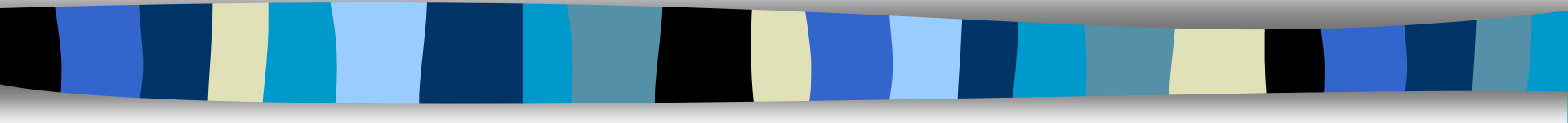
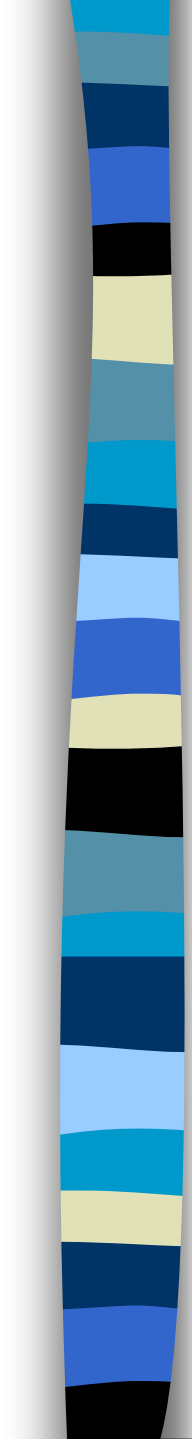


Φροντιστήριο Βιοχημείας Ι



Ε.Φραγκοπούλου
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια



Εργαστήριο Βιοχημείας Ι

Μελέτη των βιομορίων

Πρωτεΐνες, Λιποειδή, Υδατάνθρακες

Αναλυτικές Μέθοδοι

- **Κλασικές (σχετίζονται με τη μάζα)**

Σταθμικές (ζυγός ακριβείας),

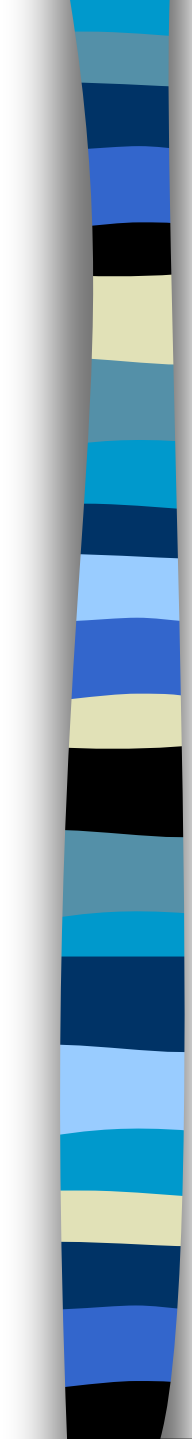
Ογκομετρικές (βαθμονομημένα γυάλινα σκεύη)

- **Ενόργανες (σχετίζονται με την ενέργεια)**

Οπτικές (αλληλεπίδραση ηλεκρομαγνητικής ακτινοβολίας και δείγματος)

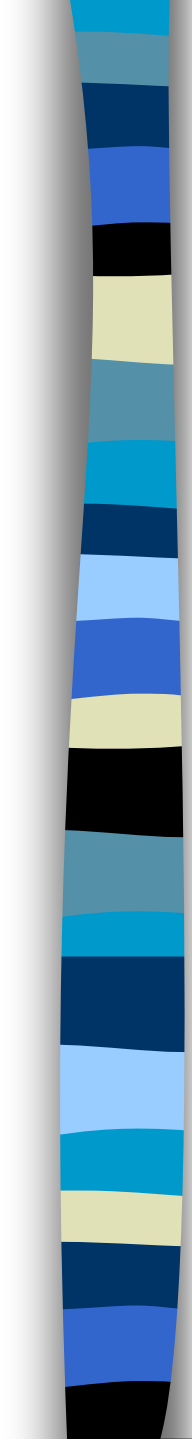
Ηλεκτροχημικές (ηλεκτρικές μετρήσεις)

Ειδικές (χρωματογραφικές, ανοσολογικές, κτλ)



Φασματοφωτομετρία

- *ανήκει στις οπτικές μεθόδους ανάλυσης*
- *μέτρηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, η οποία πηγάζει από την ύλη ή αλληλεπιδρά με αυτή*



Φασματοφωτομετρία

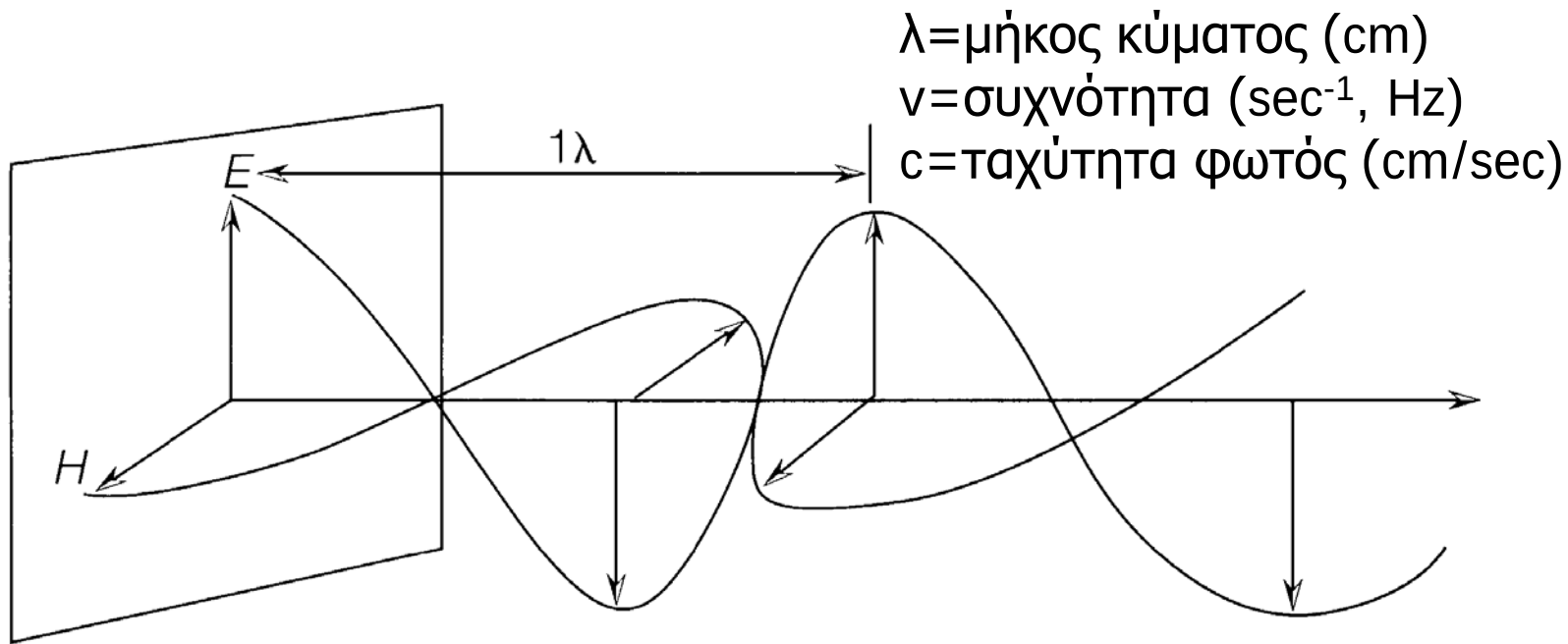
Οι οπτικές μέθοδοι υποδιαιρούνται σε δύο κατηγορίες:

