

Αικατερίνη Κ. Μαρκοπούλου-Αλμπάνη
Αναπλ. Καθηγήτρια Φαρμ. Ανάλυσης

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΑΝΑΛΥΣΗΣ
3^{οο}-4^{οο} εξαμήνου

Ομάδα :	Υποομάδα :	Ημερομηνία:
Ασκούμενοι Φοιτητές		Ονοματεπώνυμο
1ος		
2ος		
3ος		
4ος		



Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Φαρμακευτικής

Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας-Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2016

Πρόλογος

Οι σημειώσεις εργαστηριακών ασκήσεων Φαρμακευτικής Ανάλυσης του 3^{ου} εξαμήνου της Φαρμακευτικής Σχολής αποβλέπουν στην σύντομη ενημέρωση και εξοικείωση των φοιτητών με το αντίστοιχο αντικείμενο. Ο ρόλος της Ενόργανης Ανάλυσης που τμήμα της αποτελεί η Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους είναι πολύ σημαντικός και καθοριστικός για την εξέλιξη της Φαρμακευτικής επιστήμης στην έρευνα και την τεχνολογία.

Η ύλη των σημειώσεων περιλαμβάνει δύο τμήματα την **Εισαγωγή** και το **Πειραματικό**. Στην εισαγωγή γίνεται μια γενική παρουσίαση των θεωρητικών αρχών βάση* των οποίων αναπτύσσεται και εφαρμόζεται η Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους (UV).

Το πειραματικό τμήμα περιλαμβάνει την επί μέρους θεωρητική αναφορά και την πειραματική διαδικασία της πρακτικής άσκησης, όπου ο φοιτητής αναγράφει τα αποτελέσματα του πειράματος βήμα προς βήμα.

Επιθυμία μας είναι η ύλη των εργαστηριακών ασκήσεων που περιγράφονται εδώ να βοηθήσουν τους φοιτητές μας να κατανοήσουν τις βασικές αρχές της Φαρμακευτικής Ανάλυσης τόσο στη θεωρία όσο και στην πράξη ώστε να μπορούν να ανταποκριθούν επάξια στις ανάγκες ενός Αναλυτικού Εργαστηρίου.

**Ως κύρια βιβλιογραφική πηγή για τη συγγραφή του θεωρητικού μέρους των σημειώσεων χρησιμοποιήθηκε το βιβλίο της Ανάλυσης I (Ιωάννης Κουντουρέλλης, επίτιμος καθηγητής Φαρμακευτικής Ανάλυσης)*

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Πρόλογος

Φαρμακευτική Ανάλυση είναι ο κλάδος της Φαρμακευτικής που έχει σαν αντικείμενο έρευνας την ανάπτυξη και εφαρμογή μεθόδων για το ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών που έχουν θεραπευτικές ή καλλυντικές ιδιότητες.

Τα κυριότερα αντικείμενα μελέτης της ειδικότητας αυτής είναι:

- Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός καθώς και η ανάλυση της δομής των δραστικών ουσιών (φαρμάκων) σε σκευάσματα, βιολογικά υγρά και δρόγες που αναφέρονται στις φαρμακοποιίες με χημικές ηλεκτρικές και φυσικοχημικές ενόργανες μεθόδους ανάλυσης.
- Η εκτίμηση της ποιότητας των αμιγών φαρμάκων, των φαρμακευτικών ουσιών, των φαρμακομορφών και καλλυντικών από χημικής πλευράς.
- Η εύρεση και ο προσδιορισμός των ίδιων των φαρμάκων και των μεταβολιτών αυτών στα βιολογικά υγρά καθώς και των ενδογενών ουσιών.
- Οι διεργασίες απομόνωσης κάθε δραστικής ουσίας
- Η ανάπτυξη νέων μεθόδων ανάλυσης των φαρμάκων
- Η συσχέτιση χημικής δομής και φάσματος που οδηγεί στην ασφαλή ταυτοποίηση του φαρμάκου.
- Ο έλεγχος καθαρότητας του φαρμάκου, δηλαδή ο έλεγχος της παρουσίας ή μη ξένων προσμίξεων, οι οποίες τουλάχιστον πρέπει να βρίσκονται στο ελάχιστο επιτρεπτό όριο.
- Ο έλεγχος σταθερής ποσότητας δραστικής ουσίας σε κάθε φαρμακοσκεύασμα.

Σχεδόν κάθε φυσικοχημική ιδιότητα ενός χημικού συστατικού (στοιχείου, ιόντος ή ενώσεως), της οποίας το μέγεθος είναι συνάρτηση της μάζας ή της συγκέντρωσης του συστατικού αυτού, μπορεί ν' αποτελέσει τη βάση μιας τεχνικής προσδιορισμού του. Όλες λοιπόν οι αναλυτικές τεχνικές συσχετίζουν τη μέτρηση μιας φυσικής ιδιότητας ή παραμέτρου με τη συγκέντρωση (ποσότητα) του προσδιοριζόμενου συστατικού.

Θεωρητικά και κυρίως για ιστορικούς λόγους η Φαρμακευτική Ανάλυση μπορεί να διαχωριστεί σε δύο κλάδους. Στις κλασικές τεχνικές (σταθμικές και ογκομετρικές) και στις ενόργανες που ονομάζονται και φυσικές ή φυσικοχημικές.

Η διαφορά της ενόργανης ανάλυσης από τη χημική, βρίσκεται στο τρόπο υπολογισμού της ποσότητας μιας δραστικής ουσίας. Στις ενόργανες μεθόδους ανάλυσης, η ποσότητα ενός συστατικού υπολογίζεται βάση κάποιας φυσικοχημικής του ιδιότητας, σε αντίθεση με τις λεγόμενες κλασικές ή χημικές μεθόδους που ο προσδιορισμός γίνεται βάση της μάζας

Οι σπουδαιότερες μέθοδοι ενόργανου ανάλυσης αναφέρονται στον Πίνακα 1, και ταξινομούνται σύμφωνα με το μετρούμενο μέγεθος σε τρεις γενικές κατηγορίες.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΝΟΡΓΑΝΟΥ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

ΜΕΘΟΔΟΣ	ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗ ΦΥΣΙΚΗ ΙΔΙΟΤΗΤΑ
Οπτικές μέθοδοι	
Φλογοφωτομετρία	εκπεμπόμενη ακτινοβολία
Φθορισμομετρία α. ακτινών χ	εκπεμπόμενη ακτινοβολία
β. υπεριώδους	εκπεμπόμενη ακτινοβολία
γ. ορατού	εκπεμπόμενη ακτινοβολία
Φασματοφωτομετρία απορρόφησης υπεριώδους	απορροφούμενη ακτινοβολία
Φασματοφωτομετρία απορρόφησης ορατού	απορροφούμενη ακτινοβολία
Φασματοφωτομετρία απορρόφησης υπέρυθρου	απορροφούμενη ακτινοβολία
Φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης	απορροφούμενη ακτινοβολία
Φασματοφωτομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού	απορροφούμενη ακτινοβολία
Φασματοσκοπία Raman	σκεδαζόμενη ακτινοβολία
Θολωσιμετρία	σκεδαζόμενη ακτινοβολία
Νεφελομετρία	σκεδαζόμενη ακτινοβολία
Πολωσιμετρία	στροφή επιπέδου πολωμένου φωτός
Διαθλασιμετρία	δείκτης διάθλασης
Ηλεκτρικές μέθοδοι	
Ποτενσιομετρία	δυναμικό
Κουλομετρία	ποσότητα ηλεκτρισμού
Πολαρογραφία	ένταση ρεύματος
Αμπερομετρία	ένταση ρεύματος
Αγωγιμομετρία	αγωγιμότητα
Διάφορες άλλες μέθοδοι	
Φασματοσκοπία μαζών	λόγος μάζας προς σθένος προϊόντων θραύσης
Ραδιοχημικές μέθοδοι	
Ραδιοχημική ανάλυση δια ενεργοποίησης δια ισοτοπικής αραίωσης	εκπεμπόμενη ακτινοβολία α, β, γ

Παρόλο που οι ενόργανες μέθοδοι ανάλυσης υπερτερούν στην ευαισθησία, την ταχύτητα, τη δυνατότητα χρήσης μικροποσοτήτων ή τη δυνατότητα επαναπρόκτησης των δειγμάτων, παρουσιάζουν μειονεκτήματα που είναι τα εξής:

- Απαιτούνται ακόμα πρότυπα διαλύματα για τη βαθμονόμηση των οργάνων ή για την κατασκευή καμπύλων αναφοράς εφόσον πρόκειται να κάνουμε ποσοτικούς προσδιορισμούς.
- Υστερούν ως προς την ακρίβεια.
- Το κόστος των οργάνων είναι αρκετά υψηλό.
- Απαιτείται συνεχής συντήρηση των οργάνων

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ (UV-Vis)

Η φύση της ακτινοβολούμενης ενέργειας

Το ορατό φως είναι μια μορφή ενέργειας που περιγράφεται αρχικά με δύο θεωρίες. Τη θεωρία των κυμάτων (wave theory) και εκείνη των σωματιδίων (corpuscular theory). Με καμία όμως θεωρία δεν μπόρεσαν να εξηγηθούν όλες οι ιδιότητες του φωτός επειδή μερικά φαινόμενα γίνονταν κατανοητά με τη μία ή την άλλη θεωρία. Μόλις το 1900 με τη θεωρία της κβαντομηχανικής (quantum theory) εξηγήθηκαν πλήρως ορισμένα φαινόμενα. Με τη θεωρία αυτή δεχόμαστε πως η υλική ενέργεια μπορεί να μετατρέπεται σε ενέργεια ακτινοβολίας μόνο κατά στοιχειώδη ποσά ορισμένου μεγέθους ή «κατά κβαντικές μονάδες».

Οι μονάδες αυτές που χαρακτηρίζονται με τον όρο κβάντα ή φωτόνια καθώς επίσης και οι μονάδες της ακτινοβολούμενης ενέργειας μπορούν να έχουν συγχρόνως ιδιότητες κυμάτων και σωματιδίων. Πάντως οι θεμελιώδεις νόμοι της κβαντομηχανικής, βάσει των οποίων περιγράφονται οι διάφορες ακτινοβολίες είναι νόμοι πιθανοτήτων και όχι νόμοι βεβαιότητας.

Αν υποθέσουμε πως η διάδοση του φωτός πραγματοποιείται υπό μορφή κυμάτων, τότε τα δύο πεδία που δημιουργούνται, το ηλεκτρικό και το μαγνητικό είναι κάθετα μεταξύ τους .

Έτσι προκύπτει ο όρος ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Το ορατό φως αποτελεί μόνο μικρό μέρος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, το οποίο εκτείνεται από την περιοχή των κοσμικών ακτινών μέχρι την περιοχή των ραδιοκυμάτων.

$\lambda(m)$	$\nu(Hz)$	
10^{-7}	10^{15}	Υπεριώδες
10^{-6}	10^{14}	Ορατό
10^{-5}	10^{13}	Υπέρυθρο

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες με ευρεία εφαρμογή στη Φαρμακευτική Ανάλυση είναι οι εξής:

Ακτίνες Χ ($\nu=10^{17}$ H²), Υπεριώδεις ($c=10^{15}$ H²), του Ορατού ($\nu=10^{14}$ H²), του Υπερύθρου ($\nu=10^{13}$ H²) και του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR ($\nu=10^7$ H²).

Τα επιμέρους χρώματα του ορατού φωτός αντιστοιχούν σε ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες ενός ορισμένου μήκους κύματος. Έτσι το φως της ημέρας είναι δέσμες ακτινοβολιών διαφορετικού μήκους κύματος. Μια δέσμη ακτινοβολίας ενός ορισμένου μήκους κύματος καλείται μονοχρωματική και απομονώνεται με τη βοήθεια πρίσματος.

Γενικά, μια κύμανση μπορεί να χαρακτηριστεί με τρία διαφορετικά μεγέθη: με το μήκος κύματος λ , με τον αριθμό κύματος $\bar{\nu}$, με τη συχνότητα ν .

Μήκος κύματος λ : Είναι η απόσταση (παράλληλη με τη διάδοση του κύματος) μεταξύ δύο διαδοχικών κορυφών του κύματος.

Αριθμός κύματος $\bar{\nu}$: φανερώνει πόσα μήκη κύματος αντιστοιχούν σε ένα εκατοστό (cm)

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu \cdot n}{c} \text{ (units, cm}^{-1}\text{)}$$

όπου ν = συχνότητα

n = δείκτης διάθλασης

c = ταχύτητα φωτός στο κενό.

Συχνότητα ν : Είναι ο αριθμός κυμάτων (wavelength units) που διέρχεται από ένα δεδομένο σημείο στη μονάδα του χρόνου (sec). Οι μονάδες μέτρησης της συχνότητας ν είναι κύκλοι ανά δευτερόλεπτο (cps ή hertz, hz). Η συχνότητα ν μπορεί επίσης να εκφραστεί και από την εξίσωση:

$$\nu = \frac{c}{\lambda \cdot n}$$

όπου c = ταχύτητα φωτός στο κενό

n = δείκτης διάθλασης

λ = μήκος κύματος

Η ταχύτητα του φωτός c στο κενό ισούται με $c=2,977 \times 10^{10}$ cm/sec ενώ ο δείκτης διάθλασης στο κενό είναι ίσος με τη μονάδα $n=1$. Με βάση την παραπάνω εξίσωση λοιπόν η συχνότητα ν

εκφράζει τον αριθμό μηκών κύματος που αντιστοιχεί σε μια απόσταση $2,977 \times 10^8$ m. Επίσης, από την εξίσωση φαίνεται η ταχύτητα του φωτός ή οποιασδήποτε ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας εξαρτάται από το μέσο διάδοσής της. Καθώς η ακτινοβολία διαπερνά το μέσο η τιμή της συχνότητας παραμένει σταθερή. Αντίθετα η τιμή του μήκους κύματος είναι μεταβλητή.

Για να κατανοήσουμε πως μια ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αντιδρά με την ύλη είναι ανάγκη να αναφερθούμε και στη σωματιδιακή φύση της ακτινοβολίας. Τα σωματίδια του φωτός που καλούνται φωτόνια περιέχουν ενέργεια. Η ποσότητα της ενέργειας που περιέχει κάθε φωτόνιο είναι ανάλογη της συχνότητας της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Η παρακάτω εξίσωση δίνει τη μαθηματική σχέση μεταξύ ενέργειας και συχνότητας.

$$E = h \cdot \nu = h \frac{c}{\lambda \cdot n}$$

όπου h = σταθερά του Planck $6,624 \times 10^{-27}$ erg/sec ή 6.624×10^{-34} J/sec

E = η ενέργεια της ακτινοβολίας σε erg, joules ή cal

ν = η συχνότητα της ακτινοβολίας σε hz

c = η ταχύτητα του φωτός

λ = μήκος του κύματος της ακτινοβολίας.

Αυτό που είναι σημαντικό να προσέξουμε είναι ότι όπως προκύπτει από τις παραπάνω εξισώσεις αύξηση της ενέργειας ανά φωτόνιο συνεπάγεται αύξηση της τιμής της συχνότητας, οπότε έχουμε ελάττωση της τιμής του μήκους κύματος. Από την άλλη πλευρά ελάττωση της ενέργειας ανά φωτόνιο συνεπάγεται ελάττωση της τιμής της συχνότητας, άρα αύξηση στην τιμή του μήκους κύματος. Δηλαδή, ένα φωτόνιο με υψηλή τιμή συχνότητας ν και κατ' ανάγκη με μικρή τιμή μήκους κύματος λ περιέχει περισσότερη ενέργεια συγκριτικά με ένα άλλο φωτόνιο που έχει μικρή τιμή συχνότητας και μεγάλη τιμή μήκους κύματος λ .

Εδώ πρέπει να διευκρινιστεί πως η ένταση μιας δέσμης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας είναι ανάλογη του αριθμού των φωτονίων που περιέχει και ανεξάρτητη από την ενέργεια κάθε φωτονίου.

