την παρακολούθηση των επιπέδων του υπεροξειδίου του υδρογόνου και οργανικών υπεροξείων στις διεργασίες, όπου συμμετέχουν.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η εφαρμογή των ογκομετρικών μεθόδων περιορίζεται από τα υψηλά όρια ανίχνευσης. Για την επίτευξη χαμηλών ορίων ανίχνευσης, η συνδρομή των ενόργανων μεθόδων είναι απαραίτητη.



Από τις ενόργανες μεθόδους, η φασματοφωτομετρική είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη. Άλλες μέθοδοι που έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία, περιλαμβάνουν τις φθορισμομετρικές και ηλεκτροχημικές τεχνικές [10-20].

Ο Ohsaka ανέπτυξε μια ηλεκτροχημική μέθοδο κυκλικής βολταμετρίας για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του υπεροξικού οξέος χωρίς όμως εφαρμογές σε πραγματικά δείγματα [21].

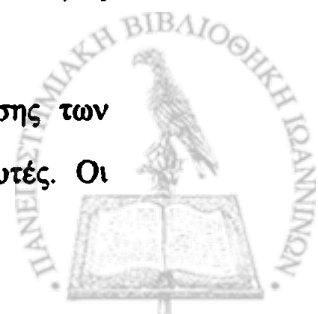
Από τις φασματοφωτομετρικές, η μέθοδος των τριωδικών έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου και οργανικών υπεροξέων [22].

Οι Saltzman και Gilbert ανέπτυξαν μια κινητική μέθοδο για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό μίγματος υπεροξειδίου του υδρογόνου και υπεροξικού οξέος με τη ιωδομετρική μέθοδος και γραφική επεξεργασία των αποτελεσμάτων [23].

Η αντίδραση των υπεροξέων με τα ιωδιούχα είναι πολύ πιο γρήγορη από αυτή του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Έτσι οι Davies και Deary ανέπτυξαν μια μέθοδο για τον προσδιορισμό του *m*-χλωρο υπερβενζοϊκού οξέος παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου, σε συγκέντρωση 1000 φορές μεγαλύτερη, η οποία βασίζεται στην προεκβολή σε χρόνο μηδέν της μεταβολής της μετρούμενης απορρόφησης που οφείλεται στην αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου με τα ιωδιούχα, για την εκτίμηση της συγκέντρωσης του *m*-χλωρο υπερβενζοϊκού οξέος, το οποίο αντιδρά με τα ιωδιούχα πριν τη μέτρηση της απορρόφησης με το σύστημα ανίχνευσης που χρησιμοποίησαν [24]. Η επίδραση της συγκέντρωσης των ιωδιούχων και του καταλύτη (μολυβδαινικά ιόντα) επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό τη διαφοροποίηση και τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του *m*-χλωρο υπερβενζοϊκού οξέος λόγω της αύξησης της ταχύτητας της αντίδρασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου με τα ιωδιούχα σε μεγάλη συγκέντρωση των τελευταίων. Παρόλα τα πλεονεκτήματα, η μέθοδος αυτή δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε μίγμα με περισσότερα από δύο υπεροξείδια.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές, σε συνδυασμό με τις εκλεκτικές και ευαίσθητες μεθόδους ανίχνευσης χρησιμοποιούνται ευρέως στην Αναλυτική Χημεία.

Σε πολλές περιπτώσεις απαιτείται η χρήση αντιδράσεων παραγωγοποίησης των αναλυτών για την επίτευξη χαμηλών ορίων ανίχνευσης με τις τεχνικές αυτές. Οι



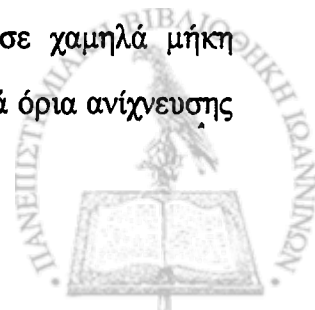
μέθοδοι παραγωγοποίησης στοχεύουν στην αύξηση της ευαισθησίας μέσω αντιδράσεων παραγωγής χρωμοφόρων ή ενώσεων που φθορίζουν ή άλλων αντιδράσεων που παράγουν μεγαλύτερο αναλυτικό σήμα, καθώς και στην αύξηση της εκλεκτικότητας της μεθόδου, αφού οι αντιδράσεις παραγωγοποίησης λαμβάνουν χώρα μεταξύ των αναλυτών πριν τη στήλη και το διαχωρισμό παράγωγων ενώσεων ή μετά από το διαχωρισμό τους από τη χρωματογραφική στήλη [25-27].

Ο Di Furia πρότεινε μια μέθοδο για τον προσδιορισμό του *m*-χλωρο υπερβενζοϊκού οξέος παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου με αέρια χρωματογραφία με την τεχνική της παραγωγοποίησης πριν τη στήλη (pre-column derivatization) [28]. Η μέθοδος βασίζεται στην εκλεκτική οξείδωση του *p*-τολυλο σουλφιδίου από τα οργανικά υπεροξεία και το σουλφοξείδιο που παράγεται, μαζί με το σουλφίδιο που δεν αντέδρασε, εκχυλίζονται με χλωροφόρμιο και εισάγονται στον αέριο χρωματογράφο για το διαχωρισμό και την ποσοτικοποίησή τους.

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε αργότερα τροποποιημένη από τον Karst και τους συνεργάτες του για τον προσδιορισμό του υπεροξικού οξέος σε εκπλύματα ζυθοποιίας με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης [29]. Η τροποποίηση παρακάμπτει το στάδιο της εκχύλισης του σουλφοξειδίου από την υδατική φάση και προσδιορίζεται ταυτόχρονα και το υπεροξείδιο του υδρογόνου με προσθήκη τριφαινυλοφωσφίνης, η οποία αντιδρά με το υπεροξείδιο του υδρογόνου.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές με παραγωγοποίηση πριν τη στήλη μειονεκτούν στο ότι ο προσδιορισμός μεγαλύτερου αριθμού υπεροξειδίων απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο ανάλυσης και τη χρήση μεγαλύτερου αριθμού αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης, διαδικασία που δυσκολεύει το διαχωρισμό τους από την χρωματογραφική στήλη ή απαιτεί πιο πολύπλοκα συστήματα ανίχνευσης.

Η τεχνική της παραγωγοποίησης μετά τη στήλη έχει χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό και προσδιορισμό υπεροξειδικών ενώσεων με εφαρμογές κυρίως σε βιομηχανικά και περιβαλλοντικά δείγματα. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται εργασίες πάνω στον προσδιορισμό υπεροξειδίων με HPLC με ανίχνευση σε χαμηλά μήκη κύματος στην περιοχή του UV, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τα υψηλά όρια ανίχνευσης λόγω της χαμηλής απορροφητικότητάς τους [30,31].



Επίσης αναφέρονται ηλεκτροχημικές, φθορισμομετρικές μέθοδοι ανάλυσης και μέθοδοι χημειοφωταύγειας [32-36]. Οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι, με την απλότητα του ανιχνευτικού συστήματος, χρησιμοποιούνται περισσότερο από κάθε άλλη σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης [37,38].

3.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.3.1 Αντιδραστήρια

Όλα τα εμπορικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν, είτε αναλυτικού είτε του μεγίστου, διαθέσιμου, βαθμού καθαρότητας. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο ύδωρ.

Πρότυπο διάλυμα H_2O_2 : παρασκευάζεται με διαδοχικές αραιώσεις του εμπορικού διαλύματος 30% (Merck, Germany), το οποίο τιτλοδοτήθηκε με υπερμαγγανικό κάλιο (δευτερογενής πρότυπη ουσία). Τα αραιά διαλύματα του υπεροξειδίου του υδρογόνου παρασκευάζονται καθημερινά από το πρότυπο διάλυμα.

Πρότυπο διάλυμα υπεροξικού οξέος: παρασκευάζεται με αραιώση του εμπορικού διαλύματος (35% σε αραιό οξικό οξύ (Aldrich)), το οποίο τιτλοδοτήθηκε με θειοθειικό νάτριο. Πριν την τιτλοδότηση προστίθενται 100 mg διοξείδιο του μαγγανίου, το δείγμα αναδεύεται για 10 min για να διασπαστεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου που περιέχει και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 10 min σε 3000 στροφές ανά λεπτό. Το υπερκείμενο διαχωρίζεται από το στερεό διοξείδιο του μαγγανίου και τιτλοδοτείται.

Πρότυπο διάλυμα *m*-χλωρο-υπερβενζοϊκού οξέος: παρασκευάζεται με διάλυση συγκεκριμένης ποσότητας του εμπορικού προϊόντος (70% (Fluka)) σε δισαπεσταγμένο ύδωρ και τιτλοδοτείται όπως και το υπεροξικό οξύ.

Το KI, το NaOH και το όξινο φθαλικό κάλιο ήταν των εταιριών Merck, Riedel DeHaën και Fluka. Το τετραένυδρο μολυβδαινικό αμμώνιο ήταν της εταιρίας Fluka.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν (ακετονιτρίλιο, νερό), ήταν κατάλληλης καθαρότητας για χρήση σε συστήματα HPLC, της εταιρίας Lab-Scan.

Το εμπορικό απορρυπαντικό πλυντηρίου (PERSIL) ήταν της εταιρίας Henkel.



3.3.2 Διαλύματα εργασίας

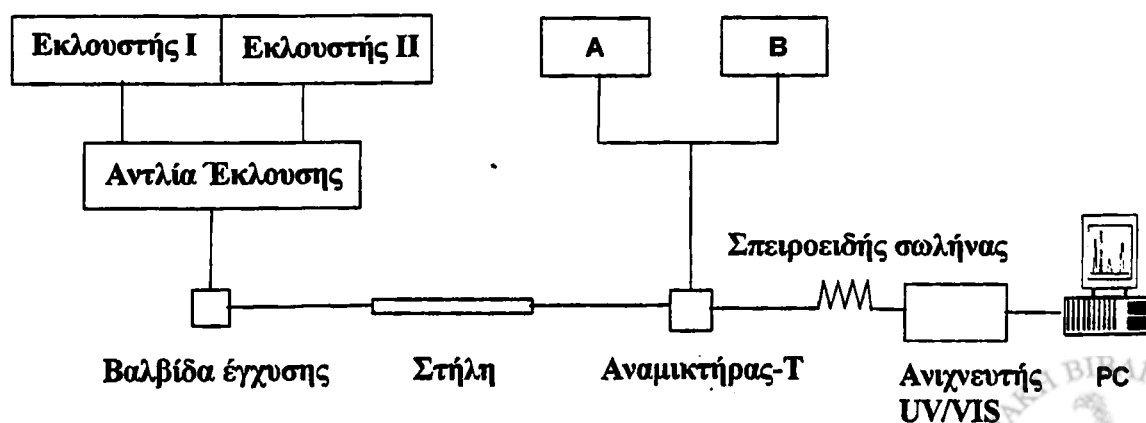
Για την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και των οργανικών υπεροξέων μετά το διαχωρισμό τους από το υδροχρωματογραφικό σύστημα, παρασκευάζονται δύο διαλύματα εργασίας A και B.

Το διάλυμα A αποτελείται από 33 g KI, 1,0 g NaOH και 0,1 g τετραένυδρο μολυβδαινικό αμμώνιο, σε 500 mL δισαπεσταγμένο ύδωρ. Το διάλυμα A διατηρείται σε σκοτεινό μέρος όταν δεν χρησιμοποιείται προς αποφυγή οξείδωσης των ιωδιούχων ιόντων.

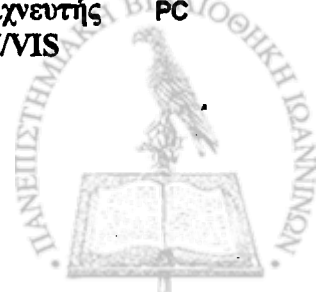
Το διάλυμα B είναι υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα φθαλικών (pH 4,3) και περιέχει 10 g όξινο φθαλικό κάλιο σε 500 mL διπλά απεσταγμένο ύδωρ.

3.3.3 Πειραματική διάταξη

Η διάταξη HPLC η οποία χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο φαίνεται στο σχήμα 3.1. Για την προώθηση των διαλυτών χρησιμοποιήθηκαν δύο πιστονικές αντλίες δύο εμβόλων (Shimadzu LC-10 AD), συνδεδεμένες μεταξύ τους με σύστημα οπτικών ινών, ενώ για τη συνεχή απαέρωση και το φιλτράρισμα των διαλυτών χρησιμοποιήθηκε το σύστημα DGU-2A της εταιρίας Shimadzu, το οποίο προϋποθέτει και την χρησιμοποίηση ηλίου πολύ υψηλής καθαρότητας. Η βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος είναι της εταιρίας Rheodyne (model 7725), έξι κατευθύνσεων, δύο θέσεων.



Σχήμα 3.1: Σχηματική διάταξη της χρησιμοποιούμενης HPLC.



Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των υπεροξειδίων είναι της εταιρίας Zorbax Chromatography Column (Zorbax-ODS, μήκους 250 mm και εσωτερικής διαμέτρου 3,0 mm). Το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης της στήλης (με ομάδες $C_{18}H_{37}$ -δεσμευμένες σε Zorbax Sil-πυριτικά σωματίδια) είναι 5 μm .

Για την προώθηση των αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης χρησιμοποιείται περισταλτική αντλία τεσσάρων καναλιών Gilson Miniplus 3 (Middleton, USA).

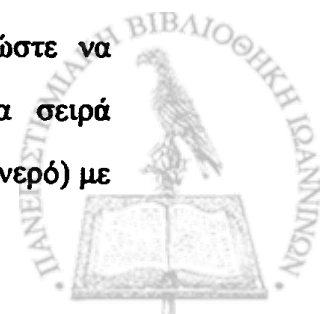
Τα διαλύματα Α και Β των αντιδραστηρίων με ροή 0,7 mL/min προωθούνται μέσω της περισταλτικής αντλίας και αναμειγνύονται μέσω αναμικτήρα-Τ μικρού νεκρού όγκου με τα εκλούσματα της υγρής χρωματογραφίας. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε σπειροειδή σωλήνα 1 m και τα ιόντα I_3^- που σχηματίζονται φθάνουν στη συνέχεια στον ανίχνευτή CCD (Charge-Coupled Device) (OceanOptics Inc.) και καταγράφεται η απορρόφηση στα 352 nm. Η κυψελίδα ροής μεγάλης οπτικής διαδρομής, όγκου 127 μL (World Precision Instruments, USA), που χρησιμοποιήθηκε, συνδέεται με τον ανίχνευτή και την πηγή δευτερίου μέσω οπτικών ινών 400 μm . Ο όγκος έγχυσης των προτύπων διαλυμάτων για τη βαθμονόμηση του συστήματος και την ανάλυση των πραγματικών δειγμάτων ήταν 100 μL .

Οι σωλήνες που χρησιμοποιούνται στην περισταλτική αντλία και τις συνδέσεις για τα αντιδραστήρια και τον εκάστοτε φορέα, είναι κατασκευασμένοι από PVC και Teflon διαφόρων διαμέτρων.

3.3.4 Σύστημα μεταβολής της πολικότητας των διαλυτών κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού των αναλυτών του δείγματος

Στη βιβλιογραφία έχουν προταθεί διάφορα συστήματα έκλουσης για το διαχωρισμό διαφόρων ενώσεων που περιέχουν υπεροξειδικούς δεσμούς. Ανάλογα με το σύστημα ανίχνευσης και το υλικό πλήρωσης της χρωματογραφικής στήλης, καθορίζεται και η σύσταση των διαλυτών της κινητής φάσης.

Για τον προσδιορισμό της βέλτιστης σύστασης της κινητής φάσης, ώστε να επιτευχθεί ο καλύτερος δυνατός διαχωρισμός των αναλυτών, έγινε μια σειρά πειραμάτων με μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης (ακετονιτρίλιο και νερό) με



το χρόνο. Ο όγκος του εγχυόμενου μίγματος, που περιείχε 10^{-2} M υπεροξείδιο του υδρογόνου, 5×10^{-3} M υπεροξικό οξύ και 10^{-2} M *m*-χλωρο-υπερβενζοϊκό οξύ, ήταν 20 μ L. Για τα πειράματα αυτά ειδικά χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής ορατού – υπεριώδους (UV-VIS) SPD-10AV και ολοκληρωτής σήματος CR5A-Chromatorac (Shimadzu). Το μήκος κύματος που επιλέχθηκε ήταν 206 nm.

Ο καλύτερος διαχωρισμός επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας το συνδυασμό βαθμωτής και ισοκρατικής έκλουσης του συστήματος των διαλυτών που παρουσιάζεται στον πίνακα 3.1. Η ταχύτητα ροής των διαλυτών της κινητής φάσης ήταν 0,7 mL/min. Η θερμοκρασία θερμοστάτησης της στήλης ήταν 30°C.

