

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13^ο

Η ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΑΙ ΟΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

Σύνοψη

Στο κεφάλαιο, αυτό επιχειρείται μια εισαγωγή στη φασματοσκοπία υπερύθρου και σε εφαρμογή της στη κλινική χημεία και γενικότερα στη διαγνωστική. Η φασματοσκοπία υπερύθρου χρησιμοποιείται στο κλινικό εργαστήριο για την ποιοτική ανάλυση, κυρίως, ουρολίων, με σκοπό την άμεση ή έμμεση διάγνωση νοσολογικών καταστάσεων. Περιγράφεται η αρχή λειτουργίας της μεθόδου, αλλά δίνεται έμφαση στη ευρέως χρησιμοποιούμενη φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμούς Fourier (FTIR). Περιγράφεται η οργανολογία, η διαδικασία λήψης φάσματος, καθώς και η αξιολόγησή του για την ποιοτική ανάλυση του ουρολίου.

Προαπαιτούμενες γνώσεις

Απαιτούνται βασικές γνώσεις χημείας, φυσικής οπτικής καθώς και αυτές του Κεφαλαίου 1.

13.1 Εισαγωγή

13.1.1 Η νεφρολιθίαση

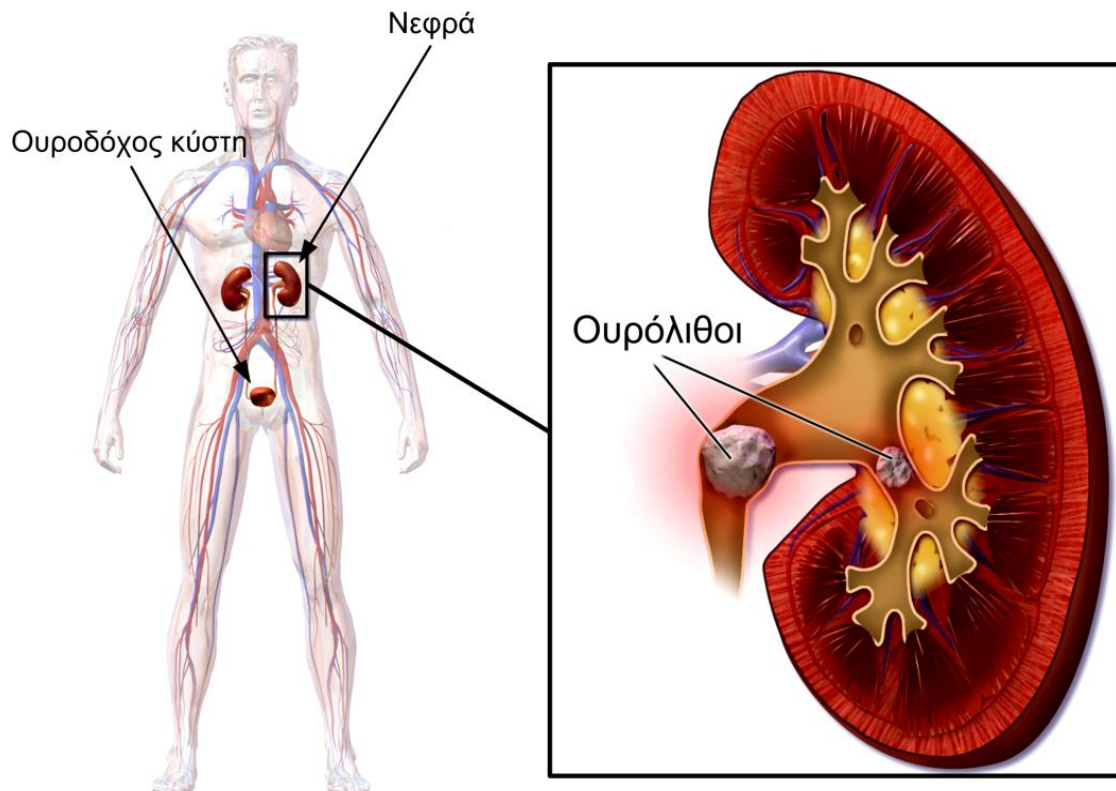
Η **ουρολιθίαση** είναι η παθολογική κατάσταση κατά την οποία ένας ή περισσότεροι λίθοι σχηματίζονται σε κάποιο σημείο των νεφρών, των ουρητήρων, της ουροδόχου κύστης και της ουρήθρας, δηλαδή σε κάποιο σημείο του ουροποιητικού συστήματος (Σχήμα 13.1) και εκδηλώνεται με κωλικό, δυσουρικά ενοχλήματα και μακροσκοπική ή μικροσκοπική αιματουρία. Αντίστοιχα, **νεφρολιθίαση** είναι ο σχηματισμός λίθων στα νεφρά, δηλαδή στην ανώτερη αποχετευτική μοίρα του ουροποιητικού συστήματος.

Η ουρολιθίαση προσβάλλει το 1 με 5% του πληθυσμού στις βιομηχανικές χώρες, συνήθως άτομα ηλικίας 20 - 40 ετών, με τους άνδρες να προσβάλλονται συχνότερα από τις γυναίκες σε αναλογία 3:1, λόγω της μεγαλύτερης ουρήθρας.

Τα αίτια εμφάνισης της ουρολιθίας μπορεί να είναι ποικίλα, όπως η υπερουριχαιμία (αυξημένο ουρικό οξύ), η ουρική αρθρίτιδα, γενετική προδιάθεση, διαβήτης, λευχαιμία, παράσιτα της κύστης, βακτήρια, ανατομικά προβλήματα, εγκλωπώματα, υπερπαραθυροειδισμός, ακινησία και χρήση καθετήρα, υπερασβεστιουρία, υπερβιταμίνωση D, πολλαπλό μυέλωμα, το σύνδρομο Cushing, τα καρκινώματα (με ή χωρίς οστικές μεταστάσεις), σπογγοειδής νεφρός, ιδιοπαθής σωληναριακή οξέωση, δηλητηριάσεις με οξαλικό οξύ (διάφορα βιομηχανικά προϊόντα με αιθυλική γλυκόζη και με μεθοξυφουράνιο), πρωτοπαθής υπεροξαλουρία (κληρονομικό νόσημα που εμφανίζεται σε παιδιά και συνδέεται με αυξημένη απορρόφηση οξαλικών), νεφρική ανεπάρκεια, παθήσεις του εντέρου, εκτεταμένες εντερεκτομές, έλλειψη χολικών αλάτων, κυστινουρία, φάρμακα που λαμβάνονται στην κορτικοθεραπεία, ένδεια βιταμίνης B6, κ.ά.

Ο τρόπος ζωής, το pH των ούρων, η μειωμένη πρόσληψη υγρών, η αυξημένη άσκηση, που συνοδεύεται με αφυδάτωση και φυσικά η διατροφή, είναι επίσης παράγοντες που ευνοούν το σχηματισμό λίθων στα ούρα.

Στη λιθιασική νόσο υπάρχει και εποχιακή κατανομή, αφού έχει διαπιστωθεί αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της νόσου στους μήνες Ιούλιο, Αύγουστο και Σεπτέμβριο, στους οποίους η αυξημένη εφίδρωση προκαλεί αποβολή υπέρπυκνων ούρων, με αυξημένες συγκεντρώσεις λιθογόνων αλάτων.



Σχήμα 13.1 Περιοχές όπου μπορούν να εντοπιστούν λίθοι στο ουροποιητικό σύστημα

Εκτεταμένες αναφορές υπάρχουν στη βιβλιογραφία σχετικά με τον ρόλο του πόσιμου νερού στην ουρολιθίαση και αφορούν την ποσότητα του προσλαμβανόμενου νερού, καθώς και την περιεκτικότητά του σε ιχνοστοιχεία. Υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με το αν η σκληρότητα του νερού, η περιεκτικότητά του δηλαδή σε ορισμένα δυσδιάλυτα άλατα, σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα της νόσου. Η αυξημένη πρόσληψη νερού και η αυξημένη παραγωγή ούρων, ελαττώνει τη συχνότητα της νόσου, στα άτομα με προδιαθεσικούς παράγοντες, εξαιτίας της ελάττωσης της συγκέντρωσης και του χρόνου παραμονής στα ούρα των αλάτων που σχηματίζουν τους λίθους.

