

Αναλυτική Μεθοδολογία και Αυτοματισμοί στην Κλινική Χημεία

5.1. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ - ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

5.1.1. Οπτικές τεχνικές ανάλυσης

Μια σειρά μεθόδων στην Κλινική Χημεία που έχουν ως σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών, στηρίζονται στην αλληλεπίδραση μεταξύ ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και ύλης, ενώ περιγράφονται αναλυτικά σε εγχειρίδια Αναλυτικής Χημείας. Οι οπτικές τεχνικές ανάλυσης βασίζονται στη μέτρηση της έντασης της απορροφώμενης, σκεδαζόμενης ή εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και περιλαμβάνουν μεθόδους όπως η φασματοφωτομετρία, η φθορισμομετρία, η νεφελομετρία, η θολερομετρία, η φλογοφασματοφωτομετρία, η φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης κ.ά.

Είναι γνωστό ότι η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αποτελείται από συγκεκριμένα (κβαντισμένα) πακέτα ενέργειας, τα φωτόνια ή quanta. Η ενέργεια κάθε φωτονίου δίνεται από τη σχέση $E = h \times \nu$, όπου E είναι η ενέργεια του φωτονίου, h η σταθερά Planck ($6,63 \times 10^{-34}$ J \times sec) και ν η συχνότητα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Από τη σχέση $\nu = c/\lambda$, όπου c η ταχύτητα του φωτός (3×10^8 m/s) και λ το μήκος κύματος, είναι φανερό πως, όταν το μήκος κύματος είναι μικρό, η συχνότητα και συνακόλουθα και η ενέργεια του φωτονίου θα είναι μεγάλη και αντίστροφα.

Στον Πίνακα 1 φαίνονται τα μήκη κύματος όλου του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Σε αυτό το σημείο πρέπει να διευκρινιστεί ότι οι ακτίνες X είναι ένα υποσύνολο των ακτίνων γ και παράγονται όταν ταχύως κινούμενα ηλεκτρόνια προσπέσουν σε ένα μεταλλικό στόχο. Από το φάσμα αυτό, στο Κλινικό Βιοχημικό Εργαστήριο, χρησιμοποιείται κυρίως για τις προαναφερθείσες μεθόδους το ορατό φως (390-780 nm) καθώς και οι γειτονικές περιοχές του υπεριώδους (UV) και του εγγύς υπέρυθρου φωτός (IR).

Όταν ένα φωτόνιο συναντήσει ένα μόριο, τότε, ανάλογα με τη φύση του τελευταίου, απορροφάται από αυτό ή αλλάζει κατεύθυνση (σκεδάζεται). Στην περίπτωση της απορρόφησης η ενεργειακή κατάσταση του μορίου αλλάζει και αυτό μεταβαίνει στη διεγερμένη μορφή του. Μόρια ή τμήματα μορίων που έχουν την ικανότητα διέγερσης ονομάζονται χρωμοφόρα. Η κατάσταση διέγερσης του μορίου μπορεί να χαρακτηρίζεται από οποιαδήποτε από τις εξής διεργασίες:

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Το εύρος του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας

	ΜΟΡΦΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ					
	Ακτίνες γ	Ακτίνες X	Υπεριώδες (UV)	Ορατό (VIS)	Υπέρυθρο (IR)	Μικροκύματα, Ραδιοκύματα
ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ (nm)	<0,1	0,001-10	10-400	400-700	700-10 ⁵	>10 ⁵

1. Μεταφορά ηλεκτρονίου σε ανώτερο ενεργειακό επίπεδο.
2. Μεταβολή της ταλάντωσης γύρω από τους ομοιοπολικούς δεσμούς του μορίου.
3. Μεταβολή της περιστροφής γύρω από τους ομοιοπολικούς δεσμούς του μορίου.

Επειδή οι μεταβολές στην περιστροφή απαιτούν μικρότερα ποσά ενέργειας, μπορούν να προκληθούν ακόμα και από μικροκύματα (μεγάλα μήκη κύματος). Για τις μεταβολές της ταλάντωσης γύρω από τον ομοιοπολικό δεσμό απαιτούνται μήκη κύματος του ορατού ή του εγγύς υπέρυθρου φωτός. Τέλος, η μετάβαση ενός ηλεκτρονίου από μια ενεργειακή στοιβάδα σε υψηλότερη απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η ακτινοβολία μεταξύ των ακτίνων Χ και του ορατού φωτός.