Ενέργεια Ηλεκτρομαγνητικής Ακτινοβολίας ,Φάσματα υπεριώδους – ορατού (UV-VIS)

Όταν μια ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία προσπέσει σε μια ουσία, μέρος της ενέργειας που περικλείει μεταβιβάζεται στην ουσία. Ως συνέπεια αυτού μεγάλος αριθμός ατόμων ή μορίων μεταβαίνουν από τη βασική κατάσταση στη διεγερμένη. Σύμφωνα με την κβαντομηχανική

θεωρία η διεγερμένη κατάσταση ενός ατόμου ή μορίου ορίζεται επακριβώς, συνεπώς και η ποσότητα ενέργειας που προσλαμβάνεται είναι καθορισμένη. Το ποσό της ενέργειας παρέχεται από φωτόνια ορισμένου μήκους κύματος λ , οπότε η τιμή λ είναι χαρακτηριστική για κάθε ουσία. Σύμφωνα με τα παραπάνω προκύπτει η εξίσωση:

$$M + h \cdot \nu = M^*$$

Όπου M = δέκτης ενέργειας

M^* = δέκτης στη διεγερμένη κατάσταση

Οι μονοατομικές ουσίες που συνήθως βρίσκονται σε αέρια κατάσταση μεταβαίνουν από τη βασική στη διεγερμένη κατάσταση μόνο όταν ηλεκτρόνια μεταπηδούν από τη μία στιβάδα σε άλλη με δαπάνη ενέργειας από τη χρησιμοποιούμενη ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία.

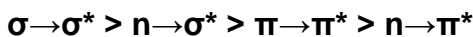
Στην περίπτωση όμως των μορίων δε συμβαίνουν μόνο ηλεκτρονικές διεγέρσεις. Και τούτο γιατί οι ηλεκτρονικές διεγέρσεις που καταγράφονται στα φάσματα απορρόφησης, συνοδεύονται από επί μέρους διεγέρσεις δόνησης και περιστροφής. Όλες αυτές τις διεγέρσεις ανεξάρτητα από το είδος τους είναι κβαντισμένες. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι η απορρόφηση ενέργειας από ένα μόριο είναι πολυπλοκότερο φαινόμενο απ' ότι η απορρόφηση ενέργειας από ένα άτομο.

Έτσι τα φάσματα απορρόφησης των μορίων ή μοριακών ιόντων είναι φάσματα ταινιών, γιατί πολλές διεγέρσεις ευρισκόμενες ενεργειακά πολύ κοντά, μαζί με διάφορες επιδράσεις του διαλύτη αλληλοκαλύπτονται. Συνεπώς δεν είναι δυνατόν να ξεχωρίσουν οι διεγέρσεις και να δώσουν γραμμικό φάσμα.

Είναι γνωστό ότι ο αριθμός των ηλεκτρονίων σε κάθε στοιβάδα είναι απόλυτα καθορισμένος. Η πιθανή θέση του ηλεκτρονίου στην τροχιά του περιγράφεται με μαθηματικές εξισώσεις που ονομάζονται τροχιακά. Στα φαρμακευτικά μόρια και εν γένει στις οργανικές ενώσεις υπάρχουν τέσσερα είδη ηλεκτρονίων.

- Ηλεκτρόνια που βρίσκονται στις εσωτερικές στιβάδες και απαιτούν μεγάλα ποσά ενέργειας για να μεταπηδήσουν σε τροχιά μεγαλύτερης ενέργειας. Επομένως δεν απορροφούν στην περιοχή υπεριώδους – ορατού.
- Ηλεκτρόνια που συμμετέχουν σε σ δεσμούς. Αυτά απαιτούν ικανό ποσό ενέργειας για να μεταβούν στη διεγερμένη κατάσταση σ^* και απορροφούν στην περιοχή του άπυ υπεριώδους.
- Ηλεκτρόνια π που συμμετέχουν σε διπλούς ή τριπλούς δεσμούς και απορροφούν στην περιοχή υπεριώδους-ορατού.
- Ηλεκτρόνια n του μονήρους ζεύγους που βρίσκονται στην εξωτερική στιβάδα. Μεταβαίνουν στη διεγερμένη κατάσταση π^* και απορροφούν στην περιοχή του υπεριώδους.

Στη Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους ενδιαφέρον έχουν οι διεγέρσεις των π και η ηλεκτρονίων. Οι ηλεκτρονιακές διεγέρσεις που γίνονται με την απορρόφηση ακτινοβολίας, δίνονται με τη σειρά της μεγαλύτερης προς τη μικρότερη απαιτούμενη ενέργεια για την πραγματοποίησή τους.



Οι διεγέρσεις $\eta \rightarrow \pi^*$ απαιτούν μικρότερη ενέργεια από εκείνη που απαιτείται για τη διέγερση $\sigma \rightarrow \sigma^*$, οπότε και η διέγερση $n \rightarrow \pi^*$ προκαλείται από απορρόφηση ακτινοβολίας μικρότερης συχνότητας ή μεγαλύτερου μήκους κύματος. Η μετάπτωση $\pi \rightarrow \pi^*$ γίνεται από ενώσεις που έχουν π - δεσμό. Η ισχύς αυτού του δεσμού είναι μικρότερη του σ δεσμού, γι αυτό και το αιθυλένιο απορροφά σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με το αιθάνιο (160 και 140 nm αντίστοιχα). Η μετάπτωση $\sigma \rightarrow \sigma^*$ γίνεται στις ενώσεις που έχουν μόνο σ μοριακά τροχιακά, όπως είναι οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες. Οι μεταπτώσεις $n \rightarrow \pi^*$ και $\eta \rightarrow \sigma^*$ οφείλονται στην ανύψωση ενός η αδεσμικού ηλεκτρονίου στο αντιδεσμικό π^* ή σ^* τροχιακό. Η πρώτη διέγερση εμφανίζεται στα 280 nm και έχει ασθενή ένταση.

Τα φάσματα UV-VIS είναι ιδιαίτερα σημαντικά στη μελέτη της δομής των οργανικών ενώσεων, ιδιαίτερα αν λάβουμε υπόψη μας ότι κατάλληλοι δομικοί συσχετισμοί τέτοιων στοιχείων σε ένα μόριο, επηρεάζουν την ενεργειακή του κατάσταση και προκαλούν χαρακτηριστικές απορροφήσεις. Για παράδειγμα, σε συζυγικά συστήματα όπως $C=C-C=C$ ή $C=C-C=O$ η απορρόφηση $\pi \rightarrow \pi^*$ μετατοπίζεται προς μεγαλύτερη μήκη κύματος σε σύγκριση με την απορρόφηση ακόρεστων μη συζυγικών συστημάτων με το ίδιο πλήθος πολλαπλών δεσμών. Η αύξηση της συζυγίας, μετατοπίζει το μέγιστο της απορρόφησης προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, λόγω περισσότερων δομών συντονισμού.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για τη λήψη φασμάτων UV-VIS δεν πρέπει να απορροφούν στην περιοχή υπεριώδους διότι θα παρεμβάλλουν στο φάσμα απορρόφησης της υπό προσδιορισμό ουσίας.

Ορολογία

Τα περισσότερα των φαρμακευτικών μορίων δίνουν απορροφήσεις στην περιοχή του υπεριώδους ορατού επειδή περιέχουν χαρακτηριστικές ομάδες στο μόριό τους. Η μέγιστη απορρόφηση ενός μορίου που αναφέρεται σε ορισμένο μήκος κύματος (λ_{max}) καθώς και το σχήμα της ταινίας απορρόφησης μερικές φορές είναι χαρακτηριστικά μιας συγκεκριμένης ομάδας. Έτσι στη φασματοσκοπία χρησιμοποιείται ειδική ορολογία για να περιγράψουν τα χαρακτηριστικά του φάσματος σε σχέση με συγκεκριμένες χημικές ομάδες εντός του μορίου που καλούνται χρωμοφόρες.

Χρωμοφόρος ομάδα ή χρωμοφόρα: είναι μια χημική ομάδα που είναι υπεύθυνη για την απορρόφηση μιας ουσίας στην περιοχή υπεριώδους ορατού. Συνήθως, η ομάδα αυτή περιέχει τουλάχιστον έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς π.χ. φαινιλική.

Αυξόχρωμος ομάδα: αυξόχρωμη είναι μια χημική ομάδα που μόνη της δεν έχει μεγάλη ένταση απορρόφησης αλλά όταν βρίσκεται κοντά σε μια χρωμοφόρο ομάδα ή η μέγιστη απορρόφηση (λ_{\max}) μετατοπίζεται σε μεγαλύτερη μήκη κύματος ή αυξάνει η ένταση απορρόφησης ή συμβαίνουν και οι δύο προαναφερθείσες περιπτώσεις π.χ. υδροξυλικές αμινικές ομάδες όταν είναι υποκατάστατες σε φαινυλική μερίδα.

Βαθυχρωμία: χαρακτηρίζεται το φαινόμενο κατά το οποίο μια ταινία απορρόφησης μετατοπίζεται σε μεγαλύτερη μήκη κύματος. Βαθυχρωμία έχουμε συνήθως όταν προστίθενται και άλλες αυξόχρωμες ομάδες στο μόριο της υπό εξέτασης ουσίας ή όταν χρησιμοποιείται διαφορετικός διαλύτης ο οποίος αλληλεπιδρά με το μόριό της αλλάζοντας την πολικότητα και κατ' επέκταση τις δομές συντονισμού της. Η βαθυχρωμία ονομάζεται και κόκκινη μετατόπιση επειδή το λ_{\max} μετατοπίζεται προς την περιοχή του υπέρυθρου στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

Υψιχρωμία: Καλείται η μετατόπιση της απορρόφησης προς βραχύτερα μήκη κύματος. Συνήθως, οφείλεται στις επιδράσεις του διαλύτη. Η υψιχρωμία ονομάζεται και μπλε μετατόπιση.

Υπερχρωμισμός: είναι η αύξηση της έντασης απορρόφησης, δηλαδή η αύξηση της τιμής του E_{\max} ή A^{11} .

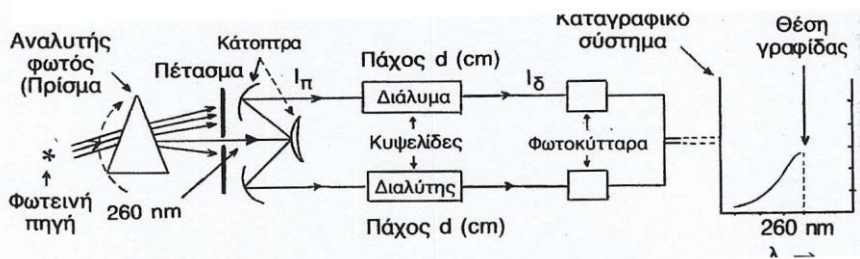
Υποχρωμισμός: είναι η ελάττωση της έντασης απορρόφησης, δηλαδή η ελάττωση της τιμής του E_{\max} ή A^{11} .

Οργανολογία Φασματοφωτομετρίας Υπεριώδους=ορατού

Για τη λήψη φάσματος υπεριώδους ορατού χρησιμοποιούνται ειδικά όργανα: τα φασματοφωτόμετρα και τα φωτόμετρα.

Στα φασματοφωτόμετρα η ουσία με μορφή διαλύματος σε κατάλληλο διαλύτη τοποθετείται σε κυψελίδα καθορισμένου πάχους (συνήθως 1 cm), ενώ σε μια άλλη κυψελίδα τοποθετείται μόνο διαλύτης. Κατάλληλη φωτεινή πηγή (λυχνία Hg ή δευτερίου για την περιοχή υπεριώδους και λυχνία βολφραμίου για την περιοχή του ορατού) στέλνει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σε πρίσμα ή περιθλαστικό φράγμα, το οποίο την αναλύει σε μονοχρωματικές δέσμες. Διάφραγμα με λεπτή σχισμή (μονοχρωμάτορας) παρεμβάλλεται κατάλληλα και επιτρέπει τη διέλευση μια μόνο μονοχρωματικής δέσμης, η οποία ανακλάται σε κυρτό κάτοπτρο προς δύο ισοδύναμες δέσμες. Αυτές ανακλώμενες κατάλληλα διέρχονται από τις δύο κυψελίδες και στη συνέχεια με κατάλληλα φωτοκύτταρα προσδιορίζεται η έντασή τους. Όταν απορροφά μόνο ο διαλύτης, οι δύο δέσμες διέρχονται από τις δύο κυψελίδες με την ίδια ένταση και γραφίδα στο καταγραφικό

σύστημα δείχνει για το αντίστοιχο μήκος κύματος μηδενική απορρόφηση. Όταν αρχίζει να απορροφά και η ουσία, η δέσμη που διέρχεται από το διάλυμα έχει μικρότερη ένταση και γραφίδα κινείται, δείχνοντας την αντίστοιχη απορρόφηση. Το πρίσμα περιστρέφεται ισοταχώς ως προς καθορισμένο άξονα, με συνέπεια να κατευθύνει προς τη σχισμή του πετάσματος μονοχρωματικές δέσμες με διαρκώς μεταβαλλόμενο μήκος κύματος, το οποίο αναγνωρίζεται από τη θέση της ισοταχώς κινούμενης γραφίδας σε κατάλληλη κλίμακα τιμών μήκους κύματος. Έτσι η γραφίδα σημειώνει διαδοχικά σε κατάλληλα βαθμολογημένο χαρτί το μήκος κύματος και την αντίστοιχη απορρόφηση, δίνοντας την εικόνα του φάσματος της ουσίας. Ένα σχήμα φασματοφωτόμετρου δίνεται παρακάτω:



Διάταξη φασματοφωτόμετρου UV-Vis

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Πειραματική άσκηση 1

Μελέτη Φάσματος UV Βενζολίου

Μεταβολές Φάσματος Απορρόφησης Βενζολίου Με Μεταβολή Του Εύρους Σχισμής Μονοχρωμάτορα

Εισαγωγή: Το βενζόλιο δεν χρησιμοποιείται ως φάρμακο, διότι είναι τοξικό, αλλά είναι η μητρική ένωση των περισσότερων φαρμάκων. Το βενζόλιο παραχωρεί τρεις ταινίες απορρόφησης στην περιοχή του υπεριώδους που ονομάζεται E₁ 184 nm (E_{max} 60.000), E₂ 204 nm (E_{max}>900) και βενζοειδής B 254 nm (E_{max} 200). Οι παραπάνω απορροφήσεις που οφείλονται σε διεγερμένες καταστάσεις π→π* ηλεκτρονίων μέσα στο βενζολικό πυρήνα μπορούν να θεωρηθούν πολύπλοκες.

Θεωρητικά θα ανέμενε κανείς τέσσερις ισοδύναμες ηλεκτρονικές διεγέρσεις, που θα παραχωρούσαν μια μόνο ταινία απορρόφησης.

Στην πράξη, όμως, επειδή εντός του αρωματικού δακτυλίου λαμβάνουν χώρα φαινόμενα απώθησης ηλεκτρονίων – ηλεκτρονίων σε συνάρτηση πάντοτε με την σχετική συμμετρία του μορίου, οι πραγματικές ενεργειακές καταστάσεις των ηλεκτρονίων εμφανίζονται τροποποιημένες.

Όμως τα έξι ηλεκτρόνια ισομερώς κατανεμημένα στο ίδιο επίπεδο του εξαμελούς δακτυλίου προσδίδουν στο σύστημα σταθερότητα σε σύγκριση με άλλα συζυγή τριένια. Συνεπώς εξαιτίας της ιδιάζουσας ενεργειακής κατάστασης του βενζολίου, η ουσία παρουσιάζει ελαττωμένη τάση διέγερσης των π ηλεκτρονίων. Από τις τρεις ταινίες απορρόφησης οι δύο πρώτες 184, 204 nm ονομάζονται πρωταρχικές και η τρίτη 254 nm δευτερεύουσα. Η πρώτη, 184 nm, θεωρείται ευνοούμενη απορρόφηση, γι αυτό χαρακτηρίζεται από μεγάλη τιμή μοριακού συντελεστή απορρόφησης, ενώ οι υπόλοιπες (204, 254 nm) είναι απαγορευμένες και με μικρή τιμή μοριακού συντελεστή απορρόφησης. Μάλιστα η τελευταία 254 nm αναδύεται από τη διατάραξη της συμμετρίας του βενζολίου εξαιτίας της κάμψης των δεσμών. Με ένα μέτριο φασματοφωτόμετρο η πρώτη ταινία απορρόφησης 184 nm δεν καταγράφεται κανονικά επειδή βρίσκεται στα όρια της περιοχής άπω υπεριώδους – υπεριώδους.