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η πιθανότητα σχηματισμού νέου λίθου ένα χρόνο μετά το αρχικό επεισόδιο νεφρολιθίασης φθάνει το 10%, ενώ μέσα σε 5-7 χρόνια το ποσοστό υποτροπής ανέρχεται στο 50%, καθώς και ότι στο 25% των ασθενών με λιθίαση αναφέρεται ύπαρξη λιθίασης και σε άλλα μέλη της οικογένειας, κάτι που πιθανόν να οφείλεται στις ίδιες διατροφικές συνήθειες και συνθήκες διαβίωσης (Fleish et al.,1976). Τέλος, πρέπει να τονιστεί ότι οι χολόλιθοι (λίθοι στη χολή) και οι ουρόλιθοι δε συσχετίζονται. Διαμορφώνονται σε διαφορετικές περιοχές του σώματος και η ύπαρξη χολόλιθου δε σημαίνει απαραίτητα ότι θα αναπτυχθούν και ουρόλιθοι.

13.1.2 Η σύσταση των ουρόλιθων

Οι ουρόλιθοι είναι πολυκρυσταλλικά συσσωματώματα και αποτελούνται από ποικίλες ποσότητες κρυσταλλοειδούς και οργανικού υλικού (Drach et al.,1992).

Το 75% περίπου των λίθων περιλαμβάνει κυρίως άλατα του ασβεστίου. Από αυτούς οι μισοί περίπου είναι λίθοι οξαλικού ασβεστίου. Το υπόλοιπο μισό των ασβεστούχων λίθων αποτελούνται από οξαλικό ασβέστιο μαζί με άλατα του φωσφορικού ασβεστίου.

Γενικά, οι περισσότεροι από τους νεφρικούς λίθους αποτελούνται από μία ή περισσότερες από τις ακόλουθες ενώσεις:

- 75% οξαλικό ασβέστιο (CaC_2O_4),

- 15% εναμμώνιο φωσφορικό μαγνήσιο (Struvite, $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$),
- 1 - 5% μυκοπρωτεΐνη (γλυκοπρωτεΐνη, αποτελούμενη κυρίως από μυκοπολυσακχαρίτες),
- ουρικό οξύ (2,6,8,τριόξυ-πουρίνη, $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$),
- κυστίνη (2R,2'R)-3,3'-διθειο-δισ(2-αμινο-προπανοϊκό οξύ, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$).

Στον Πίνακα 13.1, δίνονται οι σημαντικότερες χημικές ενώσεις, που απαντώνται σε ουρόλιθους, τα φυσικά χαρακτηριστικά των λίθων, το pH των ούρων καθώς και οι αιτίες σχηματισμού του λίθων.

Χημική ένωση	pH ούρων	Φυσικά χαρακτηριστικά	Αιτιολογία
Ουρικό οξύ ή ουρικό άλας	όξινο	Υφή: σκληροί και λείοι. Σχήμα: Ωοειδές Χρώμα: καφέ, καφεκίτρινο, κίτρινέρυθρο, ερυθρωπό. Πυρήνας και περιφερική διάταξη αλάτων κατά στοιβάδες	Ουρική αρθρίτιδα (Gout) / Αύξηση ουρικού οξέος στο αίμα / αύξηση ουρικού οξέος στα ούρα/ δίαιτα υψηλή σε πουρίνες.
Οξαλικό ασβέστιο	Ποικίλλει	Υφή: Σκληροί με ανώμαλη επιφάνεια. Σχήμα: ανάλογο με τη θέση εύρεσής τους. Χρώμα: βαθύ καφέ προς μαύρο ή σκούρο βαθύ πράσινο.	Πυκνά ούρα / Υπερασβεστοουρία / δηλητηρίαση με βιταμίνη D / Υπερθυρεοειδισμός / σαρκοειδωση / αλκαλικό σύνδρομο / Οστεοπόρωση / Νεφρική σωληναριακή οξέωση / Ιδιοπαθής υπερασβεστοουρία / Υπεροξαλουρία
Φωσφορικό ασβέστιο και φωσφορικό μαγνήσιο	Αλκαλικό	Υφή: Μαλακοί και λείοι. Σχήμα: ανάλογο με τη θέση εύρεσης και Χρώμα: λευκό	Νεφρική σωληνώδης οξέωση / Πρόσληψη αλκαλικών τροφών / Λοίμωξη από μικροοργανισμούς που διασπούν την ουρία (παραγωγή μικτών λίθων)
Κυστίνη	Όξινο	Σχήμα: ομαλοί και στρογγυλοί Χρώμα: ασπροκίτρινοι, διαφανείς ή και κηρώδεις.	Κυστινουρία πρωτογενής
Ξανθίνη		Σχήμα: μοιάζουν με τους λίθους του ουρικού οξέος. Χρώμα: καφεκίτρινοι.	
Ανθρακικό ασβέστιο	Αλκαλικό	Σχήμα: μοιάζουν με τους φωσφορικούς λίθους αλλά είναι πιο σκληροί. Χρώμα: άσπρο προς μεζ	

Πίνακας 13.1 Περιέχει τις σημαντικότερες χημικές ενώσεις, που απαντώνται σε ουρόλιθους, το pH των ούρων, τα φυσικά χαρακτηριστικά των λίθων, καθώς και οι αιτίες σχηματισμού του λίθων.

Οι περισσότεροι λίθοι, σε ποσοστό 60 - 70%, είναι μικτοί, δηλαδή αποτελούνται από περισσότερες από μία ουσίες. Από τις ουσίες αυτές, η κυστίνη προέρχεται από κληρονομική νόσο.

Ο σχηματισμός του λίθου οφείλεται στην εναπόθεση κρυσταλλοειδών ουσιών γύρω από έναν κεντρικό πυρήνα, που αποτελείται από μια οργανική ουσία. Η οργανική ουσία είναι κυρίως πρωτεΐνη και καλείται matrix. Άλλες ουσίες που συγκροτούν το matrix είναι τα φωσφολιπίδια, οι υδαάνθρακες και το νερό. Αυτή η πρωτεϊνική ουσία προέρχεται από τα σωληνάκια του νεφρού, ενώ η καθίζηση των κρυσταλλοειδών σωμάτων εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους αλλά και το pH.

Στον Πίνακα 13.2, δίνονται οι κυριότερες κρυσταλλοειδείς ουσίες που απαντώνται σε ουρόλιθους.

Ουσία	Ορυκτολογικό όνομα	Χημικός τύπος
Οξαλικά		
Μονοϋδρικό οξαλικό ασβέστιο	Βεβελίτης	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Διϋδρικό οξαλικό ασβέστιο	Βεντελίτης	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Φωσφορικά		
Υδροξυαπατίτης	Υδροξυαπατίτης	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Καρβονοαπατίτης	Καρβονοαπατίτης	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3, \text{OH})_6(\text{OH})_2$
Διϋδρικό υδρογονούχο φωσφορικό ασβέστιο	Βρουσίτης	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
Φωσφορικό τριασβέστιο	Whitlockite	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Φωσφορικό οκτασβέστιο	--	$\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$
Εναμμώνιο φωσφορικό μαγνήσιο	Στρουβίτης	$\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Τριϋδρικό φωσφορικό υδρογονούχο μαγνήσιο	Newberyite	$\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
Ουρικό οξύ		
Άνυδρο ουρικό οξύ	--	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$
Διϋδρικό ουρικό οξύ	--	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Ουρικά		
Εναμμώνιο ουρικό οξύ	--	$\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{NH}_4$
Μονοϋδρικό νατριούχο άλας του ουρικού οξέος	--	$\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$

Πίνακας 13.2 Κρυσταλλοειδείς ουσίες που απαντώνται σε ουρολίθους.