Κάθε μόριο που έχει διεγερθεί, επανέρχεται στο αρχικό ενεργειακό επίπεδο, κυρίως έπειτα από σύγκρουση με κάποιο άλλο μόριο, με ταυτόχρονη αποβολή της ενέργειας που έχει απορροφηθεί κατά τη διέγερσή του. Ωστόσο, η ένταση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας είναι μικρότερη από την ένταση της ακτινοβολίας που έχει απορροφηθεί, επειδή ένα μέρος της απορροφημένης ακτινοβολίας έχει μετατραπεί σε θερμότητα ή κινητική ενέργεια του μορίου. Έτσι, αν I είναι η ένταση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και I_0 η ένταση της αρχικής ακτινοβολίας, τότε ισχύει η σχέση:

$$I = I_0 10^{-abc}$$

$$\log I/I_0 = -abc$$

$$\log I_0/I = abc$$

Η διαπερατότητα T μιας ουσίας είναι ένα μέγεθος που εκφράζει την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που διαπερνά το διάλυμα της ουσίας που εξετάζουμε και ορίζεται από το λόγο $T = I/I_0$. Η απορρόφηση της ουσίας δίνεται από τη σχέση $A = \log I_0/I$ και έτσι προκύπτει η ακόλουθη σχέση, γνωστή και ως νόμος των *Lambert-Beer*:

$$A = abc = \epsilon bc = -\log T \quad \text{ή}$$

$$A = \log 100 - \log \%T = 2 - \log \%T$$

όπου:

- c: Συγκέντρωση της ουσίας, τα μόρια της οποίας διεγείρονται με την απορρόφηση φωτός.

b: Μήκος της οπτικής διαδρομής που διανύθηκε μέσα στο διάλυμα και εκφράζεται συνήθως σε cm.

a: Συντελεστής απόσβεσης ή απορροφητικότητα, όταν η συγκέντρωση c εκφράζεται σε g/L, που αποτελεί σταθερά εξαρτώμενη από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας.

e: Σταθερά αναλογίας, όταν η συγκέντρωση c εκφράζεται σε mol/L, που καλείται μοριακή απορροφητικότητα. Αποτελεί και αυτή σταθερά εξαρτώμενη από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας.

5.1.2. Φασματοφωτομετρία υπεριώδους - ορατού

Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους - ορατού στηρίζεται στις βασικές αρχές αλληλεπίδρασης φωτός και ύλης, που περιγράφονται στο νόμο των Lambert-Beer, με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών, που είναι και ο αντικειμενικός σκοπός ενός εργαστηρίου Κλινικής Χημείας.

Τα κύρια στοιχεία ενός φασματοφωτόμετρου είναι τα εξής:

1. *Η πηγή του φωτός*. Συνήθως, για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται λάμπες βολφραμίου, οι οποίες εκπέμπουν φως σε μήκη κύματος 360-950 nm, λάμπες εκκένωσης υδρογόνου ή δευτερίου, οι οποίες εκπέμπουν υπεριώδη ακτινοβολία (220-360 nm) ή λάμπες ατμών υδραργύρου. Οι τελευταίες εκπέμπουν στα 313, 365, 405, 436 και 546 nm, ενώ χρησιμοποιούνται κυρίως για βαθμονόμηση. Η επιλογή φωτός είναι σημαντική και πρέπει η ενέργεια που παρέχει να είναι αρκετή, ώστε να γίνει η απαιτούμενη ανάλυση.
2. *Ένας μονοχρωμάτορας*, που παρεμβάλλεται μεταξύ του δείγματος και της πηγής του φωτός. Η χρήση του είναι απαραίτητη, γιατί τελικά το φως που προσπίπτει στο δείγμα πρέπει να είναι μονοχρωματικό. Αποτελείται από ένα πρίσμα ή ένα φράγμα περίθλασης, μέσα από το οποίο επιλέγεται με μηχανικό τρόπο το επιθυμητό μήκος κύματος. Μια πιο απλή συσκευή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντί του μονοχρωμάτορα, στην περιοχή του ορατού και του εγγύς υπεριώδους φωτός, είναι τα φίλτρα που έχουν την ικανότητα απορρόφησης όλων των υπόλοιπων μηκών κύματος, πλην του επιθυμητού. Με τα φίλτρα πετυχαίνεται επιλογή στενής περιοχής μηκών κύματος του φάσματος της

ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, αλλά όχι πλήρως μονοχρωματική ακτινοβολία. Απόλυτη μονοχρωματική ακτινοβολία παράγεται σήμερα με συσκευές λέιζερ.