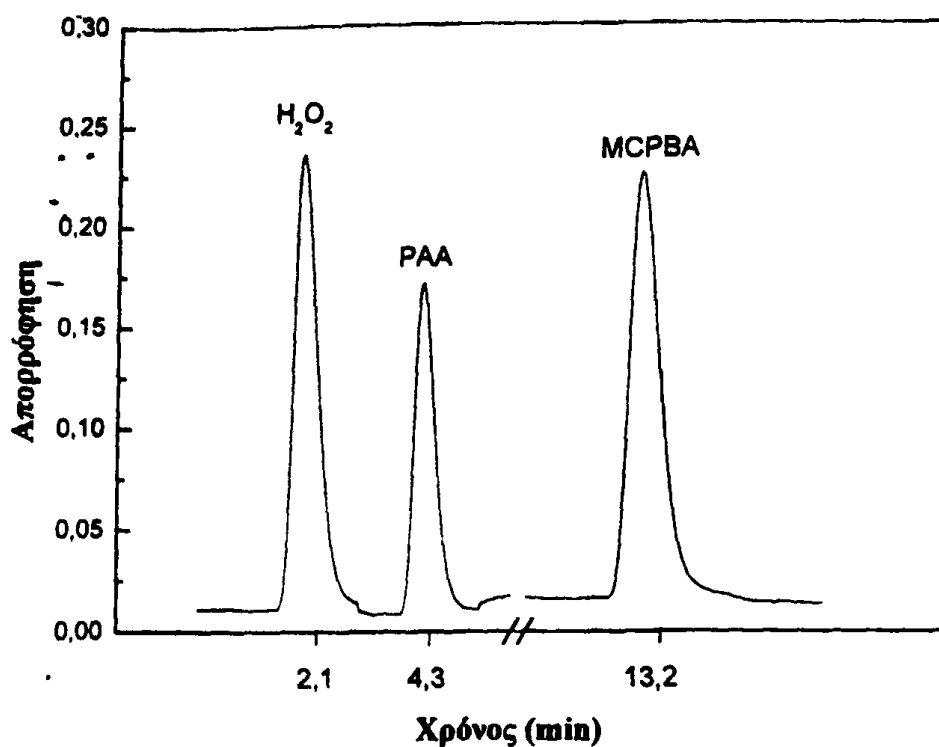
Πίνακας 3.1: Πρόγραμμα συνδυασμού βαθμωτής και ισοκρατικής έκλουσης διαλυτών για τον διαχωρισμό του H₂O₂, PAA και MCPBA

Χρόνος (min)	Ακετονιτρίλιο/Νερό (%)
0	30/70
5	100/0
14	100/0
15	30/70
16	STOP

Ένα τυπικό HPLC χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος που περιέχει και τις τρεις υπεροξειδικές ενώσεις, δίνεται στο σχήμα 3.2. Όπως φαίνεται και στο σχήμα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου και τα οργανικά υπεροξέα διαχωρίζονται πολύ καλά, οι κορυφές είναι συμμετρικές και μπορούν να ποσοτικοποιηθούν.

Υπό τις βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού οι χρόνοι κατακράτησης είναι 2,1 min για το H₂O₂, 4,3 min για το PAA, και 13,2 min για το MCPBA, και η ταυτοποίησή τους έγινε με τα πρότυπα αναφοράς με ανίχνευση στα 206 nm.

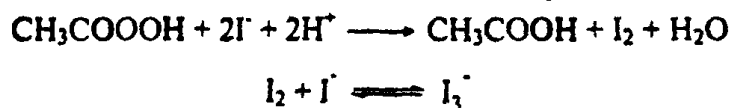


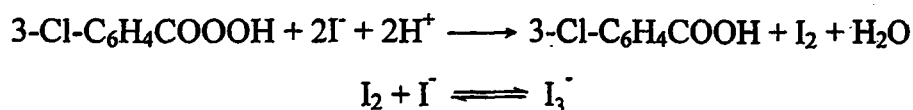


Σχήμα 3.2: Τυπικό HPLC χρωματογράφημα μίγματος H_2O_2 , PAA και MCPBA.

3.4 Η χημική αντίδραση

Όπως αναφέρθηκε ήδη, η χημική αντίδραση που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και των οργανικών υπεροξέων βασίζεται στον σχηματισμό τριωδικών ιόντων μετά από αντίδρασή τους με οξιτισμένο KI, παρουσία μολυβδαινικών ιόντων που δρουν καταλυτικά. Η στοιχειομετρία αυτών των αντιδράσεων είναι 1:1, δηλαδή η συγκέντρωση των τριωδικών ιόντων που παράγονται είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου ή των οργανικών υπεροξέων που αντιδρούν με περίσσεια KI. Για το υπεροξικό οξύ και το *m*-γλωρο-υπερβενζοϊκό οξύ οι αντίστοιχες αντιδράσεις είναι:



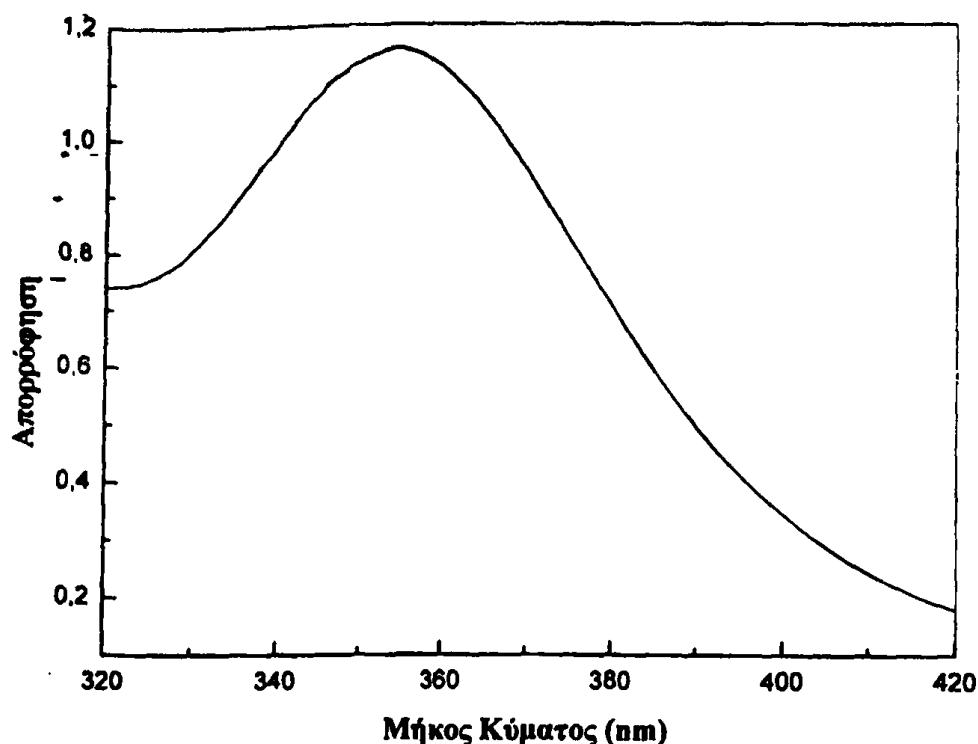


Οι αντιδράσεις αυτές μελετήθηκαν για την επίδραση των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην HPLC. Έτσι, ίδιοι όγκοι από τα διαλύματα Α και Β προστίθενται σε ποτήρια ζέσεως των 10 mL, και σ' αυτά προστίθενται υπό ανάδευση τα πρότυπα διαλύματα του υπεροξειδίου του υδρογόνου, του υπεροξικού οξέος και του *m*-χλωρο-υπερβενζοϊκού οξέος σε τελική συγκέντρωση 0,04 mM. Σε μία δεύτερη σειρά πειραμάτων, εκτός από τα διαλύματα Α και Β προστίθεται και ακετονιτρίλιο σε αναλογίες ίδιες με αυτές που χρησιμοποιούνται στην κινητή φάση για τον διαχωρισμό των αναλυτών.

Τα φάσματα απορρόφησης καταγράφονται αφαιρώντας κάθε φορά το φάσμα του τυφλού. Για τον υπολογισμό του συντελεστή μοριακής απορρόφησης ϵ , χαράχθηκε καμπύλη αναφοράς με πρότυπα διαλύματα υπεροξειδίου του υδρογόνου. Το ϵ υπολογίστηκε από την κλίση της καμπύλης και βρέθηκε ίσο με $26.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Σε όλες τις περιπτώσεις τα φάσματα απορρόφησης έχουν την ίδια μορφή (Σχήμα 3.3) και επίσης δεν παρατηρείται μεταβολή της τιμής της μέγιστης απορρόφησης στα 352 nm. Το πείραμα αυτό δείχνει ότι το σύστημα έκλουσης δεν επηρεάζει την χημική αντίδραση που πραγματοποιείται μετά τη στήλη.





Σχήμα 3.3: Φάσμα απορρόφησης των τριωδικών ιόντων συγκέντρωσης $4 \times 10^{-5} \text{ M}$ μετρημένο με κυψελίδα 1 cm. Συνθήκες όπως περιγράφηκαν παραπάνω.

3.5 Βέλτιστες πειραματικές συνθήκες για την αντίδραση παραγωγοποίησης

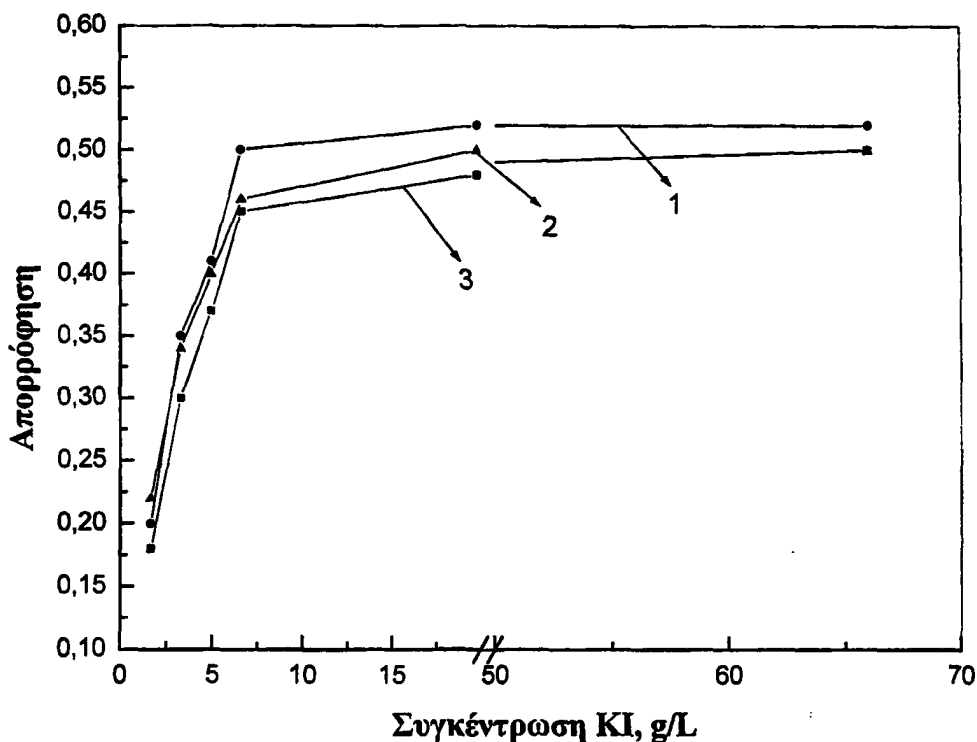
Μετά το διαχωρισμό τους από τη χρωματογραφική στήλη, μελετήθηκαν οι υδροδυναμικές και χημικές παράμετροι που επηρεάζουν την αντίδραση σχηματισμού των τριωδικών ιόντων. Έτσι μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του KI, η ταχύτητα ροής των διαλυμάτων A και B και η θερμοκρασία της αντίδρασης.

Στο σχήμα 3.4 φαίνεται η επίδραση της συγκέντρωσης του KI στην απόκριση του συστήματος. Οι αντιδράσεις των υπεροξειδίων με τα ιωδιούχα, και ο σχηματισμός των τριωδικών ιόντων απαιτεί μεγάλη περίσσεια των πρώτων έτσι ώστε η τελευταία αντίδραση ισορροπίας να μετατοπίζεται προς τα δεξιά.

Όπως φαίνεται και από το σχήμα 3.4, η βέλτιστη συγκέντρωση του KI στο διάλυμα παραγωγοποίησης είναι 6,6 g/L. Μικρότερες συγκεντρώσεις μειώνουν το σήμα



απόκρισης του ανιχνευτή ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δεν βελτιώνουν επιπλέον την ευαισθησία της μεθόδου αυξάνοντας μόνο την κατανάλωση των αντιδραστηρίων.



Σχήμα 3.4: Επίδραση της συγκέντρωσης του KI στην απόκριση του συστήματος. 1. PAA, 2. H₂O₂, 3. MCPBA.

Η αντίδραση σχηματισμού του τριωδικού ανιόντος από τα υπεροξειδία και το διάλυμα των ιωδιούχων, που εισάγεται μέσω της περισταλτικής αντλίας στο σύστημα, απαιτεί κάποιο χρονικό διάστημα για να ολοκληρωθεί. Σε συνθήκες ροής πρέπει να βρεθεί η βέλτιστη ταχύτητα ροής των αντιδραστηρίων έτσι ώστε η χημική αντίδραση να ολοκληρωθεί ή να φθάσει όσο το δυνατό πιο κοντά στη χημική ισορροπία. Από τη μελέτη της μεταβολής της ταχύτητας ροής για τα διαλύματα Α και Β, βρέθηκε ως βέλτιστη ταχύτητα 0,7 mL/min, έτσι η συνολική ροή του συστήματος ήταν 1,4 mL/min.

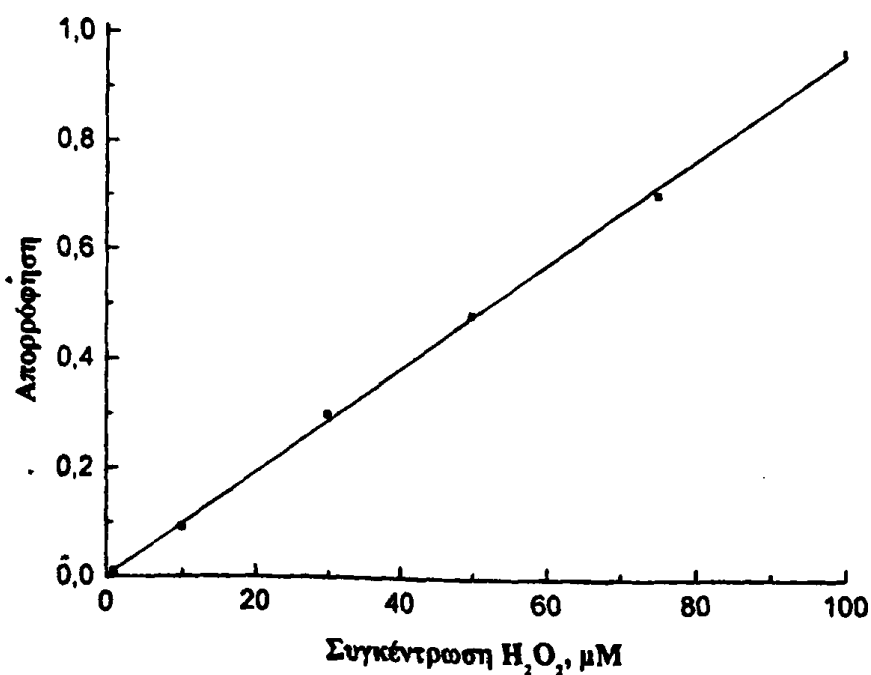
Η θερμοκρασία στην οποία διεξήχθησαν τα πειράματα βαθμονόμησης του συστήματος και ανάλυσης των δειγμάτων ήταν 30°C τοποθετώντας το σπειροειδή σωλήνα στο θερμοστάτη της χρωματογραφικής στήλης.

3.6 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου

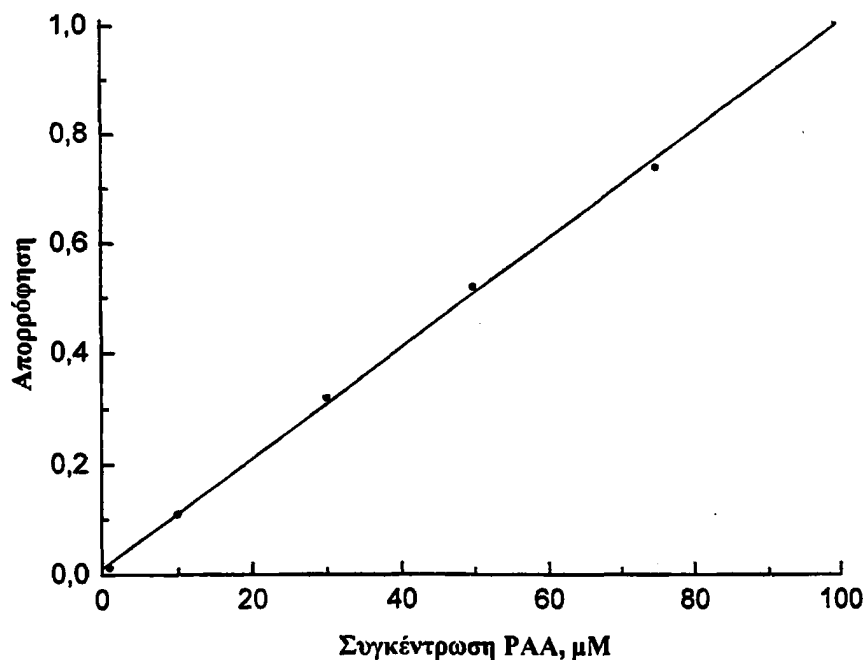
3.6.1 Καμπύλες αναφοράς- Όρια ανίχνευσης μεθόδου

Υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες χαράχθηκαν οι καμπύλες αναφοράς για τους τρεις αναλύτες που διαχωρίστηκαν με την HPLC. Από τα διαλύματα παρακαταθήκης του υπεροξειδίου του υδρογόνου, του υπεροξικού οξέος και του *m*-χλωρο-υπερβενζοϊκού οξέος παρασκευάστηκαν μείγματα που καλύπτουν την περιοχή συγκεντρώσεων από 1 έως 100 μM . Οι καμπύλες αναφοράς φαίνονται στα παρακάτω σχήματα (Σχήματα 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3).