13.1.3 Μακροσκοπική εξέταση των ουρολίθων

Οι προς ανάλυση λίθοι τοποθετούνται σε ένα καθαρό ποτήρι και πλένονται προσεκτικά με κρύο νερό βρύσης, για την απομάκρυνση του αίματος και της βλέννας.

Αρχικά, εξετάζονται τα φυσικά χαρακτηριστικά δηλαδή το χρώμα, το σχήμα και το μέγεθός τους. Οι ουρολίθοι προσλαμβάνουν διάφορα σχήματα ανάλογα με τη χημική τους σύσταση. Διαφέρουν μεταξύ τους στη δομή, στο σχήμα και το χρώμα. (Φωτογραφία 13.1). Με τη βοήθεια μεγεθυντικού φακού, μπορεί να εκτιμηθεί αδρά η σύσταση του λίθου, δηλαδή αν αποτελείται από μία ή περισσότερες ουσίες.



Φωτογραφία 13.1 Διάφοροι τύποι ουρολίθων.

13.1.4 Ποιοτική ανάλυση των Ουρολίθων

Η εύρεση της χημικής σύστασης των ουρολίθων είναι βασικής σημασίας, προκειμένου να προγραμματιστεί η κατάλληλη φαρμακευτική ή διατροφική θεραπεία. Για την ποιοτική ανάλυση των ουρολίθων μπορούν να χρησιμοποιηθούν χημικές ή φυσικές μέθοδοι. Στις φυσικές μεθόδους ανήκει η υπέρυθη φασματοσκοπία, η οποία ανιχνεύει κυρίως ποιοτικά τη σύσταση των ουρολίθων. Πρόκειται για μέθοδο, εξαιρετικά γρήγορη και αξιόπιστη.

13.2 Υπέρυθη φασματοσκοπία

Η υπέρυθη φασματοσκοπία (Infrared Spectroscopy) είναι μια από τις πλέον συνηθισμένες και ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους ενόργανης ανάλυσης (Skoog et al., 2014· Βαλαβανίδης, 2006). Χρησιμοποιείται τόσο για τη διερεύνηση της δομής μιας χημικής ένωσης, όσο και για τον έλεγχο της καθαρότητάς της.

13.2.1 Υπέρυθη ακτινοβολία

Η υπέρυθη ακτινοβολία καλύπτει την περιοχή μηκών κύματος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος από 0,78 έως 1000 μm (Σχήμα 13.2). Σε αντίθεση με τη φασματοσκοπία υπεριώδους και ορατού, στη φασματοσκοπία υπέρυθρου αντί του μήκους κύματος της ακτινοβολίας, λ , χρησιμοποιείται ο κυματαριθμός, ν , για τον οποίο ισχύει:

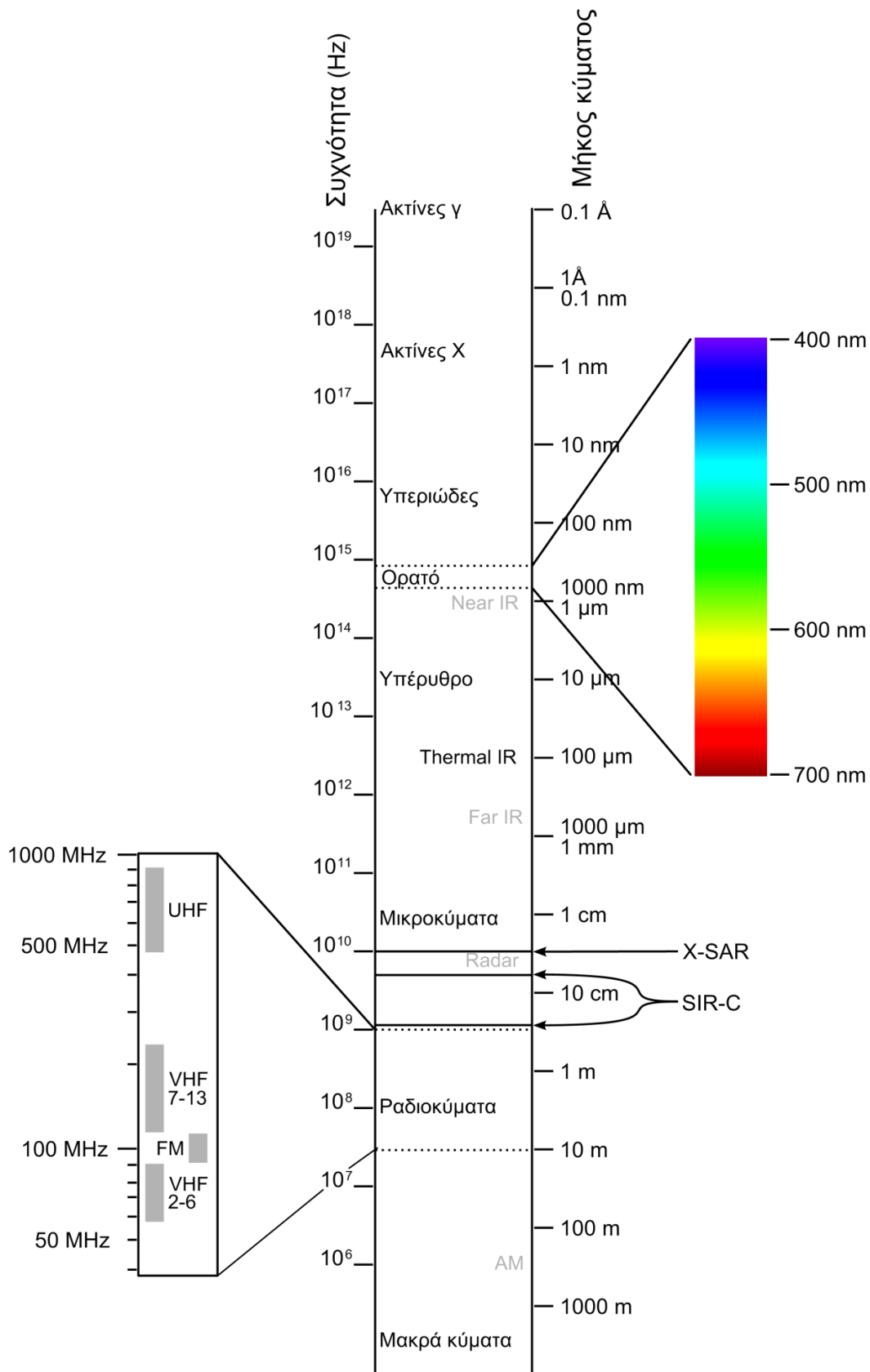
$$\nu(\text{cm}^{-1}) = \frac{1}{\lambda(\text{cm})} \quad (\text{Εξίσωση 13.1})$$

Η φασματική περιοχή της υπέρυθρης ακτινοβολίας μπορεί να διαιρεθεί σε τρεις υποπεριοχές: την εγγύς υπέρυθη (NIR, 0,75 – 3 μm), τη μέση υπέρυθη (MWIR, 3 – 30 μm) και την άπω υπέρυθη περιοχή (FIR, 30 - 1000 μm). Στον Πίνακα 13.3 δίνονται οι παραπάνω περιοχές, με το αντίστοιχο εύρος μηκών κύματος σε μm και κυματαριθμών σε cm^{-1} .