3. *Ο υποδοχέας των κυψελίδων* μέσα στις οποίες τοποθετείται το δείγμα. Οι κυψελίδες κατασκευάζονται από γυαλί, για την περιοχή του ορατού φωτός ή από χαλαζία για την υπεριώδη και την εγγύς υπέρυθη ακτινοβολία. Τέλος, υπάρχουν και πλαστικές κυψελίδες μιας χρήσεως. Συνήθως, έχουν τετράγωνη διατομή, δηλαδή τοιχώματα κάθετα μεταξύ τους αλλά και κάθετα ως προς τη δέσμη του φωτός. Το εσωτερικό μήκος πλευράς τους είναι 1 cm, αν και υπάρχουν και κυψελίδες διαφορετικών διαστάσεων.
4. *Ο ανιχνευτής του φωτός* που διέρχεται μέσα από το δείγμα. Ο ανιχνευτής μπορεί να είναι ένα απλό φωτοβολταϊκό κύτταρο ή ένας φωτοπολλαπλασιαστής ο οποίος, μέσω μιας σειράς ημικυκλικών δυνόδων και με εκμετάλλευση του φωτοηλεκτρικού φαινομένου, έχει την ικανότητα να πολλαπλασιάζει το σήμα που ανιχνεύεται με τη μορφή ηλεκτρικού ρεύματος.
5. Τέλος, υπάρχει ένας *μετρητής* που καταγράφει την ένταση του σήματος. Στα περισσότερα φασματοφωτόμετρα απεικονίζεται γραφικά η απορρόφηση μιας ουσίας, σε συνάρτηση με το μήκος κύματος, δίνοντας έτσι το φάσμα απορρόφησης.

Εκτός από τα φασματοφωτόμετρα μονής δέσμης (*single beam*), που περιγράφηκαν παραπάνω, υπάρχουν και τα φασματοφωτόμετρα διπλής δέσμης, στα οποία είτε όλα τα στοιχεία είναι διπλά, εκτός από την πηγή του φωτός, είτε το φως που περνάει από ένα μονοχρωμάτορα κατευθύνεται σε δύο χωριστές κυψελίδες και το τελικό σήμα ανιχνεύεται από κοινό ανιχνευτή. Και στις δύο περιπτώσεις, στη μία κυψελίδα τοποθετείται το δείγμα και στην άλλη το διάλυμα αναφοράς.

Στο νόμο των *Lambert-Beer*, αν $b = 1$, τότε η απορρόφηση ταυτίζεται αριθμητικά με την οπτική πυκνότητα (OD). Επίσης, αν η συγκέντρωση c εκφράζεται σε mol/L και το b σε cm, τότε ο συντελεστής a αντικαθίσταται από τη μοριακή απορροφητικότητα ή το μοριακό συντελεστή απόσβεσης ϵ . Επομένως, αν γνωρίζουμε την τιμή του μοριακού συντελεστή απόσβεσης για μια ουσία με βάση την απορρόφηση που δίνει, μπορούμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωσή της. Επιπλέον, αν

έχουμε κατασκευάσει μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τη συγκεκριμένη ουσία (καμπύλη βαθμονόμησης), όπου στον έναν άξονα αναγράφεται η απορρόφηση και στον άλλον η συγκέντρωση, γνωρίζοντας την απορρόφηση, μπορούμε να καταλήξουμε στη συγκέντρωση της ουσίας. Τέλος, αν έχουμε μια άγνωστη ουσία και θέλουμε να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωσή της, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ένα γνωστό διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης. Στην περίπτωση αυτή ισχύει η σχέση:

$$\begin{aligned} A_Y/A_a &= C_Y/C_a \\ C_a &= (A_a/A_Y) \times C_Y \end{aligned}$$

όπου C_Y και C_a οι συγκεντρώσεις και A_Y και A_a οι απορροφήσεις της γνωστής και της άγνωστης ουσίας αντίστοιχα.