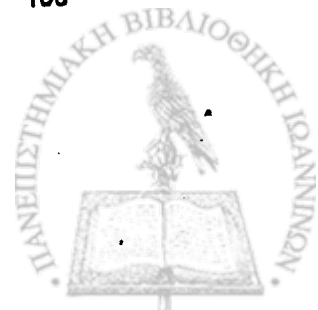
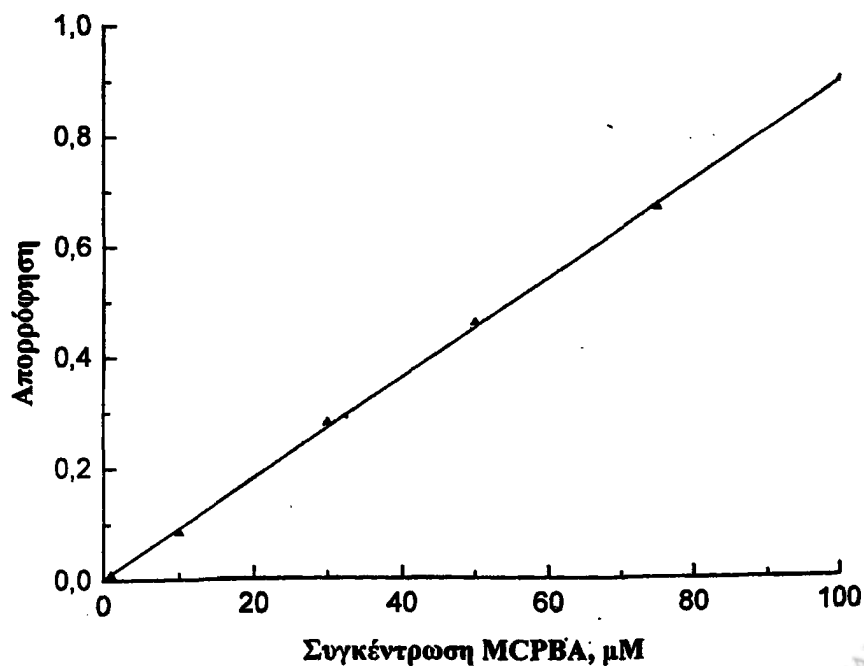
3.5.1) Για το υπεροξείδιο του υδρογόνου η εξίσωση της καμπύλης δίνεται από τη σχέση $A=0,0134 + 0,0095 \times C$ ($r^2=0,9996$, $n=6$), όπου A - ύψος της κορυφής και C - συγκέντρωση. Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε 0,5 μM H_2O_2 .



3.5.2) Για το υπεροξικό οξύ η εξίσωση της καμπύλης δίνεται από τη σχέση $A=0,0108 + 0,0095 \times C$ ($r^2=0,9995$, $n=6$), όπου A - ύψος της κορυφής και C - συγκέντρωση. Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε $0,5 \mu\text{M}$ PAA.



3.5.3) Για το *m*-χλωρο-υπερβενζοϊκό οξύ η εξίσωση της καμπύλης δίνεται από τη σχέση $A=0,0021 + 0,0089 \times C$ ($r^2=0,9998$, $n=6$), όπου A - ύψος της κορυφής και C - συγκέντρωση. Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε $0,6 \mu\text{M}$ MCPBA.



3.6.2 Επαναληψιμότητα της μεθόδου

Ο έλεγχος της επαναληψιμότητας της μεθόδου τόσο την ίδια ημέρα όσο και μεταξύ διαφορετικών ημερών πραγματοποιείται με ανάλυση τριών μειγμάτων, συγκέντρωσης 50 μμποL/L ως προς το κάθε ένα από τα υπεροξειδία, την ίδια ημέρα καθώς και για τρεις συνεχόμενες ημέρες. Η σχετική τυπική απόκλιση, στο πείραμα της ίδιας ημέρας για το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι 1,5%, για το υπεροξικό οξύ είναι 1,7% και για το *m*-χλωρο-υπερβενζοϊκό οξύ 2,5%. Μεταξύ διαφορετικών ημερών είναι 2,5%, 3,5% και 3,0%, αντίστοιχα. Σε κάθε περίπτωση η επαναληψιμότητα είναι ιδιαίτερα ικανοποιητική.

Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα πειραματικά δεδομένα από την παραπάνω μελέτη.

Πίνακας 3.2: Μελέτη της επαναληψιμότητας της μεθόδου.

	Ίδια ημέρα			Διαφορετικές ημέρες		
	H ₂ O ₂	ΡΑΑ	MCPBA	H ₂ O ₂	ΡΑΑ	MCPBA
	0,48*	0,52	0,46	0,48	0,52	0,46
	0,46	0,49	0,41	0,43	0,48	0,43
	0,49	0,49	0,43	0,45	0,45	0,40
M.O.	0,48	0,50	0,43	0,45	0,48	0,43
RSD(%)	1,5	1,7	2,5	2,5	3,5	3,0

*Τιμές απορρόφησης

M.O. Μέσος όρος

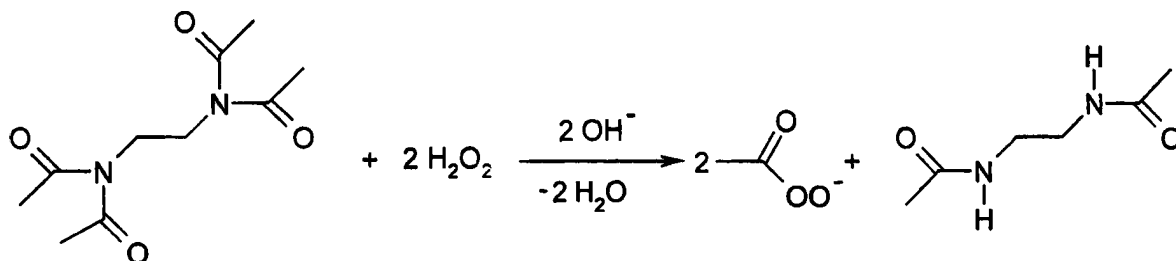
RSD(%) σχετική τυπική απόκλιση

3.7 Εφαρμογή της μεθόδου στην ανάλυση απορρυπαντικών

Η προτεινόμενη μέθοδος εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του υπεροξικού οξέος κατά τη διάρκεια προσομοίωσης ενός κύκλου πλυσίματος με το εμπορικό απορρυπαντικό Persil.



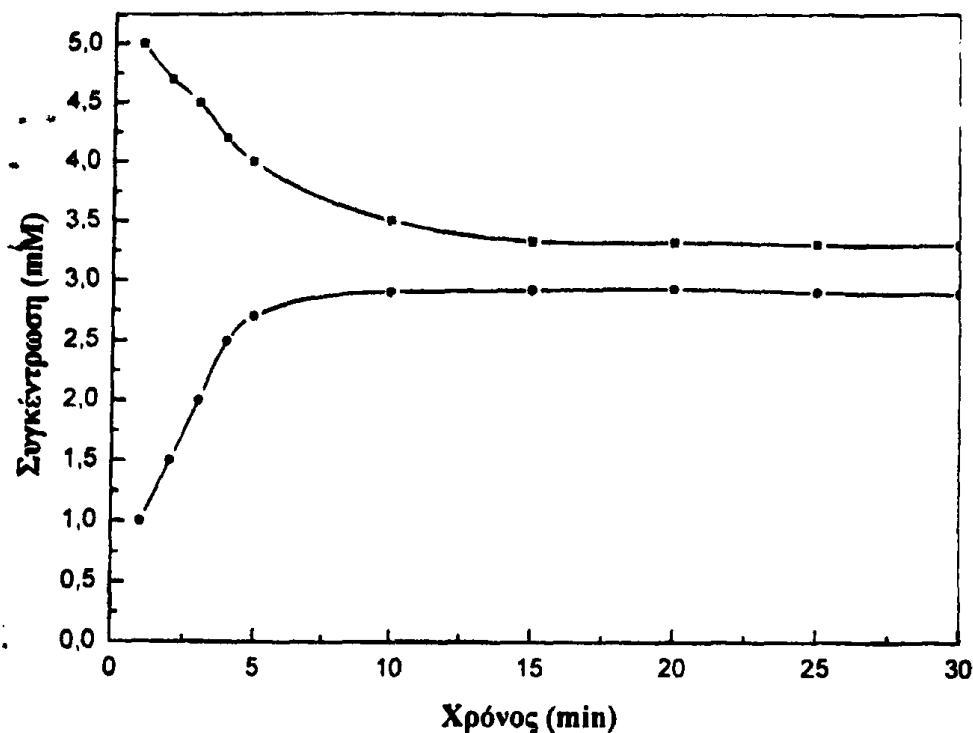
Κατά τη διάρκεια ενός κύκλου πλυσίματος με εμπορικά απορρυπαντικά τα στερεά σύμπλοκα του υπεροξειδίου του υδρογόνου με ανθρακικό ή βορικό νάτριο, ελευθερώνουν υπεροξείδιο του υδρογόνου και ταυτόχρονα δημιουργούν αλκαλικές συνθήκες στο διάλυμα. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου που ελευθερώνεται αντιδρά στη συνέχεια με τους ενεργοποιητές λεύκανσης, όπως η τετραακετυλοαιθυλενοδιαμίνη (TAED-tetraacetyl ethylenediamine) και ελευθερώνει υπεροξικά ανιόντα (Σχήμα 3.6).



Σχήμα 3.6: Αντίδραση σχηματισμού υπεροξικών ιόντων από τη διάλυση των απορρυπαντικών

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τη διάλυση 1 g Persil σε 100 mL νερό, στους 30°C, υπό μαγνητική ανάδευση. Λαμβάνεται κάθε φορά δείγμα 100 μL, αραιώνεται σε τελικό όγκο 3 mL (νερό-ακετονιτρίλιο-οξικό οξύ, 50:20:30), διηθείται μέσω ηθμού PTFE 0,2 μm (Gelman, acrodisc 13 CR) για την απομάκρυνση της θολερότητας και εγχέεται στο σύστημα HPLC υπό τις προαναφερόμενες συνθήκες. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και κάθε φορά η δειγματοληψία γίνεται σε διαφορετικούς χρόνους από την έναρξη της διαδικασίας υπερυδρόλυσης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 3.7. Παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του

υδρογόνου και ταυτόχρονα αύξηση της συγκέντρωσης του υπεροξικού οξέος.



Σχήμα 3.7: Μεταβολή των συγκεντρώσεων του υπεροξειδίου του υδρογόνου (■) και του υπεροξικού οξέος (●) κατά τη διάρκεια ενός «κύκλου πλυσίματος» με το εμπορικό απορρυπαντικό Persil στους 30°C.

3.8 Συμπεράσματα

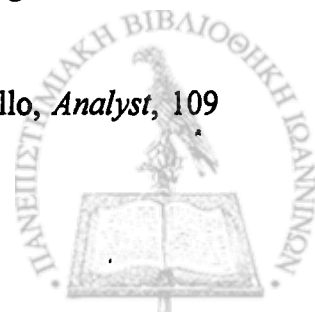
Ο συνδυασμός της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με την τεχνική της παραγωγοποίησης μετά τη στήλη επιφέρει σημαντική βελτίωση της ευαισθησίας και της εκλεκτικότητας και τον ταυτόχρονο προσδιορισμό περισσότερων της μιας υπεροξειδικής ένωσης.

Με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε είναι δυνατός ο ταυτόχρονος προσδιορισμός του υπεροξειδίου του υδρογόνου, του υπεροξικού οξέος και του *m*-χλωρο-υπερβενζοϊκού οξέος με χαμηλά όρια ανίχνευσης.



Βιβλιογραφία

- [1] C.W. Jones, *Application of Hydrogen Peroxide and Derivatives*, RSC, Cambridge, 1999.
- [2] O. Kirk, T. Damhus and M.W. Christensen, *J. Chromatogr.*, 606 (1992) 49.
- [3] K. Grime and A. Clauss, *Chem. Ind.*, (1990) 647.
- [4] S. Minning, A. Weiss, U.T. Bornscheuer and R.D. Schmid, *Anal. Chim. Acta*, 378 (1999) 293.
- [5] P.F. Hudrlik, A.M. Hudrlik, G. Nagandrappa, T. Yimenn and E. Chin, *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (1980) 6894.
- [6] S. Effkemann and U. Karst, *Analyst*, 123 (1998) 1761.
- [7] D. Harms and U. Karst, *Anal. Chim. Acta*, 389 (1999) 233.
- [8] F.P. Greenspand and D.G. Mackellar, *Anal. Chem.*, 20 (1948) 1061.
- [9] B.D. Sully and P.L. Williams, *Analyst*, 87 (1962) 653.
- [10] U. Pinkernell, S. Effkemann and U. Karst, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3623.
- [11] J.M. Gebicki and J. Guille, *Anal. Biochem.*, 176 (1989) 360.
- [12] R.S. Deelder, M.G.F. Kroll and J.H.M. Van Den Berg, *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 307.
- [13] U. Pinkernell, S. Effkemann, F. Nitzsche and U. Karst, *J. Chromatogr. A*, 730 (1996) 203.
- [14] C. Gooijer, G.P. Hoornweg, T. de Beer, A. Bader, D.J. van Iperen and U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, 824 (1998) 1.
- [15] W. Jianhua and H. Ronghuan, *Anal. Chim. Acta*, 303 (1995) 241.
- [16] S. Effkemann, U. Pinkernell, R. Neumuller, F. Schwan, H. Engelhardt and U. Karst, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 3857.
- [17] F. Di Furia, M. Prato, U. Quintily, G. Scorrano and M. Stivenello, *Analyst*, 109 (1984) 985.



- [18] W. Jessup, R.T. Dean and J.M. Gebicki, *Methods in Enzymology*, 233 (1994) 289.
- [19] S. Effkemann, S. Brodsgaard, P. Mortensen S.A. Linde and U. Karst, *J. Chromatogr.*, 855 (1999) 551.
- [20] U. Pinkernell, H.J. Luke and U. Karst, *Analyst*, 122 (1997) 567.
- [21] M.I. Awad, C. Harnood, K. Tokuda and T. Ohsaka, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 1839.
- [22] J.E. Frew, P. Jones and G. Scholes, *Anal. Chim. Acta*, 155 (1983) 139.
- [23] B.E. Saltzman and N. Gilbert, *Anal. Chem.*, 31 (1959) 1914.
- [24] D.M. Davies and M.E. Deary, *Analyst*, 113 (1988) 1477.
- [25] J.L.E. Reubsæet and K. Jinno, *Trends Anal. Chem.*, 17 (1998) 157.
- [26] M. Lores, O. Cabaleiro and R. Cela, *Trends Anal. Chem.*, 18 (1999) 392.
- [27] K. Wang and W.H. Glaze, *J. Chromatogr. A*, 822 (1998) 207.
- [28] F. Di Furia, M. Prato, G. Scorrano and M. Stivenello, *Analyst*, 113 (1988) 793.
- [29] U. Pinkernell, S. Effkemann and U. Karst, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3623.
- [30] P. Jonvel and G. Andermann, *J. Chromatogr.*, 289 (1984) 193.
- [31] S. Baj, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 350 (1994) 159.
- [32] O. Evans, *Analyst*, 123 (1998) 705.
- [33] J. Hong, J. Maguhn, D. Freitag and A. Kettrup, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 361 (1998) 124.
- [34] S. Effkemann, S. Brodsgaard, P. Mortensen S.A. Linde and U. Karst, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366 (2000) 361.
- [35] F. Sauer, S. Limbach and G.K. Moortgat, *Atm. Environ.*, 31 (1997) 1173.
- [36] B.B. Jones, B.C. Clark and G.A. Iakobucci, *J. Chromatogr.*, 202 (1980) 127.
- [37] H.H. Kurth, S. Gab, W.V. Turner and A. Kettrup, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 2586.
- [38] S. Effkemann, U. Pinkernell, D. Harms and U. Karst, *Int. Lab.*, 29 (1999) 14.



ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΧΗΜΙΚΟΥ ΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΟΠΤΙΚΩΝ ΙΝΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ

4.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η κατασκευή ενός χημικού αισθητήρα οπτικών ινών με χρήση μεμβρανών οξικής κυτταρίνης, στις οποίες ενσωματώνεται διπυρηνικό σύμπλοκο του τρισθενούς σιδήρου (dinuclear iron (III) complex - DCI). Το υπεροξειδίο του υδρογόνου σχηματίζει ένωση προσθήκης (adduct) με το διπυρηνικό σύμπλοκο του τρισθενούς σιδήρου. Το έγχρωμο προϊόν που σχηματίζεται έχει ταινία απορρόφησης μεταξύ 590 και 630 nm και ευαισθησία που επιτρέπει τον προσδιορισμό χαμηλών συγκεντρώσεων υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Οι μεμβράνες οξικής κυτταρίνης τοποθετούνται στην επίπεδη επιφάνεια ενός επιπεδόκυρτου φακού μιας κυψελίδας τύπου καθετήρα (probe-type) με την τεχνική της εναπόθεσης σταγόνας (drop coating). Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε διαθέτει εμβαπτιζόμενη κυψελίδα και χρησιμοποιεί μια οπτική ίνα για τη μεταφορά του φωτός από την πηγή στη μεμβράνη που βρίσκεται μεταξύ του άκρου των οπτικών ινών και ενός επίπεδου κατόπτρου. Η ανακλώμενη από το κάτοπτρο ακτινοβολία προσπίπτει στον ανιχνευτή ζεύξης φορτίου, όπου μεταφέρεται με μια δεύτερη οπτική ίνα.