εριοχή	Μήκος κύματος / μm	Κυματαριθμός / cm^{-1}
Εγγύς Υπέρυθη	0,75 - 3	13300 - 3330
Μέση Υπέρυθη	3 - 30	4000 - 330
Άπω Υπέρυθη	30 - 1000	330 - 10

Πίνακας 13.3 Περιοχές υπέρυθρης ακτινοβολίας, η αντίστοιχη περιοχή μηκών κύματος και η αντίστοιχη περιοχή κυματαριθμών.

Τα περισσότερα φάσματα υπέρυθρου λαμβάνονται και αξιολογούνται στην περιοχή 4000 – 400 cm^{-1} .



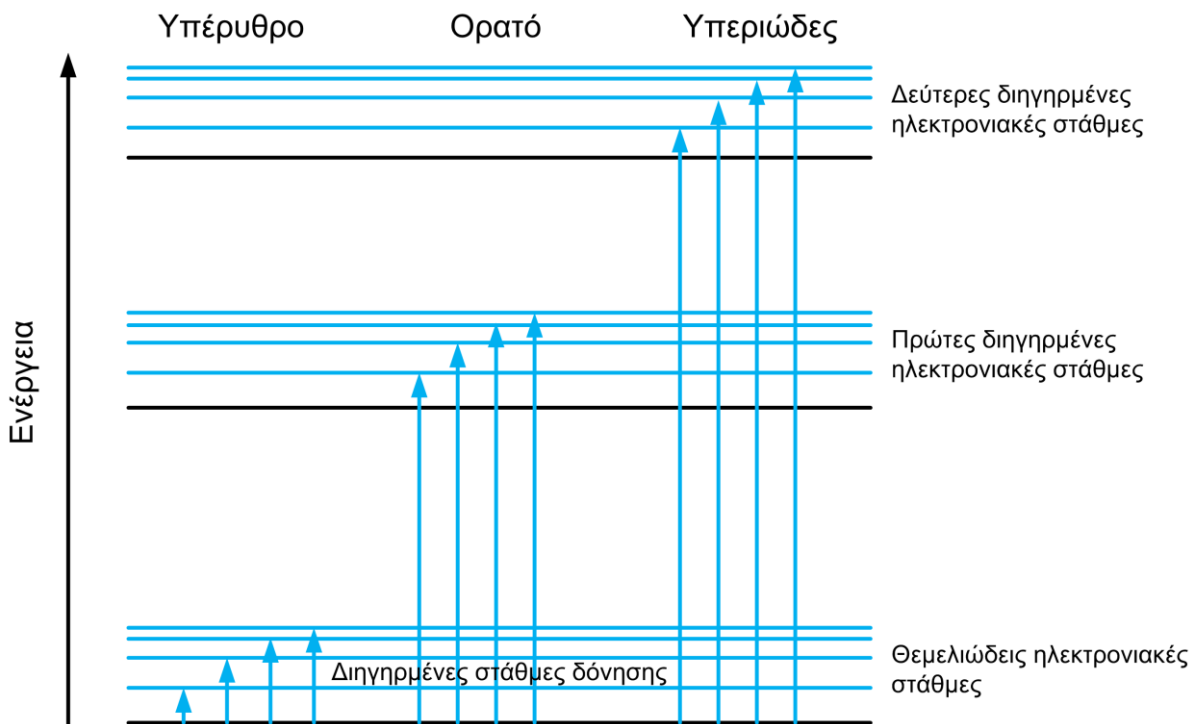
Σχήμα 13.2 Περιοχές φάσματος ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

13.2.2 Αρχή Φασματοσκοπίας Υπέρυθρου

Στο Σχήμα 13.3, παρουσιάζονται διαφορετικά ενεργειακά επίπεδα του ίδιου μορίου. Οι τρεις ομάδες οριζόντιων γραμμών, αντιστοιχούν σε τρεις διαφορετικές, ενεργειακά, ηλεκτρονιακές διαμορφώσεις (configurations). Η χαμηλότερης ενέργειας, πιο σταθερή ηλεκτρονιακή διαμόρφωση είναι αυτή της θεμελιώδους κατάστασης (ground state electron configuration). Τα άτομα των μορίων, ακόμα και όταν βρίσκονται στη θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση, δε μένουν ακίνητα, αλλά εκτελούν δονητικές και περιστροφικές κινήσεις.

Όταν ακτινοβολία, με μήκη κύματος στην υπεριώδη και ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, αλληλεπιδράσει με ένα δείγμα, ηλεκτρόνια των ατόμων του δείγματος διεγείρονται σε υψηλότερα, ενεργειακά, τροχιακά (τέτοιες διεγέρσεις φαίνονται στη μεσαία και δεξιά ομάδα κάθετων γραμμών, για την ορατή και υπεριώδη ακτινοβολία, αντίστοιχα). Ακτινοβολία με μήκη κύματος στην υπέρυθη περιοχή, έχει χαμηλότερη ενέργεια από αυτή στην ορατή ή υπεριώδη περιοχή και για αυτό το λόγο, μπορεί να διεγείρει μόνο τις δονήσεις των μορίων, στην ίδια ηλεκτρονιακή διαμόρφωση (στάθμη). Τέτοιες διεγέρσεις φαίνονται στην αριστερή ομάδα κάθετων γραμμών.

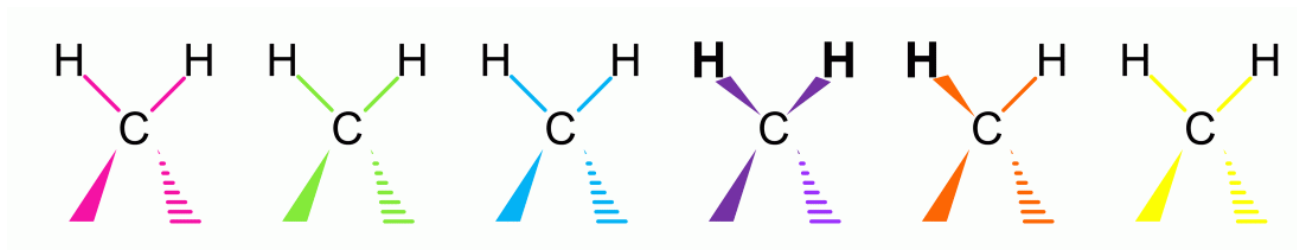
Όταν η υπέρυθη ακτινοβολία αλληλεπιδράσει με το δείγμα που μελετάται, τα μόρια διεγείρονται, αυξάνοντας έτσι την ενέργεια δόνησης και περιστροφής τους. Για να μπορούν τα μόρια του δείγματος να απορροφήσουν στο υπέρυθρο φάσμα, θα πρέπει η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να συμπίπτει με τη συχνότητα δόνησης των ατόμων του δεσμού. Οι συχνότητες, με τις οποίες δονούνται τα άτομα στο μόριο, εξαρτώνται από τις μάζες των ατόμων (τα πιο βαριά μόρια δονούνται σε χαμηλότερες συχνότητες), τον τύπο του δεσμού (πολλοί και ισχυροί δεσμοί δονούνται σε υψηλότερες συχνότητες) και το σχήμα του μορίου.



Σχήμα 13.3 Ενεργειακά επίπεδα ηλεκτρονίων του μορίου και απορρόφηση ακτινοβολίας.