Για να μπορούν να εφαρμοστούν όμως οι παραπάνω σχέσεις, απαραίτητο είναι να ισχύουν ο νόμος και η γραμμικότητα του νόμου των *Lambert-Beer*. Αυτό διασφαλίζεται όταν:

- α. Το φως που χρησιμοποιείται είναι μονοχρωματικό. Συγκεκριμένα, όσο στενότερο είναι το εύρος του φάσματος φωτός που διέρχεται από τη σχισμή εξόδου του μονοχρωμάτορα, τόσο ακριβέστερη θα είναι η μέτρηση.
- β. Η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας βρίσκεται μέσα στα όρια στα οποία ισχύει ο νόμος των *Beer-Lambert* και δεν υπερβαίνει, συνήθως, την τιμή των 10^{-3} mol/L.
- γ. Το περιβάλλον έχει τον ίδιο δείκτη διάθλασης, σε όλες τις κατευθύνσεις, είναι δηλαδή ισότροπο και τα μόρια της ουσίας δεν αντιδρούν με συστατικά του περιβάλλοντος.
- δ. Τα μόρια της ουσίας δεν πρέπει να συμπυκνώνονται ούτε διαστέλλονται.

Περιορισμοί και έλεγχος στη χρήση φασματοφωτόμετρου. Κάθε φορά που μετράμε την απορρόφηση μιας ουσίας, στην πράξη μετράμε το σύνολο των απορροφήσεων της συγκεκριμένης ουσίας, του διαλύτη, των υπόλοιπων στοιχείων του διαλύματος, των πιθανών αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούμε και της κυψελίδας. Για να υπολογίσουμε ακριβώς την απορρόφηση της συγκεκριμένης ουσίας, παρασκευάζουμε το “τυφλό” του διαλύτη, την απορρόφηση του οποίου αφαιρούμε από την τελική απορρόφηση του δείγματος. Στην περίπτωση που χρησιμοποιούμε χρωμογόνο αντιδραστήριο, παρασκευάζουμε το “τυφλό” του

δείγματος, όπου το αντιδραστήριο έχει αντικατασταθεί με νερό. Γενικότερα, στο τυφλό των αντιδραστηρίων το δείγμα αντικαθίσταται με νερό. Το τελευταίο χρησιμοποιείται για το μηδενισμό του οργάνου.

Σημασία πρέπει να δοθεί στην καθαρότητα της κυψελίδας, στην ομαλότητα των επιφανειών της και την ακρίβεια της συγκέντρωσης των πρότυπων διαλυμάτων. Αλκαλικά διαλύματα δεν πρέπει να έρχονται σε παρατεταμένη επαφή με τις κυψελίδες λόγω αλληλεπίδρασής τους με το γυαλί. Ένα ήπιο απορροπαντικό ή μείγμα υδροχλωρίου, νερού και αιθανόλης σε αναλογία 1:3:4 είναι ικανοποιητικό για τον καθαρισμό τους.

Βασικά κριτήρια για τον έλεγχο αξιοπιστίας ενός φασματοφωτόμετρου είναι:

- Η ακρίβεια στην επιλογή μήκους κύματος. Η αλλαγή της βαθμονόμησης του μήκους κύματος πρέπει να συνεπάγεται και αλλαγή στην απορρόφηση.
- Η γραμμικότητα του μετρητή. Πρέπει να υπάρχει σταθερή αναλογία μεταξύ της έντασης της ακτινοβολίας που απορροφάται και της ένδειξης του μετρητή.
- Οι μικρές τιμές παράσιτης ακτινοβολίας.
- Η ακρίβεια μέτρησης. Διαλύματα βαθμονόμησης πρέπει να δίνουν συγκεκριμένες απορροφήσεις σε συγκεκριμένα μήκη κύματος.