Πρωταρχική ταινία απορρόφησης E₂ 204 nm

Έχει σημασία όσον αφορά την ευαισθησία της μεθόδου και τους ποσοτικούς προσδιορισμούς, με την προϋπόθεση ότι λαμβάνει χώρα μετατόπισής της σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (225-230 nm), διότι σε χαμηλά μήκη κύματος μπορεί να υπάρχουν παρεμβολές από το

διαλύτη ή και διέγερση του μοριακού οξυγόνου που είναι διαλυμένο σε μεγάλα ποσά στο απεσταγμένο νερό.

Η βενζοειδής ταινία Β, 254 nm

Αν και απαγορευμένη και συνεπώς μικρής έντασης, παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, γιατί δεν υπάρχουν παρεμβολές στο φάσμα της ούτε αυτές των εκδοχών. Όμως, σε χαμηλά μήκη κύματος εμφανίζεται ασαφής απορρόφηση, γι αυτό μετρήσεις κάτω από 220-225 nm πρέπει να αποφεύγονται. Ένα άλλο γνώρισμα της βενζοειδούς ταινίας β του βενζολίου είναι η χαρακτηριστική λεπτή υφή που οφείλεται σε διεγέρσεις δόνησης των δεσμών, λόγω συμμετρίας της δομής του μορίου. Διεγέρσεις δονήσεις είναι οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις που επικάθονται με τη μορφή λόγχων επί των κυρίων διεγέρσεων, των ηλεκτρονικών διεγέρσεων. Επίσης, πρέπει να προστεθεί ότι τα μέγιστα απορρόφησης δεν μεταβάλλονται από την πολικότητα ή μη των διαλυτών, αυτό που επηρεάζεται είναι η οξύτητα των απορροφήσεων της λεπτής υφής. Τέλος, η βενζοειδής ταινία β που λαμβάνεται από το βενζόλιο σε κατάσταση ατμών, παρουσιάζει πολύ λεπτή υφή, επειδή δεν υπάρχουν επιδράσεις από τον διαλύτη υπό μορφή έντονων διαμοριακών αλληλεπιδράσεων.

Διαλύτης βενζολίου- μεθανόλη

Ως διαλύτης για την μελέτη της ουσίας χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη διότι:

- Δεν απορροφά αφού δεν έχει χρωμοφόρες ομάδες.
- Είναι σχετικά μη πολική ένωση και δεν επιδρά στα φαρμακομόρια.
- Έχει άριστες διαλυτικές ικανότητες

Προσοχή: Η μεθανόλη είναι πτητική με αποτέλεσμα λόγω εξάτμισής της να μεταβάλλεται η συγκέντρωση της υπό προσδιορισμό διαλυμένης ουσίας.

Άσκηση

- 1) Να ληφθούν τα παρακάτω φάσματα, να συμπληρωθούν τα κενά και να υπολογιστούν τα ζητούμενα.
- 2) Να υπολογίσετε σε όλα τα φάσματα του βενζολίου, δυο λόγους τιμών απορρόφησης (αποστάσεις σημείων από βασική γραμμή) που αντιστοιχούν σε μέγιστα και ελάχιστα του φάσματος. **Σημ.** Οι λόγοι να αναφέρονται πάντα στα ίδια σημεία (μήκη κύματος).

Βενζόλιο σε μεθανόλη . Εύρος σχισμής 0,5

Ανάλυση φάσματος: Τα βασικότερα στοιχεία του φάσματος είναι η πλούσια λεπτή υφή και η ισχυρή απορρόφηση, αφού η ένταση είναι μεγάλη. Δηλαδή, σε αυτό το εύρος σχισμής, όπου και παίρνουμε συνήθως τα φάσματα, η βενζοειδής ταινία Β του βενζολίου αποκαλύπτεται πλήρως με όλα τα χαρακτηριστικά της λεπτής υφής. Το φάσμα του βενζολίου είναι σημαντικό εξαιτίας της λεπτής υφής, η οποία επιτρέπει τη διεξαγωγή ποσοτικών προσδιορισμών.

Εύρος ταινίας: _____

MAX:

nm

MIN:

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

ΩΜΟΙ:

ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΕΙΣ:

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

$$A_1 = \frac{\lambda_{1 \max} \text{_____}}{\lambda_{2 \max} \text{_____}} = \frac{\text{_____}}{\text{_____}} =$$

$$A_2 = \frac{\lambda_{1 \min} \text{_____}}{\lambda_{2 \min} \text{_____}} = \frac{\text{_____}}{\text{_____}} =$$

*Λόγοι υψών.

Βενζόλιο σε πεντάνιο – εύρος σχισμής 1 nm

Σε αυτό το εύρος σχισμής παρατηρούμε ότι η ένταση απορρόφησης της ταινίας Β έχει ελαττωθεί και τα χαρακτηριστικά της λεπτής υφής (μέγιστα, ελάχιστα, ώμοι, παρεκκλίσεις) είναι αμβλυμμένα.

Εύρος ταινίας: _____

MAX:

nm

MIN:

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

ΩΜΟΙ:

ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΕΙΣ:

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

$$A_1 = \frac{\lambda_{1 \max} \text{_____}}{\lambda_{2 \max} \text{_____}} = \frac{\text{_____}}{\text{_____}} =$$

$$A_2 = \frac{\lambda_{1 \min} \text{_____}}{\lambda_{2 \min} \text{_____}} = \frac{\text{_____}}{\text{_____}} =$$

Βενζόλιο σε μεθανόλη – εύρος σχισμής _____ nm

Σε αυτό το εύρος σχισμής παρατηρούμε ότι η ένταση της απορρόφησης της ταινίας Β ελαττώνεται ακόμη περισσότερο από ό,τι στο εύρος σχισμής 1. Η λεπτή υφή του φάσματος αμβλύνεται. Συγκεκριμένα, τα χαρακτηριστικά της λεπτής υφής διαμορφώνονται ως εξής:

Εύρος ταινίας: _____

MAX:

nm

MIN:

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

ΩΜΟΙ:

ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΕΙΣ:

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

nm

$$A_1 = \frac{\lambda_{1 \max} ______}{\lambda_{2 \max} ______} = \frac{______}{______} =$$

$$A_2 = \frac{\lambda_{1 \min} ______}{\lambda_{2 \min} ______} = \frac{______}{______} =$$

Βενζόλιο σε μεθανόλη – εύρος σχισμής _____ nm

Σε αυτό το εύρος σχισμής παρατηρούμε σταδιακή ελάττωση της έντασης απορρόφησης της ταινίας B καθώς και τη λεπτή υφή ακόμη περισσότερο αμβλυμένη. Αυτό γίνεται φανερό από το γεγονός ότι η κορυφή στα 236 nm μετατράπηκε σε ώμο. Τα χαρακτηριστικά της λεπτής υφής διαμορφώνονται ως εξής:

Εύρος ταινίας: _____

MAX:	nm	MIN:	nm
	nm		nm
	nm		nm
	nm		nm
	nm		nm
	nm		nm
	nm		nm

ΩΜΟΙ:**ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΕΙΣ:**

nm	nm
nm	nm
nm	nm
nm	nm
nm	nm

$$A_1 = \frac{\lambda_{1 \max}}{\lambda_{2 \max}} = \frac{\quad}{\quad} =$$

$$A_2 = \frac{\lambda_{1 \min}}{\lambda_{2 \min}} = \frac{\quad}{\quad} =$$

- 3) Σε χιλιοστομετρικό χαρτί να χαραχτούν δύο διαγράμματα μεταβολής απορρόφησης ενός μεγίστου και ενός ελαχίστου, σε συνάρτηση με το εύρος σχισμής του μονοχρωμάτορα. Τι παρατηρείτε;
- 4) Το εύρος σχισμής του μονοχρωμάτορα επηρεάζει (βαθυχρωμικά-υψιχρωμικά) το φάσμα του βενζολίου;
- 5) Πώς επηρεάζει η μεταβολή του εύρους σχισμής του μονοχρωμάτορα το φάσμα του βενζολίου. Ποιό εύρος σχισμής είναι το καταλληλότερο;

Πειραματική άσκηση 2

Μεταβολές Φάσματος Απορρόφησης UV Λόγω Υποκατάστασης

Στον Αρωματικό Δακτύλιο

Εισαγωγή: Μονοϋποκατάσταση στον αρωματικό δακτύλιο του βενζολίου ελαττώνει τη συμμετρία του μορίου, προκαλεί αλλαγές στην υφή του φάσματος, στην ένταση των απορροφήσεων και παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση του λ_{max} . Στην περίπτωση μικρών υποκατάστατων (π.χ. $-CH_3$) που δεν λειτουργούν αυχοχρωμικά προκαλείται αμελητέα βαθυχρωμική μετατόπιση. Διαφορετική υφή βενζοειδούς ταινίας B, λόγω αλλαγής της συμμετρίας του μορίου, λαμβάνουμε και στην περίπτωση του όρθο-, μετα-, παρα- ξυλολίου .

Παρατήρηση

Η ελευθερία δόνησης των μορίων επηρεάζεται από δύο παράγοντες, έναν εσωτερικό και έναν εξωτερικό:

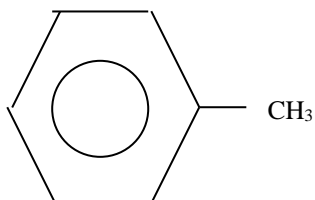
1. Συμμετρία στη χημική δομή (εσωτερικός παράγοντας) που συνεπάγεται ευκολότερη δόνηση.
2. Ο διαλυτής (εξωτερικός παράγοντας) καθώς όσο ελαττώνεται η πολικότητά του, τόσο μεγαλύτερη ευκολία έχουμε στη δόνηση του μορίου.

Άσκηση

- 1) Να ληφθούν τα παρακάτω φάσματα, να συμπληρωθούν τα κενά και να υπολογιστούν τα ζητούμενα. *Σημ.:Οι συγκρίσεις θα γίνουν με το φάσμα της ουσίας που δίνει την λεπτότερη υφή ή το φάσμα του βενζολίου*
- 2) Να επιλέξετε δύο μέγιστα, δύο ελάχιστα σε συγκεκριμένα μήκη κύματος και αφού υπολογίσετε τις αποστάσεις τους από τη βασική γραμμή (δηλ. τις απορροφήσεις τους) να υπολογίσετε τους παρακάτω λόγους.

Τολουόλιο σε πεντάνιο

Μια ενδιαφέρουσα χρωμοφόρος ομάδα είναι το τολουόλιο που έχει υποκαταστήσει ένα υδρογόνο του βενζολίου με _____ ομάδα. Στην περίπτωση,



λοιπόν, του τολουολίου, επειδή υπάρχει ο μεθυλο-υποκαταστάτης η δόνηση του μορίου _____ αισθητά, οπότε το τολουόλιο _____ λεπτή υφή και _____ βαθυχρωμική μετατόπιση γιατί λειτουργεί _____ λόγω του _____ φαινόμενου.

Εύρος σχισμής: 1 nm

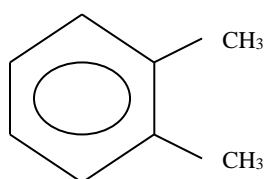
Εύρος ταινίας: _____

MAX:			MIN:		
Σημείο	Απορρόφηση	nm	Σημείο	Απορρόφηση	nm
ΩΜΟΙ:			ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΕΙΣ:		
Σημείο	Απορρόφηση	nm	Σημείο	Απορρόφηση	nm

$$A_1 = \frac{\lambda_{1 \max} \text{_____}}{\lambda_{2 \max} \text{_____}} = \frac{\text{_____}}{\text{_____}} =$$

$$A_2 = \frac{\lambda_{1 \min} \text{_____}}{\lambda_{2 \min} \text{_____}} = \frac{\text{_____}}{\text{_____}} =$$

Ορθό- Ξυλόλιο σε Πεντάνιο



Οι δύο μεθυλικές ομάδες (υποκαταστάσεις) βρίσκονται σε _____ θέση στον βενζολικό δακτύλιο. Κατά συνέπεια η δόνηση του δακτυλίου _____ αισθητά και αυτό αντικατοπτρίζεται στο φάσμα.

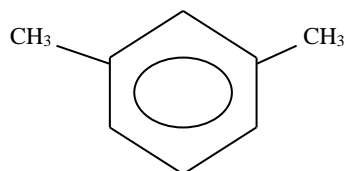
Πράγματι το φάσμα του ορθο-ξυλόλιο _____ λεπτή υφή σε σχέση με το αντίστοιχο του βενζολίου.

MAX:			MIN:		
Σημείο	Απορρόφηση	nm	Σημείο	Απορρόφηση	nm
ΩΜΟΙ:			ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΕΙΣ:		
Σημείο	Απορρόφηση	nm	Σημείο	Απορρόφηση	nm

$$A_1 = \frac{\lambda_1 \text{ nm}}{\lambda_2 \text{ nm}} = \frac{\text{---}}{\text{---}} =$$

$$A_2 = \frac{\lambda_1 \text{ nm}}{\lambda_2 \text{ nm}} = \frac{\text{---}}{\text{---}} =$$

Μετά – Ξυλόλιο σε πεντάνιο



Στο μεταξυλόλιο τα μεθύλια βρίσκονται υποκατεστημένα σε -μετα θέση, στα οποία παρεμβάλλεται ο άνθρακας. Έτσι, το μόριο του μετα-ξυλολίου μπορεί να δонηθεί ευκολότερα από το ορθο-ξυλόλιο.

Εύρος σχισμής: 1 nm

Εύρος ταινίας: _____

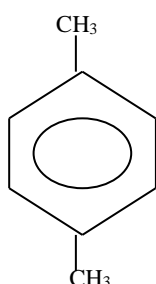
MAX:			MIN:		
Σημείο	Απορρόφηση	nm	Σημείο	Απορρόφηση	nm
ΩΜΟΙ:			ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΕΙΣ:		

Σημείο	Απορρόφηση	nm	Σημείο	Απορρόφηση	nm

$$A_1 = \frac{\lambda_{1 \max}}{\lambda_{2 \max}} = \frac{\quad}{\quad} =$$

$$A_2 = \frac{\lambda_{1 \min}}{\lambda_{2 \min}} = \frac{\quad}{\quad} =$$

Παρα – Ξυλόλιο σε πεντάνιο



Συγκριτικά, με τα φάσματα του ορθο και μετα-ξυλολίου, τα παρα-ξυλόλιο φαίνεται πιο πολύπλοκο, πράγμα που οφείλεται στις εκ διαμέτρου αντίθετες θέσεις των μεθυλίων στο μόριό του. Δηλαδή, το φάσμα του παραξυλολίου παρουσιάζει _____, παρόλο που είναι διπλά υποκατεστημένο.

Πράγματι, η θέση των υποκαταστατών επιτρέπει στο μόριο να _____, με αποτέλεσμα λόγω της συμμετρίας που έχει να δίνει _____ φάσμα λεπτής υφής.

Εύρος σχισμής: 1 nm

Εύρος ταινίας: _____

MAX:			MIN:		
Σημείο	Απορρόφηση	nm	Σημείο	Απορρόφηση	nm
ΩΜΟΙ:			ΠΑΡΕΚΚΛΙΣΕΙΣ:		
Σημείο	Απορρόφηση	nm	Σημείο	Απορρόφηση	nm

$$A_1 = \frac{\lambda_{1 \max}}{\lambda_{2 \max}} = \frac{\quad}{\quad} =$$

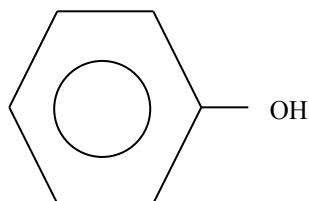
$$A_2 = \frac{\lambda_{1 \min}}{\lambda_{2 \min}} = \frac{\quad}{\quad} =$$

3) Ποια η εφαρμογή της ανεύρεσης λόγω απορρόφησης;

4) Πότε έχουμε λεπτότερη υφή φάσματος στο βενζόλιο, στο ορθο- μετά –παρά ξυλολίου ή στο τολουολίου και γιατί;

Φαινόλη

Μια ενδιαφέρουσα χρωμοφόρος ομάδα είναι της φαινόλης στην οποία ένα υδρογόνο του βενζολίου έχει αντικατασταθεί με _____ ομάδα. Στην περίπτωση, λοιπόν της φαινόλης, επειδή υπάρχει ο υδροξύλο-υποκαταστάτης η δόνηση του μορίου _____ αισθητά, οπότε η φαινόλη _____ λεπτή υφή. Από άποψη χρωμοφόρων η φαινόλη _____ βαθυχρωμική μετατόπιση γιατί το υδροξύλιο λειτουργεί_____. Τη μεγαλύτερη βαθυχρωμική μετατόπιση παρουσιάζει σε _____ pH.