Οι δονήσεις που λαμβάνουν χώρα σε ένα μόριο διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τις δονήσεις τάσης (stretching modes), όταν τα άτομα πλησιάζουν και απομακρύνονται μεταξύ τους κατά μήκος του δεσμού και τις δονήσεις κάμψης (bending modes), όταν τα άτομα των δεσμών κινούνται με τέτοιο τρόπο, ώστε να αλλάζει η γωνία των δεσμών. Εκτός από τις δονήσεις τάσης και κάμψης, υπάρχουν και άλλα είδη παραμόρφωσης της

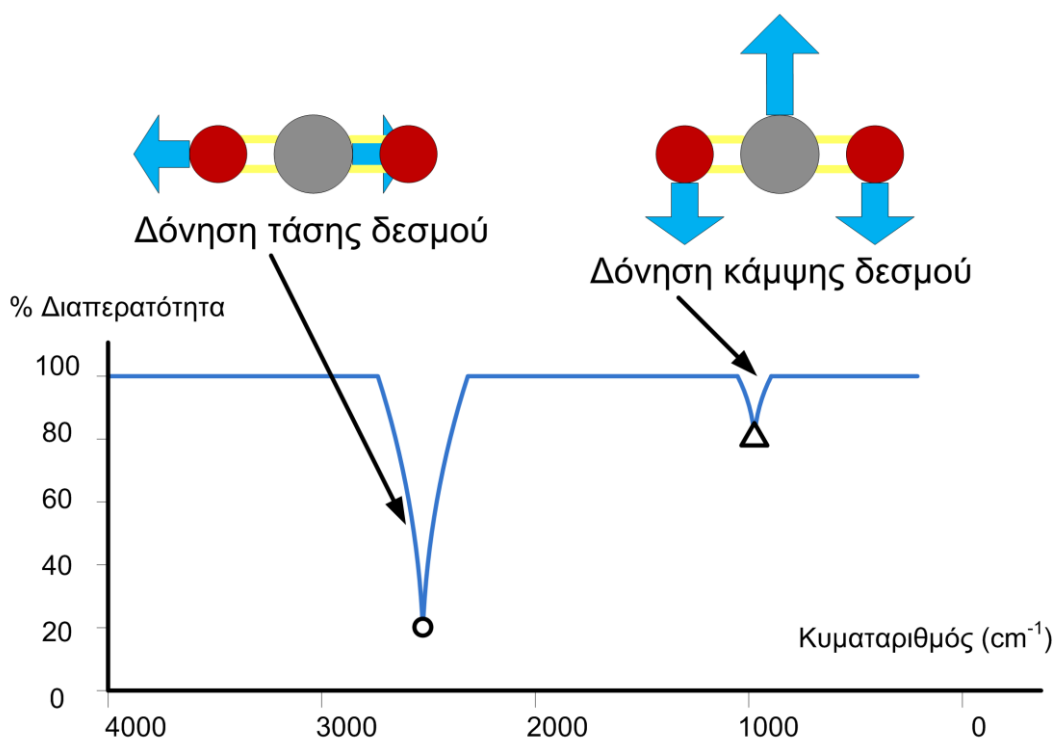
δομής των μορίων όπως, όταν αυτό σείεται (wagging mode), κλυδωνίζεται (rocking mode), στρεβλώνεται (twisting mode) ή έχει ψαλιδοτή κίνηση (scissoring mode) (Animation 13.1).



Animation 13.1 Τύποι δονήσεων μορίων. Οι δεσμοί του άνθρακα με τα άτομα υδρογόνου, της ίδιας ένωσης, εμφανίζονται σε διαφορετικές θέσεις στον χώρο.

Ο αριθμός των τρόπων δόνησης ενός μορίου είναι $3N-5$ για γραμμικά μόρια και $3N-6$ για μη γραμμικά μόρια, όπου N ο αριθμός των ατόμων του μορίου. Π.χ το μόριο του CO_2 , που είναι τριατομικό, γραμμικό μόριο έχει 4 τρόπους δόνησης: μία (1) συμμετρική δόνηση τάσης του δεσμού C-O, δύο (2) δονήσεις κάμψης των δεσμών O-C-O και μία (1) μη συμμετρική δόνηση τάσης του δεσμού C-O (Animation 13.2).

Εντούτοις, στο φάσμα υπεράυθρου του CO_2 (Σχήμα 13.4) εμφανίζονται δύο κορυφές διαπερατότητας, σε 2338 cm^{-1} και 581 cm^{-1} . Η μεν πρώτη αποδίδεται στη μη συμμετρική δόνηση τάσης του δεσμού C-O, η δε δεύτερη στις δονήσεις κάμψης, οι οποίες απορροφούν στην ίδια συχνότητα.



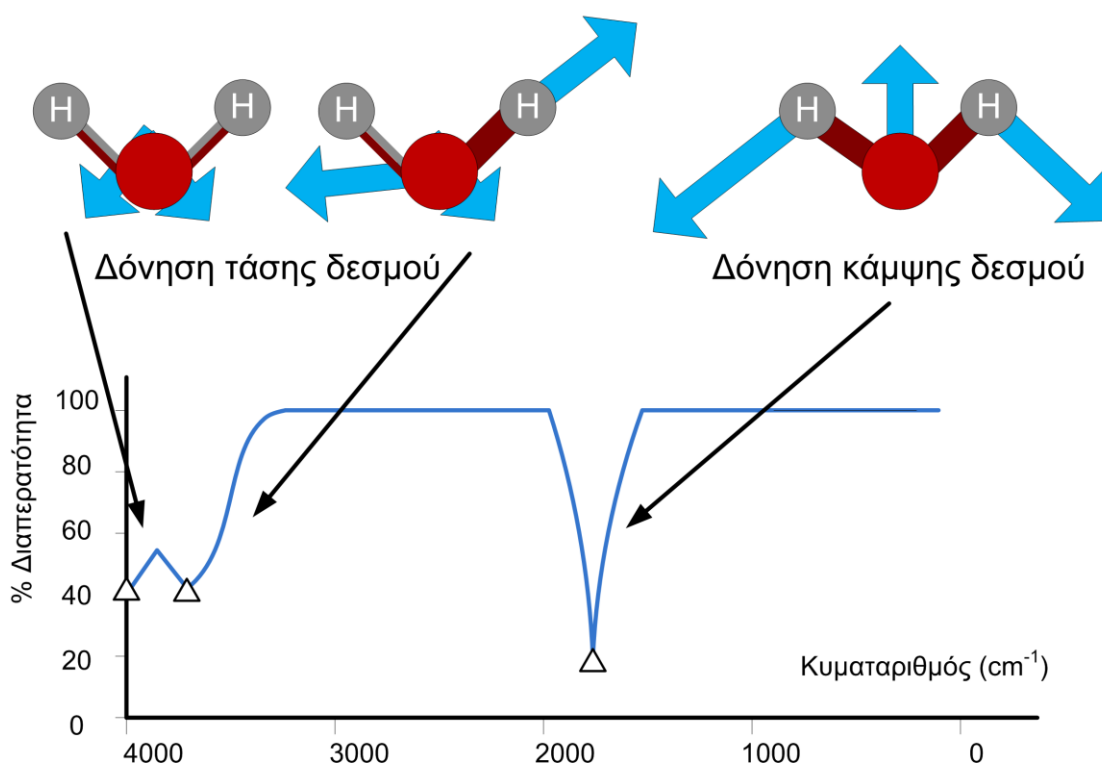
Σχήμα 13.4 Φάσμα διαπερατότητας του CO_2 .



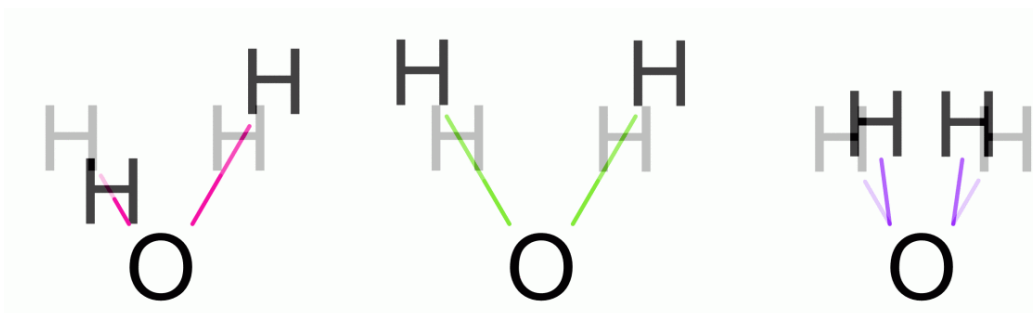
Animation 13.2 Τύποι δονήσεων του μορίου CO_2 .