Στην πολυλειτουργική αυτή επικάλυψη του αισθητήρα, η τροποποιημένη μεμβράνη οξικής κυτταρίνης αποτελεί το μικροπεριβάλλον της χημικής αντίδρασης και σε συνδυασμό με τη δυνατότητα αποκλεισμού παρεμποδιστικών μορίων



(διαπερατοεκλεκτικότητα της μεμβράνης οξικής κυτταρίνης) συνθέτουν ένα χημικό αισθητήρα μεγάλης εκλεκτικότητας και σταθερότητας.

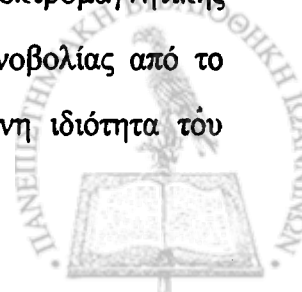
Το διπυρηνικό σύμπλοκο του τρισθενούς σιδήρου εγκλωβίστηκε σε μεμβράνη οξικής κυτταρίνης σε συγκεντρώσεις από 1-8 mM. Οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του οπτικού αισθητήρα, όπως η χωρητικότητα των μεμβρανών ως προς την ενεργή ουσία, το pH και η σύσταση των ρυθμιστικών συστημάτων, η σταθερότητα του σχηματιζόμενου συμπλόκου, η θερμοκρασία και πιθανές παρεμποδιστικές δράσεις άλλων υπεροξειδίων μελετήθηκαν με σκοπό την εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα. Η περιοχή γραμμικότητας του αισθητήρα είναι 0,1-2,0 mM, με όριο ανίχνευσης 0,05 mM. Η σχετική τυπική απόκλιση κατά την ανάλυση 1 mM διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι 1,5% (n=5).

Η συνολική αναλυτική διαδικασία είναι απλή και επιτρέπει τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε δείγματα διαλυμάτων καθαρισμού φακών επαφής και στοματικά διαλύματα, ενώ είναι απαλλαγμένη από τις παρεμποδίσεις συνυπαρχόντων ιόντων.

4.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι χημικοί αισθητήρες οπτικών ινών (Fiber Optic Chemical Sensors - FOCS) αποτελούν μια υποκατηγορία των χημικών αισθητήρων, όπου οι οπτικές ίνες χρησιμοποιούνται ως μέρος του μεταλλάκτη. Η αρχή λειτουργίας των FOCS βασίζεται είτε στην παραγωγή φωτός από μια αντίδραση χημειοφωταύγειας ή βιοφωταύγειας [1-7], είτε στον φθορισμό του αναλύτη [8-13] ή στο σχηματισμό χρωμοφόρων ουσιών του αναλύτη με ανόργανες ή οργανικές ενώσεις [14-18].

Οι φωτομετρικοί αισθητήρες οπτικών ινών είναι από τους πρώτους που εμφανίστηκαν στη βιβλιογραφία μετά την "είσοδο" των οπτικών ινών στο πεδίο της Αναλυτικής Χημείας [19]. Οι πρώτοι αισθητήρες αυτής της κατηγορίας χρησιμοποιούσαν τις οπτικές ίνες για τη μεταφορά της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από την πηγή στο δείγμα και της ανακλώμενης ακτινοβολίας από το δείγμα προς τον ανιχνευτή. Σ' αυτές τις περιπτώσεις η μετρούμενη ιδιότητα του



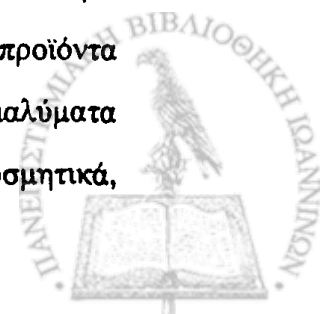
δείγματος είναι η απορρόφηση σε συγκεκριμένη περιοχή του φάσματος. Οι αισθητήρες αυτού του τύπου έχουν πολλά μειονεκτήματα που σχετίζονται με τις φασματικές ιδιότητες των αναλυτών και την επίδραση της μήτρας του δείγματος [20].

Ένας αποτελεσματικός τρόπος για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων είναι η χρήση εκλεκτικών αντιδραστηρίων τα οποία ακινητοποιούνται φυσικά ή χημικά στο άκρο της οπτικής ίνας ή σε κοντινή απόσταση από αυτό ή ακόμα και στο περίβλημα της οπτικής ίνας. Σε συνδυασμό με τα υλικά στήριξης των εκλεκτικών αντιδραστηρίων και τις μεμβράνες επικάλυψης που εξασφαλίζουν εκλεκτική διαπερατότητα, οι αισθητήρες που κατασκευάζονται αποκτούν σημαντική εκλεκτικότητα για τον προσδιορισμό αναλυτών σε φυσικά δείγματα [21-24].

Οι προδιαγραφές που πρέπει να πληρούν τα εκλεκτικά αντιδραστήρια είναι η ταχύτητα αντίδρασης με τον αναλύτη για να εξασφαλίζουν μικρούς χρόνους απόκρισης, η σταθερότητά τους σε ακινητοποιημένη μορφή, η φωτοευαισθησία και η επαναληψιμότητα στη διαδικασία φόρτωσης του υλικού στήριξης.

Ανάλογα με τις εφαρμογές προσδιορίζονται και τα χαρακτηριστικά λειτουργίας και σταθερότητας των χημικών αισθητήρων. Για εφαρμογές σε κλινικές αναλύσεις απαιτείται η κατασκευή αισθητήρων μικρού μεγέθους για χρήσεις *in vivo*, η χρήση συγκεκριμένων βιοσυμβατών υλικών, η ελαχιστοποίηση των χρόνων απόκρισης και το χαμηλό κόστος τους. Επειδή στις περισσότερες περιπτώσεις οι αισθητήρες που κατασκευάζονται για το σκοπό αυτό είναι μιας χρήσης, η αξιοπιστία τους σχετίζεται με τους σχετικά μικρούς χρόνους λειτουργίας. Ενώ για εφαρμογές σε βιομηχανική κλίμακα και σε περιβαλλοντικές μελέτες (*monitoring*) απαιτείται η χρήση τους *in situ* καθώς και η δυνατότητα συνεχούς λειτουργίας. Το μέγεθος και το κόστος τους για τις εφαρμογές αυτές είναι δευτερεύουσας σημασίας.

Η χρήση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ως οξειδωτικού και λευκαντικού μέσου σε διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές καθώς και ως απολυμαντικού σε πολλά προϊόντα καθημερινής χρήσης απαιτεί και την ανάπτυξη κατάλληλων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό σε επίπεδα ιχνοποσοτήτων μέχρι αυτών που υπάρχουν σε προϊόντα καθημερινής οικιακής χρήσης. Στα προϊόντα αυτά περιλαμβάνονται τα διαλύματα καθαρισμού φακών επαφής, στοματικά διαλύματα, οδοντόκρεμες, αποσμητικά,



καλλυντικά και καθαρά αραιά διαλύματα (συνήθως 3%) για τοπική απολύμανση πληγών. Στα περισσότερα από τα προϊόντα αυτά η περιεκτικότητα του υπεροξειδίου, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία, πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0,1 και 4% [25].

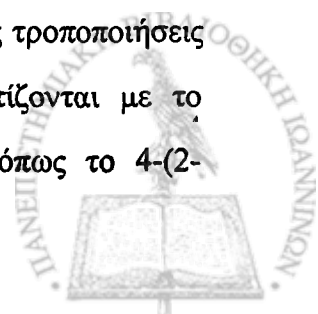
Από τους οπτικούς αισθητήρες που περιγράφονται στη βιβλιογραφία, αυτοί για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου κατέχουν από τις πρώτες θέσεις όχι μόνο σε αριθμό αλλά και σε εφαρμογές [26].

Ο άμεσος προσδιορισμός του υπεροξειδίου του υδρογόνου περιορίζεται από τη χαμηλή απορροφητικότητα ($\epsilon = 140\text{-}35 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) των διαλυμάτων του στην περιοχή του υπεριώδους (200-240 nm). Επίσης η απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας από το υπεροξείδιο του υδρογόνου προκαλεί τη διάσπασή του και το σχηματισμό ελεύθερων ριζών υδροξυλίου οι οποίες προκαλούν παράπλευρες αντιδράσεις με τα συστατικά του δείγματος.

Έτσι η ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων με χρήση εκλεκτικών αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου προσελκύει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων.

Τα πρώτα αντιδραστήρια, που σχηματίζουν σύμπλοκα με το υπεροξείδιο του υδρογόνου και χρησιμοποιήθηκαν για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό του είναι ανόργανες ενώσεις του τιτανίου, όπως το χλωριούχο τιτάριο, το θειικό τιτάριο ή το οξαλικό τιτάριο [27,28]. Οι ενώσεις αυτές σχηματίζουν μονοπυρηνικά σύμπλοκα με το υπεροξείδιο του υδρογόνου τα οποία απορροφούν σε περιοχές από 400-430 nm και οι αντιδράσεις συμπλοκοποίησης λαμβάνουν χώρα σε όξινο περιβάλλον. Η μέθοδος αυτή, που ονομάζεται και μέθοδος του τιτανυλίου, χαρακτηρίζεται από χαμηλή ευαισθησία ($\epsilon = 935 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), προβλήματα επαναληψιμότητας λόγω της φωτοευαισθησίας του τιτανίου και εκλεκτικότητας από παρεμποδίσεις από τα φθοριούχα, το EDTA και τα φωσφορικά.

Πολλές τροποποιήσεις της μεθόδου περιλαμβάνουν την εκχύλιση του κίτρινου συμπλόκου με οξικό αιθυλεστέρα ή την χρήση ιονοανταλλακτικών ρητινών προς άρση της παρεμποδιστικής δράσης των προαναφερθεισών ουσιών [29]. Άλλες τροποποιήσεις που αποσκοπούν στην αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου σχετίζονται με το σχηματισμό συμπλόκων του τιτανίου με οργανικά αντιδραστήρια, όπως το 4-(2-



πυριδιλαζω)-ρεσορκινόλη, (4-(2-pyridilazo)-resorcinol, PAR) και πολλές πορφυρίνες [30,31]. Τα σύμπλοκα αυτά σχηματίζουν τριτοταγείς ενώσεις προσθήκης με το υπεροξειδίο του υδρογόνου τα οποία απορροφούν σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με την κλασσική μέθοδο του τιτανυλίου και εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερη απορροφητικότητα. Ως μειονεκτήματα των μεθόδων αυτών αναφέρονται η συμπλοκοποίηση πολλών στοιχείων μετάπτωσης από το PAR και στην περίπτωση των πορφυρικών συμπλόκων η μικρή διαφορά στα μέγιστα απορρόφησης των συμπλόκων τους με το τιτάνιο και τις ενώσεις προσθήκης.

Άλλες μέθοδοι βασίζονται στο σχηματισμό συμπλόκων του υπεροξειδίου του υδρογόνου με χηλικές ενώσεις του βαναδίου και του ουρανίου με το βενζοϋδροξαμικό οξύ. Στα μειονεκτήματα των μεθόδων αυτών περιλαμβάνονται η αστάθεια των συμπλόκων σε υδατικά διαλύματα και η χαμηλή εκλεκτικότητα [32-35].

Ο U. Karst και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μια μέθοδο για τον εκλεκτικό προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε δείγματα προϊόντων καθημερινής οικιακής χρήσης (household products) με χρήση ενός διπυρηνικού συμπλόκου του σιδήρου (III). Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από υψηλή εκλεκτικότητα ως προς την παρεμποδιστική δράση άλλων υπεροξέων και μεταλλικών κατιόντων [36-38].

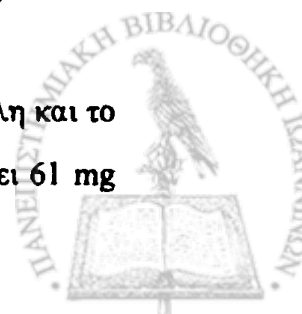
Η μεταφορά της αντίδρασης σχηματισμού του συμπλόκου αυτού από την υγρή χημεία στο μικροπεριβάλλον μιας μεμβράνης οξικής κυτταρίνης και η ανάπτυξη ενός αισθητήρα οπτικών ινών αποτελούν το αντικείμενο της παρακάτω μελέτης.

4.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

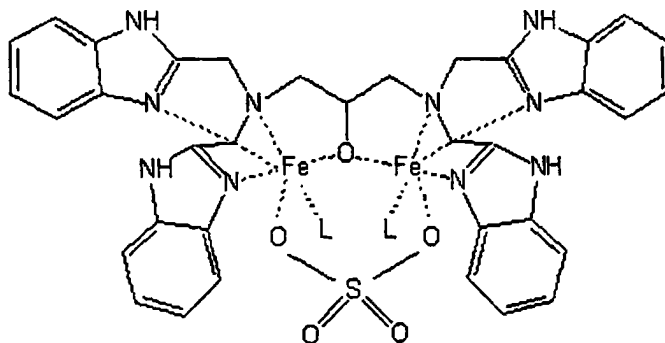
4.3.1 Αντιδραστήρια

Η σύνθεση του διπυρηνικού συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου (dinuclear iron (III) - DCI) (Σχήμα 4.1) έγινε στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου του Münster της Γερμανίας σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία [36]:

Ποσότητα 104 mg (0.2 mmol) $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ διαλύονται σε 5 mL μεθανόλη και το σχηματιζόμενο διάλυμα προστίθεται σε 2 mL αιθανολικό διάλυμα που περιέχει 61 mg



(0,1 mmol) H(TBPO). Στο κόκκινο μίγμα που σχηματίζεται προστίθενται 1 mL υδατικό διάλυμα Na_2SO_4 (14 mg) και 800 μL διάλυμα 0,1 M θεικού οξέος. Το προϊόν που σχηματίζεται κρυσταλλώνεται μετά από μερικές μέρες στο ψυγείο. Οι λεπτοί κόκκινοι βελονοειδείς κρύσταλλοι που σχηματίζονται πλένονται σχολαστικά με αιθανόλη και αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα.



Σχήμα 4.1: Δομή του μορίου του διπυρηνικού συμπλόκου του σιδήρου (III)

Ο οργανικός υποκαταστάτης (H(TBPO) N,N,N',N'-tetrakis(2-βενζυμιδαζωλυλομεθυλο)-1,3-διαμινοπροπαν-2-όλη) που χρησιμοποιήθηκε συντέθηκε στο εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του Πανεπιστημίου του Münster της Γερμανίας όπου και ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπικές τεχνικές [39].

Όλα τα εμπορικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν, είτε αναλυτικού ή του μεγίστου, διαθέσιμου, βαθμού καθαρότητας. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο δις απεσταγμένο ύδωρ.

Πρότυπο διάλυμα H_2O_2 : παρασκευάζεται με διαδοχικές αραιώσεις του εμπορικού διαλύματος 30% (Merck, Germany). Τα αραιά διαλύματα του υπεροξειδίου του υδρογόνου παρασκευάζονται καθημερινά από το πρότυπο διάλυμα.

Παρασκευάστηκαν ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών (pH 5,5-10,0), οξικών (pH 3,0-5,6), MOPS (pH 6,5-7,9), HEPES (pH 6,8-8,2) και Tris-HCl (pH 7,5-9,0) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η γενικότερη ρύθμιση του pH κατά τα πειράματα βελτιστοποίησης έγινε με σταγόνες διαλυμάτων HCl 0,1 N ή NaOH 0,1 N. Η οξική κυτταρίνη (40% acetyl), η πολυβινυλική αλκοόλη και όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας, προϊόντα των εταιρειών Merck και Sigma.



4.3.2 Πραγματικά δείγματα

Τα δείγματα προς ανάλυση ήταν δυο διαλύματα απολύμανσης φακών επαφής τα εμπορικά ονόματα των οποίων είναι NOVASEPT και OXYSEPT 1STEP και ένα στοματικό διάλυμα με την εμπορική ονομασία UNISEPT. Τα πρώτα ήταν των εταιριών Ciba Vision (Duluth, Ga, USA) και Allergan (Ballsbridge, Dublin, Ireland) ενώ το στοματικό διάλυμα ήταν της εταιρίας UNI-PHARMA (Κηφισιά, Αθήνα).

Από τα παραπάνω σκευάσματα (τα οποία χρησιμοποιούνται σε διαλύματα) παρασκευάζονται τρία υδατικά διαλύματα μετά από αραιώση με έναν συντελεστή 100 σε απιονισμένο νερό. Μέρος των σκευασμάτων ογκομετρείται με υπερμαγγανικό κάλιο.