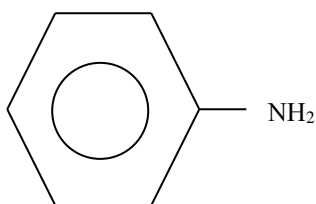
Εύρος σχισμής: 1 nm

Όξινο pH		Αλκαλικό pH	
Απορρόφηση	Μήκος κύματος λ(nm)	Απορρόφηση	Μήκος κύματος λ(nm)

5) Συγκρίνετε το φάσμα της φαινόλης με αυτό του βενζολίου σε όξινο και αλκαλικό περιβάλλον. Ερμηνεύστε πλήρως το φαινόμενο.

Ανιλίνη

Η χρωμοφόρος ομάδα της ανιλίνης δημιουργήθηκε με υποκαταστήσει ενός υδρογόνου του βενζολίου με _____ ομάδα. Στην περίπτωση, λοιπόν της ανιλίνης, επειδή υπάρχει ο υποκαταστάτης, η δόνηση του μορίου _____ αισθητά, οπότε η ανιλίνη _____ λεπτή υφή και _____ βαθυχρωμική μετατόπιση γιατί η αμινοομάδα λειτουργεί _____. Δεν επηρεάζεται από το περιβάλλον της σε _____ pH.

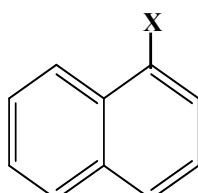
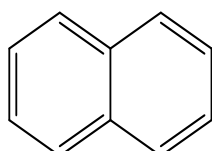


Εύρος σχισμής: 1 nm

Όξινο pH		Αλκαλικό pH	
Απορρόφηση	Μήκος κύματος λ(nm)	Απορρόφηση	Μήκος κύματος λ(nm)

5) Συγκρίνετε το φάσμα της ανιλίνης με αυτό του βενζολίου σε όξινο και αλκαλικό περιβάλλον. Ερμηνεύστε πλήρως το φαινόμενο

Ναφθαλένιο



Μια επίσης ενδιαφέρουσα χρωμοφόρος ομάδα είναι αυτή του ναφθαλενίου και των παραγώγων του ($X=OH, -Cl, \dots$). Στην περίπτωση, που το μόριό μας είναι το ναφθαλένιο, επειδή υπάρχει μια επιπλέον βενζολική υποκατάσταση στο μόριο του πρώτου βενζολίου έχουμε παρατεταμένη _____ και _____ βαθυχρωμική μετατόπιση. Η ταινία που μας δίνει σημαντική απορρόφηση στα _____ nm, είναι η _____.

Εύρος σχισμής: 1 nm

Όξινο pH		Αλκαλικό pH	
Απορρόφηση	Μήκος κύματος λ(nm)	Απορρόφηση	Μήκος κύματος λ(nm)

5) Συγκρίνετε το φάσμα του υποκατεστημένου παραγώγου του ναφθαλενίου με αυτό του ναφθαλενίου σε όξινο και αλκαλικό περιβάλλον. Ερμηνεύστε πλήρως το φαινόμενο

Πειραματική άσκηση 3

Προσδιορισμός της Δραστηκής Ουσίας 'Φουροσεμίδης' σε Φαρμακοτεχνικά Σκευάσματα (δισκία) και Μελέτη αυτής με Υπεριώδη Ακτινοβολία (UV)

Εισαγωγή: Ποσοτικοί προσδιορισμοί βάσει φασμάτων απορρόφησης στην περιοχή υπεριώδους ορατού

Οι ποσοτικοί προσδιορισμοί με χρήση φασμάτων απορρόφησης βασίζονται στη σχέση που υπάρχει μεταξύ ποσότητας ακτινοβολίας που απορροφάται και συγκέντρωσης δραστικής ουσίας. Η πειραματική απόδειξη της παραπάνω πρότασης είναι η ακόλουθη:

Αν μια μονοχρωματική δέσμη ακτινοβολίας ορισμένου μήκους κύματος προσπέσει σε μια διαλυμένη ουσία, που απορροφά στο συγκεκριμένο μήκος κύματος, τότε μέρος της ακτινοβολίας αυτής απορροφάται από τη διαλυμένη ουσία. Η ελάττωση της έντασης της μονοχρωματικής ακτινοβολίας από I_0 σε I είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του διαλύματος c , με το πάχος της στοιβάδας b και με ένα συντελεστή α , δηλαδή ισχύει η σχέση.

Τελικά καταλήγουμε στη σχέση:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \alpha bc$$

Η εξίσωση αυτή εκφράζει το **νόμο των Beer-Lambert**, ο οποίος δείχνει πως η ένταση της δέσμης του μονοχρωματικού φωτός ελαττώνεται εκθετικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος και με το πάχος της στιβάδας. Η σχέση $\log \frac{I_0}{I}$ καλείται απορρόφηση του διαλύματος. Επειδή το πάχος της στιβάδας διατηρείται σταθερό (1cm), ο συντελεστής α εκφράζεται σύμφωνα με τη συγκέντρωση του διαλύματος. Δηλαδή, όταν η συγκέντρωση του διαλύματος εκφράζεται σε g/100 mL ο συντελεστής α ονομάζεται Ειδικός Συντελεστής

Απορρόφησης και συμβολίζεται με $A^{1\%}_{1\text{cm}}$ ή $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ ($b=1\text{cm}$). Όταν η συγκέντρωση του διαλύματος εκφράζεται σε gmole/litre , ο συντελεστής α καλείται Μοριακός Συντελεστής Απορρόφησης και συμβολίζεται με ϵ , $A^M_{1\text{cm}}$, $E^M_{1\text{cm}}$ ($b=1\text{cm}$). Οι συντελεστές $A^{1\%}_{1\text{cm}}$ και ϵ συνδέονται με τη σχέση:

$$\epsilon = \frac{A^{1\%}_{1\text{cm}} \times \text{Μοριακό Βάρος}}{10}$$

και εξαρτώνται από τη φύση της ουσίας, από το μήκος κύματος, από το χρησιμοποιούμενο διαλύτη και σε αρκετές περιπτώσεις από το PH του διαλύματος. Μικρές μεταβολές της θερμοκρασίας δεν επιφέρουν σημαντικές μεταβολές στην τιμή των $A^{1\%}_{1\text{cm}}$ και ϵ .

Απαραίτητες προϋποθέσεις για την ισχύ του νόμου Beer-Lambert:

1. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία να είναι μονοχρωματική
2. Το πάχος της κυψελίδας να είναι ομοιόμορφο
3. Η απορρόφηση να είναι ο μόνος μηχανισμός αλληλεπίδρασης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας – διαλυμένης ουσίας.

Οι σταθερές αναλογίας $A^{1\%}_{1\text{cm}}$ και ϵ χαρακτηρίζονται ως φυσικές σταθερές κάθε ουσίας και είναι ανεξάρτητες από τη συγκέντρωση και το πάχος του διαλύματος (διαστάσεις κυψελίδων). Έτσι, στην πράξη, δε χρησιμοποιούμε διαλύματα $1\text{g}/100 \text{ mL}$ ή 1gmole/litre επειδή είναι μεγάλης συγκέντρωσης και απορροφούν πλήρως τη μονοχρωματική δέσμη της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Στη Φαρμακευτική Ανάλυση συνήθως παρασκευάζονται διαλύματα της τάξης των $0,01$ - $0,001 \text{ gr}/100 \text{ mL}$ από τα οποία μετράται η απορρόφηση A του διαλύματος και εν συνεχεία υπολογίζεται αναλογικά ο Ειδικός ή ο Μοριακός Συντελεστής Απορρόφησης. Φαρμακευτικές ουσίες που έχουν Ειδικό Συντελεστή Απορρόφησης $A^{1\%}_{1\text{cm}}$ από 0 - 5 θεωρούνται ως ασθενώς απορροφούσες ουσίες, από 5 - 50 ως μετρίως απορροφούσες και από 50 και πάνω θεωρούνται ως ισχυρώς απορροφούσες ουσίες.

Εδώ πρέπει να τονισθεί πως τα μόρια δρουν ως ανεξάρτητα χημικά σωματίδια και άσχετα προς τον αριθμό και τη φύση του καθενός.

Στην περίπτωση λοιπόν μίγματος δύο ή περισσοτέρων φαρμακευτικών ουσιών, ο νόμος του Beer εκφράζεται με τη σχέση:

$$A_{\text{ολ}} = A_1 + A_2 + A_3 + \dots A_n = A^{1\%}_{1(1)} bc_1 + A^{1\%}_{1(2)} bc_2 + A^{1\%}_{1(3)} bc_3 + \dots A^{1\%}_{1(n)} bc_n$$

όπου $A_{ολ}$ είναι η ολική απορρόφηση του μίγματος $A_1+A_2+A_3 \dots A_n$ οι επιμέρους απορροφήσεις των απορροφούντων φαρμακευτικών ουσιών, $A_{1(1)}, A_{1(2)}, A_{1(3)}, A_{1(n)}$ οι ειδικοί συντελεστές απορρόφησης κάθε ουσίας, b το πάχος της στιβάδας, c_1, c_2, c_3, c_n οι συγκεντρώσεις των διαφόρων ουσιών στο διάλυμα.

Στην πράξη είναι μάλλον αδύνατη η μέτρηση των εντάσεων της προσπίπτουσας ακτινοβολίας I_0 και της εξερχόμενης ακτινοβολίας I (μετά τη διόδο του διαλύματος). Βασική δυσκολία για τη μέτρηση των εντάσεων I, I_0 θεωρούνται οι κυψελίδες στα τοιχώματα των οποίων συμβαίνει ανάκλαση ή απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Επιπλέον, όταν η ίδια ουσία αποτελείται από μακρομόρια προκαλείται σκεδασμός του φωτός που έχει ως συνέπεια την ελάττωση της έντασης της ακτινοβολίας. Γι αυτό ακριβώς τον λόγο στις μετρήσεις χρησιμοποιείται και τυφλό (που περιέχει μόνο διαλύτη) και συγκρίνεται η ένταση της ακτινοβολίας που διέρχεται δια μέσου του υπό εξέταση διαλύματος με εκείνη που διέρχεται από το τυφλό οπότε ισχύει η σχέση για την απορρόφηση του διαλύματος:

$$A \approx \log \frac{I_{\text{τυφλόν}}}{I_{\text{ουσία}}} \approx \log \frac{I_0}{I} \approx A_{1\text{cm}}^{1\%} bc$$

Επομένως από τις εξισώσεις $\log \frac{I_0}{I} = abc$ και $\epsilon = A_{1\text{cm}}^{1\%} \times \text{MB}/10$ είναι δυνατόν να υπολογισθεί η συγκέντρωση ενός διαλύματος με βάση τη μετρηθείσα απορρόφηση A , του πάχους της στιβάδας του διαλύματος που πάντα είναι ίσο με 1cm και του Ειδικού ή Μοριακού Συντελεστή Απορρόφησης.

Η πρώτη μέθοδος Ποσοτικής Φασματοφωτομετρικής Ανάλυσης που αναπτύχθηκε παραπάνω με τη χρήση της σχέσης $A = abc$ παρουσιάζει το εξής μειονέκτημα: οι τιμές του συντελεστή απορρόφησης (a) για μια φαρμακευτική ουσία μπορεί να διαφέρουν μεταξύ τους, αφού ενδέχεται να υπολογίστηκαν με διαφορετικούς τύπους φασματοφωτομέτρων, διαφορετικού εύρους σχισμής και κάτω από διαφορετική τάση ρεύματος κ.λ.π.

Το αποτέλεσμα είναι οι τιμές του a που αναφέρονται στις διάφορες Φασμακοπίες να διαφέρουν μεταξύ τους. Τη δυσκολία αυτή αντιμετωπίζει η δεύτερη μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού, σύμφωνα με την οποία η απορρόφηση A μιας ουσίας είναι γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσης c , οι απορροφήσεις A_1, A_2 δύο διαλυμάτων της ίδιας ουσίας και συγκέντρωσης c_1, c_2 αντίστοιχα συνδέονται με τη σχέση:

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{C_1}{C_2}$$

Με τη σχέση αυτή μπορούμε να υπολογίσουμε την ποσότητα μιας ουσίας που περιέχεται σε ένα άγνωστο διάλυμα. Έτσι, αν, C_2 είναι η συγκέντρωση της ουσίας στο άγνωστο διάλυμα τότε:

$$C_2 = \frac{A_2}{A_1} C_1$$

Η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί της πρώτης μεθόδου γιατί με τη χρήση της σχέσης $\frac{A_1}{A_2} = \frac{C_1}{C_2}$

παίρνουμε αξιόπιστα αποτελέσματα αφού τα A_1 και A_2 καταγράφονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

Η μέθοδος που παρέχει τη μεγαλύτερη δυνατή αξιοπιστία στον ποσοτικό προσδιορισμό μιας δραστικής ουσίας σε ένα άγνωστο δείγμα θεωρείται αυτή της χάραξης καμπύλης αναφοράς. Για την ανάπτυξη της τεχνικής απαιτείται προηγουμένως η προετοιμασία μιας σειράς προτύπων διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων της υπό προσδιορισμό δραστικής η οποία βρίσκεται σε καθαρή μορφή.

Η μέθοδος της χάραξης καμπύλης αναφοράς, γνωστής και σαν ευθεία παλινδρόμησης (regression line), στηρίζεται στη γραμμική συσχέτιση της συγκέντρωσης (χ) και της απορρόφησης (ψ) της ουσίας σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση.

$$\psi = \beta\chi + \alpha$$

- Οπου β , κλίση (slope) καθορίζει την ευαισθησία της μεθόδου και δηλώνει το λόγο μεταβολής απορρόφησης δια της μεταβολής συγκέντρωσης .
- Η τομή α (intercept) είναι η απόσταση του σημείου τομής της καμπύλης απ' την αρχή των αξόνων. Η τομή α αναφέρεται στο πειραματικό σφάλμα που μπορεί να έχει μια μέθοδος και θεωρητικά πρέπει να είναι ίση με 0.
- Ο συντελεστής συσχέτισης r (correlation coefficient) δείχνει πόσο καλή συσχέτιση υπάρχει μεταξύ των τιμών απορρόφησης και συγκέντρωσης. Μια καμπύλη αναφοράς θεωρείται ιδανική όταν η τιμή του r πλησιάζει τη μονάδα και ικανοποιητική για τιμές $0,95 < |r| < 0,99$ ενώ τιμές $|r| > 0,99$ δηλώνουν πολύ καλή γραμμικότητα.

Για την αντικειμενική χάραξη της καλύτερης καμπύλης (ευθείας) συνήθως εφαρμόζεται η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων, που βασίζεται στην αρχή ότι καλύτερη καμπύλη είναι εκείνη για την οποία το άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων είναι το ελάχιστο.

Τα **πλεονεκτήματα** αυτής της μεθόδου είναι:

- Ακρίβεια (η συγκέντρωση υπολογίζεται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων ή γραφικά).
- Επαναληψιμότητα.
- Έχουμε ευθεία γραμμή οπότε και γραμμική εξάρτηση.
- Καταδεικνύει ποια είναι η περιοχή μέσα στην οποία υπάρχει εξάρτηση της συγκέντρωσης από την απορρόφηση.
- Επειδή κάνουμε χρήση του συντελεστή αραίωσης δεν είναι αναγκαία η λήψη μικροποσοτήτων

Τα **μειονεκτήματα** αυτής είναι τα εξής:

- Το δείγμα πρέπει να είναι πανομοιότυπο με τα πρότυπα διαλύματα, γιατί τα τυχόντα έκδοχα μπορεί να αλλοιώσουν την απορρόφηση.
- Παίρνουμε το δείγμα πάντα κατά προσέγγιση και ποτέ ακριβή ποσότητα.