Αυτό συμβαίνει γιατί, όταν η δόνηση ενός δεσμού είναι συμμετρική, δεν παρατηρείται απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας. Για να υπάρξει απορρόφηση στην υπέρυθη περιοχή, θα πρέπει να υπάρχει μεταβολή της διπολικής ροπής κατά τη διάρκεια της δόνησης. Σε αντίθετη περίπτωση, η δόνηση είναι ανενεργή στην υπέρυθη περιοχή. Όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολικής ροπής, τόσο ισχυρότερη είναι η απορρόφηση.

Το μόριο του H_2O που είναι τριατομικό, μη γραμμικό μόριο έχει 3 τρόπους δόνησης: μία (1) συμμετρική δόνηση τάσης του δεσμού H-O, μία (1) δόνηση κάμψης των δεσμών H-O-H και μία (1) μη συμμετρική δόνηση τάσης του δεσμού H-O (Σχήμα 13.5, Animation 13.3).



Σχήμα 13.5 Τύποι δονήσεων και κορυφές διαπερατότητας του μορίου H_2O .



Animation 13.3 Τύποι δονήσεων του μορίου H_2O .

13.2.3 Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier

Στη συνήθη φασματοσκοπία υπέρυθρου (dispersive IR spectroscopy), η πολυχρωματική ακτινοβολία της πηγής αναλύεται με χρήση μονοχρωμάτων (πρίσμα ή φράγμα) και ανιχνεύεται κατά συχνότητες $\nu + \Delta\nu$, όπου το $\Delta\nu$ καθορίζεται από το εύρος των σχισμών του φωτομέτρου. Για τη μέση υπέρυθρη περιοχή, ως πηγή της πολυχρωματικής ακτινοβολίας χρησιμοποιείται συνήθως καρβίδιο του πυριτίου (silicon carbide ή SiC) θερμαινόμενο στους 1200 K (Smith et al., 1968).

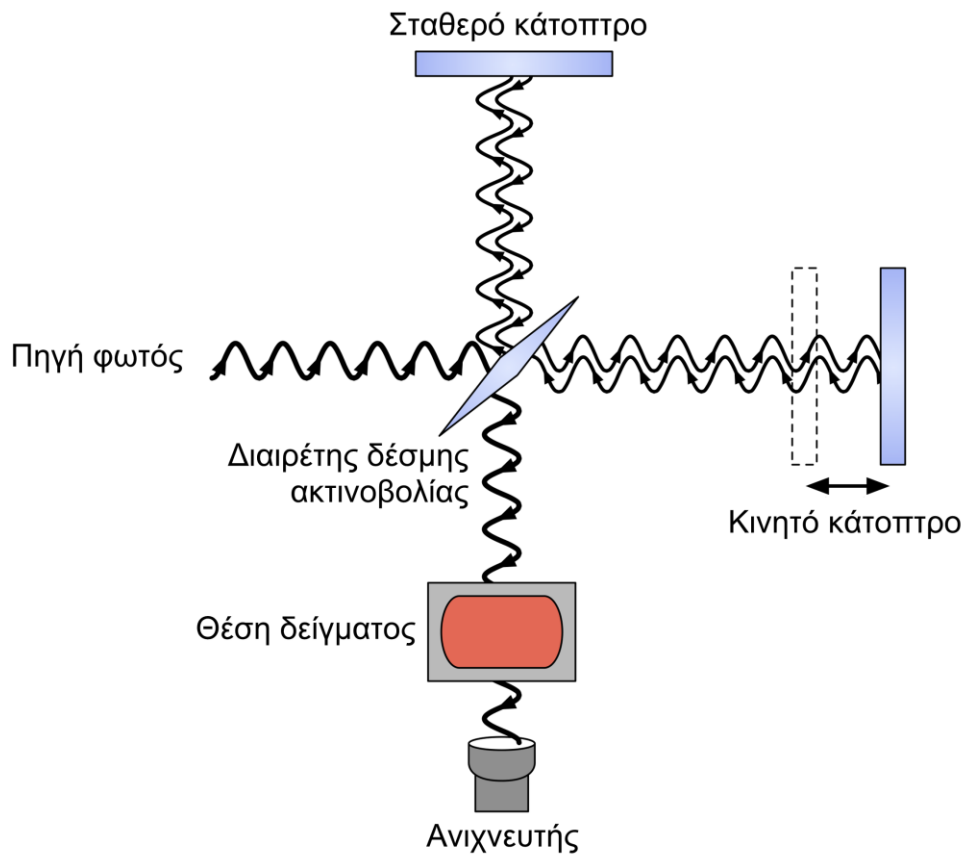
Αντίθετα, στη φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), το συμβολόμετρο Michelson, γνωστό ήδη από τα τέλη του 19ου αιώνα (Michelson et al., 1887), αποτελεί την καρδιά της τεχνικής. Το συμβολόμετρο Michelson είναι μια διάταξη οπτικών, που απαρτίζεται από δύο κάτοπτρα κάθετα μεταξύ τους, εκ των οποίων το ένα είναι κινητό, και ένα διαιρέτη δέσμης (beam splitter) που παρεμβάλλεται μεταξύ τους σε γωνία 45°. Το συμβολόμετρο Michelson χωρίζει μια δέσμη ακτινοβολίας σε δύο δέσμες και τις επανασυνθέτει, αφού πρώτα ακολουθήσουν ξεχωριστές διαδρομές που διαφέρουν στο μήκος. Οι μεταβολές της έντασης της επαλληλίας των δύο δεσμών ακτινοβολίας ως συνάρτηση της διαφοράς των οπτικών διαδρομών καταγράφονται από έναν ανιχνευτή (Hariharan, 2007).

Τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier σε σχέση με τη συνήθη φασματοσκοπία υπέρυθρου, είναι η βελτιωμένη και σταθερή διακριτική ικανότητα (λόγος σήμα/θόρυβος) για δεδομένο χρόνο σάρωσης ή η μείωση του χρόνου σάρωσης για την ίδια διακριτική ικανότητα, λόγω ταυτόχρονης συλλογής πληροφοριών από μεγάλο εύρος μηκών κύματος (White, 1990).

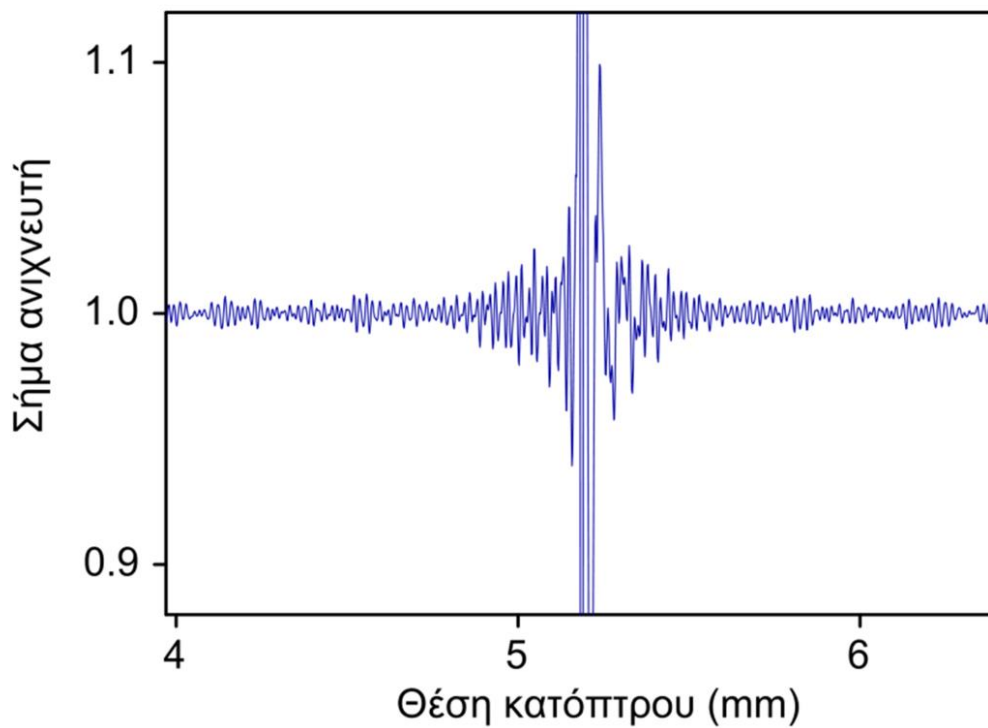
Στο Σχήμα 13.6 δίνεται σχηματικό διάγραμμα συμβολομέτρου Michelson, το οποίο χρησιμοποιείται για να δημιουργηθεί ένα συμβολογράφημα (Σχήμα 13.7). Η μαθηματική επεξεργασία του συμβολογραφήματος (μετασχηματισμός Fourier) δίνει το φάσμα απορρόφησης υπέρυθρου.