Τα σκευάσματα NOVASEPT και OXYSEPT 1STEP περιέχουν και συστήματα απενεργοποίησης (καταλυτικής διάσπασης) του υπεροξειδίου του υδρογόνου μετά τη διαδικασία απολύμανσης των φακών επαφής. Το πρώτο περιέχει θήκη απολύμανσης που φέρει και καταλύτη πλατίνα ενώ το δεύτερο κυκλοφορεί με ταμπλέτες που περιέχουν καταλάση (0,1 mg εκάστη) οι οποίες προστίθενται στην κατάλληλη θήκη μαζί με το διάλυμα απολύμανσης και είναι καλυμμένες με προστατευτικό υμένιο, το οποίο επιβραδύνει την απελευθέρωση της καταλάσης στο διάλυμα.

Και οι δύο κατασκευαστές προτείνουν 6 ώρες για να ολοκληρωθεί η διαδικασία απολύμανσης των φακών επαφής πριν την επόμενη χρήση τους.

4.3.3 Κατασκευή του Χημικού Αισθητήρα

Ο χημικός αισθητήρας κατασκευάστηκε με επικάλυψή του με μεμβράνη οξικής κυτταρίνης, στην οποία ενσωματώθηκε το DCI [40]. Η κατασκευή του αισθητήρα επιχειρήθηκε με δύο τρόπους:

1. Άμεση χύτευση (direct casting) της πολυμερικής επικάλυψης DCI στην επιφάνεια του αισθητήρα.
2. Παρασκευή της πολυμερικής επικάλυψης CA/DCI και προσαρμογή της στην επιφάνεια του αισθητήρα.



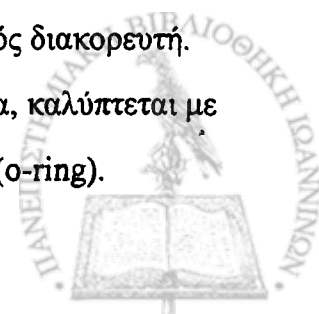
4.3.4 Άμεση Χύτευση της Πολυμερικής Επικάλυψης

Ως τεχνική ακινητοποίησης για την κατασκευή του χημικού αισθητήρα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική εναπόθεσης σταγόνας (drop coating). Το διάλυμα παρακαταθήκης (οξική κυτταρίνη 4% w/v) παρασκευάστηκε ως εξής: 3,9960 g οξικής κυτταρίνης και 4 mg πολυβινυλικής αλκοόλης διαλύονται σε μίγμα 60 mL ακετόνης και 40 mL κυκλοεξανόνης σε καθαρή αεροστεγή φιάλη των 250 mL. Η προσθήκη της οξικής κυτταρίνης γίνεται σταδιακά με συνεχή ανάδευση, ώστε το διάλυμα που προκύπτει να είναι διαυγές. Η ανάδευση του διαλύματος συνεχίζεται επί 1 ώρα περίπου και το διάλυμα παρακαταθήκης φυλάσσεται στους +4°C για μεγάλο χρονικό διάστημα. Το διάλυμα τροποποίησης (1-8 mM DCI σε 2% οξική κυτταρίνη) παρασκευάζεται καθημερινά με ανάμιξη κατάλληλου όγκου διαλύματος DIC σε ακετονιτρίλιο με 5 mL του διαλύματος παρακαταθήκης. Η τροποποίηση του probe γίνεται με εναπόθεση μιας σταγόνας όγκου 7 μ L στην επιφάνειά του και παραμονή 1 ώρας (ή 10 λεπτά σε ρεύμα θερμού αέρα) για την εξάτμιση τού διαλύτη με αποτέλεσμα την κατασκευή του αισθητήρα.

4.3.5 Παρασκευή της Πολυμερικής Μεμβράνης - Προσαρμογή στην Επιφάνεια του αισθητήρα

Όγκος 10 mL του παραπάνω διαλύματος οξικής κυτταρίνης (4% w/v) αναμιγνύονται με ίσο όγκο διαλύματος DCI (2-16 mM) σε ακετονιτρίλιο και απλώνονται πάνω στη λεία καθαρή γυάλινη επιφάνεια ενός Petri dish (διάμετρος 110 mm) και αφήνονται για διάστημα 24 ωρών μέχρι την πλήρη εξάτμιση του μίγματος των διαλυτών. Το λεπτό στρώμα της μεμβράνης αποκολλάται κατά τη βύθιση της γυάλινης επιφάνειας σε λουτρό απεσταγμένου ύδατος, παραλαμβάνεται με φύλλο Teflon και αφήνεται για 12 ώρες να στεγνώσει, καλυμμένο με διηθητικό χαρτί. Τα φύλλα των μεμβρανών τεμαχίζονται σε μικρότερα, διαμέτρου 6 mm περίπου, με τη βοήθεια ενός διακορευτή.

Στη συνέχεια η μεμβράνη εφαρμόζεται στην επιφάνεια του καθετήρα, καλύπτεται με μεμβράνη Nylon και συγκρατείται με τη βοήθεια πλαστικού δακτυλίου (o-ring).



Η τεχνική της παρασκευής πολυμερικών μεμβρανών επικάλυψης είναι μια χρονοβόρα διαδικασία και τα αποτελέσματα των αισθητήρων που κατασκευάστηκαν με χρήση των μεμβρανών αυτών δεν ήταν ικανοποιητικά. Τα προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν με τη βοήθεια ενός εμβαπτιζόμενου καθετήρα της εταιρίας Metrohm (Herisen, Switzerland) έδειξαν κακή επαναληψιμότητα των μετρήσεων λόγω της διείσδυσης του υγρού στη διεπιφάνεια αισθητήρα/μεμβράνης που είχε ως αποτέλεσμα την κακή επαφή της μεμβράνης με τον αισθητήρα. Έτσι, η άμεση επικάλυψη (χύτευση) της επιφάνειας του αισθητήρα επιλέχτηκε για τη μελέτη και την εφαρμογή του στα παρακάτω πειράματα.

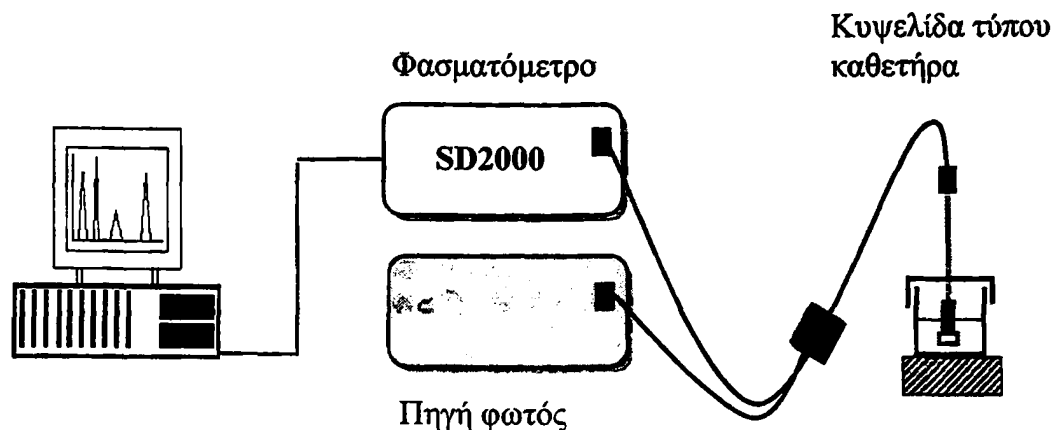
4.3.6 Πειραματική Διάταξη

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε (Σχήμα 4.2) αποτελείται από μια πηγή ακτινοβολίας τύπου LS-1 (360-900 nm, OceanOptics Inc., USA), το φασματοφωτόμετρο τύπου SD2000 δύο καναλιών της εταιρίας OceanOptics Inc., (Florida, USA) και την εμβαπτιζόμενη κυψελίδα τύπου TP300-UV-VIS (OceanOptics Inc., USA) που χρησιμοποιεί μια οπτική ίνα 300 nm για τη μεταφορά του φωτός από την πηγή στη μεμβράνη, που βρίσκεται μεταξύ του άκρου των οπτικών ινών και ενός επίπεδου κατόπτρου. Η ανακλώμενη από το κάτοπτρο ακτινοβολία προσπίπτει στον ανιχνευτή ζεύξης φορτίου, στο οποίο μεταφέρεται με μια δεύτερη οπτική ίνα 300 nm. Το μήκος των οπτικών ινών είναι 2 m. Τα υλικά της εμβαπτιζόμενης κυψελίδας είναι τηγμένη πυριτία, οξύμαχο πλαστικό Epotek 353 NDT, πολυμερές PEEK (το κάλυμμα που φέρει το επίπεδο κάτοπτρο) και ανοξείδωτο χάλυβα (εσωτερική φέρουλα).

Η οπτική της διαδρομή είναι 16 mm δηλαδή δύο φορές την απόσταση μεταξύ της επίπεδης πλευράς του επιπεδόκυρτου φακού και του επίπεδου κατόπτρου.

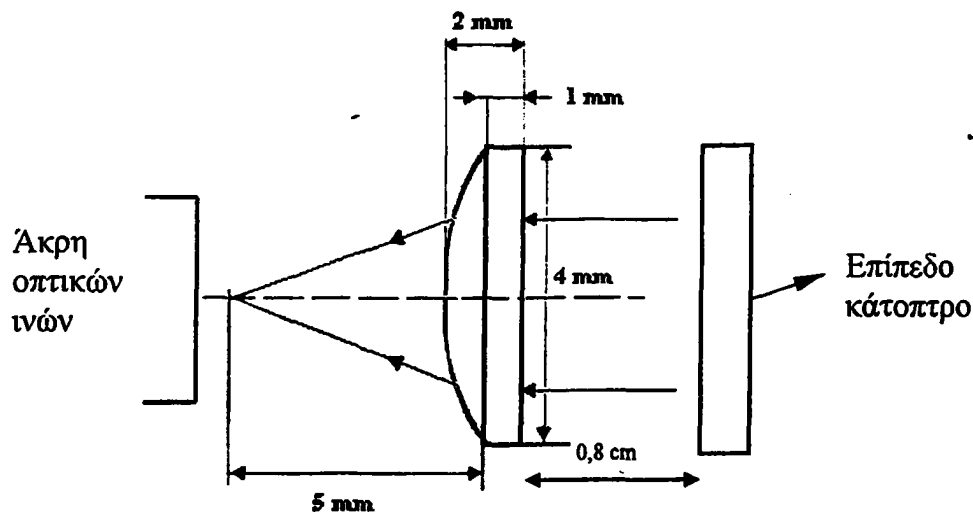
Το όλο σύστημα συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ελέγχεται μέσω του λογισμικού Spectra Win 4.2 (Top Sensors System, The Netherlands). Μια πιο λεπτομερή περιγραφή της λειτουργίας του ανιχνευτή και του λογισμικού δίνεται στο πρώτο κεφάλαιο του πειραματικού μέρους.





Σχήμα 4.2: Πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Η ανακλώμενη από το κάτοπτρο δέσμη συγκλίνει στο άκρο των οπτικών ινών και η συγκλίνουσα ακτινοβολία περικλείεται στον κώνο αποδοχής της οπτικής ίνας (Σχήμα 4.3).



Σχήμα 4.3: Επιπεδόκυρτος φακός που χρησιμοποιείται για την προσαρμογή των μεμβρανών στον χημικό αισθητήρα. Το σημείο σύγκλισης των ακτίνων βρίσκεται στο άκρο της οπτικής ίνας

4.3.7 Πορεία Εργασίας

Σε ποτήρι ζέσεως των 25 mL προστίθενται κάθε φορά 15 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών (0,1 M, pH 5,0) και σ' αυτό εμβαπτίζεται η κυψελίδα που φέρει τη μεμβράνη της οξικής κυτταρίνης με το σύμπλοκο του σιδήρου. Το διάλυμα βρίσκεται υπό συνεχή ανάδευση καθ' όλη τη διάρκεια των μετρήσεων. Όπως περιγράφεται και στο πρώτο κεφάλαιο του πειραματικού μέρους, για την καταγραφή των φασμάτων

απορρόφησης με τον ανιχνευτή ζεύξης φορτίου απαιτείται η λήψη σκοτεινού φάσματος του ανιχνευτή, δηλαδή του σήματος όταν ο ανιχνευτής δεν «βλέπει» την πηγή φωτός και η λήψη τυφλού του πειράματος. Η κυψελίδα καλύπτεται με αλουμινόχαρτο για να εμποδίζεται η επίδραση του περιβάλλοντος στις μετρήσεις.

Η προσθήκη των προτύπων διαλυμάτων του υπεροξειδίου του υδρογόνου και των δειγμάτων από διαλύματα καθαρισμού φακών επαφής και στοματικά διαλύματα γίνεται με μικροσιφώνιο και υπό ανάδευση. Το σύστημα αφήνεται για 5 min να αντιδράσει και η απορρόφηση καταγράφεται και αποθηκεύεται.

Για μετρήσεις της αντίδρασης του διαλυτού DCI με το υπεροξείδιο του υδρογόνου χρησιμοποιήθηκε η πειραματική διάταξη που περιγράφεται στο πρώτο κεφάλαιο του πειραματικού μέρους.

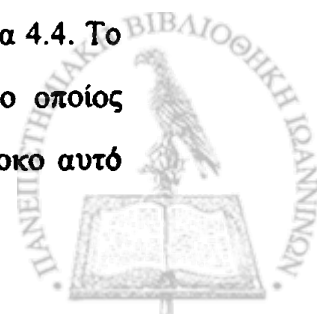
Για το σκοπό αυτό παρασκευάζεται διάλυμα του DCI 5 mM διαλύοντας 7 mg στερεής ουσίας σε 1 mL απιονισμένο νερό. Το διάλυμα χωρίζεται σε δυο μέρη. Στο πρώτο μέρος προστίθεται 1 mL υδατικού διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου 5 mM και το μείγμα αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση για 5 min. Καταγράφεται το φάσμα του στην ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Στο δεύτερο μέρος προστίθεται 1 mL απεσταγμένο νερό και καταγράφεται το φάσμα του στο ορατό.

4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

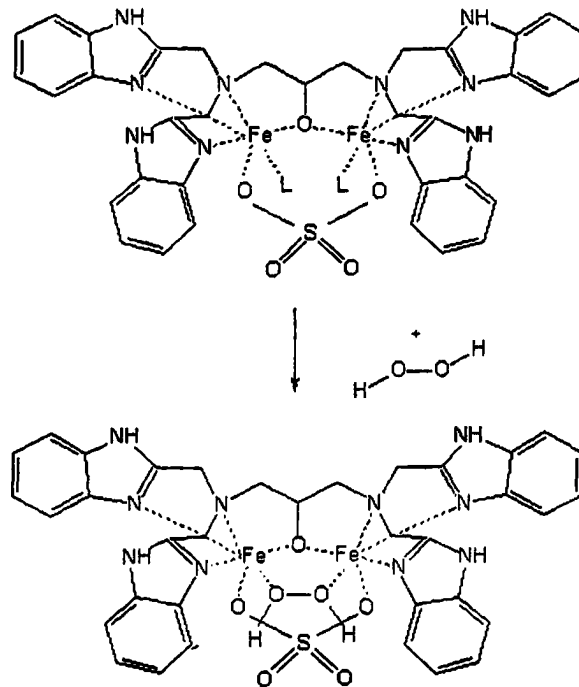
4.4.1 Η χημική αντίδραση

Η αντίδραση του διπυρηνικού συμπλόκου του σιδήρου (III) με το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι μη αντιστρεπτή, με στοιχειομετρία 1:1. Η σταθερά σχηματισμού της ένωσης πρόσθης είναι $10^6 M^{-1}$, ενώ οι μετρήσεις με φασματοσκοπία συντονισμού Raman έδειξαν ότι τα οξυγόνα του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο προϊόν της αντίδρασης δεν είναι πρωτονιωμένα. Η δομή του τελικού προϊόντος επιβεβαιώνεται και από τις μελέτες NMR που έγιναν από τον Krebs και του συνεργάτες του [41-43].

Η αντίδραση του DCI με το υπεροξείδιο του υδρογόνου φαίνεται στο σχήμα 4.4. Το L συμβολίζει το διαλύτη που χρησιμοποιείται κατά την παρασκευή του ο οποίος αντικαθίσταται εύκολα από το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Έτσι, το σύμπλοκο αυτό



χαρακτηρίζεται ως ένα λειτουργικό μοντέλο ενεργοποίησης μικρών μορίων, αφού τα μόρια του διαλύτη στη σφαίρα σύνταξης του σιδήρου αντικαθίστανται από τα μόρια του υπεροξειδίου του υδρογόνου σχηματίζοντας μια σταθερή ένωση προσθήκης [44,45].



Σχήμα 4.4: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης προσθήκης μεταξύ του διπυρηνικού συμπλόκου του σιδήρου (III) (DCI) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου

Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η απόδοση της μεθόδου και να επιτευχθούν μέγιστες ανακτήσεις και χαμηλά όρια ανίχνευσης, μελετήθηκε η επίδραση όλων των παραμέτρων που εμπλέκονται τόσο στο σχηματισμό της ένωσης προσθήκης όσο και στη σταθερότητά της κατά τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε πραγματικά δείγματα.