Μείωση της παρεμπόδισης των μετρήσεων, που προέρχεται από το υπόβαθρο (*background*), μπορεί να επιτευχθεί με μέτρηση του “τυφλού”. Είναι δυνατό, επίσης, να γίνουν μετρήσεις σε 2 ή 3 μήκη κύματος χωρίς τη χρήση τυφλού. Στην πρώτη προσέγγιση, που είναι γνωστή και ως “bichromatic”, μετράται η απορρόφηση σε δύο μήκη κύματος, που το ένα αντιστοιχεί στο μέγιστο της απορρόφησης και το άλλο σε ένα σημείο κοντά στη βάση της κορυφής του φάσματος. Η διαφορά της απορρόφησης στα δύο μήκη κύματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας. Στη δεύτερη προσέγγιση μετράται η απορρόφηση στο μήκος κύματος, που αντιστοιχεί στο μέγιστο της απορρόφησης (λ_1) και σε άλλα δύο μήκη κύματος, τα οποία ισαπέχουν από το λ_1 . Από τις απορροφήσεις που λαμβάνονται υπολογίζεται η διορθωμένη απορρόφηση, η οποία είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας και ισούται με:

$$A_{\text{διορθωμένη}} = A_{\lambda_1} - [(A_{\lambda_2} + A_{\lambda_3})/2]$$

5.1.3. Φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης

Η φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης αποτελεί μια πολύ ευαίσθητη και εξειδικευμένη μέθοδο ανίχνευσης στοιχείων και ιχνοστοιχείων στην Κλινική Χημεία. Περίπου 70 στοιχεία μπορούν να προσδιοριστούν μεταξύ των οποίων είναι το ασβέστιο, το μαγνήσιο, το λίθιο, ο μόλυβδος, ο χαλκός, ο ψευδάργυρος και άλλα μέταλλα.

Η φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας χαρακτηριστικού μήκους κύματος από ουδέτερα άτομα, ενός στοιχείου που βρίσκονται σε κατάσταση ατμού. Το δείγμα με το προσδιοριζόμενο στοιχείο θερμαίνεται μέχρι την ατμοποίηση και, συνεπώς, την ατομοποίησή του. Η θέρμανση, η οποία γίνεται συνήθως με φλόγα ή σε κατάλληλο κλίβανο, οδηγεί στη διέγερση ενός μικρού κλάσματος των ατόμων, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό παραμένει στη θεμελιώδη κατάσταση και είναι ικανό να απορροφήσει χαρακτηριστική προσπίπτουσα ακτινοβολία. Οι ατμοί του στοιχείου έχουν την ικανότητα απορρόφησης ακτινοβολίας μήκους κύματος χαρακτηριστικού του μετάλλου. Ο μετρητής του οργάνου, στην περίπτωση αυτή, καταγράφει την ελάττωση της έντασης του φωτός.

Το βασικό στοιχείο ενός φασματοφωτόμετρου ατομικής απορρόφησης είναι η λυχνία κοίλης καθόδου, η οποία είναι κατασκευασμένη από το προσδιοριζόμενο μέταλλο και είναι διαφορετική για κάθε στοιχείο που εξετάζεται. Ανάμεσα στα δύο ηλεκτρόδια της λυχνίας κοίλης καθόδου εφαρμόζεται ρεύμα, οπότε άτομα του μετάλλου διαφεύγουν από την κάθοδο και μεταβαίνουν στο αέριο που βρίσκεται μέσα στη λυχνία. Έτσι, όταν τα άτομα του μετάλλου συγκρουστούν με τα άτομα του αερίου, χάνουν μέρος της ενέργειάς τους και εκπέμπουν χαρακτηριστική ακτινοβολία, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για την ακτινοβολήση του προς ανάλυση βιολογικού δείγματος.

Παράγοντες που μπορεί να συντελέσουν στη λανθασμένη εξαγωγή αποτελεσμάτων είναι:

- Χημικές αλληλεπιδράσεις των μεταλλικών ιόντων με τα συστατικά του προς ανάλυση δείγματος.
- Αλληλεπιδράσεις ιονισμού, όταν κάποια από τα θερμαινόμενα άτομα δεν μένουν στο αρχικό ενεργειακό επίπεδο, αλλά ιονίζονται. Στην ιονισμένη μορφή δεν μπορούν να απορροφή-

σουν το φως, οπότε η συγκέντρωσή τους παρουσιάζεται ελαττωμένη.