Η μεγάλη ευαισθησία που χαρακτηρίζει τη φασματοσκοπία FTIR, μετατρέπεται σε μειονέκτημα στην περίπτωση μη ακριβούς ρύθμισης των οπτικών του οργάνου και κυρίως του συμβολομέτρου Michelson. Μειονέκτημα επίσης, αποτελεί η παρουσία H_2O και CO_2 στο χώρο του φωτομέτρου, τα οποία εμφανίζουν έντονες απορροφήσεις στο φάσμα υπέρυθρου. Μία συνήθης πρακτική αντιμετώπισης του προβλήματος είναι η διοχέτευση αερίου αζώτου στο θάλαμο του φωτομέτρου.

Λήψη φάσματος υπέρυθρου, μπορεί να γίνει σε: αέρια φάση, υγρή φάση μεταξύ δύο πλακών NaCl, σε διάλυμα, σε στερεή κατάσταση υπό μορφή αιωρήματος σε παραφινέλαιο, σε στερεή κατάσταση υπό μορφή δισκίου σε KBr.



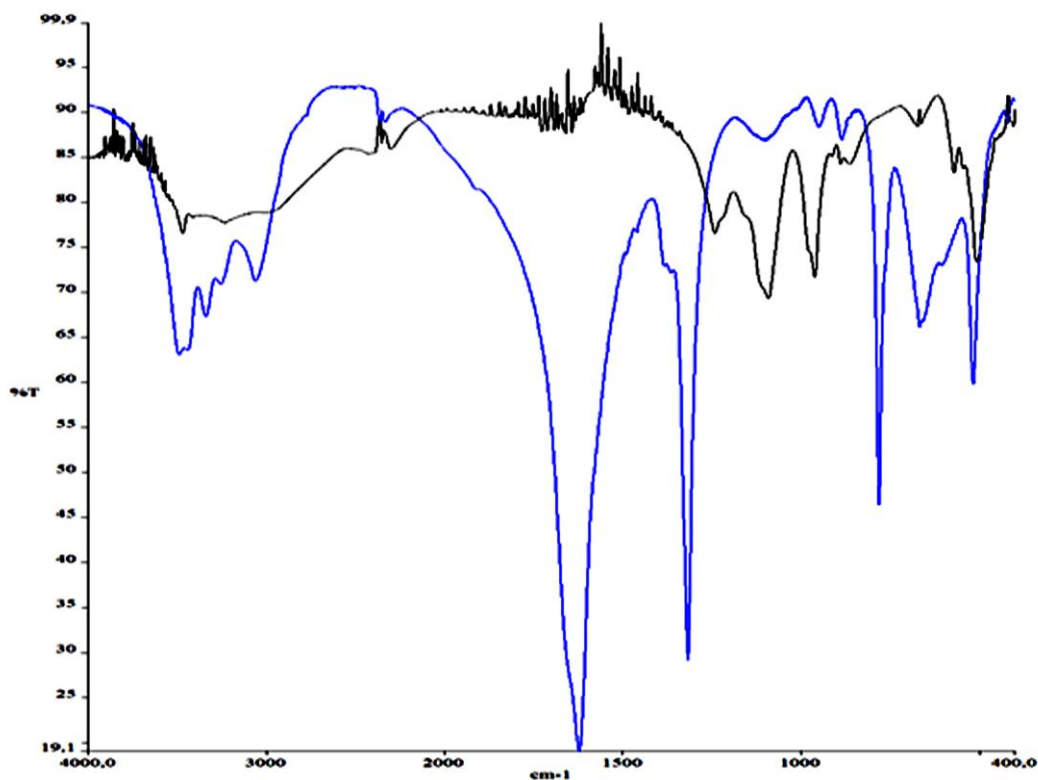
Σχήμα 13.6 Σχηματικό διάγραμμα συμβολομέτρου Michelson.



Σχήμα 13.7 Τυπικό συμβολογράφημα.

Τα φάσματα υπερέυθρου είναι γραφικές παραστάσεις της διαπερατότητας, %T, (κυρίως) αλλά και της απορρόφησης, A, έναντι του κυματάριθμου, ν (cm^{-1}). Ένα φάσμα υπερέυθρου μπορεί να χωριστεί στις παρακάτω περιοχές, με βάση τα άτομα ή τις ομάδες των οποίων οι δονήσεις προκαλούν απορρόφηση στο IR (Σχήμα 13.8).

- Περιοχή δονήσεων τάσης υδρογόνου ($4.000 - 2.500 \text{ cm}^{-1}$). Η απορρόφηση στις περιοχές αυτές προκαλείται από δονήσεις τάσεων δεσμών C-H, O-H, N-H και S-H. Η συχνότητα απορρόφησης εξαρτάται από το άτομο που με το οποίο συνδέεται το H.
- Περιοχή δονήσεων τάσης τριπλού δεσμού ($2.500 - 2.000 \text{ cm}^{-1}$). Στην περιοχή αυτή απορροφούν οι τριπλοί δεσμοί μεταξύ ατόμων άνθρακα και οι τριπλοί δεσμοί μεταξύ ατόμων άνθρακα και αζώτου. Στην ίδια περιοχή απορροφούν και οι δεσμοί -C=C=C- και N=C=O .
- Περιοχή δονήσεων τάσης διπλού δεσμού ($2.000 - 1.600 \text{ cm}^{-1}$). Υπεύθυνες για την απορρόφηση στην περιοχή αυτή, είναι οι δονήσεις των δεσμών C=C, C=O και C=N.
- Περιοχή δονήσεων τάσης και κάμψης απλού δεσμού ($1.500 - 700 \text{ cm}^{-1}$). Στην περιοχή αυτή εμφανίζονται πολλές απορροφήσεις, π.χ. δονήσεις κάμψεων των δεσμών C-H και οι δονήσεις τάσεων και κάμψεων απλών δεσμών που συνδέουν ομάδες, όπως του μεθυλενίου ($\text{-CH}_2\text{-}$), μεθυλίου (-CH_3) και αμινομάδες (-NH_2). Η περιοχή αυτή ονομάζεται περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος (fingerprint region), επειδή το φάσμα στην περιοχή αυτή χαρακτηρίζει το μόριο ως σύνολο.



Σχήμα 13.8 Τυπικό φάσμα απορρόφησης ουρόλιθου. Η μπλε γραμμή είναι το φάσμα απορρόφησης του ουρόλιθου, άγνωστης σύστασης, και η μαύρη γραμμή το φάσμα απορρόφησης του KBr.