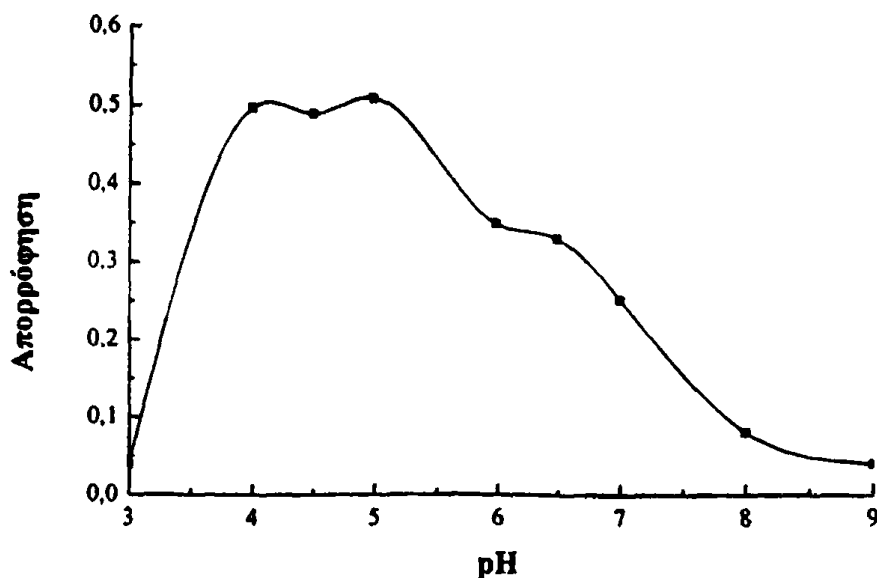
4.4.2 Επίδραση πειραματικών συνθηκών

Το pH αποτελεί έναν από τους ρυθμιστικούς παράγοντες για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου καθώς επηρεάζει τη χημική του συμπεριφορά. Όπως φαίνεται και από το σχήμα 4.5, η απόδοση της μεθόδου εξαρτάται από το pH και παρουσιάζει μια βέλτιστη στενή περιοχή μεταξύ 4,0 και 5,0.



Η αντίδραση του διπυρηνικού συμπλόκου του σιδήρου (III) με το υπεροξειδίο του υδρογόνου επηρεάζεται και από το διαλύτη που χρησιμοποιείται. Έτσι, ο Krebs και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι η αντίδραση αυτή σε οργανικούς διαλύτες (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο) είναι πιο ευαίσθητη και το μέγιστο της απορρόφησης του προϊόντος μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση μ' αυτό σε υδατικά διαλύματα. Η αντίδραση σε υδατικά διαλύματα παρουσιάζει όμως μεγαλύτερη ταχύτητα [41].

Στην παρούσα μελέτη όλες οι μετρήσεις έγιναν σε υδατικά διαλύματα διότι οι μεμβράνες που φέρουν το DCI διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες και η μέθοδος που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε στον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε υδατικά δείγματα. Έτσι, επιλέχτηκε ένα ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (0,1 M, pH 5,0) ως ρυθμιστικό εργασίας για τα επόμενα πειράματα.



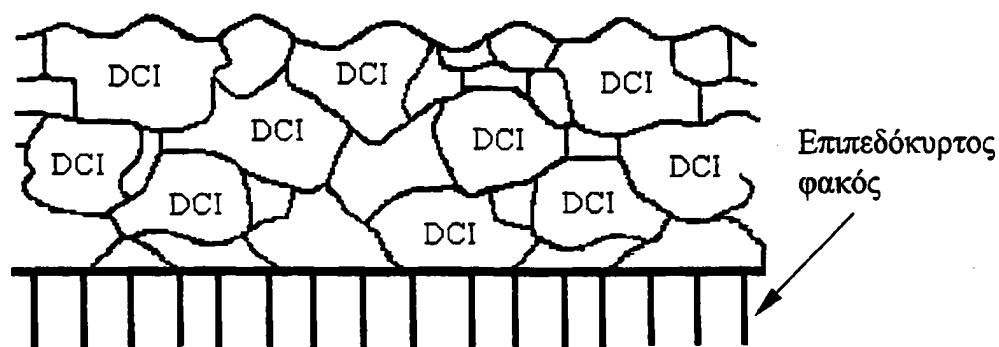
Σχήμα 4.5: Επίδραση του pH στο σχηματισμό της ένωσης προσθήκης του διπυρηνικού συμπλόκου του σιδήρου (III) με το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Συγκέντρωση H_2O_2 1,0 mM.

Η μεγαλύτερη απόκριση στην περιοχή pH 4,0-5,0 οφείλεται πιθανώς στη διατήρηση της υπεροξειδικής γέφυρας $-O-O-$ που είναι αυτή που αντικαθιστά τα L και συνδέεται με το Fe(III).

Η επικάλυψη του χημικού αισθητήρα μπορεί να θεωρηθεί ως ένα πολυμερικό πλέγμα οξικής κυτταρίνης, που έχει εγκλωβισμένα μέσα του τα μόρια του DCI (Σχήμα 4.6) [40]. Το πλέγμα της οξικής κυτταρίνης επιτρέπει τη διόδο σε μόρια αναλυτών πολύ

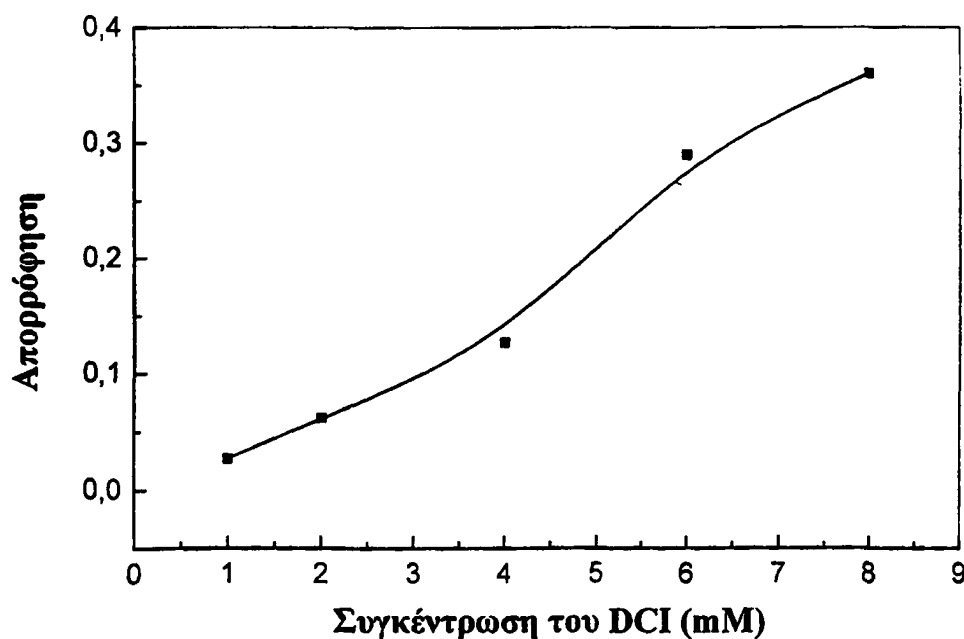


μικρού μεγέθους (μικρού μοριακού βάρους π.χ. H_2O_2 , και μεταλλικά κατιόντα ή ανιόντα) λειτουργώντας ως φράγμα για μεγαλύτερα μόρια.



Σχήμα 4.6: Σχηματική αναπαράσταση της πολυμερικής επικάλυψης οξικής κυτταρίνης / DCI.

Η συγκέντρωση του DCI στη μεμβράνη επηρεάζει αισθητά την απόκριση του αισθητήρα. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 4.7, η αύξηση της συγκέντρωσης του DCI αυξάνει την ευαισθησία του αισθητήρα, όμως σε συγκεντρώσεις πάνω από 6 mM DCI δεν σχηματίζονται ομοιογενείς μεμβράνες και συνεπώς δεν έχουμε επαναλήψιμες μετρήσεις.



Σχήμα 4.7: Επίδραση της συγκέντρωσης του DCI στην απόδοση του χημικού αισθητήρα. Συγκέντρωση H_2O_2 0,75 mM. pH 5,0 σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών.



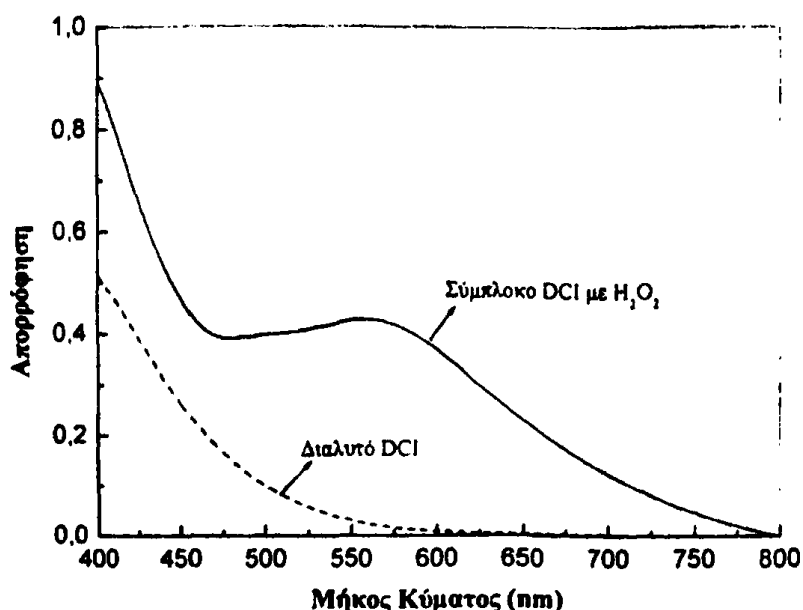
Επίσης σε υψηλότερες συγκεντρώσεις DCI παρατηρείται έκπλυσή του από τις μεμβράνες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της απόκρισης του αισθητήρα λόγω της αντίδρασης του διαλυτού DCI με το υπεροξείδιο του υδρογόνου.

4.4.3 Σύγκριση του χημικού αισθητήρα με τη φωτομετρική μέθοδο. Φασματικές ιδιότητες του ακινητοποιημένου DCI

Κατά τη διάρκεια της ακινητοποίησης ενδέχεται το αντιδραστήριο να σχηματίζει συσσωματώματα ή κρυστάλλους, τα οποία μειώνουν την ευαισθησία του αισθητήρα.

Επιπλέον, το ακινητοποιημένο αντιδραστήριο μπορεί να σχηματίσει χημικούς δεσμούς με το πολυμερές μέσω των ενεργών του κέντρων, πράγμα που προκαλεί μείωση της απόδοσης του αισθητήρα ή και ελάττωση της αντιστρεπτότητας στις περιπτώσεις των αντιστρεπτών αντιδράσεων [46,47].

Η φασματική συμπεριφορά των ακινητοποιημένων αντιδραστηρίων δίνει σημαντικές πληροφορίες για πιθανές αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του φορέα ακινητοποίησης σε σχέση με τη διαλυτή τους μορφή.

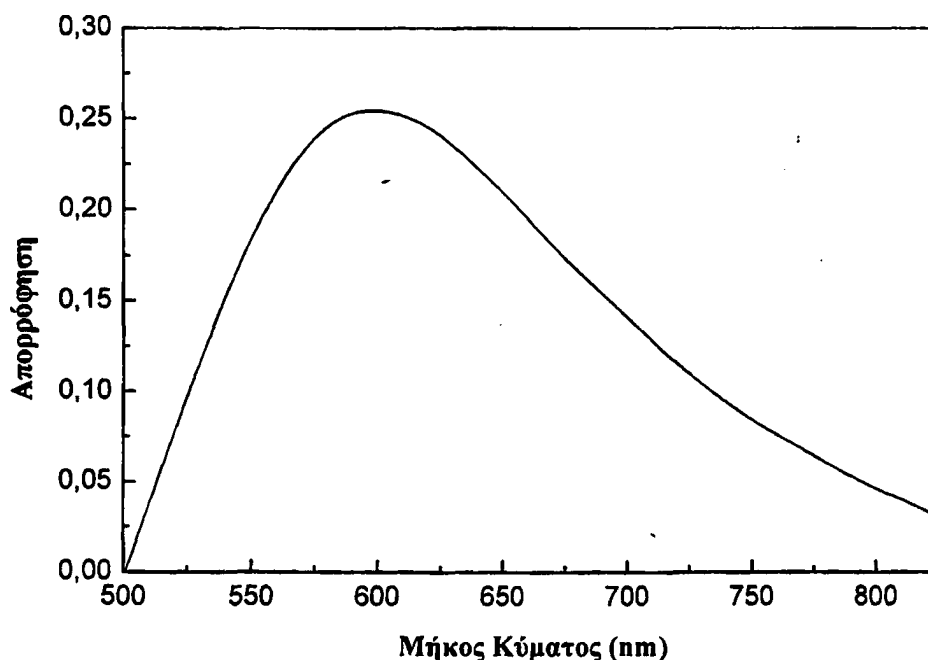


Σχήμα 4.8: Φάσματα απορρόφησης του διαλυτού DCI και του αντίστοιχου συμπλόκου με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Συγκέντρωση H_2O_2 0,5 mM. pH 5,0 σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών.



Όπως φαίνεται και στα σχήματα 4.8 και 4.9, τα φάσματα απορρόφησης του σχηματιζόμενου συμπλόκου του DCI με το υπεροξείδιο του υδρογόνου διαφέρουν ελάχιστα ως προς το μέγιστο απορρόφησης. Σε διαλυτή μορφή το προϊόν της αντίδρασης του DCI με το υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσιάζει μέγιστο στα 575 nm ενώ σε ακινητοποιημένη μορφή έχουμε μετατόπιση του μεγίστου απορρόφησης στα 600 nm. Επίσης παρατηρείται μια αποκοπή (cut-off) στο φάσμα απορρόφησης για το ακινητοποιημένο DCI στην οξική κυτταρίνη κάτω από τα 500 nm διότι στην κατασκευή του αισθητήρα η ίδια έγχρωμη μεμβράνη λειτουργεί ως φίλτρο αποκοπής της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Το γεγονός ότι η φασματική συμπεριφορά του ακινητοποιημένου DCI είναι παρόμοια μ' αυτήν σε διαλυτή μορφή υποδηλώνει ότι το σύμπλοκο αυτό εγκλωβίζεται



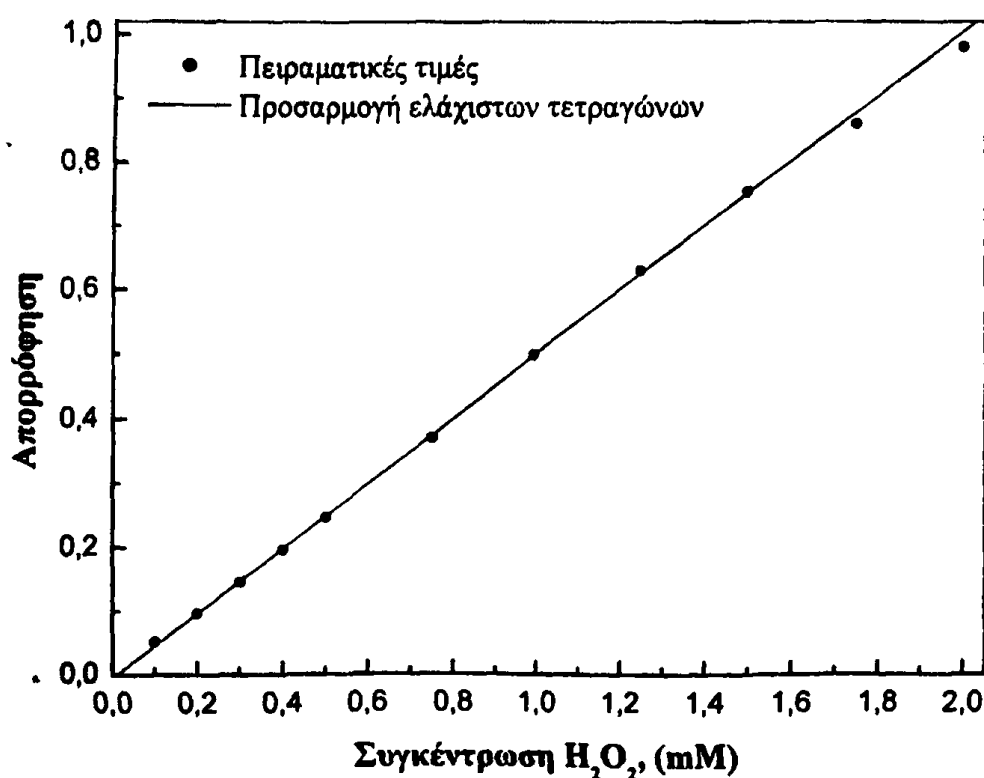
Σχήμα 4.9: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου του ακινητοποιημένου DCI με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Συγκέντρωση H_2O_2 0,5 mM. pH 5,0 σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών.

φυσικά στην οξική κυτταρίνη χωρίς να σχηματίζει «σημαντικούς» χημικούς δεσμούς ή συσσωματώματα.