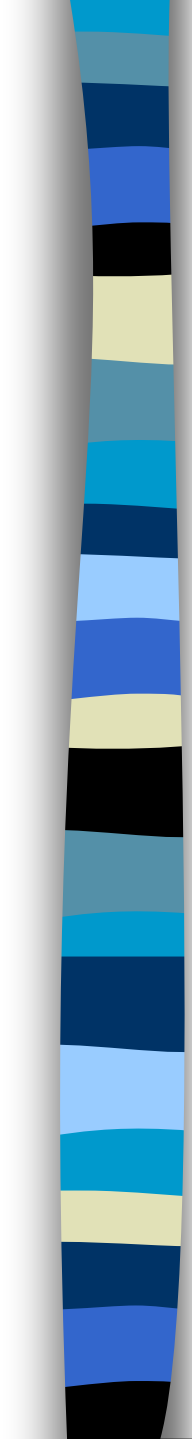
- ❑ στις **φασματοσκοπικές μεθόδους**, οι οποίες βασίζονται στην ικανότητα διαφόρων ουσιών να απορροφούν ακτινοβολίες χαρακτηριστικών συχνοτήτων και στη μέτρηση της απορρόφησης αυτής ή στη καταγραφή φασμάτων (μήκους κύματος και ισχύος της ακτινοβολίας)
- ❑ στις **μη φασματοσκοπικές μεθόδους**, οι οποίες βασίζονται στην αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και ύλης, η οποία συνεπάγεται αλλαγή στη διεύθυνση ή στις φυσικές ιδιότητες της ακτινοβολίας.

Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

Ποια είναι η φύση του φωτός ?

*1800 (Maxwell) => είναι ένα διαδιδόμενο ηλεκτρομαγνητικό κύμα
($c = \lambda \nu$)*





Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

1900 (Planck, Einstein,...) η εκπομπή ή η απορρόφηση ΗΑ από κάποια πηγή δεν γίνεται συνεχώς αλλά είναι κβαντισμένη δηλαδή διαδίδεται υπό την μορφή μικρών διακριτών μονάδων ενέργειας που λέγονται φωτόνια.

$$E=h\nu=hc/\lambda$$

E= ενέργεια 1 φωτονίου (κβάντο)

h=σταθερά Planck

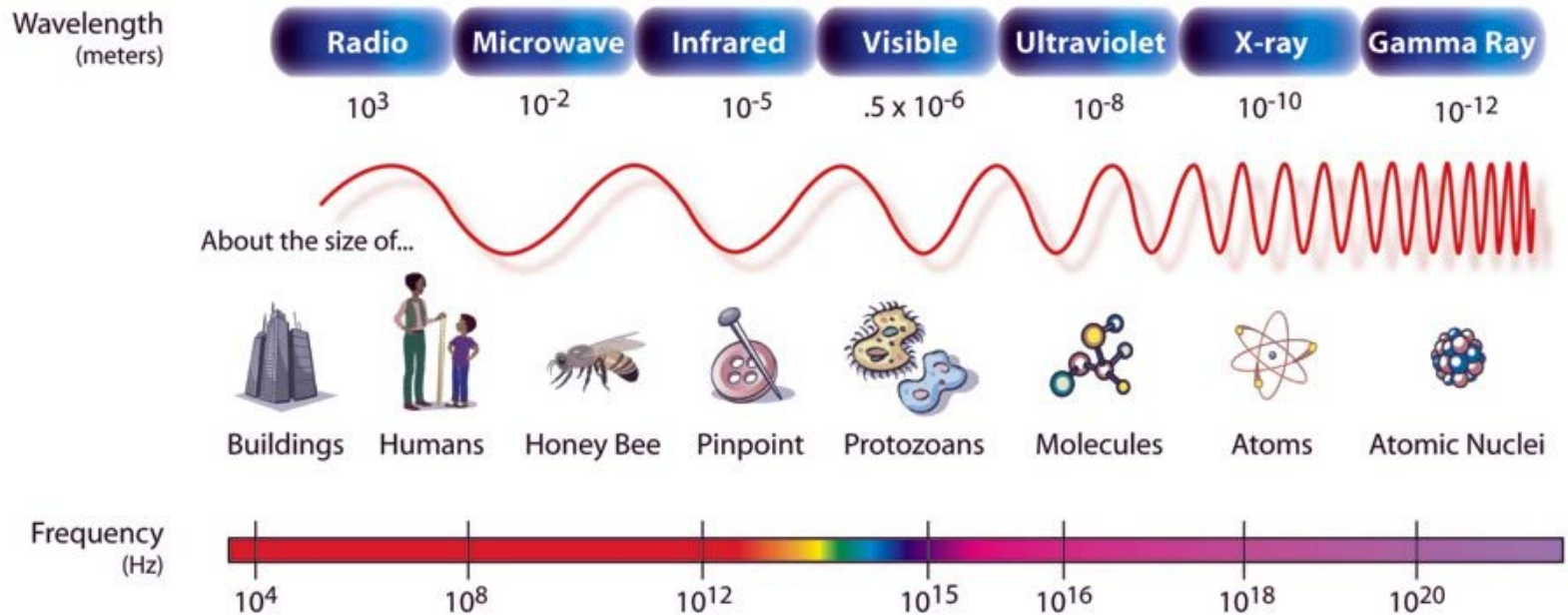
λ =μήκος κύματος (cm)

ν =συχνότητα (sec^{-1} , Hz)

c=ταχύτητα φωτός (cm/sec) (3×10^{10} cm/sec)

Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

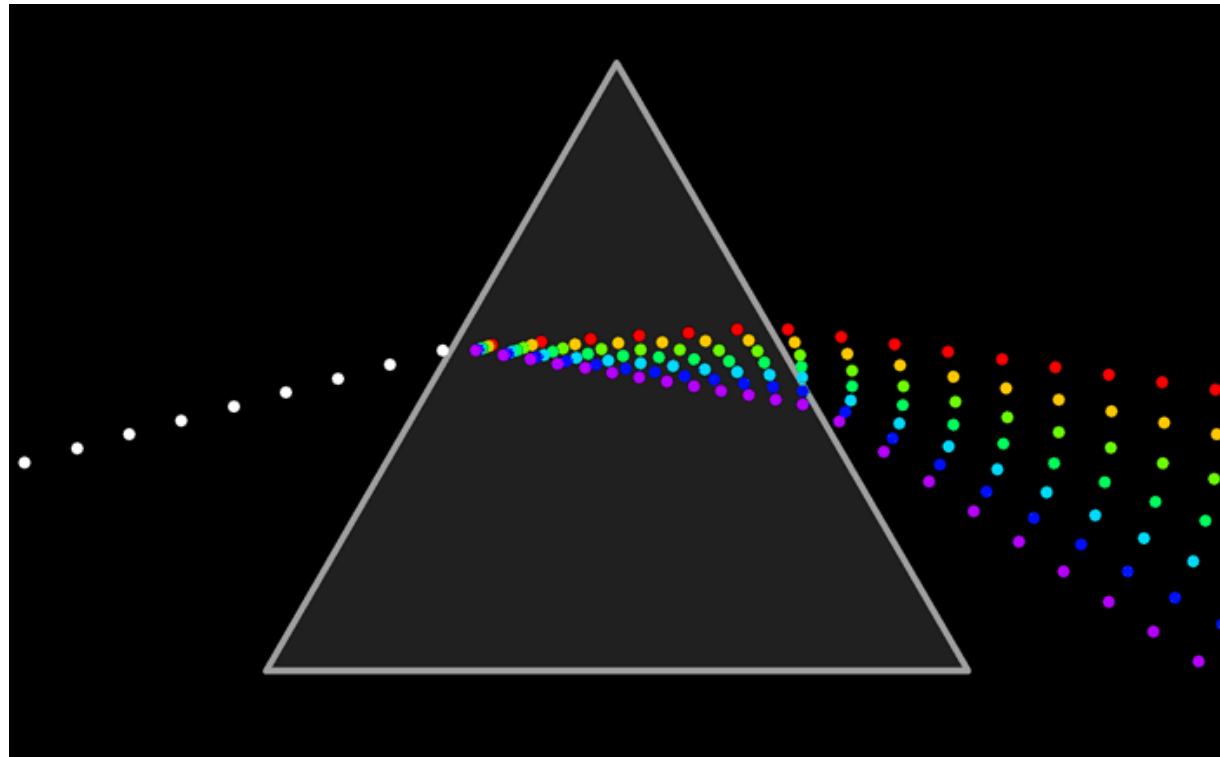
(το πλήρες εύρος των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων)