Αν η ελεγχόμενη ουσία συνυπάρχει στο τελικό προς ανάλυση διάλυμα με άλλη ουσία της οποίας η απομάκρυνση δεν ήταν δυνατή τότε υπάρχουν τρεις δυνατότητες:

α. Η υπό ανάλυση δραστική ουσία μπορεί να μετατραπεί με κατάλληλο αντιδραστήριο σε άλλη ουσία παράγωγο, που απορροφά ισχυρά συνήθως σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Η αντίδραση μπορεί να είναι συμπλοκομετρική διαζώτωση και λοιπά. Η ύπαρξη άλλης ουσίας στο τελικό προς ανάλυση διάλυμα δεν είναι ο μόνος λόγος για το σχηματισμό παραγώγου αλλά και η αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου πολλές φορές επιβάλλει την ανάγκη δημιουργίας παραγώγου. Για το σχηματισμό του παραγώγου πρέπει να έχουμε υπόψη μας τα παρακάτω:

- Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται να αντιδρά εκλεκτικά και ποσοτικά με την προσδιοριζόμενη ουσία. Να είναι σταθερό, να μην απορροφά στην περιοχή απορρόφησης του παραγώγου. Συνήθως υπολογίζεται η ποσότητα του αντιδραστηρίου που πρέπει να χρησιμοποιηθεί γιατί περίσσεια ή ανεπάρκεια αυτού είναι δυνατόν να προκαλέσει αποκλίσεις από το νόμο του Beer.
- Το διαλυτικό μέσο που χρησιμοποιείται πρέπει να διαλύει άριστα τις ουσίες που πρόκειται να αντιδράσουν και εκείνες που προκύπτουν ώστε αφενός να αποφευχθεί καθίζηση και αφετέρου να δημιουργηθούν τέτοιες συνθήκες ώστε να προχωρήσει η αντίδραση σχηματισμού του παραγώγου εύκολα. Επειδή πολλά φαρμακευτικά μόρια, αντιδραστήρια και παράγωγα είναι δυσδιάλυτα στο νερό γι αυτό χρησιμοποιείται οργανικός διαλύτης συνήθως μεθανόλη, αιθανόλη ή μίγμα νερού – οργανικού διαλύτη.
- Η μέτρηση της απορρόφησης του τελικού διαλύματος (που περιέχει το προϊόν της αντίδρασης και το παράγωγο) πρέπει να γίνει κάτω από διαφορετικά pH ώστε να καθοριστεί μια βέλτιστη περιοχή τιμών PH. Οι διαφορετικές τιμές του pH επιτυγχάνονται

με την προσθήκη ρυθμιστικών διαλυμάτων. Εδώ πρέπει να τονισθεί πως η προσθήκη του αντιδραστηρίου γίνεται νωρίτερα από την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος. Διαφορετικά, είναι πιθανόν να υπάρξουν τέτοιες συνθήκες που θα εμποδίσουν το σχηματισμό παραγώγου.

- Ο σχηματισμός παραγώγου πρέπει να παράγεται σε εύλογο χρονικό διάστημα αλλά προπαντός, πρέπει να είναι σταθερή η θερμοκρασία του περιβάλλοντος για μια χρονική περίοδο τουλάχιστον, ώστε η μέτρηση της απορρόφησης A να γίνεται και με άνεση και να τηρούνται οι άριστες συνθήκες για την ακρίβεια της μεθόδου.
- β.** Για την απαλλαγή της δραστηκής από την παράσιτο απορρόφηση μπορεί να γίνει η μέτρηση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, εφόσον βέβαια επιτρέπει το φάσμα της υπό προσδιορισμό ουσίας.
- γ.** Για την απαλλαγή από τις απορροφήσεις των εκδόχων και εφόσον βοηθάει η μοριακή δομή του φαρμάκου μπορεί να χαραχτεί καμπύλη αναφοράς λαμβάνοντας σαν απορρόφηση το ΔA αντί της απορρόφησης A . Δηλαδή να ληφθεί το φάσμα της πρότυπης αμιγούς δραστηκής ουσίας σε όξινο και κατόπιν σε αλκαλικό διάλυμα. Αν στο τελικό προς ανάλυση διάλυμα υπάρχει παράσιτος απορρόφηση η τιμή της ΔA παραμένει αμετάβλητη και το αποτέλεσμα είναι αξιόπιστο.
- δ.** Να εφαρμοστεί μέθοδος εκχύλισης υγρού-υγρού, υγρού-στερεού ή η τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (solid phase extraction), η οποία επιτυγχάνεται με τη διαβίβαση διαλυτών σε μικροστήλες και επιτελείται με τη βοήθεια συριγγών ή συσκευών κενού.
- ε.** Με την εφαρμογή της προσθετικής μεθόδου.
- στ.** Με την παραγωγή των φασμάτων μηδενικής τάξης μιάς ουσίας σε φάσματα πρώτης, δευτέρας..... n τάξης.

Διαδικασία Εκτέλεση Μιας Ποσοτικής Φασματοφωτομετρικής Ανάλυσης:

Πριν αρχίσει η ποσοτική φασματοφωτομετρική ανάλυση μιας ουσίας με τη χρήση φασμάτων UV, πρέπει πρώτα να είναι γνωστό πως η ως προς εξέταση ουσία να απορροφάει στην περιοχή του υπεριώδους και το διάλυμα της να μην περιέχει προσμίξεις.

Επιγραμματικά τα στάδια μιας ποσοτικής φασματοφωτομετρικής ανάλυσης είναι τα εξής:

1. Λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης της υπό εξέταση καθαρής ουσίας
2. Επιλέγεται το κατάλληλο μήκος κύματος, συνήθως αυτό που είναι γνωστό ότι δε μπορεί να επικαλυφθεί από άλλες παραμέτρους (έκδοχα, αλλαγή διαλύτη, κτλ)
3. Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα της ουσίας με διαφορετικές συγκεντρώσεις
4. Λαμβάνονται τα φάσματα των πρότυπων διαλυμάτων
5. Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς (διάγραμμα απορρόφησης-συγκέντρωσης)

6. Μετράται η απορρόφηση του άγνωστης συγκέντρωσης δείγματος και
7. Βρίσκεται η συγκέντρωση του δείγματος από την καμπύλη αναφοράς

Εργαστηριακά όργανα: 1)Φασματοφωτόμετρο Υπεριώδους πλήρους φάσματος.
 2) Φασματοφωτόμετρο Υπεριώδους με δυνατότητα επιλογής ενός μήκους κύματος.
 3)Αναλυτικός ζυγός με τουλάχιστον ένα δεκαδικό ψηφίο.
 4)Συσκευή υπερήχων

Αναλυτικά σκεύη: 1) Ένα ιγδίο με ύπερο.
 2) Μία ογκομετρική φιάλη των 50, δύο των 100 mL, έναν ογκομετρικό κύλινδρο των 1000 mL και 5 φιάλες των 25 mL.
 3)Σιφώνια πληρώσεως των 2,3,5,10 mL.
 4)Ροιρε βοηθητικά για την αναρρόφηση των διαλυμάτων.
 5) Πλαστικό σταγονόμετρο για την προσθήκη σταγόνων διαλύτη και τη ρύθμιση της χαραγής στη φιάλη.
 6) Ποτήρι ζέσεως των 25,50,100 mL
 7)Συσκευή διήθησης δειγμάτων (acrodisc).
 8) Πλαστικές σύριγγες των 20 mL.
 9)Ξύλινη σπάτουλα για τη ζύγιση των δισκίων και του NaOH.
 10) Απορροφητικό χαρτί για τον καθαρισμό των σκευών.
 11)Υαλογράφο
 12)5 μικροί γυάλινοι περιέκτες για την αποθήκευση των δειγμάτων

Διαλύματα: 1)Διάλυμα NaOH 0.1N.

Για την παρασκευή του διαλύματος NaOH 0.1N, να υπολογίσετε το συνολικό όγκο διαλύτη που απαιτείται για την εφαρμογή της άσκησης και να τον προσαρμόσετε στον αντίστοιχο όγκο φιάλης (ογκομετρικό κύλινδρο) που διατίθεται στο εργαστήριο. Στην συνέχεια να παρασκευάσετε το διάλυμα λαμβάνοντας υπόψη τα ακόλουθα Ατομικά Βάρη των στοιχείων: Na=23 O=16 H=1.

Αναφέρετε: 1)Συνολικό όγκο που παρασκευάσατε(με το απόθεμα) _____ mL

2)Ποσότητα NaOH που ζυγίσατε _____g

3)Περιγράψτε την παρασκευή του διαλύματος και δικαιολογήστε μαθηματικός τις επιλογές σας.

ΑΣΚΗΣΗ

Α. Παρασκευή Προτύπων Διαλυμάτων Φουροσεμίδης

Από το αρχικό διάλυμα «**A,B,Γ,Δ**» φουροσεμίδης που περιέχει ____mg δραστικής να μεταφέρετε με τη βοήθεια σιφωνίου πληρώσεως των ____ mL, ποσότητα αντίστοιχη σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Αφού γίνει πλήρωση της φιάλης με διάλυμα NaOH 0.1N, να τη συμπληρώσετε μέχρι τη χαραγή (με τη βοήθεια σταγονόμετρου) και να την ανακινήσετε καλά. Το διάλυμα αυτό θα αποτελέσει το **Μητρικό Διάλυμα** παρασκευής μιας σειράς προτύπων διαλυμάτων για τη χάραξη καμπύλης αναφοράς.

Από το μητρικό διάλυμα και με σιφώνια πληρώσεως των 2, 3, 5, 10 mL να μεταφέρετε τους αντίστοιχους όγκους σε ογκομετρικές φιάλες των 25 mL. Ακολουθεί πλήρωση της φιάλης μέχρι τη χαραγή με διάλυμα NaOH 0.1N και ανακίνηση.

Να αναφέρετε τους συντελεστές αραίωσης των διαλυτών, ξεκινώντας τους υπολογισμούς από το αρχικό διάλυμα, καθώς και τις τελικές συγκεντρώσεις ($\mu\text{g}/\text{mL}$) που προκύπτουν για κάθε ένα από τα πρότυπα διαλύματα ως ακολούθως:

1) Πρότυπο διάλυμα που προκύπτει μετά από τελική αραίωση 2 mL στα 25 mL.

(A τρόπος) Συντελεστής αραίωσης _____.

(όγκος φιάλης αραίωσης / όγκος σιφωνίου)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

(B τρόπος) Συντελεστής αραίωσης _____

(Συγκέντρωση αρχικού δείγματος/συγκέντρωση τελικού)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

Τελική συγκέντρωση _____.

(Αρχική συγκέντρωση δείγματος X όγκος σιφωνίου/ όγκος φιάλης αραίωσης)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

2) Πρότυπο διάλυμα που προκύπτει μετά από τελική αραίωση 3 mL στα 25 mL.

(A τρόπος) Συντελεστής αραίωσης _____.

(όγκος φιάλης αραίωσης / όγκος σιφωνίου)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

(B τρόπος) Συντελεστής αραίωσης _____

(Συγκέντρωση αρχικού δείγματος/συγκέντρωση τελικού)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

Τελική συγκέντρωση _____.

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

3) Πρότυπο διάλυμα που προκύπτει μετά από τελική αραίωση 5 mL στα 25 mL.

(A τρόπος) Συντελεστής αραίωσης _____.

(όγκος φιάλης αραίωσης / όγκος σιφωνίου)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

(B τρόπος) Συντελεστής αραίωσης _____

(Συγκέντρωση αρχικού δείγματος/συγκέντρωση τελικού)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

Τελική συγκέντρωση _____.

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

4) Πρότυπο διάλυμα που προκύπτει μετά από τελική αραίωση 10 mL στα 25 mL.

(A τρόπος) Συντελεστής αραίωσης _____.

(όγκος φιάλης αραίωσης / όγκος σιφωνίου)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

(B τρόπος) Συντελεστής αραίωσης _____

(Συγκέντρωση αρχικού δείγματος/συγκέντρωση τελικού)

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

Τελική συγκέντρωση _____.

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις

Προετοιμασία δείγματος φουροσεμίδης σε δισκία

Αφού λάβετε 3 δισκία, από το συνολικό βάρος τους _____ να υπολογίσετε το μέσο βάρος του ενός δισκίου. Στη συνέχεια να λιотριβήσετε επαρκώς τα δισκία στο ιγδίο, με τη βοήθεια του υπέρου, και να ζυγίσετε (σκαφίδιο ζύγισης) ποσότητα κόνεως περίπου ίση με _____ mg. Γράψτε με ακρίβεια δεκαδικού ψηφίου την ποσότητα που ζυγίσατε _____.

Μεταφέρετε ποσοτικά τη ζυγισθείσα ποσότητα κόνεως σε ογκομετρική φιάλη των **100 mL**. Αφού προσθέσετε περίπου 50 mL διαλύματος NaOH 0.1N στην ογκομετρική φιάλη του δείγματος να το τοποθετήσετε σε λουτρό υπερήχων για περίπου 10min (ανακίνηση ανά 3 λεπτά). Όταν το δείγμα έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (με τη βοήθεια υδατόλουτρου) να συμπληρώσετε μέχρι τη χαραγή τη φιάλη με διάλυμα NaOH 0.1N και να την ανακινήσετε. Ακολουθεί μια αραιώση του δείγματος με σιφώνιο πληρώσεως των _____ mL σε ογκομετρική φιάλη των _____ mL και πλήρωση αυτής μέχρι τη χαραγή με διάλυμα NaOH 0.1N.

Υπολογίστε το συντελεστή αραιώσεως του τελικού δείγματος _____.

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις.

Μέτρηση απορροφήσεων στο φασματοφωτόμετρο Υπεριώδους.



1) Αφού μηδενίσετε το 'φασματοφωτόμετρο πλήρους φάσματος' με το διαλύτη NaOH 0.1N, να υπολογίσετε την τιμή λ_{max} της φουροσεμίδης λαμβάνοντας το πλήρες φάσμα της ουσίας. Σημ: Για τη λήψη του φάσματος χρησιμοποιείστε ένα δείγμα από τα πρότυπα της καμπύλης αναφοράς.

2) Ρυθμίστε το «φασματοφωτόμετρο επιλογής ενός μήκους κύματος» στην τιμή λ_{max} της φουροσεμίδης, που υπολογίσατε από πριν και αφού το μηδενίσετε, να λάβετε τις απορροφήσεις των ακόλουθων δειγμάτων.

Πρότυπο διάλυμα που προκύπτει μετά από τελική αραιώση **2 mL** στα **25 mL** (5 φορές)

1η _____ 2η _____ 3η _____ 4η _____ 5η _____

Πρότυπο διάλυμα που προκύπτει μετά από τελική αραιώση **3 mL** στα **25 mL** _____

Πρότυπο διάλυμα που προκύπτει μετά από τελική αραιώση **5 mL** στα **25 mL** _____

Πρότυπο διάλυμα που προκύπτει μετά από τελική αραιώση **10 mL** στα **25 mL** _____

Απορρόφηση αγνώστου δείγματος_____

3) Χαράξτε σε σύστημα ορθογωνίων αξόνων, την καμπύλη αναφοράς που προκύπτει από τα πρότυπα διαλύματα (Άξονας των «X» συγκεντρώσεις $\mu\text{g}/\text{mL}$, άξονας των «Ψ» απορροφήσεις). Στη συνέχεια βάση της καμπύλης αναφοράς που θα χαράξετε επίσης με τη βοήθεια του προγράμματος “Excel” (regression analysis) και της τιμής απορρόφησης του αγνώστου δείγματος να υπολογίσετε την τελική συγκέντρωση αυτού σε $\mu\text{g}/\text{mL}$ _____

Ποια η περιεκτικότητα των δισκίων σε φουροσεμίδα ανά μέσο βάρος δισκίου;_____

Να αναφέρετε τις πράξεις

4) Να βρείτε βάση του προγράμματος “Excel” (regression analysis) τις τιμές που περιγράφουν την ευθεία παλινδρόμησης εφαρμόζοντας τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Η ευθεία είναι της μορφής $\psi = \beta \chi + \alpha$ και οι τιμές που την περιγράφουν είναι:

Το β _____ η κλίση της ευθείας, δηλαδή η μεταβολή του ψ για μεταβολή του χ κατά μια μονάδα. Μεγάλη τιμή του β δηλώνει ότι η μέθοδος μας είναι πολύ ευαίσθητη.