4.4.4 Βαθμονόμηση του Συστήματος

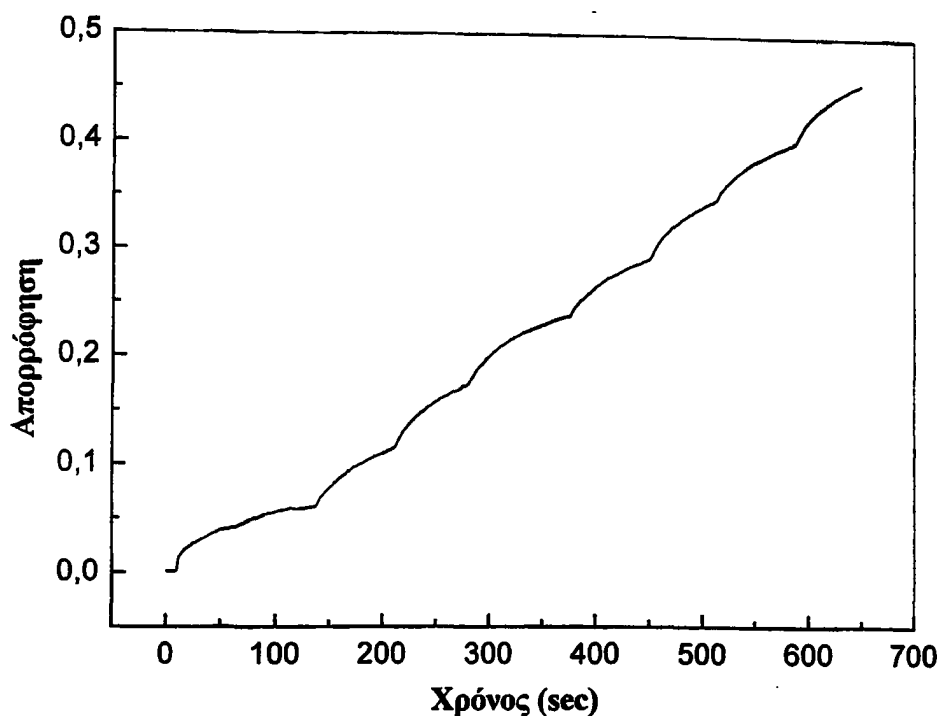
Για τη βαθμονόμηση του αισθητήρα χαράχθηκε καμπύλη αναφοράς υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες που προέκυψαν από τη μελέτη που περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Πρότυπα διαλύματα υπεροξειδίου του υδρογόνου που περιείχαν από 0,1 έως 2,0 mmol/L H_2O_2 χρησιμοποιήθηκαν για την χάραξη της καμπύλης αναφοράς, η οποία είναι γραμμική και δίνεται από την εξίσωση: $A_{max} = -0,0052(\pm 0,0021) + 0,5049(\pm 0,0019) \cdot [H_2O_2]$ ($r^2 = 0,9995$) (Σχήμα 4.10).



Σχήμα 4.10: Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου

Το όριο ανίχνευσης είναι 0,05 mmol/L υπεροξείδιο του υδρογόνου για $S/N = 3$. Η σχετική τυπική απόκλιση (επαναληψιμότητα της μεθόδου), για 8 επαναληπτικές μετρήσεις 1,0 mmol/L υπεροξειδίου του υδρογόνου, είναι 1,5% (Σχήμα 4.11). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί επιτυχώς για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε πραγματικά δείγματα.





Σχήμα 4. 11: Τυπική καμπύλη για τον υπολογισμό της σχετικής τυπικής απόκλισης της μεθόδου. Τα τμήματα της καμπύλης σημαίνουν προσθήκες ίδιων όγκων προτύπου διαλύματος H_2O_2 σε διάφορα χρονικά διαστήματα.

4.4.5 Παρεμποδίζουσες ενώσεις και ανάλυση πραγματικών δειγμάτων

Όπως αναφέρθηκε το συμπλεκτικό αντιδραστήριο το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη αυτή είναι εκλεκτικό ως προς το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το συμπέρασμα αυτό το υποστηρίζουν και τα πειράματα που έγιναν για να μελετηθεί η πιθανή παρεμποδιστική δράση διαφόρων οξειδωτικών ουσιών, μεταλλικών κατιόντων και ανιόντων, που μπορεί να συνυπάρχουν σε πραγματικά δείγματα.

Έτσι μελετήθηκε η επίδραση οργανικών υπεροξέων, όπως το υπεροξικό οξύ και το *m*-χλωρο-υπερβενζοϊκό οξύ, στα οποία πρώτα προστέθηκαν 100 mg MnO_2 και φυγοκεντρήθηκαν μετά από 10 min με σκοπό τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που περιέχουν τα εμπορικά τους παρασκευάσματα.



Κατά τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε συγκέντρωση 0,5 mM, δεν παρατηρήθηκε αύξηση της μετρούμενης απορρόφησης σε συγκεντρώσεις των παραπάνω υπεροξέων που έφθαναν μέχρι και 50 mM.

Μελετήθηκε επίσης η πιθανή παρεμποδιστική δράση διαφόρων κατιόντων όπως K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , $Cr(VI)$, Co^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , από τα οποία τα κατιόντα του σιδήρου, του κοβαλτίου και του χρωμίου μείωναν σημαντικά την απόκριση του αισθητήρα σε συγκεντρώσεις πάνω από 1 mM, γεγονός που οφείλεται στην καταλυτική διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου από τα κατιόντα αυτά. Τα υπόλοιπα κατιόντα δεν έδειξαν παρεμποδιστική δράση σε συγκεντρώσεις έως και 1000 φορές μεγαλύτερες από αυτήν του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Τέλος μια σειρά από ανιόντα όπως φθοριούχα, φωσφορικά, νιτρικά, χλωριούχα, ανθρακικά και θειικά, μελετήθηκαν σε συγκεντρώσεις μέχρι 100 mg/L χωρίς να επιδείξουν καμία σημαντική παρεμπόδιση.

Η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού υπεροξειδίου του υδρογόνου εφαρμόστηκε σε πραγματικά δείγματα όπως αυτά περιγράφηκαν πιο πάνω. Για το στοματικό διάλυμα έγιναν τριπλές μετρήσεις για την εύρεση της περιεκτικότητας του υπεροξειδίου του υδρογόνου μετά από αραιώση 50 φορές. Έτσι η ολική αραιώση του δείγματος είναι 1:500, αν ληφθεί υπ' όψη και αυτή που υφίσταται κατά την ανάμειξη του με το ρυθμιστικό διάλυμα στη μετρητική κυψελίδα. Με τις παραπάνω αραιώσεις επιτυγχάνεται περιοχή συγκεντρώσεων μέσα στην περιοχή των μετρήσεων στην καμπύλη αναφοράς προσδιορισμού του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Τα δείγματα καθαρισμού φακών επαφής μετρήθηκαν για τον προσδιορισμό της αρχικής τους περιεκτικότητας και μετά από τη διαδικασία απολύμανσης των φακών και εξουδετέρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου που δεν αντέδρασε. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα επιτρεπτά επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου στους φακούς επαφής μετά τη διαδικασία απολύμανσής τους με τις παραπάνω μεθόδους δεν πρέπει να ξεπερνά τα 50 ppm, συγκέντρωση που εξουδετερώνεται σε λιγότερο από 1 min από την καταλάση που βρίσκεται στο ανθρώπινο μάτι. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προκαλούν τσούξιμο των ματιών. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται κατά την απολύμανση των μαλακών φακών επαφής με μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό, διότι η καταλάση δεν



δισιδύει εύκολα σ' αυτούς και έτσι το υπολειμματικό υπεροξειδίου του υδρογόνου μπορεί να φθάσει και τα 200 ppm [48].

Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 4.1, και δείχνουν την καταλληλότητα του αισθητήρα που αναπτύχθηκε για την ανάλυση τέτοιου είδους δειγμάτων.

Πίνακας 4.1 Προσδιορισμός του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε πραγματικά δείγματα

Δείγμα	Προτεινόμενη μέθοδος, % w/v	Ογκομέτρηση, % w/v	Σφάλμα, %	Ενδεικτική τιμή, % w/v
1A	3,02	3,06	1,33	3,0
1B	0,53 mM	-	-	-
2A	3,05	3,10	1,66	3,0
2B	0,45 mM	-	-	-
3	3,10	3,16	2,00	3,0

1A, 1B, Διάλυμα απολύμανσης φακών επαφής της ALLERGAN, 1B μετά από 6 ώρες διαδικασίας απολύμανσης

2A, 2B, Διάλυμα απολύμανσης φακών επαφής της NOVASEPT, 2B μετά από 6 ώρες διαδικασίας απολύμανσης

3, Στοματικό διάλυμα της UNI-PHARMA

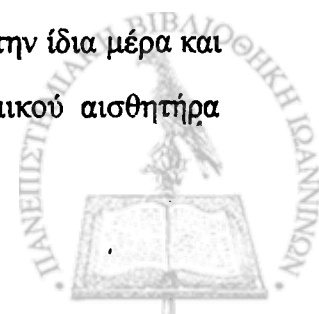
Η επίδραση της σύστασης (matrix) των πραγματικών δειγμάτων μελετήθηκε με πειράματα ανάκτησης στα δείγματα καθαρισμού των φακών επαφής και του στοματικού διαλύματος με την προσθήκη προτύπων διαλυμάτων υπεροξειδίου του υδρογόνου. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4.2, η ανάκτηση της μεθόδου κυμαίνεται στην περιοχή 96 έως 106%.

Πίνακας 4.2 Ανάκτηση προτύπων διαλυμάτων υπεροξειδίου του υδρογόνου

Δείγμα	Προτεινόμενη μέθοδος (mM)	Προστιθέμενη (mM)	Μετρούμενη (mM)	Ανάκτηση (%)
1	0,53	0,50	1,05	104
2	0,45	0,50	0,98	106
3	0,36	0,50	0,84	96

4.4.6 Σταθερότητα του Χημικού Αισθητήρα

Η σταθερότητα του χημικού αισθητήρα CA/DCI, εξετάστηκε μετρώντας την απόκρισή του για συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου 0,5 mM την ίδια μέρα και μεταξύ διαφορετικών ημερών. Ως μέτρο της σταθερότητας του χημικού αισθητήρα



θεωρείται η επί τοις εκατό (%) ενεργότητά του (η εκατοστιαία μεταβολή της αρχικής τιμής της απορρόφησης). Η ενεργότητα του CA/DCI βρέθηκε ίση με 98 και 95% της αρχικής για την 1^η και την 5^η ημέρα λειτουργίας του αντίστοιχα.

Επομένως ο χημικός αισθητήρας παρουσιάζει αξιοσημείωτη σταθερότητα ως προς το ακινητοποιημένο ποσοστό του διπυρηνικού συμπλόκου του σιδήρου (III), γεγονός το οποίο ήταν αναμενόμενο λόγω της ισχυρής του συγκράτησης στο πλέγμα της οξικής κυτταρίνης.

4.5 Συμπεράσματα

Η χρήση της οξικής κυτταρίνης για την κατασκευή χημικών αισθητήρων με ακινητοποίηση χρωμοφόρων ενώσεων στο πλέγμα της, επιφέρει σημαντικά αποτελέσματα στην εκλεκτικότητα και τη σταθερότητά τους. Η διαδικασία που περιγράφηκε δίνει τη δυνατότητα κατασκευής οπτικών χημικών αισθητήρων που εμφανίζουν μεγάλη επαναληψιμότητα και δυνατότητα για επιτόπιες μετρήσεις.



Βιβλιογραφία

- [1] X. Zhou and M.A. Arnold, *Anal. Chim. Acta*, 304 (1995) 147.
- [2] B.S. Walters, T.J. Nielsen and M.A. Arnold, *Talanta*, 35 (1988) 151.
- [3] Z.H. Xie, F. Zhang and Y.S. Pan, *Analyst*, 123 (1998) 273.
- [4] L.J. Blum, S.M. Gautier and P.R. Coulet, *Anal. Lett.*, 21 (1988) 717.
- [5] B. Li, Zh. Zhang and Y. Jin, *Sens. Actuators B*, 72 (2001) 115.
- [6] A.B. Collaudin and L.J. Blum, *Sens. Actuators B*, 38-39 (1997) 189.
- [7] D. Janasek and U. Spohn, *Sens. Actuators B*, 38-39 (1997) 291.
- [8] K.P. McNamara, X. Li, A.D. Stull and Z. Rosenzweig, *Anal. Chim. Acta*, 361 (1998) 73.
- [9] F. Wang, F. Schubert and H. Rinneberg, *Sens. Actuators B*, 28 (1995) 3.
- [10] R.B. Thompson, Zh. Ge, M. Patchan, C.C. Huang and C.A. Fierke, *Biosensors Bioelectron.*, 67 (1996) 557.
- [11] R.A. Potyrailo and G.M. Hieftje, *Anal. Chim. Acta*, 370 (1998) 1.
- [12] S.S. Khan, E.S. Jin, N. Sojic and P. Pantano, *Anal. Chim. Acta*, 404 (2000) 213.
- [13] C. Schelp, T. Scheper, F. Buckmann and K.F. Reardon, *Anal. Chim. Acta*, 255 (1991) 223.
- [14] N. Malcik and P. Caglar, *Sens. Actuators B*, 38-39 (1997) 386.
- [15] M. Ahmad and R. Narayanaswamy, *Anal. Chim. Acta*, 291 (1994) 225.
- [16] J. Lin and D. Liu, *Anal. Chim. Acta*, 408 (2000) 49.
- [17] J. Lin, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 19 (2000) 541.
- [18] E.K. Paleologos, M.I. Prodromidis, D.L. Giokas, A.C. Pappas and M.I. Karayannis, *Anal. Chim. Acta*, 467 (2002) 205.
- [19] R. Narayanaswamy, *Biosensors Bioelectron.*, 6 (1991) 467.
- [20] L.W. Burgess, *Sens. Actuators B*, 29 (1995) 10.



- [21] R.J. Berman and L.W. Burgess, *Chemical, Biochemical and Environmental Fiber Sensors, SPIE Proc.*, Vol. 1172 (1989) 206.
- [22] R.J. Berman, G.D. Chrisitan and L.W. Burgess, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2066.
- [23] Zh. Zhujun, Y. Zhang, M. Wangbai, R. Russell, Z.M. Shakhsher, C.L. Grant and W.R. Seitz, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 202.
- [24] W. Wroblewski, E. Rozniecka, A. Dybko and Z. Brzozka, *Sens. Actuators B*, 48 (1998) 471.
- [25] Finish Environment Institute, Chemical Division, *Risk Assessment Report, Hydrogen Peroxide*, Helsinki, Finland 2001.
- [26] M. Somasundrum, K. Kirtikara and M. Tanticharoen, *Anal. Chim. Acta*, 319 (1996) 59.
- [27] R.M. Sellers, *Analyst*, 105 (1980) 950.
- [28] A.M. Almuaibed and A. Townshend, *Anal. Chim. Acta*, 295 (1994) 163.
- [29] P.A. Clapp, D.F. Evans and T.S.S. Sheriff, *Anal. Chim. Acta*, 218 (1989) 331.
- [30] C. Matsubara, K. Kudo, T. Kawashita and K. Takamura, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 1108.
- [31] C. Matsubara, N. Kawamoto and K. Takamura, *Analyst*, 117 (1992) 1781.
- [32] C.E. Meloan, M. Mauck and C. Huffman, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 104.
- [33] P.A. Tanner and A.Y.S. Wong, *Anal. Chim. Acta*, 370 (1998) 279.
- [34] C. Zucchi, M. Forneris, L. Martines, R. Olsina and E. Marchevsky, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 360 (1998) 128.
- [35] S. Oszwaldowski, R. Lipka and M. Jarosz, *Anal. Chim. Acta*, 421 (2000) 35.
- [36] D.Harms, R. Than, U. Pinkernell, M. Schmidt, B. Krebs and U. Karst, *Analyst*, 123 (1998) 2323.
- [37] D. Harms, J. Meyer, L. Westerheide, B. Krebs and U. Karst, *Anal. Chim. Acta*, 401 (1999) 83.
- [38] D. Harms, B. Than, B. Krebs and U. Karst, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 364 (1999) 184.
- [39] B. Eulerling, F. Ahlers, F. Zippel, M. Schmidt, H-F. Nolting and B. Krebs, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1995) 1305.



- [40] Αγγελική Φλώρου, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα 2001.
- [41] L. Westerheide, F.K. Muller, R. Than, J. Dietrich, S. Schindler and B. Krebs, *Inorg. Chem.*, 40 (2001) 1951.
- [42] R. Than, A. Schrodt, L. Westerheide, R. van Eldik and B. Krebs, *Eur. J. Inorg. Chem.*, (1999) 1537.
- [43] G.V. Nizova, B. Krebs, G. Suss-Fink, S. Schindler, L. Westerheide, L. Gonzales Cuervo and G. Shul' pin, *Tetrahedron*, 58 (2002) 9231.
- [44] K.B. Jensen, C.J. McKenzie, L.P. Nielsen, J.Z. Pedersen and H.M. Svendsen, *Chem. Commun.*, (1999) 1313.
- [45] L. Que, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (1997) 3933.
- [46] W. Xu, K.A. Kneas, J.N. Demas and B.A. DeGraff, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 2605.
- [47] E.R. Carraway, J.N. Demas, B.A. DeGraff and J.R. Bacon, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 337.
- [48] R.L. Chalmers, *Int. Contact Lens Clin.*, 22 (1995) 143.



Summary

Chapter 1: The spectrophotometric determination of hydrogen peroxide by its reactions with chromogenic hydrogen donors in the presence of peroxidase has been widely accepted in the analysis of biological and environmental samples.