Ενέργεια

Ορατό

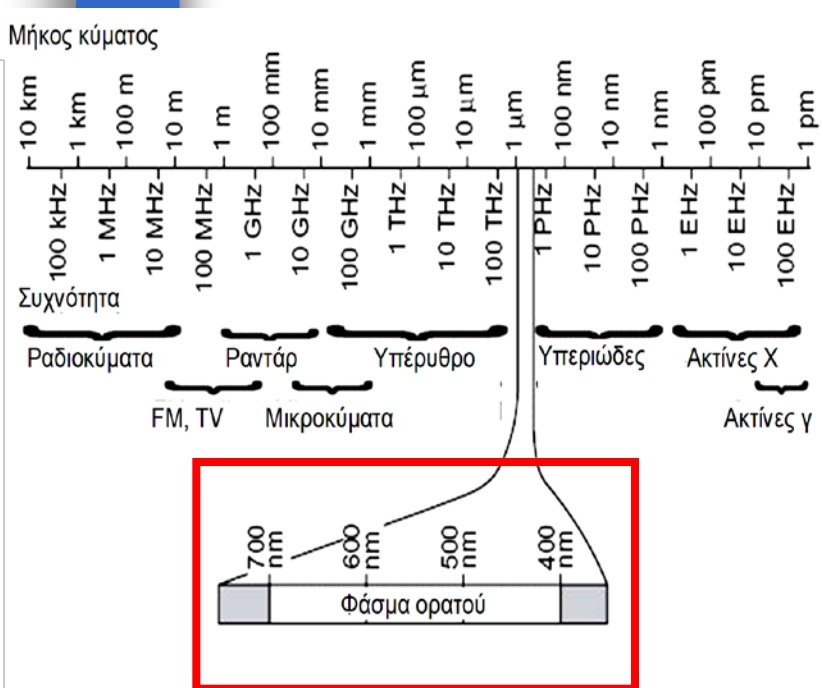
Η ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (η περιοχή που αντιλαμβάνεται ο ανθρώπινος οφθαλμός) αποτελεί μία πολύ μικρή περιοχή του φάσματος **στα 400-800 nm**



Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας - ύλης

$$\text{Ενέργεια μορίου} = E_{\text{εσωτερική}} + E_{\text{κινητική}}$$

$$E_{\text{εσωτερική}} = E_{\text{ηλεκτρονιακή}} + E_{\text{δονητική}} + E_{\text{περιστροφική}}$$



$E_{\text{ηλεκτρονιακή}}$

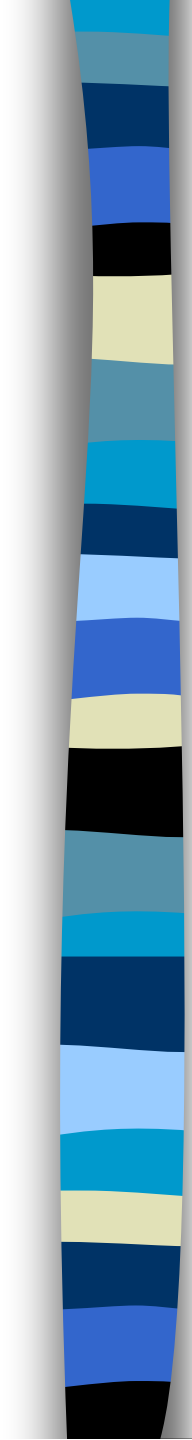
το άθροισμα της ενέργειας των ηλεκτρονίων του στα διάφορα τροχιακά

$E_{\text{δονητική}}$

της ενέργειας που οφείλεται στη ταλάντωση των ατόμων μέσα στο ίδιο το μόριο

$E_{\text{περιστροφική}}$

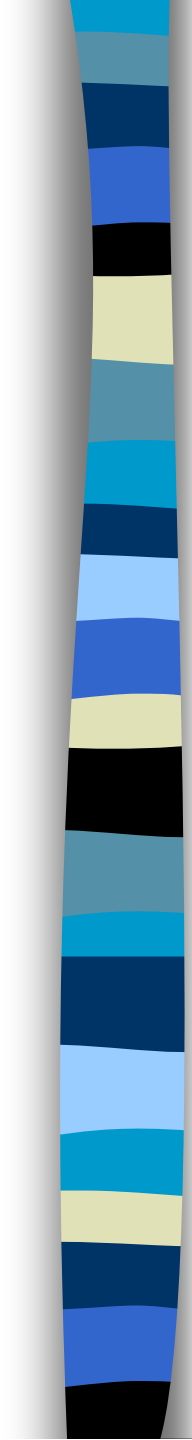
της ενέργειας που οφείλεται στη δυναμική ενέργεια των ηλεκτρονίων και τη περιστροφή των μορίων



Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας - ύλης

Όταν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία διέλθει διαμέσου ενός μορίου δύο τουλάχιστον διακριτές διεργασίες μπορούν να προκύψουν

- Η μία είναι η **σκέδαση της ακτινοβολίας**, σύμφωνα με την οποία η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία διαθλάται ή σκεδάζεται από τα μόρια χωρίς να αλλάξει η συχνότητά της.
Η σκέδαση του φωτός αποτελεί τη βάση πολλών μεθόδων χαρακτηρισμού μακρομορίων, όπως η σκέδαση ακτίνων Χ και η ηλεκτρονική μικροσκοπία.
- Η άλλη διεργασία που μπορεί να προκύψει από την αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας-ύλης είναι η **απορρόφηση**.
Στο φαινόμενο της απορρόφησης βασίζεται και η φασματοφωτομετρία.



Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας – ύλης Απορρόφηση

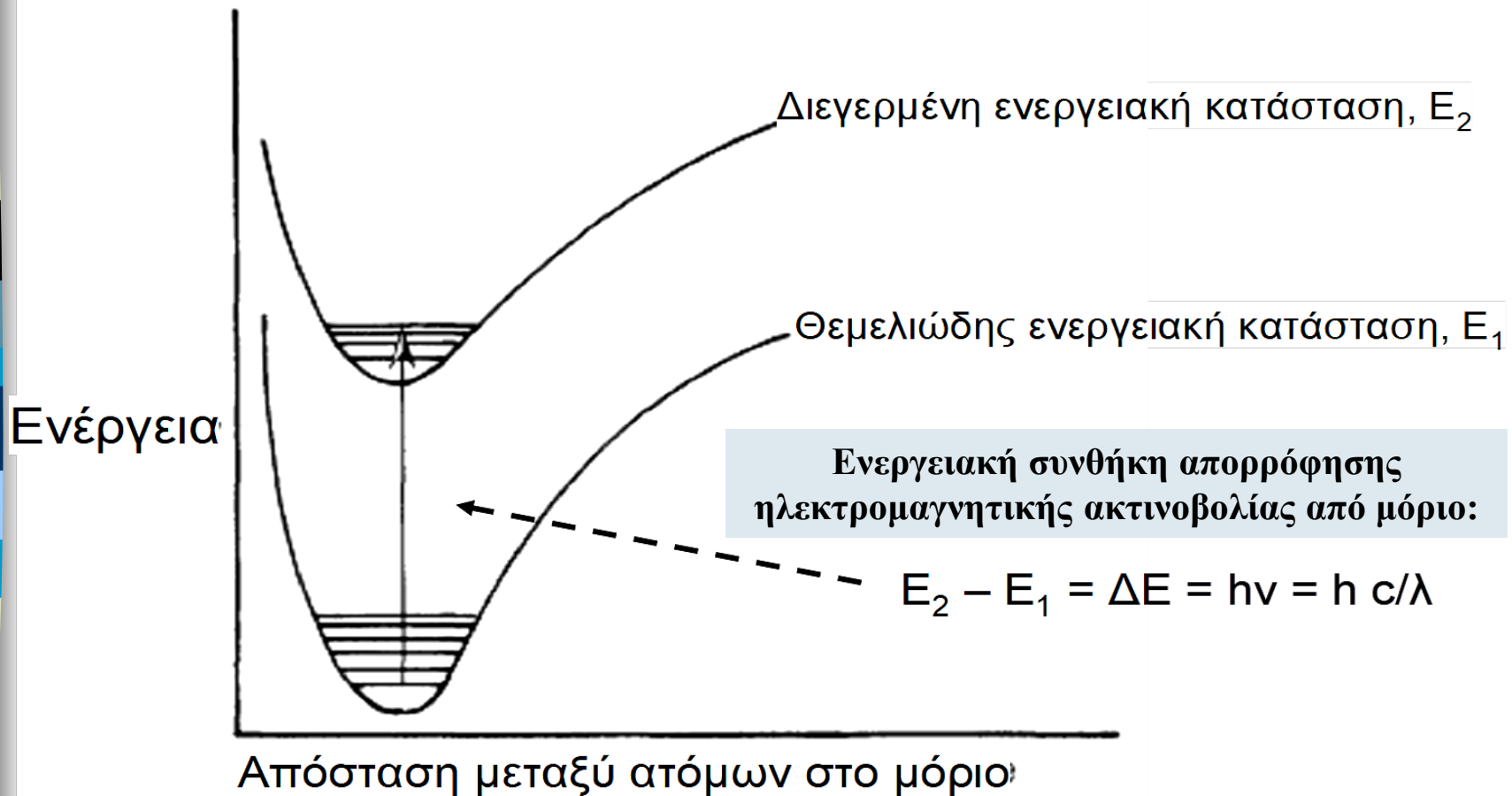
- Όταν πολυχρωματική ακτινοβολία διέλθει διαμέσου ενός μορίου τότε γίνεται **εκλεκτική απορρόφηση μέρους αυτής**

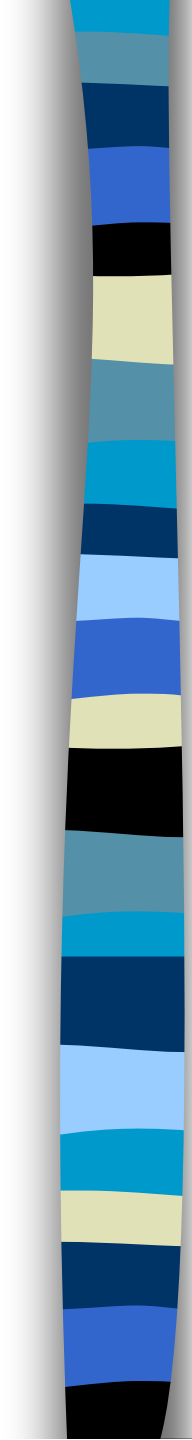
Απορροφούνται δηλαδή μόνο οι ακτινοβολίες, των οποίων τα φωτόνια έχουν ενέργεια ($E=h\nu$) που αντιστοιχεί στις ενεργειακές απαιτήσεις του μορίου προκειμένου τούτο να διεγερθεί από μία κατάσταση χαμηλής εσωτερικής ενέργειας (θεμελιώδη) σε μία κατάσταση υψηλότερης εσωτερικής ενέργειας (διεγερμένη).

- Ουσιαστικά, με το φαινόμενο της απορρόφησης μεταφέρεται μέρος της ενέργειας της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στο μόριο, η οποία **οδηγεί στη μεταβατική μετάπτωση του μορίου σε μία υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση.**

Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας – ύλης Απορρόφηση

Η απορρόφηση **ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας** (UV-Vis) διεγείρει τα ηλεκτρόνια των εξωτερικών στοιβάδων (ηλεκτρονίων σθένους), τα οποία μεταπίπτουν σε μοριακά τροχιακά υψηλότερων ενεργειών

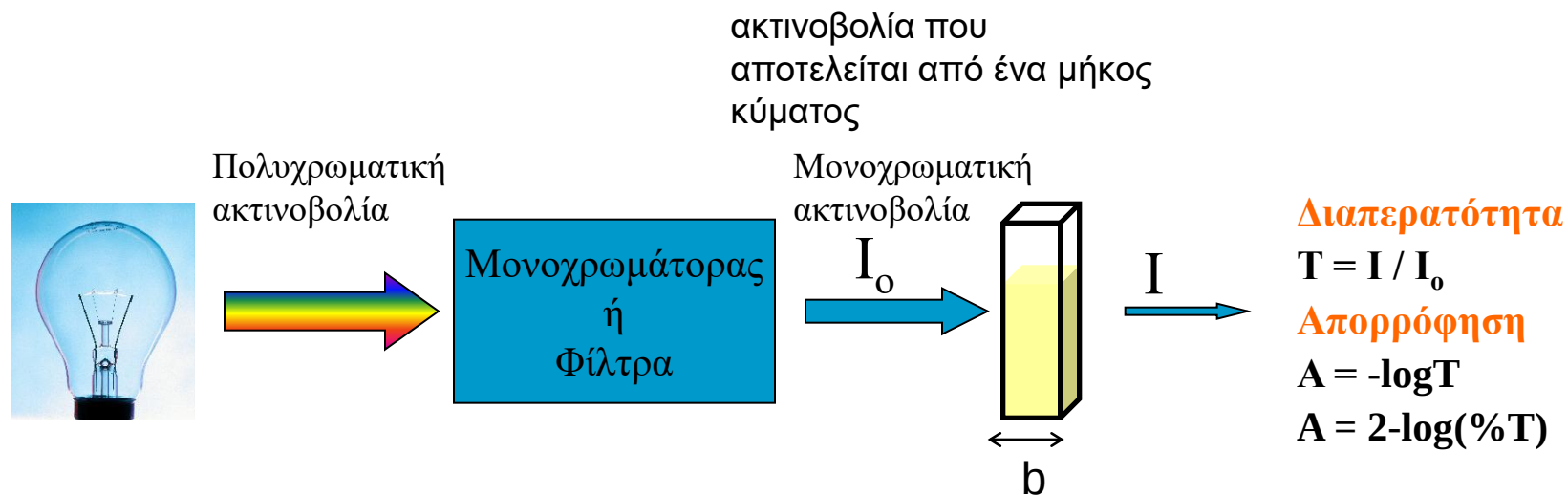




Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας – ύλης Απορρόφηση

- ❑ Η απορρόφηση ακτινοβολίας στο **εγγύς υπέρυθρο** και το **υπέρυθρο** προκαλεί διεγέρσεις δόνησης και παραμορφώσεως (και συνεπώς αύξηση της δονητικής ενέργειας των μορίων)
- ❑ Η απορρόφηση της **άπω υπερύθρου** ακτινοβολίας προκαλεί διεγέρσεις περιστροφής των μορίων (και συνεπώς αύξηση της περιστροφικής τους ενέργειας). Τα φάσματα υπερύθρου χρησιμοποιούνται κυρίως για το προσδιορισμό της δομής οργανικών ενώσεων.

Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας – ύλης

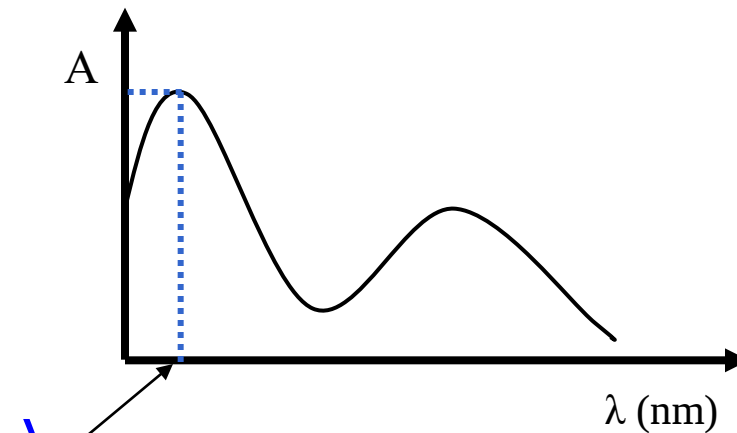


- Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία διέλθει διαμέσου διαλύματος, που περιέχει μία απορροφούσα ουσία, **η ισχύς της ακτινοβολίας θα ελαττωθεί προοδευτικά**, κατά το μήκος της διαδρομής, λόγω απορρόφησης αυτής από την ουσία.
- Αν I_0 είναι η ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, τότε η διερχόμενη ακτινοβολία θα έχει ισχύ I , **η οποία θα είναι μικρότερη από την I_0 .**

Φάσμα απορρόφησης

Το διάγραμμα της απορρόφησης συναρτήσει του μήκους κύματος

$$A = f(\lambda)$$

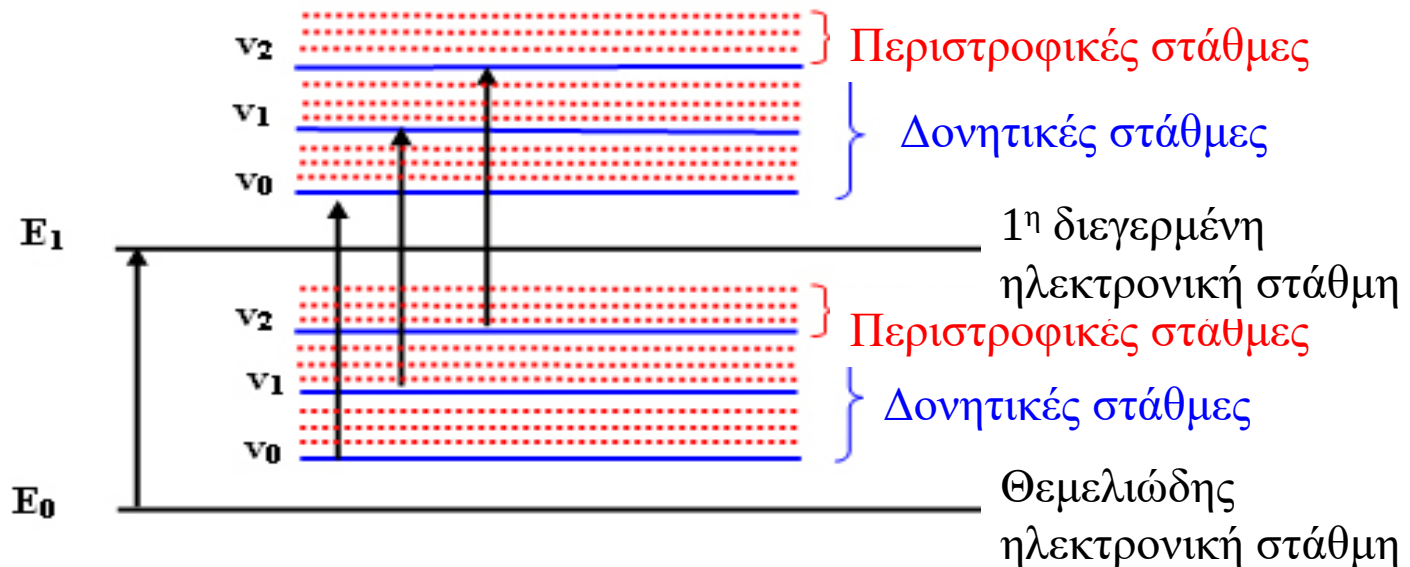


$\lambda_{\max}$

εξαρτάται από: τη φύση της ουσίας, τη φύση του διαλύτη

Φάσμα απορρόφησης

- Από τη στιγμή που ένα μόριο μπορεί να απορροφήσει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συγκεκριμένης μόνο ενέργειας θα ανέμενε κανείς ότι το φάσμα απορρόφησης μίας ένωσης θα αποτελούνταν από **στενές φασματικές γραμμές σε συγκεκριμένα μήκη κύματος**.
- Επειδή όμως κάθε ηλεκτρονιακή στάθμη ενέργειας αποτελείται από πολλές δονητικές στάθμες, αυξάνουν οι ενεργειακά επιτρεπτές μεταπτώσεις με αποτέλεσμα το φάσμα απορρόφησης μίας ένωσης να χαρακτηρίζεται από ευρείες κορυφές.



Χρώματα

Για να εμφανίσει μία ένωση χρώμα αρκεί ένα μέρος του φάσματος απορρόφησης της να εισέρχεται στην περιοχή του ορατού

Όταν το λευκό φως

- ανακλασθεί πλήρως πάνω σε ένα σώμα => λευκό
- απορροφηθεί πλήρως => μέλαν
- απορροφηθεί μερικώς εμφανίζεται με χρώμα συμπληρωματικό του απορροφούμενου

Οι χημικές ομάδες που απορροφούν πάνω σε ένα μόριο λέγονται χρωμοφόρες και είναι συνήθως ακόρεστα συζυγιακά συστήματα αλλά και οι αρωματικοί δακτύλιοι

$\nu \text{ (s}^{-1}\text{)}$	λ_{max} (nm)	Απορροφούμενο χρώμα	Συμπληρωματικό χρώμα εμφάνισης
$> \sim 8 \times 10^{14}$	200 - 400	Υπεριώδες	Άχρωμο
$\sim 6,2 \times 10^{14}$	400 - 510	Ιώδες – Κυανούν	Κίτρινο
$\sim 5,6 \times 10^{14}$	510 - 560	Πράσινο	Ερυθρό
$\sim 5,2 \times 10^{14}$	560 - 590	Κίτρινο	Ιώδες
$\sim 4,6 \times 10^{14}$	590 - 750	Ερυθρό	Πράσινο
$< \sim 4,0 \times 10^{14}$	750 - 900	Εγγύς υπέρυθρο	Άχρωμο

Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας – ύλης

Νόμος Lambert-Beer



Διαπερατότητα

$$T = I / I_0$$

$$\%T = (I/I_0) \times 100$$

Απορρόφηση

$$A = -\log T$$

$$A = 2 - \log(\%T)$$

$$A = \epsilon b C$$

I_0 = προσπίπτουσα ακτινοβολία

I = διερχόμενη ακτινοβολία

b = μήκος της διαδρομής που διανύει η ακτινοβολία (πάχος κυψελίδας)

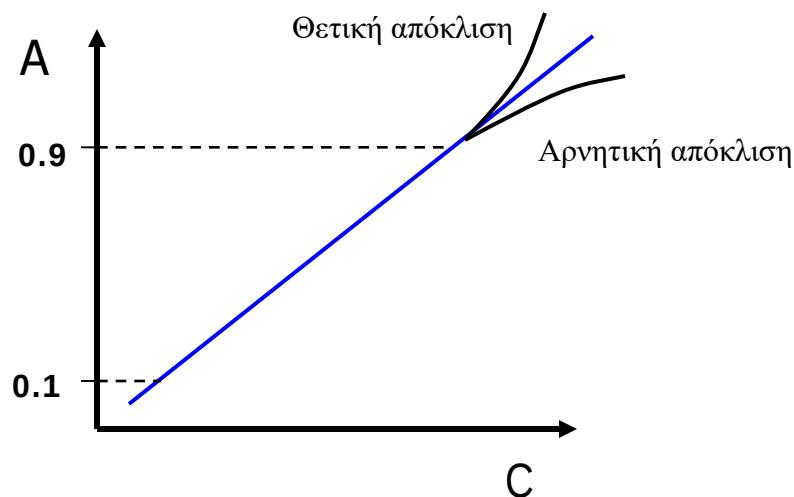
C = συγκέντρωση της ουσίας ($M \Rightarrow mol / L$)