Το α _____ είναι η τομή της ευθείας με τον άξονα των ψ . Δηλαδή είναι η τιμή του ψ για $\chi=0$.

Ο συντελεστής συσχέτισης r (correlation coefficient)_____. Είναι το μέτρο της καλής συσχέτισης των δύο μεταβλητών χ, ψ και η τιμή του είναι τόσο καλύτερη όσο πλησιέστερα προς τη μονάδα βρίσκεται.

5) Να υπολογίσετε βάση της καμπύλης αναφοράς που προκύπτει από το πρόγραμμα Excel, την τιμή του ειδικού συντελεστή ϵ απορρόφησης _____. Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις και τις μονάδες

Σημύωση: Ο ειδικός συντελεστής απορρόφησης, ϵ , δηλώνει την απορρόφηση που θα έχει μία ουσία σε συγκέντρωση 1% βάρος ανά όγκο ($1\text{gr}/100\text{mL}$).

6) Από τις 5 τιμές απορρόφησης που πήρατε για το δείγμα **2 mL** στα **25 mL** να υπολογίσετε την τιμή της τυπικής απόκλισης (standard deviation) για μικρό αριθμό μετρήσεων (s) που δίνεται από τον τύπο:

Αναφέρετε αναλυτικά τις πράξεις:

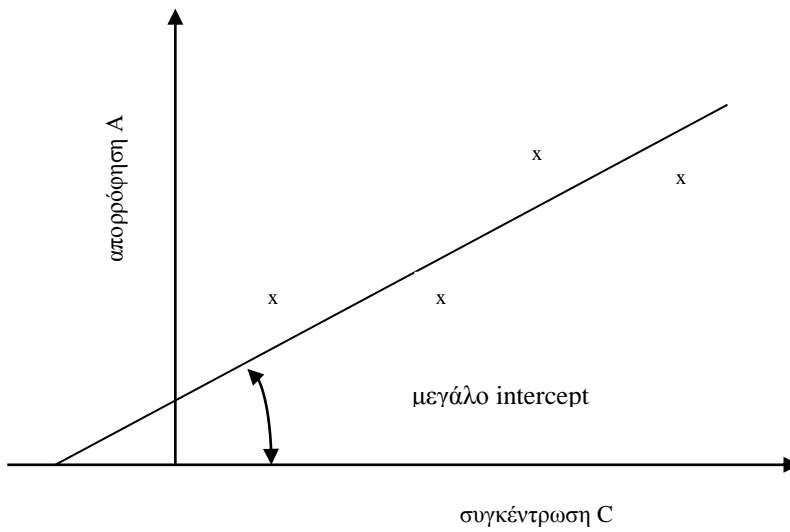
$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (xi - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

N = ο αριθμός των μετρήσεων που έγιναν (N-1= οι βαθμοί ελευθερίας).

\bar{x} = ο μέσος όρος των απορροφήσεων.

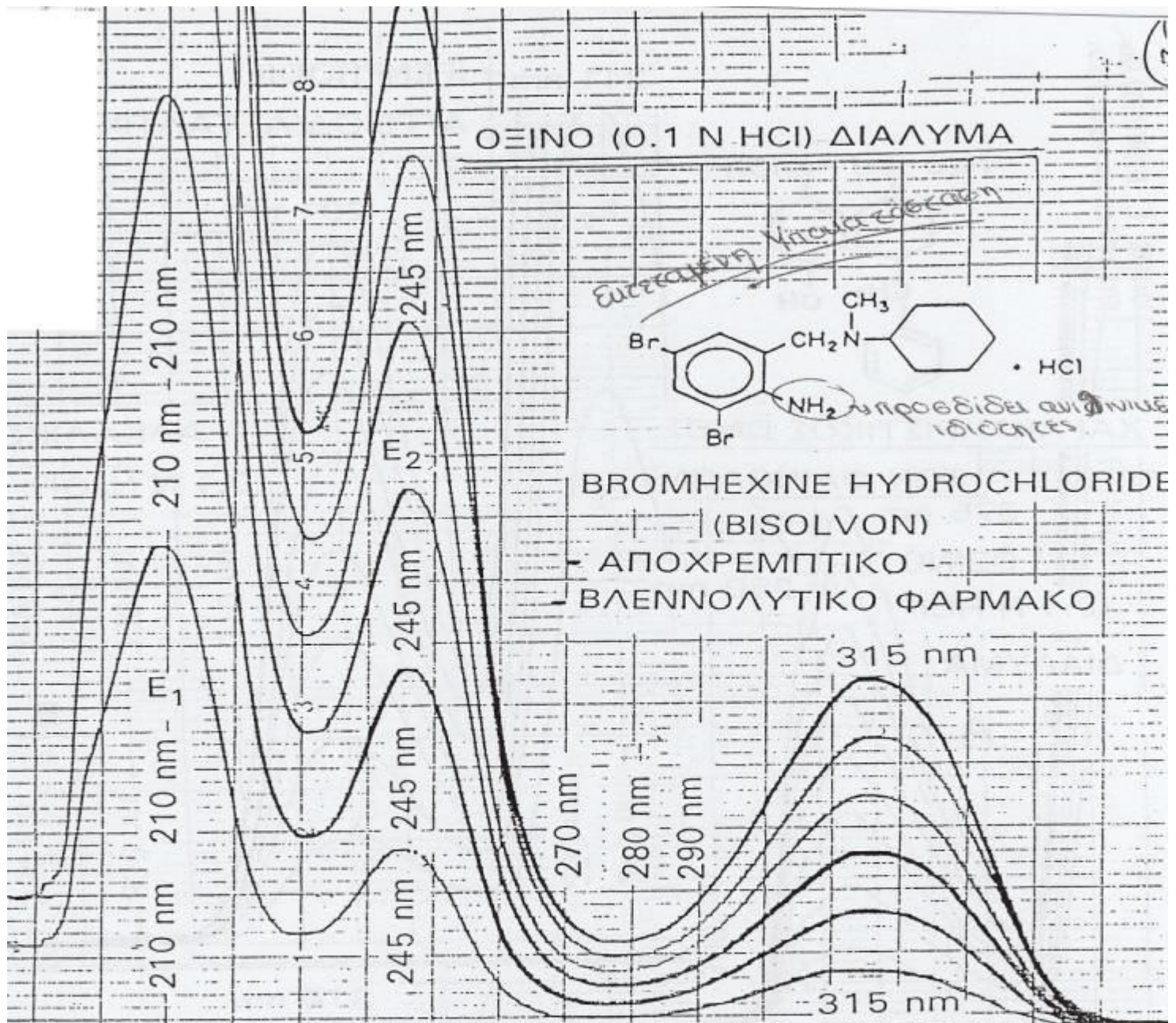
Σημείωση: Η τιμή της τυπικής απόκλισης χρησιμοποιείται σαν μέτρο ελέγχου της **επαναληπτικότητας** μιας μεθόδου, δηλαδή δείχνει πόσο κοντά βρίσκονται μεταξύ τους τα αποτελέσματα μιας σειράς μετρήσεων. Η επαναληπτικότητα είναι τόσο μεγαλύτερη, όσο μικρότερη είναι η διασπορά των αποτελεσμάτων.

Στη συνέχεια να χαράξετε (σε χιλιοστομετρικό χαρτί) καμπύλη αναφοράς των μεταβολών των συγκεντρώσεων συναρτήσει των απορροφήσεων, των πρότυπων δειγμάτων και με τη βοήθεια αυτής να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση του αγνώστου δείγματος έχοντας σαν υπόδειγμα το παρακάτω σχήμα.



Πειραματική άσκηση 5

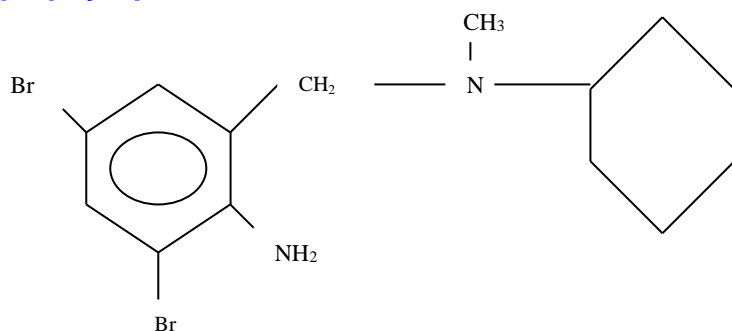
Μελέτη Φάσματος UV Υδρογλωρικής Βρωμεξίνης (Bisolvon)



ΦΑΣΜΑΤΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ ΤΟΥ ΑΠΟΧΡΕΜΠΤΙΚΟΥ-ΒΛΕΝΝΟΛΥΤΙΚΟΥ (EXPECTORANT-MUCOLYTIC) ΦΑΡΜΑΚΟΥ BROMHEXINE HYDROCHLORIDE ΣΕ ΟΞΙΝΟ (0.1 N HCl) ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 0.44, 0.88, 1.32, 1.76, 2.20, 2.64 mg/100 ml. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΗ ΕΙΝΑΙ Η ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΚΑΙ ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΤΑΙΝΙΩΝ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ E₁ (210 nm), E₂ (245 nm), ΚΑΙ "BENZOEIDOUS B"

ΑΣΚΗΣΗ

Βρωμεξίνη - BROMHEXINE

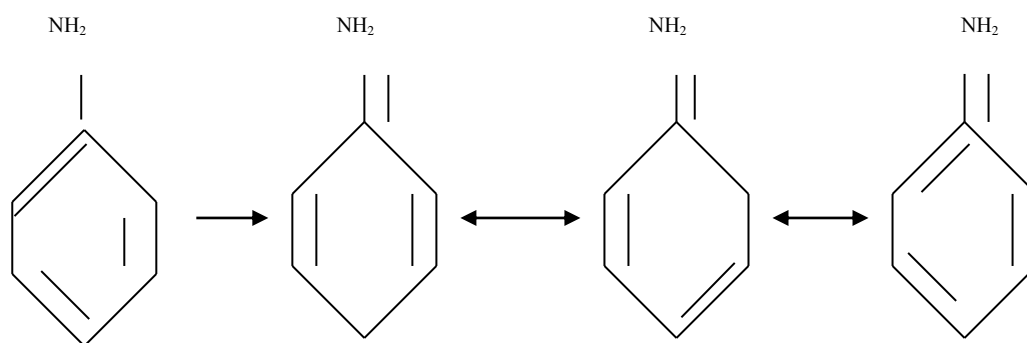


Εμπορική ονομασία: Bisolvon

Η βρωμεξίνη είναι βλεννορυθμιστικός παράγοντας που χρησιμεύει στη μείωση του ιξώδους των βρογχικών εκκρίσεων μέσω της βλεννόλυσης, δηλαδή της ρευστοποίησης των ινών των όξινων βλεννοπολυσακχαριτών της βλέννας. Επίσης, διεγείρει τη λειτουργία του κροσσώτου του επιθηλίου με αποτέλεσμα τη μεταφορά της βλέννας προς τα έξω.

Το φάσμα της βρωμεξίνης σε όξινο μεθανολικό διάλυμα παραχωρεί τρεις ταινίες απορρόφησης: την ταινία E₁ 210 nm την E₂ 245 nm και τη βενζοϊδή ταινία B στα 315 nm. Από όξινο μεθανολικό σε μεθανολικό διάλυμα δεν παρατηρείται αισθητή μεταβολή στο φάσμα της βρωμεξίνης και αυτό οφείλεται στους λοιπούς υποκατάστατες του αρωματικού πυρήνα που εμποδίζουν την επιπλέον ανάπτυξη των δομών συντονισμού. Σε καθαρά όξινο περιβάλλον το φάσμα της βρωμεξίνης μετατοπίζεται σε μικρότερα μήκη κύματος, σε σχέση με το μεθανολικό, διότι δεσμεύεται το μονήρες αδεσμικό ζεύγος των ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα να έχουμε ελαττωμένη συζυγία και λιγότερο έντονο το φαινόμενο του συντονισμού.

Η έντονη βαθυχρωμική μετατόπιση, του φάσματος της βρωμεξίνης σε σύγκριση με το φάσμα του βενζολίου οφείλεται στην παρατεταμένη υποκατάσταση του αρωματικού δακτυλίου και επιπλέον στην αυξοχρωμική επίδραση της αμινικής ομάδας. Η αμινική ομάδα περιέχει το άτομο του αζώτου, που είναι ετεροάτομο και έχει μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων, του οποίου το τροχιακό επικαλύπτεται με αυτά των p ηλεκτρονίων του αρωματικού δακτυλίου με αποτέλεσμα να εμφανίζει εντονότερο το φαινόμενο του συντονισμού σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα .



Άσκηση

Χάραξη καμπύλης αναφοράς της Bromhexine HCl βάση των πειραματικών και θεωρητικών τιμών σε δύο μήκη κύματος και ανεύρεση των συντελεστών αραίωσης.

1) Παρακάτω εμφανίζονται οι συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων βρωμεξίνης που προέκυψαν από μητρικό διάλυμα 11mg/100 mL. Να υπολογιστούν οι συντελεστές αραίωσης για κάθε περίπτωση.

• **Υπολογισμοί συντελεστών αραίωσης:** Γενικός τύπος : $C_{\text{τελ}} / C_{\text{αρχ}}$

1) Διάλυμα συγκέντρωσης 0,44 mg/100 mL : $C_{\text{τελ}} / C_{\text{αρχ}} =$

2) Διάλυμα συγκέντρωσης 0,88 mg/100 mL : $C_{\text{τελ}} / C_{\text{αρχ}} =$

3) Διάλυμα συγκέντρωσης 1,32 mg/100 mL : $C_{\text{τελ}} / C_{\text{αρχ}} =$

4) Διάλυμα συγκέντρωσης 1,76 mg/100 mL : $C_{\text{τελ}} / C_{\text{αρχ}} =$

5) Διάλυμα συγκέντρωσης 2,20 mg/100 mL : $C_{\text{τελ}} / C_{\text{αρχ}} =$

6) Διάλυμα συγκέντρωσης 2,64 mg/100 mL : $C_{\text{τελ}} / C_{\text{αρχ}} =$

3) Σύμφωνα με τα παρακάτω δεδομένα να χαραχτούν σε χιλιοστομετρικό χαρτί οι καμπύλες αναφοράς της βρωμεξίνης, με βάση τις πειραματικές και θεωρητικές τιμές των δειγμάτων, σε δύο μήκη κύματος (245 nm, 315 nm).

Πειραματικές τιμές σε μήκος κύματος 245 nm

Μητρικό διάλυμα: 11mg/100 mL

Εξίσωση: $\psi = B\chi + A$

Μήκος κύματος: 245 nm

Συγκέντρωση 11mg/100 mL:	0,44	0,88	1,32	1,76	2,20	2,64
Ύψος φάσματος σε mm:	33	70	106	139	172	206

Στην εξίσωση $\psi = B\chi + A$ ισχύουν τα δεδομένα: $A=0,6$

$$B = 78,1818$$

$$r = 0,9997$$

Επειδή ο συντελεστής συσχέτισης r τείνει στη μονάδα, υφίσταται ο νόμος Beer – Lambert. Ο συντελεστής συσχέτισης r δείχνει πόσο καλή συσχέτιση υπάρχει μεταξύ απορρόφησης και συγκέντρωσης.