In this work a survey of seven new chromogenic substances (derivatives of 4-aminoantipyrine) for the spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in the presence of peroxidase is described. The seven chromophores (with their names and abbreviations as follows) were synthesized according to a 5-step procedure developed by Fiamegos *et al*:

1. (1,2-D): 4-amino-1,2-diphenyl-5-methylpyrazol-3-one, 2. (2,5-D): 4-amino-2,5-diphenyl-1-methylpyrazol-3-one, 3. (Cl-2,5-D): 4-amino-1-methyl-2-phenyl-5-(*p*-chlorophenyl) pyrazol-3-one, 4. (DAP): 4-amino-5-(*p*-aminophenyl)-1-methyl-2-phenylpyrazol-3-one, 5. (4-AEP): 4-amino-1-ethyl-5-methyl-2-phenylpyrazol-3-one, 6. (DAA): 4-amino-2-(*p*-aminophenyl)-1-methylpyrazol-3-one, 7. (DADP): 4-amino-2-(*p*-aminophenyl)-1-methyl-5-phenylpyrazol-3-one, 8. (4-AAP): 4-aminoantipyrine.

In order to evaluate the sensitivity of each chromophore, oxidative condensation with (DCPS) (3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid) and (ALPS) (N-ethyl-N-sulphopropylaniline sodium salt) in the presence of hydrogen peroxide and peroxidase was carried out at various pH values. All the measurements were performed using an optical fiber CCD (Charge-Coupled Device) computerized spectrophotometer with a 1 cm cuvette. The standard procedure for the colour development was established after a systematic study of the concentrations of reagents and pH and temperature optimization. It was found that 15-20-fold excess with respect to hydrogen peroxide was necessary to attain maximum absorbance in each instance.

The absorption maxima of the chromogens in the reaction with DCPS are located above 515 nm, with ALPS above 560 nm, while the wavelength shifts to longer wavelengths



in the case of DAP-ALPS reaction probably due to the extension of the conjugated-formed system.

Under the optimum conditions, the experiments for hydrogen peroxide determination were carried out and the calibration curves were rectilinear up to 250 μM . The detection limits were in the sub-micro levels. Of the chromophore synthesized, DAA and DAP showed better sensitivity compared to 4-AAP in the reactions with DCPS and ALPS, respectively.

The method was successfully applied for the determination of hydrogen peroxide in samples from a brewery cleaning-in-place process and glucose in human serum.

Chapter 2: A flow-injection system was developed for the determination of hydrogen peroxide involving the use of (4-amino-5-(p-aminophenyl)-1-methyl-2-phenylpyrazol-3-one (DAP) as colour coupler and the sodium salt of N-ethyl-N-sulphopropylaniline (ALPS) as hydrogen donor.

The reaction takes place at phosphate buffer (pH 7.0) and the product formation needs only few seconds to achieve an absorbance plateau with a maximum at 590 nm.

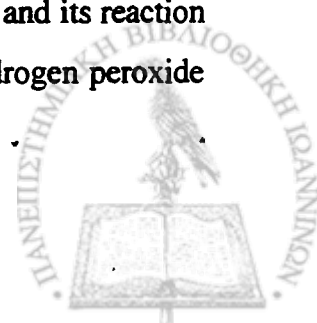
The immobilized horseradish peroxidase reactor was prepared by coupling of the periodate-treated enzyme with aminopropyl glass beads.

The coloured product formed is monitored spectrophotometrically using a 50 cm optical fiber liquid waveguide capillary cell and a CCD (Charge Coupled Device) detector. The FIA manifold has a throughput of 35 samples/h with a total flow rate of 1.2 ml/min and a detection limit of 4 nM H_2O_2 .

Samples from a brewery cleaning-in-place disinfection process were analysed

Chapter 3: The method described here is based on the separation of hydrogen peroxide and peracids (PAA and MCPBA) on a reverse-phase HPLC system and their reaction with a concentrated acidified solution of KI (I_3^- method).

I_3^- method: The reaction of peroxides with acidified KI in the presence of ammonium molybdate as catalyst was used. The measurement of I_3^- by its optical absorption forms the basis of the I_3^- method. The large value of $\epsilon_{\text{max}}(\text{I}_3^-)$ ($26500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) and its reaction rate makes the I_3^- method convenient for the determination of both hydrogen peroxide and peracids.



HPLC Conditions: The chromatographic system consists of two pumps and a combined elution was carried out using binary mixtures of water and acetonitrile as the mobile phase at a flow rate of 0.7 ml/min. The linear gradient used was from 30% acetonitrile up to 100% within 5 min, 9 min isocratic at 100% acetonitrile and within 1 min again at 30% acetonitrile.

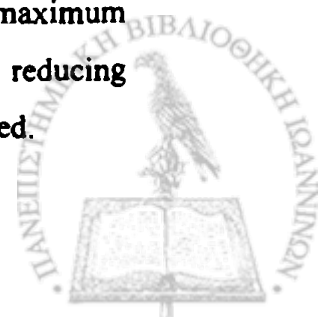
For post-column reaction, two solutions (A and B) were prepared as follows: solution A consists of 33 g of KI, 1 g of NaOH, and 0.1 g of ammonium molybdate tetrahydrate diluted to 500 ml with doubly distilled water. Solution B was an aqueous buffer containing 10 g of KHP (potassium hydrogen phthalate) per 500 ml.

Directly after separation, the eluate was introduced into a reaction coil, where the post-column reaction takes place. The reagent solutions with 0.7 ml/min were mixed with the HPLC eluates using a Tee-mixer. After the derivatization reaction, the detection of I_3^- was performed at 352 nm.

A series of standard solutions containing H_2O_2 , PAA and MCPBA were injected through a 100- μ L loop. Under our HPLC conditions the retention times were: 2.1 min for H_2O_2 , 4.3 min for PAA and 13.2 min for MCPBA, and were identified by comparison with those of reference substances using direct UV detection at 206 nm without post-column derivatization.

The method was applied to monitor the formation of PAA and H_2O_2 in the course of a washing cycle performed with the laundry detergent Persil.

Chapter 4: The development of a selective fiber-optic sensor bearing a dinuclear iron(III) complex for the determination of hydrogen peroxide in real samples is presented. Hydrogen peroxide forms a colour adduct with the proposed complex, which absorbs between 570 and 600 nm. The dinuclear iron(III) complex (6 mM) was immobilized into a 2% cellulose acetate membrane which was then placed at the distal end of a fiber-optic probe. Measurements were carried out using a photometric set up comprised by a spectrometer equipped with a 2048 pixels CCD (charge couple device) detector. Several working parameters such as polymeric matrix, membrane loading, working pH and buffering systems were optimized with respect to the maximum absorbance at a fixed time interval. The interference effect of several reducing compounds, structural related peroxides and inorganic salts was also investigated.



The proposed sensor shows fast response, high selectivity and sufficient sensitivity for the determination of hydrogen peroxide in real samples such as contact lens cleaning solutions or mouthwash solutions.



Περίληψη

1^ο Κεφάλαιο: Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η τροποποίηση μιας ενζυμικής φασματοφωτομετρικής μεθόδου, που είναι γνωστή στη βιβλιογραφία και ως “μέθοδος Trinder”, για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της γλυκόζης.

Η μέθοδος αναπτύχθηκε μετά από συγκριτική μελέτη επτά παραγώγων της 4-αμινοαντιπυρίνης, τα οποία υπό καθορισμένες συνθήκες αντιδρούν με φαινολικές ενώσεις ή αρωματικές αμίνες παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου προς σχηματισμό έγχρωμων ενώσεων. Η αντιδράσεις αυτές καταλύονται από την υπεροξειδάση. Τα προϊόντα των αντιδράσεων απορροφούν έντονα στην ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και η απορρόφηση τους στο μέγιστο του φάσματος (στην περιοχή μεταξύ 515 και 590 nm) είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Η αντικατάσταση της 4-αμινοαντιπυρίνης στην κλασσική αντίδραση Trinder με παράγωγα της αυξάνει τη συζυγία και τη βαθυχρωμία των προϊόντων της αντίδρασης με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία της μεθόδου για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου λόγω της αύξησης της απορρόφησης. Άλλο πλεονέκτημα είναι ότι τα φαινόμενα συζυγίας των χρωμοφόρων στα παράγωγα της 4-αμινοαντιπυρίνης δημιουργούν το φαινόμενο της βαθυχρωμικής μετατόπισης του μήκους κύματος στο μέγιστο της απορρόφησης. Η μετατόπιση αυτή αίρει σε σημαντικό βαθμό τα προβλήματα παρεμποδίσεων στη μέτρηση της γλυκόζης σε ορό αίματος.

Για την εύρεση των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών, μελετήθηκαν διάφορες αναλυτικές παράμετροι, οι οποίες επηρεάζουν τόσο το υπό μελέτη σύστημα όσο και τις εφαρμογές των αντιδράσεων στον προσδιορισμό της γλυκόζης. Έτσι μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης των αντιδραστηρίων, η επίδραση της συγκέντρωσης της υπεροξειδάσης, η επίδραση του pH και η σύσταση των ρυθμιστικών συστημάτων, η θερμοκρασία και η παρεμποδιστική δράση διαφόρων ουσιών.

Η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού υπεροξειδίου του υδρογόνου εφαρμόστηκε στον προσδιορισμό του σε πραγματικά δείγματα από εκπλύματα ζυθοποιίας και της γλυκόζης σε ορό ανθρώπινου αίματος.



2^ο Κεφάλαιο: Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η ανάπτυξη μιας μεθόδου με έγχυση δείγματος σε συνεχή ροή (F.I.A) για τον ενζυμικό προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου, η οποία βασίζεται σε μια τροποποιημένη αντίδραση Trinder, στην οποία η 4-αμινοαντιπυρίνη (4-AAP) αντικαθίσταται με μια διαμινοπυραζολόνη (DAP: 4-αμινο-5-(4-αμινοφαινυλο)-1-μεθυλο-2φαινυλο-1,2-διυδρο-3H-πυραζολ-3-όνη), ενώ η υπεροξειδάση (HRP) ακινητοποιείται πάνω σε υάλινα σφαιρίδια ελεγχόμενου πορώδους τροποποιημένα με προπυλοαμίνη για την κατασκευή ενός ενζυμικού αντιδραστήρα πακεταρισμένης κλίνης. Ως μέθοδος ακινητοποίησης της υπεροξειδάσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ομοιοπολικής σύνδεσης μετά από την οξείδωσή της με υπεριωδικό νάτριο.

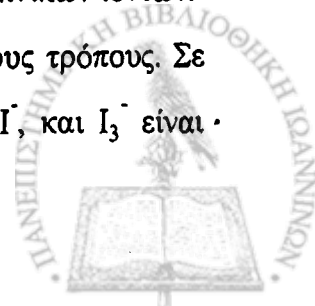
Στο τμήμα αυτό της διατριβής περιγράφεται για πρώτη φορά ένα σύστημα ανάλυσης με έγχυση σε συνεχή ροή, με ενζυμικό αντιδραστήρα, εφοδιασμένο με τριχοειδή κυψελίδα μεγάλης οπτικής διαδρομής (Liquid Waveguide Capillary Cell – LWCC).

Κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας, το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι 4 nmol/L υπεροξείδιο του υδρογόνου (σήμα/θόρυβο=3). Η καμπύλη αναφοράς καλύπτει την περιοχή 20-700 nmol/L υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η σχετική τυπική απόκλιση, για συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου 300 nmol/L, είναι 1,7% (n=7). Η μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία στον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε δείγματα από επιτόπια διαδικασία καθαρισμού κλειστών κυκλωμάτων (cleaning-in-place process - CIP).

3^ο Κεφάλαιο: Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η ανάπτυξη μιας υδροχρωματογραφικής μεθόδου με παραγωγοποίηση μετά τη στήλη (HPLC/post-column derivatization method) για τον διαχωρισμό και ανάλυση μείγματος υπεροξειδίου του υδρογόνου και οργανικών υπεροξέων, (υπεροξικό οξύ – PAA και *m*-χλωρο-υπερβενζοϊκό οξύ - MCPBA), και εφαρμογή της σε πραγματικά δείγματα.

Η προτεινόμενη μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και οργανικών υπεροξέων με οξιμισμένο διάλυμα KI, παρουσία μολυβδαινικών ιόντων.

Ο προσδιορισμός του I₂ που σχηματίζεται επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους. Σε υψηλές συγκεντρώσεις του KI η χημική ισορροπία ανάμεσα στα I₂, I⁻, και I₃⁻ είναι



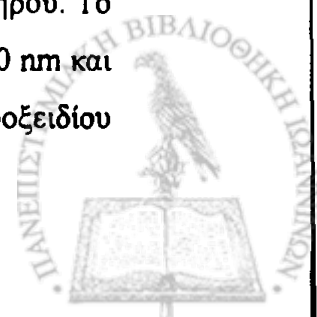
μετατοπισμένη προς τα I_3^- . Η μέτρηση της απορρόφησης των I_3^- στα 352 nm καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό των προαναφερόμενων ουσιών. Η υψηλές τιμές $\epsilon_{\max}(I_3^-)$ ($26.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), καθώς και η μεγάλη ταχύτητα της αντίδρασης είναι δυο από τα βασικότερα χαρακτηριστικά της μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου και οργανικών υπεροξέων μετά από διαχωρισμό τους με HPLC.

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Ανεστραμμένης Φάσης, με μεταβαλλόμενη ροή διαλυτών, ενώ η ανίχνευση και ο προσδιορισμός των υπεροξειδίων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της παραγωγοποίησης μετά τη στήλη. Ως μέθοδος παραγωγοποίησης χρησιμοποιήθηκε η ιωδομετρική, η οποία είναι μια απλή, ευαίσθητη και άμεσα εφαρμόσιμη για τον προσδιορισμό ενώσεων που περιέχουν υπεροξειδικές ομάδες. Επιπλέον, ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των τριωδικών ιόντων, που σχηματίζονται από την επίδραση οξιτισμένου διαλύματος ιωδιούχων με τα υπεροξείδια, επιτρέπει τον προσδιορισμό τους σε πολύπλοκα δείγματα μετά από διαχωρισμό με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

Οι χρόνοι κατακράτησης για το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το υπεροξικό οξύ και το *m*-χλωρο-υπερβενζοϊκό οξύ ήταν 2,1, 4,3 και 13,2 min υπό τις βέλτιστες συνθήκες της HPLC. Οι καμπύλες αναφοράς καλύπτουν την γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων από 1 έως 100 μM . Τα όρια ανίχνευσης ήταν 0,5, 0,5 και 0,6 μM για το H_2O_2 , PAA και MCPBA αντίστοιχα.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία για την παρακολούθηση της μεταβολής των συγκεντρώσεων των H_2O_2 και PAA κατά τη διάλυση στο νερό του εμπορικού απορρυπαντικού PERSIL.

4^ο Κεφάλαιο: Στο κεφάλαιο αυτό αναπτύσσεται η κατασκευή χημικού αισθητήρα οπτικών ινών με χρήση μεμβρανών οξικής κυτταρίνης, στις οποίες ενσωματώνεται διπυρηνικό σύμπλοκο του τρισθενούς σιδήρου. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου σχηματίζει ένωση προσθήκης με το διπυρηνικό σύμπλοκο του τρισθενούς σιδήρου. Το έγχρωμο προϊόν που σχηματίζεται έχει ταινία απορρόφησης μεταξύ 590 και 630 nm και ευαίσθησία που επιτρέπει τον προσδιορισμό χαμηλών συγκεντρώσεων υπεροξειδίου του υδρογόνου.



Οι μεμβράνες οξικής κυτταρίνης τοποθετούνται στην επίπεδη επιφάνεια ενός επιπεδόκυρτου φακού του φωτομέτρου τύπου καθετήρα με την τεχνική της εναπόθεσης σταγόνας ή την προσαρμογή των ήδη τροποποιημένων μεμβρανών. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε διαθέτει εμβαπτιζόμενη κυψελίδα και χρησιμοποιεί μια οπτική ίνα για τη μεταφορά του φωτός από την πηγή στη μεμβράνη, που βρίσκεται μεταξύ του άκρου των οπτικών ινών και ενός επίπεδου κατόπτρου. Η ανακλώμενη από το κάτοπτρο ακτινοβολία προσπίπτει στον ανιχνευτή ζεύξης φορτίου, όπου μεταφέρεται με μια δεύτερη οπτική ίνα.

Στην πολυλειτουργική αυτή επικάλυψη του αισθητήρα η τροποποιημένη μεμβράνη οξικής κυτταρίνης αποτελεί το μικροπεριβάλλον της χημικής αντίδρασης και σε συνδυασμό με τη δυνατότητα αποκλεισμού παρεμποδιστικών μορίων (ανάλογα με τη διαπερατότητα της μεμβράνης οξικής κυτταρίνης) συνθέτουν ένα χημικό αισθητήρα μεγάλης εκλεκτικότητας και σταθερότητας.

Το διυρηνικό σύμπλοκο του τρισθενούς σιδήρου εγκλωβίστηκε σε μεμβράνη οξικής σε συγκεντρώσεις από 1-8 mM. Οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του οπτικού αισθητήρα όπως η χωρητικότητα των μεμβρανών ως προς την ενεργή ουσία, το pH και η σύσταση των ρυθμιστικών συστημάτων, η σταθερότητα του σχηματιζόμενου συμπλόκου, η θερμοκρασία και πιθανές παρεμποδιστικές δράσεις άλλων υπεροξειδίων μελετήθηκαν με σκοπό τον την εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα.

Η περιοχή γραμμικότητας του αισθητήρα βρίσκεται μεταξύ 0,1-2,0 mM, με όριο ανίχνευσης 0,05 mM, και σχετική τυπική απόκλιση κατά τον προσδιορισμό 1 mM υπεροξειδίου του υδρογόνου 1,5% ($n=5$).

Η μέθοδος εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε δείγματα διαλυμάτων καθαρισμού φακών επαφής και στοματικά διαλύματα.