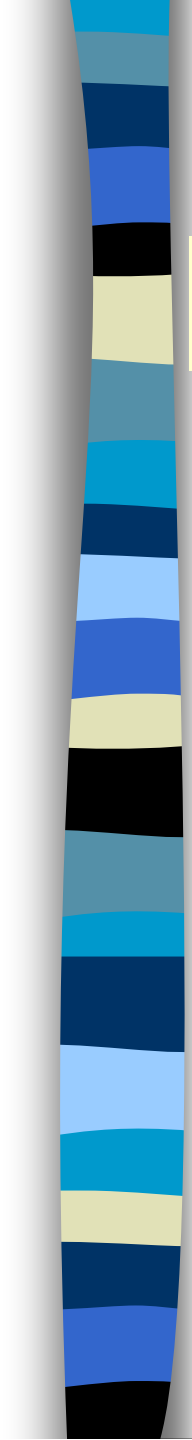
ϵ = μοριακή απορροφητικότητα ($M^{-1} cm^{-1}$)
σταθερά αναλογίας που δείχνει πόσο ισχυρά απορροφά η ουσία την ακτινοβολία στο συγκεκριμένο λ

(εξαρτάται από: λ , διαλύτη, φύση της ουσίας)

Ο νόμος του Lambert-Beer προϋποθέτει ότι :

1. Ο μόνος μηχανισμός αλληλεπίδρασης μεταξύ ουσίας και ηλεκτομαγνητικής ακτινοβολίας είναι η απορρόφηση
2. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία είναι μονοχρωματική
3. Η ουσία βρίσκεται σε κυψελίδα με ομοιόμορφη διατομή
4. Τα σωματίδια που απορροφούν την ακτινοβολία δρουν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο (όχι πυκνά διαλύματα)





Φασματοφωτόμετρο

Τα φασματοφωτόμετρα είναι τα όργανα με τα οποία μπορεί να μετρηθεί η απορρόφηση μονοχρωματικής ακτινοβολίας από μία ουσία σε διάλυμα.

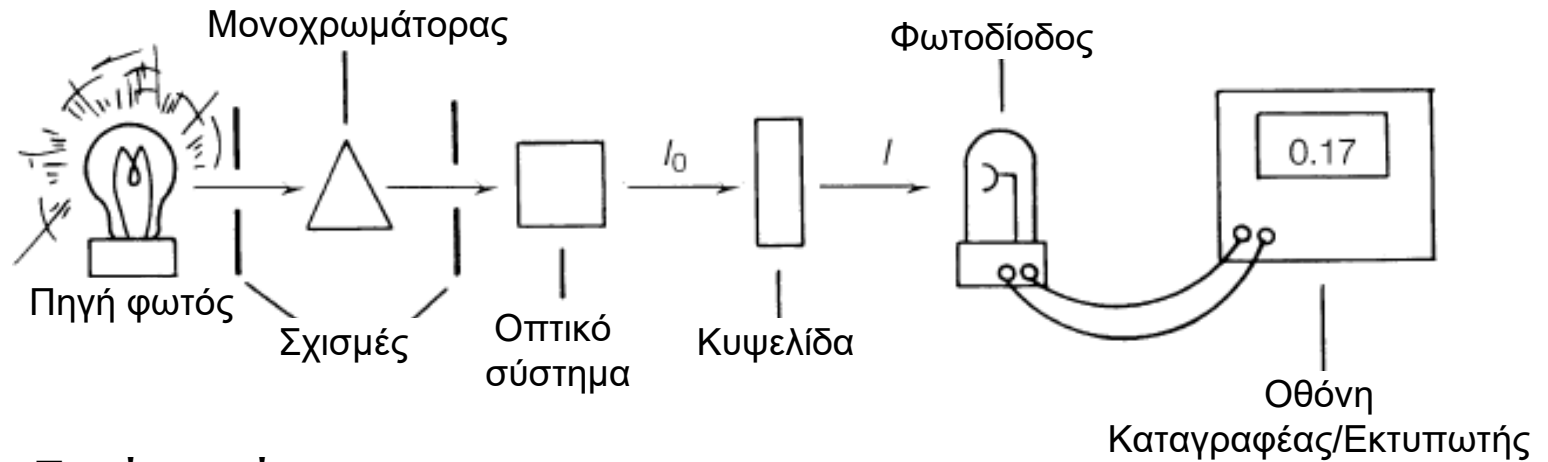
Η αρχή λειτουργίας τους στηρίζεται

- στην ικανότητα τους να παράγουν μονοχρωματική ακτινοβολία, την οποία και κατευθύνουν πάνω στο διάλυμα της απορροφούσας ουσίας
- και στη μέτρηση της έντασης της προσπίπτουσας και εξερχόμενης έντασης της ακτινοβολίας, από τις τιμές των οποίων υπολογίζεται η απορρόφηση ή η διαπερατότητα.

Τα φασματοφωτόμετρα ορατού μετρούν απορροφήσεις στην περιοχή **ορατού (360-800 nm)** και στη περιοχή του **εγγύς υπέρυθρου (800 900 nm)**.

Τα φασματοφωτόμετρα **υπεριώδους** μετρούν απορροφήσεις στην περιοχή **190-400 nm**, αν και πλέον τα σύγχρονα φασματοφωτόμετρα μπορούν να καλύψουν όλη την περιοχή του ορατού και υπεριώδους φάσματος.

Φασματοφωτόμετρο - απλής δέσμης



■ Πηγή φωτός

Η πηγή πρέπει να εκπέμπει ακτινοβολία επαρκούς ισχύος στην επιθυμητή περιοχή του φάσματος και η παραγωγή της ακτινοβολία να γίνεται με τρόπο αναπαραγώγιμο και ελεγχόμενο.

Vis => λυχνία πυρακτώσεως W (340-900 nm)

UV/Vis => πρόσθετη λυχνία εκκενώσεως H₂ (190-360 nm)