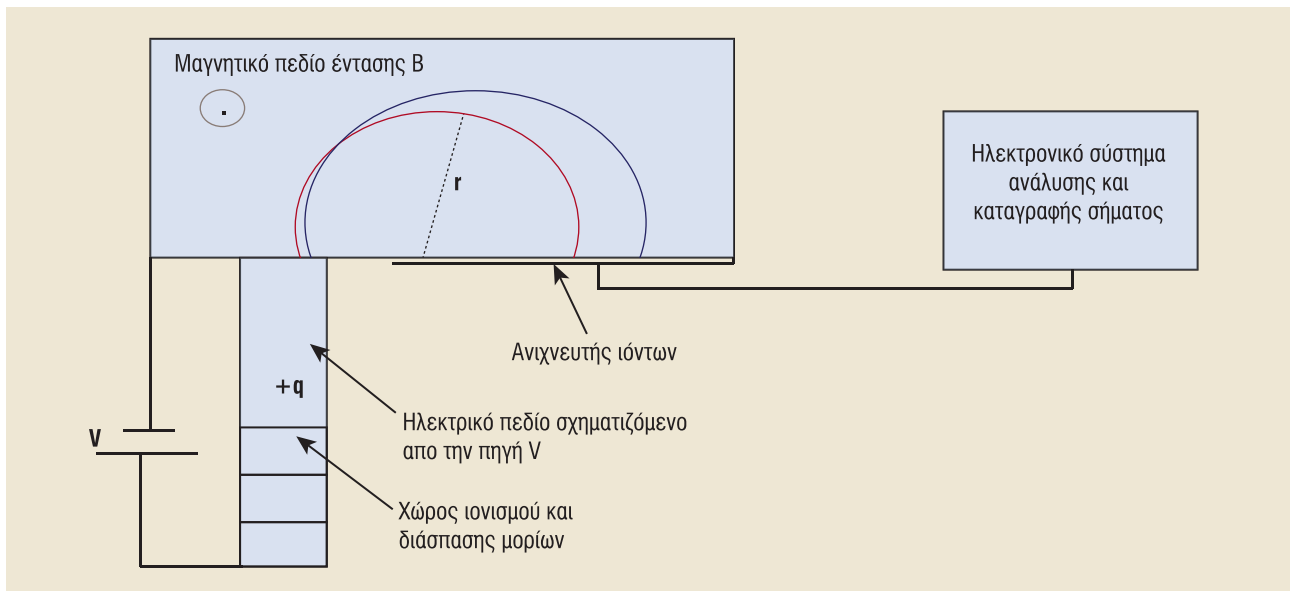
- Διαφορές στο περιβάλλον του δείγματος και του προτύπου (π.χ. ιοντική ισχύς, θερμοκρασία, ιξώδες).
- Έλλειψη σταθερών συνθηκών κατά τη δημιουργία ατομικού ατμού στο δείγμα και στο πρότυπο.

Ένα σημαντικό πρόβλημα στη φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης είναι το σήμα υπόβαθρου (background, θόρυβος), για την αντιμετώπιση του οποίου έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές, όπως η διόρθωση Zeeman. Στην τεχνική αυτή το νέφος των ατόμων του βιολογικού δείγματος τοποθετείται μέσα σε μαγνητικό πεδίο και ανάμεσα στο νέφος αυτό και την πηγή ακτινοβολίας παρατίθεται ένας πολωτής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Όταν το επίπεδο πόλωσης της ακτινοβολίας είναι κάθετο προς το μαγνητικό πεδίο, η ακτινοβολία της πηγής φωτός δεν απορροφάται από το νέφος των ατόμων. Αντίθετα, η απορρόφηση υπόβαθρου είναι ανεξάρτητη από την κατεύθυνση του επιπέδου πόλωσης του φωτός της πηγής, μπορεί να υπολογιστεί παρουσία του πολωτή και να αφαιρεθεί, στη συνέχεια, από την απορρόφηση του δείγματος.