Από την εξίσωση $\psi = B\chi + A$ υπολογίστε τα ψ που αντιστοιχούν στις θεωρητικές τιμές των σημείων της καμπύλης αναφοράς.

$$\chi=0,44 \quad \Rightarrow \quad \psi=$$

$$\chi=0,88 \quad \Rightarrow \quad \psi=$$

$$\chi=1,32 \quad \Rightarrow \quad \psi=$$

$$\chi=1,76 \quad \Rightarrow \quad \psi=$$

$$\chi=2,20 \quad \Rightarrow \quad \psi=$$

$$\chi=2,64 \quad \Rightarrow \quad \psi=$$

Πειραματικές τιμές σε μήκος κύματος 315 nm

Μητρικό διάλυμα: 11mg/100 mL

Εξίσωση: $\psi = \beta\chi + \alpha$

Μήκος κύματος: 315 nm

Συγκέντρωση 11mg/100 mL:	0,44	0,88	1,32	1,76	2,20	2,64
Ύψος φάσματος σε mm:	9	21	32	44	56	67

Στην εξίσωση $\psi = \beta\chi + \alpha$ ισχύει:

$\alpha = -2,5333$

$\beta = 26,4285$

$r = 0,9999$

Και στην περίπτωση αυτή ισχύει ο νόμος του Beer – Lambert, επειδή ο συντελεστής συσχέτισης r τείνει στη μονάδα.

Από την εξίσωση $\psi = \beta\chi + \alpha$

Από την εξίσωση $\psi = \beta\chi + \alpha$ υπολογίστε τα ψ που αντιστοιχούν στις θεωρητικές τιμές των σημείων της καμπύλης αναφοράς.

$\chi = 0,44$	\Rightarrow	$\psi =$
$\chi = 0,88$	\Rightarrow	$\psi =$
$\chi = 1,32$	\Rightarrow	$\psi =$
$\chi = 1,76$	\Rightarrow	$\psi =$
$\chi = 2,20$	\Rightarrow	$\psi =$
$\chi = 2,64$	\Rightarrow	$\psi =$

Με βάση τις πειραματικές και τις θεωρητικές τιμές συμπληρώστε τον πίνακα τιμών, και χαράξετε τις πρότυπες καμπύλες αναφοράς στα 245 nm και 315 nm στο ίδιο διάγραμμα. Σημειώνονται τα θεωρητικά και τα πειραματικά σημεία.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΙΜΩΝ				
ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ (nm)	ΔΕΔΟΜΕΝΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/100 mL)	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΥΨΟΣ (mm)	ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΨΟΣ ΣΦΑΛΜΑΤΟΣ (nm)
245 nm	A=0,6	0,44	33	
	B=78,1818	0,88	70	
	r=0,9997	1,32	106	
		1,76	138	
		2,20	172	
		2,64	206	
315 nm	$\alpha=-2,5333$	0,44	9	
	$\beta=26,4285$	0,88	21	
	r=0,9999	1,32	32	
		1,76	44	
		2,20	56	
		2,64	67	

3) Σε ποιο από τα δύο μήκη κύματος έχουμε τη μεγαλύτερη ευαισθησία και γιατί;

Σύγκριση καμπυλών αναφοράς βρωμεξίνης- παρατηρήσεις

1) Η καμπύλη αναφοράς της βρωμεξίνης στα 245 nm παρουσιάζει υπερχρωτισμό, δηλαδή αύξηση των τιμών απορρόφησης απ' ό,τι η καμπύλη στα 315 nm. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της δραστικής ουσίας επομένως, μπορεί να γίνει καλύτερα στα 245 nm όπου η ένταση απορρόφησης είναι μεγαλύτερη, δίνοντας πιο ακριβή αποτελέσματα.

2) Πρέπει να αναφερθεί ότι οι πειραματικές τιμές αποκλίνουν ελάχιστα από τις θεωρητικές τιμές των καμπυλών αναφοράς, οι οποίες προκύπτουν από την εξίσωση $\psi = \beta\chi + \alpha$. Τα θεωρητικά σημεία της καμπύλης βρίσκονται πάνω στην ευθεία ενώ τα πειραματικά εκατέρωθεν αυτής.

Για παράδειγμα για $\chi = 0,44 \text{ mg/100 mL}$ έχουμε:

$\Rightarrow c = 78,1818 \cdot 0,44 + 0,6 = 34,999 \approx 35$ ενώ η πειραματική τιμή είναι ίση με 33.

3) Στα 315 nm, η αρχή της καμπύλης δεν είναι το σημείο (0,0) αλλά το σημείο (0, -2,5333) όπως προκύπτει από την εξίσωση:

για $\chi = 0$

$$\psi = \beta\chi + A \Rightarrow \psi = 26,4285 \cdot 0 - 2,5333 \Rightarrow \psi = -2,5333$$

Η ουσία ιφεπροδίλη (inferrodil) χρησιμοποιείται σαν αγγειοδιασταλτικό φάρμακο. Όπως παρατηρείται στο φάσμα απορρόφησης του φαρμάκου, στην περιοχή του υπεριώδους, υπάρχουν δύο χρωμοφόρες ομάδες υπεύθυνες για την απορρόφηση η φαινυλική και η βενζυλική.

Το άζωτο έχει μεν μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων, όμως στο δακτύλιο που βρίσκεται δεν υπάρχουν π-ηλεκτρόνια για να υπάρχει σύζευξη και να λειτουργήσει αυξοχρωμικά.

Το υδροξύλιο της ομάδας $-CHOH$ τυγχάνει αυξόχρωμος ομάδα, όμως δε βρίσκεται κοντά στη χρωμοφόρο, οπότε δεν έχει καμία επίδραση. Το άλλο υδροξύλιο προσδίδει στο μόριο όξινες ιδιότητες και είναι άμεσα υποκατεστημένο στο αρωματικό σύστημα αφού έχει τρία μονήρη ηλεκτρονιακά ζεύγη των οποίων τα τροχιακά επικαλύπτονται από τα p ηλεκτρόνια του αρωματικού συστήματος. Επομένως η συγκεκριμένη υδροξυλική ομάδα είναι γνήσια αυξοχρωμική ομάδα και με αποτέλεσμα να προκαλεί εντονότατη βαθυχρωμική μετατόπιση (275 nm) σε σύγκριση με τη βενζοειδή ταινία Β του βενζολίου που εμφανίζεται στα 254 nm.

Το inferrodil είναι γνήσια φαινόλη και παραχωρεί τη βενζοειδή ταινία Β στα 275 nm σε όξινο και ουδέτερο περιβάλλον με το χαρακτηριστικό ώμο των φαινολών στα 280 nm που είναι κατάλοιπο της λεπτής υψή. Η φαινόλη σε εξάνιο παρουσιάζει σχετικά πλούσια υψή. Σε νερό όμως, όπως όλα τα φαινολικά φάρμακα, επειδή ο διαλύτης είναι πολικός και σχηματίζονται ισχυροί δεσμοί υδρογόνου, το μόριο δε μπορεί να δονηθεί με αποτέλεσμα να παρουσιάζει κατάλοιπο της λεπτής υψής. Σε αλκαλικό περιβάλλον ελευθερώνεται το τρίτο ζεύγος ηλεκτρονίων στο οξυγόνο της φαινυλικής ομάδας με αποτέλεσμα τη βαθυχρωμική μετατόπιση από 275 σε 291 nm του φάσματος και εμφάνιση υπερχρωμισμού.

ΑΣΚΗΣΗ

Χάραξη καμπύλης αναφοράς της δραστηκής ουσίας Ιφεπροδίλη με εφαρμογή της προσθετικής και της κανονικής μεθόδου

- 1) Σε δύο σελίδες χιλιοστομετρικού χαρτιού και με συγκεντρώσεις από 3,7 έως 25,93 mg/100 mL όπως φαίνεται παρακάτω, να χαραχθούν δύο καμπύλες αναφοράς βάση της προσθετικής και κανονικής μεθόδου.
- 2) Υπολογίστε τις αντίστοιχες θεωρητικές τιμές των δειγμάτων βάση των δεδομένων της καμπύλης αναφοράς και για τις δύο μεθόδους.

Χρησιμοποίηση της προσθετικής μεθόδου (Standard Addition Method)

Μητρικό διάλυμα 92,6 mgr/100 mL

Μήκος κύματος 291 nm

Εξίσωση $\psi = \beta\chi + \alpha$

Οι ογκομετρικές φιάλες των προτύπων διαλυμάτων περιέχουν αύξουσες συγκεντρώσεις δραστικής ουσίας και ίδιες ποσότητες δείγματος.

Στη συνέχεια χαράσσεται η καμπύλη αναφοράς μετρώντας τις απορροφήσεις των επτά προτύπων διαλυμάτων, γνωστών συγκεντρώσεων. Αυτό που είναι χαρακτηριστικό είναι ότι το σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα χ των συγκεντρώσεων δίνει τη συγκέντρωση του αγνώστου δείγματος.

Βάση της εξίσωσης $\psi = \beta\chi + \alpha$ συμπληρώστε τον παρακάτω πίνακα με τα νέα δεδομένα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΙΜΩΝ				
ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ (mm)	ΔΕΔΟΜΕΝΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/100 mL)	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΥΨΟΣ (mm)	ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΨΟΣ (mm)
291 nm	$\alpha = 24,4205$	0,00	20	
	$\beta = 4,6633$	3,7	41	
	$r = 0,9969$	7,41	61	
		11,11	79	
		14,8	96	
		18,52	114	
		22,22	128	
		25,93	140	

Παρατήρηση: Σε συγκέντρωση δείγματος 0,00 mg/100 mL (τυφλό) αντιστοιχεί ορισμένη τιμή απορρόφησης του οργάνου, γιατί μέσα στα πρότυπα διαλύματα που παρασκευάσατε, προσθέσατε σταθερή ποσότητα αγνώστου δείγματος. Επίσης τα έκδοχα που τυχόν υπάρχουν στο άγνωστο δείγμα δεν αλλοιώνουν τα αποτελέσματα, αφού ίσες ποσότητες δείγματος υπάρχουν σε όλα τα διαλύματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

Χάραξη κανονικής καμπύλης αναφοράς

Συγκέντρωση μητρικού διαλύματος 92,6 mgr/100 mL

Αλκαλικό μεθανολικό διάλυμα

Μήκος κύματος: 291 nm

Εξίσωση: $\psi = B\chi + A$

Με τα νέα δεδομένα συμπληρώστε τον παρακάτω πίνακα σύμφωνα με τη διαδικασία που ακολουθήσατε και για τους προηγούμενους πίνακες. Στη συνέχεια με βάση τα χ και τα ψ να χαράξετε την καμπύλη αναφοράς. Δηλαδή:

ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΙΜΩΝ				
ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ (mm)	ΔΕΔΟΜΕΝΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/100 mL)	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΥΨΟΣ (mm)	ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΨΟΣ (mm)
291 nm	A = 7,1455	0,00	0	
	B = 4,6635	3,70	20	
	r = 0,9969	7,41	41	
		11,11	61	
		14,81	79	
		18,52	86	
		22,22	114	
		25,93	128	
		29,63	140	

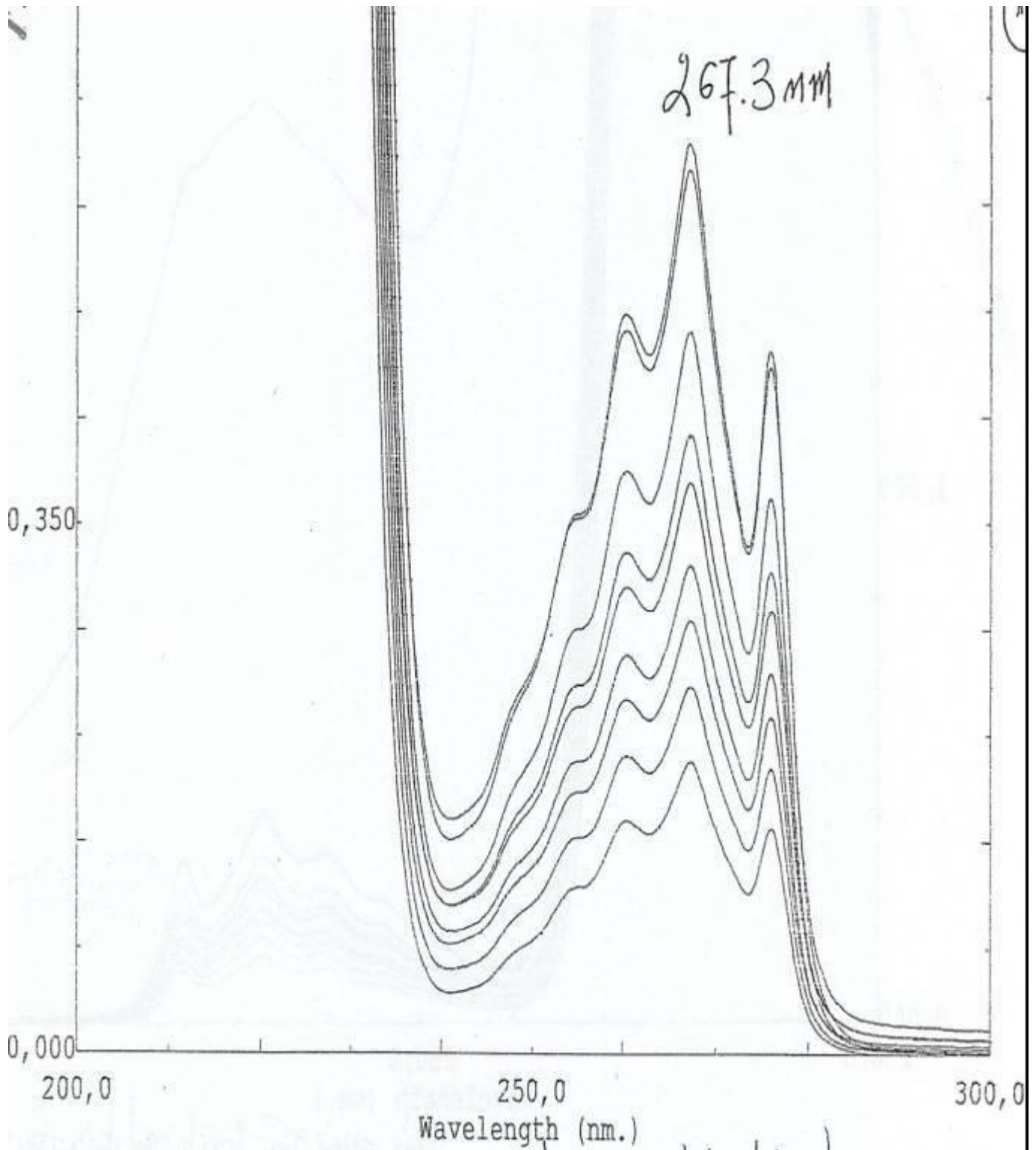
Παρατηρήσεις: Παρατηρείται ότι το intercept είναι μεγάλο: 7,1455. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει ένα συστηματικό σφάλμα στις μετρήσεις. Αυτό δεν εμποδίζει την ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου γιατί η καμπύλη είναι ευθεία με συντελεστή συσχέτισης $r=0,9969$.

Υπενθυμίζεται ότι intercept είναι η απόσταση τομής από την αρχή των αξόνων. Παρατηρούμε επίσης ότι οι δύο ευθείες είναι παράλληλες γιατί έχουν την ίδια κλίση $B = 4,6635$ και τον ίδιο συντελεστή συσχέτισης.

3) Με τα δεδομένα αυτά αφού χαραχτούν οι καμπύλες αναφοράς και σχολιαστούν να υπολογιστεί η συγκέντρωση του δείγματος _____ από το διάγραμμα. Περιγράψτε την διαδικασία.

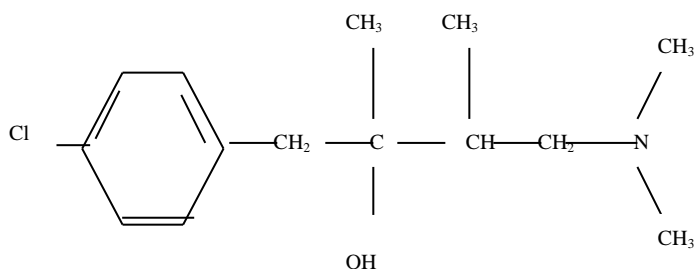
Πειραματική άσκηση 7

Μελέτη Φάσματος UV Της Κλοβουτινόλης (Silomat)
= Πρώτη και Δεύτερη παράγωγος Φάσματος



στη σειρά των φασμάτων
 Στο γράφημα αυτό φαίνονται τα
 φάσματα απορρόφησης των προτύπων
 δειγμάτων κλοβουτινόλης.