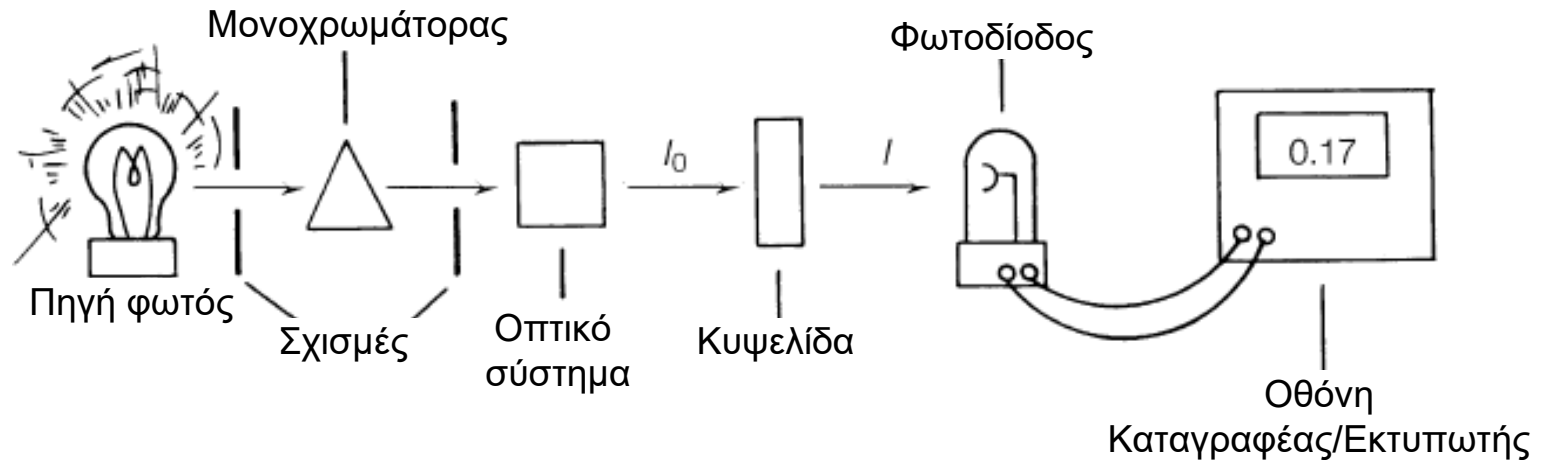
■ Επιλογέας μήκους κύματος

Ο επιλογέας μήκους κύματος έχει ως σκοπό την απομόνωση μονοχρωματικής ακτινοβολίας από το σύνολο του φάσματος που εκπέμπει η πηγή ακτινοβολίας.

οπτικά φίλτρα => καθένα από τα οποία επιτρέπει τη διέλευση στενής περιοχής του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος

ειδικά πρίσματα (μονοχρωμάτορες) => οι οποίοι επιτρέπουν τη διέλευση στενότερης περιοχής του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος σε σχέση με τα φίλτρα.

Φασματοφωτόμετρο - απλής δέσμης



- Σχισμή

σχηματίζεται από δύο διαφράγματα => ρυθμίζει την ένταση της δέσμης (I_0)

- Κυψελίδα

Στην κυψελίδα τοποθετείται το προς μέτρηση διάλυμα και αυτή τοποθετείται με τη σειρά της σε ειδική υποδοχή του οργάνου.

Το **υλικό κατασκευής των κυψελίδων** ποικίλλει ανάλογα τη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, διότι πρέπει να επιτρέπει τη δίοδο της αντίστοιχης ακτινοβολίας.

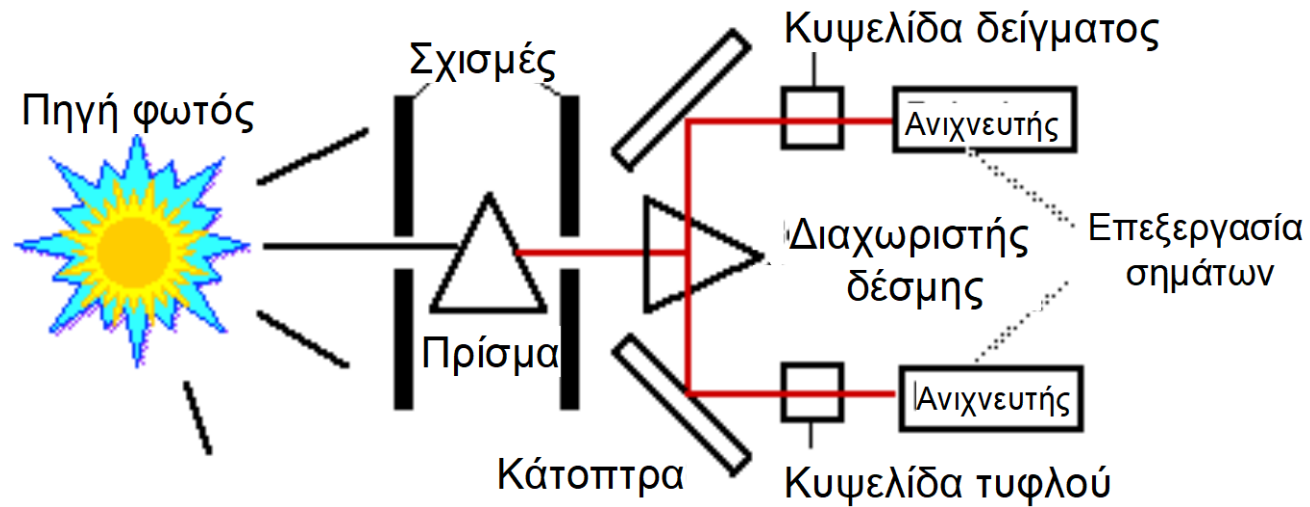
Vis => κοινό γυαλί ή διαφανές πλαστικό, UV => χαλαζία

- Ανιχνευτής

μετατρέπουν το εξερχόμενο μονοχρωματικό φως σε ηλεκτρικό ρεύμα, το οποίο μετατρέπεται στη συνέχεια σε απορρόφηση ή διαπερατότητα από τα ολοκληρωμένα κυκλώματα του οργάνου

- Οθόνη / Καταγραφέας

Φασματοφωτόμετρο - διπλής δέσμης

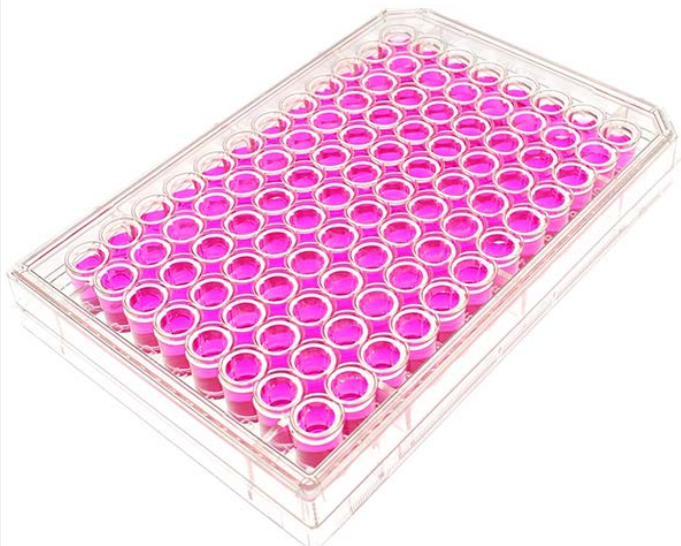
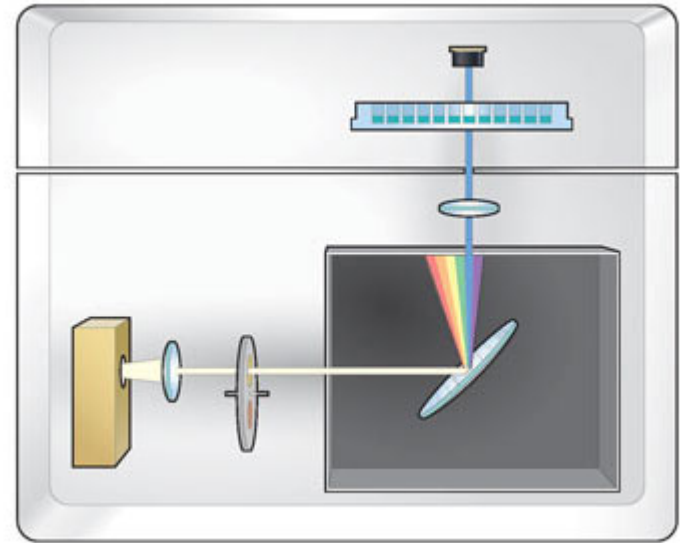


Ανάλογα τον τρόπο με τον οποίο μετριέται και αφαιρείται η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος από την απορρόφηση του δείγματος τα φασματοφωτόμετρα διακρίνονται στα φασματοφωτόμετρα απλής ή διπλής δέσμης.