5.1.4. Φασματομετρία μάζας

Η λειτουργία του φασματογράφου μάζας στηρίζεται στην κίνηση των φορτισμένων σωματιδίων μέσα σε ηλεκτρικό και, στη συνέχεια, σε μαγνητικό πεδίο. Η κίνηση στο ηλεκτρικό πεδίο προσδίδει στα φορτισμένα σωματίδια μια ταχύτητα u . Η κίνηση των φορτισμένων σωματιδίων σε μαγνητικό πεδίο έχει ως αποτέλεσμα να τους ασκείται δύναμη Laplace, η οποία τα αναγκάζει να διαγράφουν ημικυκλική τροχιά και να διαχωρίζονται βάσει του λόγου μάζας προς φορτίο. Προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός, αρχικά, τα μόρια με μηδενικό καθαρό συνολικό φορτίο ιονίζονται. Τα φορτισμένα μόρια χάνουν τη σταθερότητά τους και διασπώνται σε μικρότερα τμήματα. Τα ιονισμένα τμήματα επιταχύνονται σε ηλεκτρικό πεδίο και διαχωρίζονται κατά την ημικυκλική πορεία τους σε μαγνητικό πεδίο (Σχήμα 1). Απαραίτητη προϋπόθεση για κάτι τέτοιο είναι η επαναληπτικότητα κατά τη διαδικασία ιονισμού και διάσπασης ενός μορίου. Η ένταση του σήματος, με το οποίο ανιχνεύεται κάθε ιόν, εξαρτάται από τη συχνότητα με την οποία αυτό φτάνει στον ανιχνευτή και επομένως από τη συγκέντρωσή του.

Για τη φασματομετρία μαζών απαιτούνται πολύ μικρά ποσά της ουσίας, της τάξης των 10^{-3} –



ΣΧΗΜΑ 1 | Αρχή λειτουργίας του φασματογράφου μάζας. Μοριακό ιόν φορτίου q επιταχύνεται στο ηλεκτρικό πεδίο και η ενέργεια qV , που μεταφέρεται από το πεδίο στο ιόν, του προσδίδει κινητική ενέργεια $mu^2/2$. Έτσι, ισχύει $qV = mu^2/2$ (1). Το μαγνητικό πεδίο ασκεί στο ιόν δύναμη Laplace, ίση με quB , και το αναγκάζει να διαγράψει ημικυκλική τροχιά ακτίνας r με ταχύτητα u . Η δύναμη Laplace παίζει και το ρόλο της κεντρομόλου δύναμης, η οποία είναι ίση με mu^2/r . Έτσι, ισχύει $quB = mu^2/r$ (2). Από τις σχέσεις (1) και (2) προκύπτει ο τύπος $q/m = 2V/B^2r^2$, ο οποίος μας δίνει τη δυνατότητα υπολογισμού του λόγου φορτίου προς τη μάζα του ιόντος, καταγράφοντας τις τιμές των V , B και r .

10^{-9} g, και μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για το μοριακό βάρος και τα δομικά στοιχεία της ουσίας. Μια πολύ σημαντική εφαρμογή του φασματογράφου μάζας είναι η εύρεση της πρωτοταγούς δομής των πρωτεϊνών. Η συγκεκριμένη εφαρμογή στηρίζεται στο γεγονός ότι η παρουσία ενός συγκεκριμένου συνόλου ιόντων αμινοξέων και ολιγοπεπτιδίων μπορεί να προέλθει αποκλειστικά από μία και μόνο αμινοξική αλληλουχία της αναλυόμενης πρωτεΐνης.

5.1.5. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η αρχή λειτουργίας της φασματοσκοπίας του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR: *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*) στηρίζεται στο μαγνητικό πεδίο που δημιουργεί η κίνηση των φορτισμένων πυρήνων των ατόμων γύρω από τον άξονά τους (πυρηνικό spin), προκαλώντας μια μαγνητική ροπή. Το NMR, συνήθως, λειτουργεί με βάση το φορτίο των πρωτονίων (πυρήνες υδρογόνου, H^+), γι' αυτό και μπορεί να αναφερθεί και ως PMR (*proton magnetic resonance*), αν και σε βιοχημικές μελέτες χρησιμοποιούνται επίσης τα ισότοπα ^{13}C , ^{15}N και ^{31}P .