Στη συνέχεια, θα αναπτυχθεί μέθοδος προσδιορισμού κατόπιν παραγωγίσις μιας σειράς προτύπων φασμάτων απορρόφησης της κλοβουτινόλης στο φαρμακευτικό σκεύασμα Silomat. Η κλοβουτινόλη είναι αντιβηχικό φάρμακο και αποτελεί το βασικό – δραστικό συστατικό πολλών σιροπιών.



Η κλοβουτινόλη όπως φαίνεται από το χημικό της τύπο έχει ως κύρια χρωμοφόρο ομάδα την π-χλωροβενζυλική που παραχωρεί πλήρη βενζοειδή ταινία Β (240-290 nm) με λ_{\max} 277 nm και χαρακτηριστική λεπτή υφή. Η αισθητή βαθυχρωμική μετατόπιση οφείλεται στην π-υποκατάσταση στον αρωματικό δακτύλιο. Το φάσμα της ουσίας χαρακτηρίζεται από πλούσια λεπτή υφή αν και έχει παρατεταμένη υποκατάσταση για το λόγο ότι αυτή είναι σε π-θέση.

Τα έκδοχα του σκευάσματος Silomat όπως το στεατικό μαγνήσιο, ο τάλκης, το άμυλο και άλλες παρόμοιες φαρμακευτικές ουσίες μπορεί να μην έχουν χρωμοφόρες ομάδες παρέχουν όμως μια ασαφή απορρόφηση η οποία είναι προσθετική . Ετσι κατά τη λήψη φάσματος Silomat δεν αντικατοπτρίζεται η πραγματική τιμή απορρόφησης της δραστικής ουσίας ιφεπροδίλης στο φάσμα του άγνωστου δείγματος με αποτέλεσμα να μη είναι και εφικτός ο άμεσος προσδιορισμός της σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα.

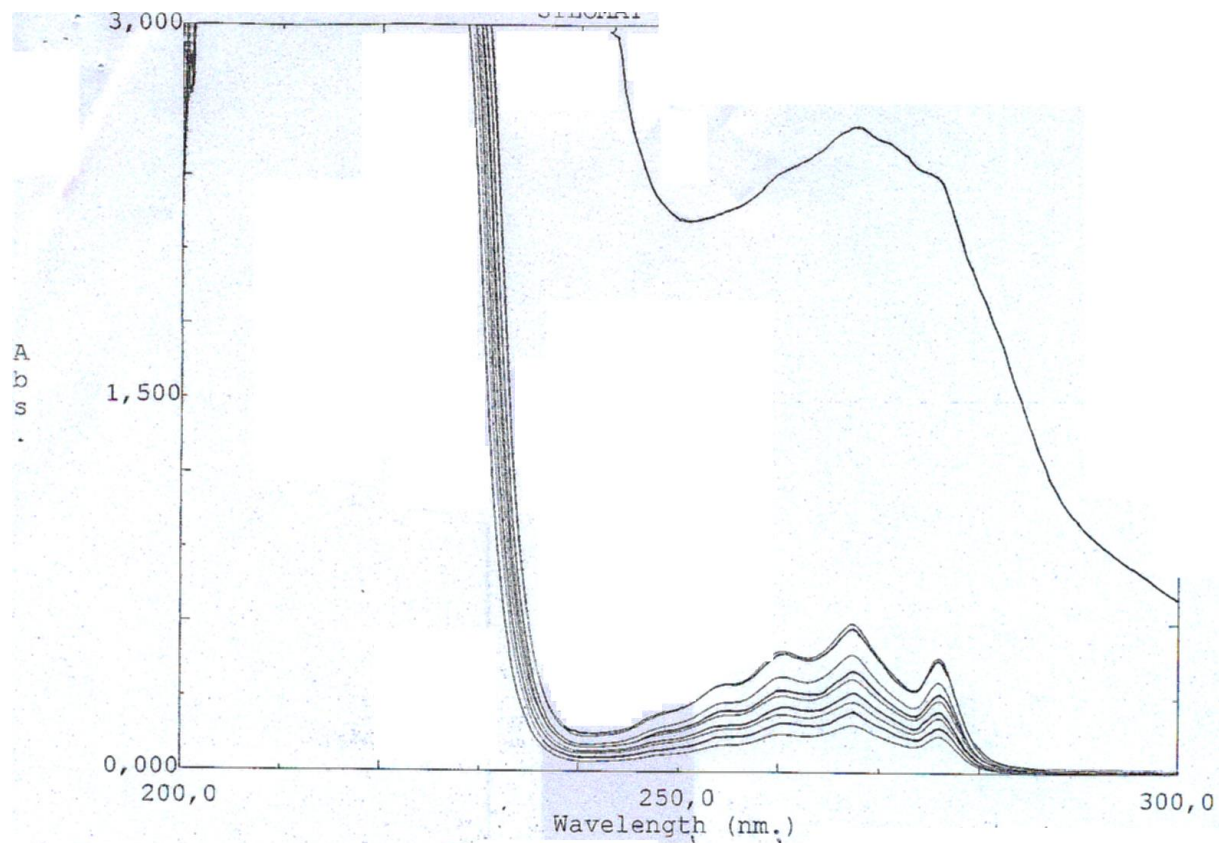
Με άλλα λόγια τα έκδοχα αρκετές φορές παρεμβάλλουν στον προσδιορισμό των δραστικών ουσιών σε σκευάσματα και για την αποφυγή του φαινομένου τούτου μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι ακόλουθες τεχνικές.

A)Τεχνική καθαρισμού του δείγματος με τη μέθοδο της εκχύλισης.

B)Προσθετική μέθοδος

Γ)Προσθήκη κατάλληλων αντιδραστηρίων ώστε να προκληθεί εκλεκτική βαθυχρωμική μετατόπιση της δραστικής.

Δ)Μέθοδος παραγώνων.



File Name: SILOMAT

Created: 12:31 27/03/00
Data: Original

Measuring Mode: Abs.
Scan Speed: Fast
Slit Width: 1,0
Sampling Interval: 0,1

Φάσματα απορρόφησης δείγματος silomat
με $c=400\mu\text{g/ml}$, όσο και προτύπων
δειγμάτων κλοβουτινόλης
Με συγκεντρώσεις :
203/243.6/284.3/324.8/365.4/406/487.2/568.
4 και $609\mu\text{g/ml}$

Μέθοδος παραγωγίσης φασμάτων και σημασία αυτής στους ποσοτικούς προσδιορισμούς των δραστικών ουσιών στα φαρμακευτικά σκευάσματα.

Σύμφωνα με τη διαδικασία παραγωγίσης, το φάσμα απορρόφησης «μηδενικής τάξης» μιας ουσίας (που περιγράφεται από μία πολυωνυμική εξίσωση συσχέτισης συγκέντρωσης με απορρόφηση), παριστάνεται εκ νέου με φάσμα (1^{ης}, 2^{ας},n τάξης) που προκύπτει κατόπιν παραγωγίσης της αρχικής εξίσωσης. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η δυνατότητα δημιουργίας φάσματος διαφορετικής μορφής για την προσδιοριζόμενη ουσία, με λεπτότερη υφή, περισσότερες λεπτομέρειες και ικανό να την προσδιορίσει σε κατάλληλα μήκη κύματος που δεν παρεμβάλλουν άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες.

Άσκηση

1) Να υπολογιστούν βάση των παρακάτω δεδομένων σειράς προτύπων διαλυμάτων μηδενικής τάξης της κλοβουτυνόλης, οι αντίστοιχες θεωρητικές τιμές ψ και να χαραχτούν σε χιλιοστομετρικό χαρτί και οι δύο καμπύλες αναφοράς.

Καμπύλη αναφοράς Κλοβουτυνόλης μηδενικής τάξης στα 267,3 nm

<i>X</i> (συγκεντρώσεις)	<i>Ψ</i> (πειραματικές τιμές)	<i>Ψ</i> (θεωρητικές τιμές)
0		0
203		0,191
243,6		0,242
284,3		0,285
324,8		0,322
365,4		0,375
406		0,408
487,2		0,474
568,2		0,581
609		0,599

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0,998893847
R Square	0,997788918
Adjusted R Square	0,997512533
Standard Error	0,009092557
Observations	10

ANOVA

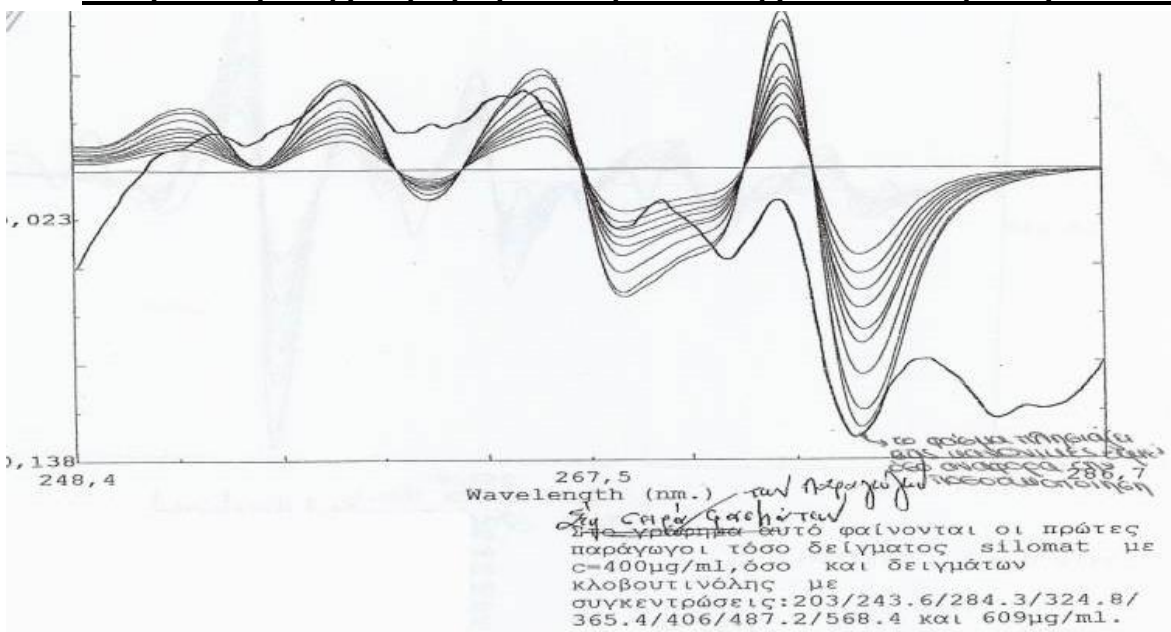
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	0,298466703	0,298466703	3610,138452	6,54127E-12
Residual	8	0,000661397	6,26748E-05		
Total	9	0,2991281			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95,0%	Upper 95,0%
Intercept	-0,00212436	0,006493507	-0,327151399	0,75194945	-0,017098422	0,012849703	-0,017098422	0,012849703
X Variable 1	0,001001874	1,66744E-05	60,0644277	6,54127E-12	0,000963423	0,001040325	0,000963423	0,001040325

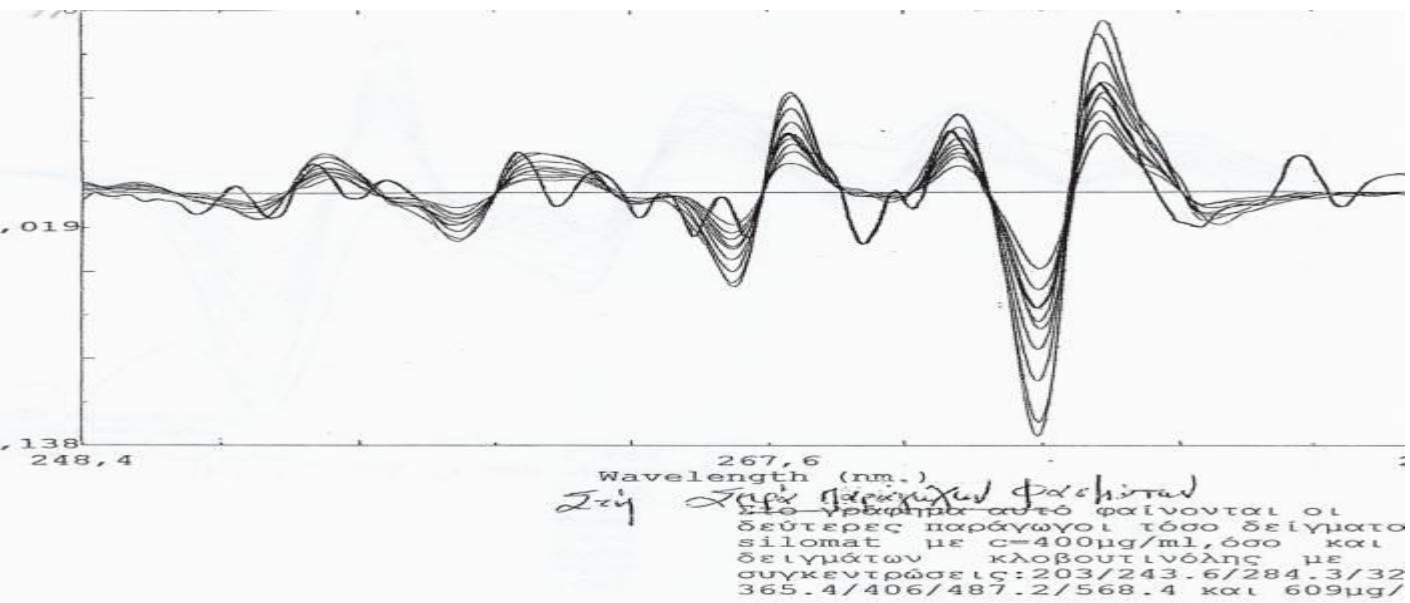
Residual output		
Observation	Predicted Y	Residuals
1	-0,00212436	0,00212436
2	0,201256071	-0,010256071
3	0,241932157	6,78428E-05
4	0,282708431	0,002291569
5	0,32328433	-0,00128433
6	0,363960416	0,011039584
7	0,404636502	0,003363498
8	0,485988674	-0,011988674
9	0,567340847	0,013659153
10	0,608016933	-0,009016933

2) Από τα δεδομένα της καμπύλης αναφοράς να υπολογίσετε το «όριο ανίχνευσης»(LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ). Δώστε τον ορισμό τους.

Φάσματα πρώτης παραγώγου κλοβουτινόλης και σκευάσματος Silomat



Φάσματα δεύτερης παραγώγου κλοβουτινόλης και σκευάσματος Silomat



- 3) Να χαραχθεί καμπύλη αναφοράς με βάση τη δεύτερη παράγωγο κλοβουτινόλης για θεωρητικές και πειραματικές τιμές .

Καμπύλη αναφοράς στα 277 nm (δύετηρη παράγωγος):

X (συγκεντρώσεις)	Ψ(πειραματικές τιμές)	Ψ(θεωρητικές τιμές)
0		0
203		0,032
243,6		0,039
284,3		0,044
324,8		0,051
365,4		0,054
406		0,06
487,2		0,071
568,2		0,086
609		0,093

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0,998471751
R Square	0,996945837
Adjusted R Square	0,996564067
Standard Error	0,00158663
Observations	10

ANOVA

	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	0,006573861	0,006573861	2611,375803	2,38209E-11
Residual	8	2,01391E-05	2,51739E-06		
Total	9	0,006594			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95,0%	Upper 95,0%
Intercept	0,001082669	0,001133102	0,955491659	0,36730661	-0,001530269	0,003695608	-0,001530269	0,003695608
X Variable 1	0,000148688	2,90965E-06	51,10162231	2,38209E-11	0,000141978	0,000155398	0,000141978	0,000155398

Residual output		
Observation	Predicted Y	Residuals
1	0,001082669	-0,001082669
2	0,031266299	0,000733701
3	0,037303025	0,001696975
4	0,04335462	0,00064538
5	0,049376477	0,00163523
6	0,055413204	-0,001413204
7	0,06144993	-0,00144993
8	0,073523382	-0,002523382
9	0,085596834	0,000403166
10	0,09163356	0,00136644

4) Από τα δεδομένα της καμπύλης αναφοράς να υπολογίσετε το «όριο ανίχνευσης» (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ).

5) Να υπολογίσετε τη συγκέντρωση κλοβουτινόλης όταν το άγνωστο δείγμα Silomat δίνει απορρόφηση $A=0,059$.