Φασματοφωτόμετρο



Φασματοφωτόμετρο



Back		Raw OD 571 nm												Output	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A		0.450	0.451	0.452	0.453	0.454	0.455	0.456	0.457	0.458	0.459	0.460	0.461		
B		0.550	0.551	0.552	0.553	0.554	0.555	0.556	0.557	0.558	0.559	0.560	0.561		
C		0.650	0.651	0.652	0.653	0.654	0.655	0.656	0.657	0.658	0.659	0.660	0.661		
D		0.750	0.751	0.752	0.753	0.754	0.755	0.756	0.757	0.758	0.759	0.760	0.761		
E		0.850	0.851	0.852	0.853	0.854	0.855	0.856	0.857	0.858	0.859	0.860	0.861		
F		0.950	0.951	0.952	0.953	0.954	0.955	0.956	0.957	0.958	0.959	0.960	0.961		
G		1.050	1.051	1.052	1.053	1.054	1.055	1.056	1.057	1.058	1.059	1.060	1.061		
H		1.150	1.151	1.152	1.153	1.154	1.155	1.156	1.157	1.158	1.159	1.160	1.161		

Back		Raw OD 450 nm												Output	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A		0.450	0.451	0.452	0.453	0.454	0.455	0.456	0.457	0.458	0.459	0.460	0.461		
B		0.550	0.551	0.552	0.553	0.554	0.555	0.556	0.557	0.558	0.559	0.560	0.561		
C		0.650	0.651	0.652	0.653	0.654	0.655	0.656	0.657	0.658	0.659	0.660	0.661		
D		0.750	0.751	0.752	0.753	0.754	0.755	0.756	0.757	0.758	0.759	0.760	0.761		
E		0.850	0.851	0.852	0.853	0.854	0.855	0.856	0.857	0.858	0.859	0.860	0.861		
F		0.950	0.951	0.952	0.953	0.954	0.955	0.956	0.957	0.958	0.959	0.960	0.961		
G		1.050	1.051	1.052	1.053	1.054	1.055	1.056	1.057	1.058	1.059	1.060	1.061		
H		1.150	1.151	1.152	1.153	1.154	1.155	1.156	1.157	1.158	1.159	1.160	1.161		

Εφαρμογές φασματοφωτομετρίας

■ Προσδιορισμό δομής

Κυρίως με τα φάσματα υπερύθρου (IR)

UV-Vis => ανίχνευση χαρακτηριστικών ομάδων

Χρωμοφόρο	Ένωση	Μετάπτωση	λ	ϵ
C=O	Aldehyde/Ketone	$n \rightarrow \sigma^*$	166	16000
		$\pi \rightarrow \pi^*$	189	900
		$n \rightarrow \pi^*$	270	10-20
C=O	Carboxylic acid	$n \rightarrow \pi^*$	200	50
C=O	Carboxylate	$n \rightarrow \pi^*$	210	150
C=O	Ester	$n \rightarrow \pi^*$	210	50
C=O	Amide	$n \rightarrow \pi^*$	205	200
C=N	$(\text{NH}_2)_2\text{C}=\text{NH}$	$n \rightarrow \pi^*$	265	15
C $\equiv$ N	$\text{CH}_3\text{C}\equiv\text{N}$	$\pi \rightarrow \pi^*$	<170	
N=N	Me-N=N-Me	$n \rightarrow \pi^*$	350-370	15
N=O	Me ₃ NO	$n \rightarrow \pi^*$	300	100

■ Ποιοτική ανάλυση

Σύγκριση φάσματος άγνωστης ένωσης με φάσματα γνωστών ενώσεων

■ Ποσοτική ανάλυση

Βασίζεται στο νόμο του Beer, κυρίως UV-Vis

Ποσοτική ανάλυση

- Εάν είναι γνωστό το ε

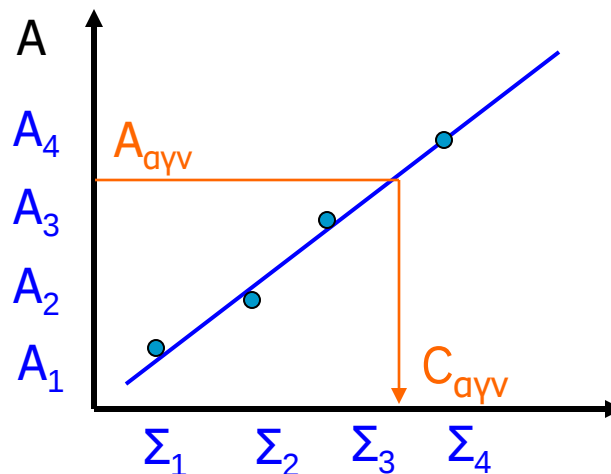
$$A = \varepsilon b C \Rightarrow C = A / \varepsilon b \text{ (ίδιες συνθήκες)}$$

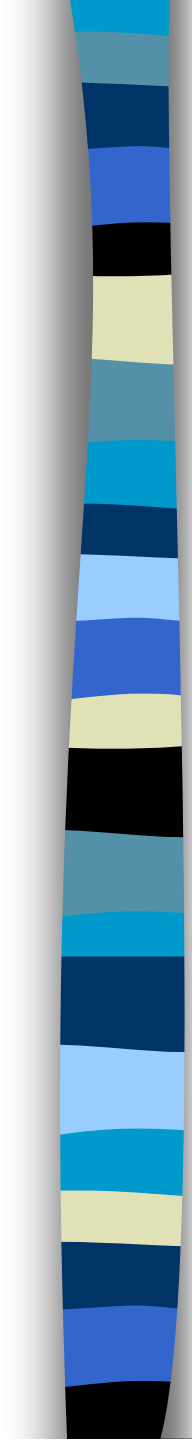
- Συγκριτική μέθοδος

$$\left. \begin{array}{l} A_{\text{προτύπου}} = \varepsilon b C_{\text{προτύπου}} \\ A_{\text{αγνώστου}} = \varepsilon b C_{\text{αγνώστου}} \end{array} \right\} C_{\text{αγν}} = C_{\text{προτ}} A_{\text{αγν}} / A_{\text{προτ}}$$

- Καμπύλη αναφοράς

$$\begin{array}{ll} \Sigma_1 \rightarrow A_1 \\ \Sigma_2 \rightarrow A_2 \\ \Sigma_3 \rightarrow A_3 \\ \Sigma_4 \rightarrow A_4 \end{array}$$





Ποσοτική ανάλυση

- Ανεξάρτητα ποιά μέθοδος θα χρησιμοποιηθεί, η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται στο $\lambda_{\max}$ δηλαδή στο μήκος κύματος που εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση η προς προσδιορισμό ένωση.
- Η μέτρηση στο $\lambda_{\max}$ επιτρέπει την αύξηση του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου και τον προσδιορισμό των ελάχιστων δυνατών ποσοτήτων μίας χρωμοφόρας ένωσης σε ένα διάλυμα.
- Για το λόγο αυτό, είναι σκόπιμο, πριν επιχειρηθεί ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης διαλύματος μίας ένωσης να ληφθεί το φάσμα απορρόφησης της, έτσι ώστε να προσδιοριστεί το/τα $\lambda_{\max}$ της και να επιλεγεί το κατάλληλο μήκος κύματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της.

Ποσοτική ανάλυση

Ανεξάρτητα ποιά μέθοδος θα χρησιμοποιηθεί πρέπει να ισχύσει ο νόμος του Lambert-Beer ο οποίος προϋποθέτει ότι :

1. Ο μόνος μηχανισμός αλληλεπίδρασης μεταξύ ουσίας και ηλεκτομαγνητικής ακτινοβολίας είναι η απορρόφηση
2. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία είναι μονοχρωματική
3. Η ουσία βρίσκεται σε κυψελίδα με ομοιόμορφη διατομή
4. Τα σωματίδια που απορροφούν την ακτινοβολία δρουν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο (όχι πυκνά διαλύματα)