Κατά την εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου κάθε φορτισμένος πυρήνας παίρνει δύο προσανατολισμούς σε σχέση με το εξωτερικό πεδίο: τον προσανατολισμό χαμηλής ενέργειας με τη μαγνητική του ροπή παράλληλα προς τη διεύθυνση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (παράλληλα spin) ή τον προσανατολισμό σε υψηλό ενεργειακό επίπεδο (αντιπαράλληλα spin).

Η μετάβαση των φορτισμένων πυρήνων (H^+) από τον παράλληλο στον αντιπαράλληλο προσανατολισμό (συντονισμός) γίνεται με απορρόφηση ακτινοβολίας, της οποίας η συχνότητα ν συνδέεται με την ένταση (B) του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου με τη σχέση

$$\nu = \gamma B / 2\pi$$

όπου γ είναι ο γυρομαγνητικός λόγος του φορτισμένου πυρήνα.

Η συχνότητα ν βρίσκεται στην περιοχή των βραχέων ραδιοκυμάτων (40 MHz για τον πυρήνα του υδρογόνου) και το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο που εφαρμόζεται είναι τη τάξης των εκατοντάδων milli-Tesla (mT). Η λήψη φασμάτων NMR γίνεται με μεταβολή της έντασης του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, ενώ κρατείται σταθερή η συ-

χνότητα των ραδιοκυμάτων που προσπίπτουν στην ουσία. Σε κάποια τιμή της έντασης B έχουμε πυρηνικό συντονισμό, οπότε παρατηρείται το σήμα απορρόφησης των ραδιοκυμάτων.

Το μοριακό περιβάλλον του πρωτονίου και η παρουσία γειτονικών πρωτονίων είναι αυτά που καθορίζουν την τιμή του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, μέσα στο οποίο συντονίζεται το πρωτόνιο. Από το γράφημα του αναλυτή μπορούμε να εξαγάγουμε συμπεράσματα για το είδος και τον αριθμό των πρωτονίων που υπάρχουν σε μια συγκεκριμένη οργανική χημική ένωση και, κατ' επέκταση, για το συντακτικό τύπο της ένωσης.

Οι αρχές της φασματοσκοπίας NMR αποτελούν βάση της μαγνητικής τομογραφίας (MRI). Στο NMR τα οστά που περιέχουν μικρό ποσοστό H_2O κατ' επέκταση λίγους πυρήνες υδρογόνου, δε δίνουν σήματα και έτσι δεν μπορούν να απεικονισθούν. Σε αντίθεση με άλλες ακτινολογικές τεχνικές (κοινές ακτινογραφίες X, αξονική τομογραφία) περισσότερα σήματα NMR δίνουν υδατοβριθείς περιοχές του σώματος. Η συγκεκριμένη ιδιότητα είναι πολύτιμη, αφού μπορούν να απεικονισθούν και να μελετηθούν με λεπτομέρεια όργανα που βρίσκονται σε κοιλότητες οστών, όπως είναι ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός. Η τεχνική της μαγνητικής τομογραφίας στηρίζεται στην αντιδιαμετρική μετατόπιση της πηγής του μαγνητικού πεδίου και του ανιχνευτή γύρω από το εξεταζόμενο όργανο, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την απεικόνιση τομής του οργάνου.

Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί κύριο εργαλείο του νεοσύστατου κλάδου των Βιοεπιστημών, *metabolomics* - *metabonomics* (μεταβολομική - μεταβονομική). Η επιστήμη της "μεταβολομικής" ή της "μεταβονομικής" αφορά στην πολυπαραμετρική ποσοτική ανάλυση μεταβολικών ανταποκρίσεων των ζώντων συστημάτων υπό την επίδραση παθοφυσιολογικών καταστάσεων ή γενετικών τροποποιήσεων.

5.1.6. Φθορισμομετρία

Το φαινόμενο του φθορισμού στηρίζεται στην αλληλεπίδραση της ενέργειας με την οποία ακτινοβολείται κάποιο μόριο ή σωματίδιο, που βρίσκεται σε διάλυμα, με το μόριο αυτό ή το σωματίδιο. Ο φθορισμός εμφανίζεται, όταν το μόριο απορροφά ενέργεια με μορφή φωτονίων, σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος (υπεριώδης ή ορατή ακτινοβολία), διεγείρεται σε χρόνο 10^{-15} sec και την εκπέμπει σε μεγαλύτερο μήκος κύματος (ορατή