13.3 Πειραματικό μέρος

13.3.1 Προετοιμασία δισκίου δείγματος

1. Ο ουρόλιθος πλένεται, στεγνώνεται και διατηρείται σε ξηραντήρα μέχρι να χρησιμοποιηθεί.
2. Εάν ο λίθος είναι μεγάλος αποσπάται μικρή ποσότητα αυτού, θρυμματίζεται και κονιορτοποιείται σε κατάλληλο ιγδίο.
3. Ζυγίζεται, σε αναλυτικό ζυγό, ποσότητα ~1 mg του κονιορτοποιημένου λίθου και μεταφέρεται σε ιγδίο αγάτη.
4. Σε αναλυτικό ζυγό ζυγίζεται επίσης, ποσότητα ~200 mg στερεού KBr και μεταφέρεται στο ίδιο ιγδίο με το δείγμα.
 - Η περιεκτικότητα του δισκίου στο προς ανάλυση δείγμα, θα πρέπει να είναι 1 – 2 mg/dL.
 - Το KBr έχει το πλεονέκτημα έναντι του NaCl να μην απορροφά καθόλου στο IR και ως εκ τούτου τα λαμβανόμενα αποτελέσματα είναι πολύ καλύτερα.
5. Ακολουθεί ανάμιξη, λειοτρίβηση και ομογενοποίηση των δύο υλικών.
6. Το ομογενοποιημένο μίγμα τοποθετείται προσεκτικά σε ειδική θέση της συσκευής συμπίεσης.
7. Η συσκευή συναρμολογείται και τοποθετείται σε υδραυλικό πιεστήριο.
8. Στη βαλβίδα εξόδου της συσκευής συνδέεται αεραντλία, για μερικά λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί ο εγκλωβισμένος, στη συσκευή, αέρας.
9. Με την αεραντλία να λειτουργεί συνεχώς, εφαρμόζεται πίεση ~ 5 tons για χρονικό διάστημα από 3 - 5 min.
10. Με το τέλος του χρόνου συμπίεσης, διακόπτεται η λειτουργία της αντλίας, εκτονώνεται η πίεση και η συσκευή συμπίεσης απομακρύνεται από το πιεστήριο και αποσυναρμολογείται. Στον πυθμένα του εμβόλου συμπίεσης της συσκευής, έχει δημιουργηθεί ένα λεπτό, διαφανές δισκίο.
11. Το δισκίο αφαιρείται, προσαρμόζεται σε ειδική υποδοχή και τοποθετείται στην πορεία της δέσμης στο φασματοφωτόμετρο υπερύθρου.

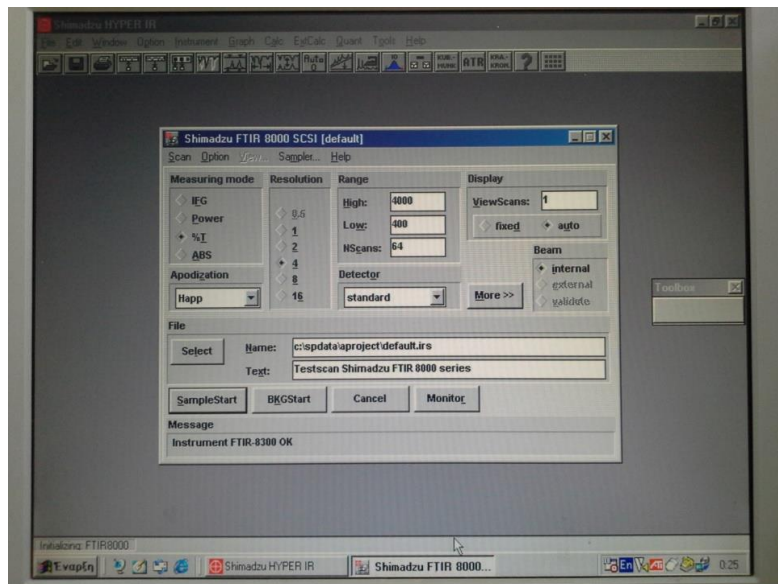
13.3.2 Λήψη φάσματος

12. Η λήψη φάσματος γίνεται με φασματοφωτόμετρο FT-IR Shimadzu 8300 (Φωτογραφία 13.2).



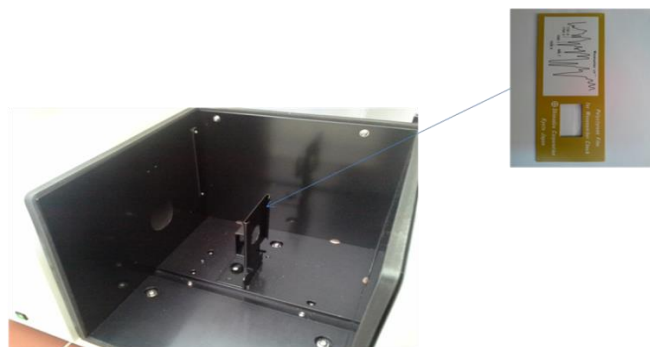
Φωτογραφία 13.2 Φασματοφωτόμετρο FT-IR Shimadzu 8300.

13. Το φασματοφωτόμετρο τίθεται σε λειτουργία, το σύστημα ελέγχεται από το λογισμικό Hyper-IR και συνδέεται με αυτό αυτόματα. Με την ολοκλήρωση της σύνδεσης εμφανίζεται το παράθυρο της Φωτογραφίας 13.3.



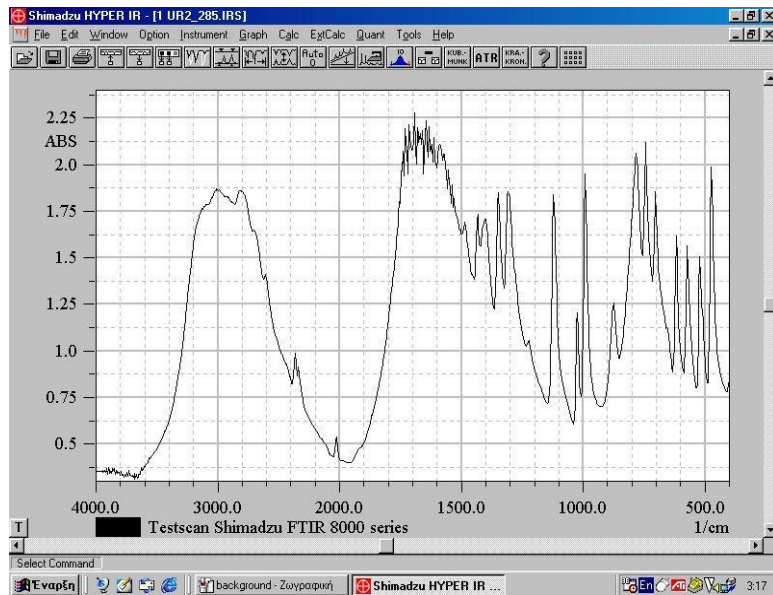
Φωτογραφία 13.3 FTIR 8000 Window.

14. Επιλέγεται η μετρούμενη συνάρτηση: %T, η ανάλυση (resolution): 4, η περιοχή σάρωσης σε κυματαριθμούς (range, high: 4000, low: 400), ο αριθμός των σαρώσεων (scans): 64, apodization: Happ-Genzel function.
15. Αρχικά, λαμβάνεται φάσμα με κενό το θάλαμο τοποθέτησης του δείγματος, με σκοπό την ελαχιστοποίηση του θορύβου.
16. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία του background, τοποθετείται στην εγκοπή του δειγματοφορέα ένα ειδικό φιλμ πολυστυρενίου (Φωτογραφία 13.4) και λαμβάνεται το φάσμα του. Σκοπός της ενέργειας αυτής, είναι ο έλεγχος της καλής λειτουργίας του αναλυτή. Μετά τη λήψη του φάσματος του πολυστυρενίου, τη σύγκριση του με το πρότυπο FTIR φάσμα και την αξιολόγησή του (να μην παρατηρείται απουσία ή μετατόπιση κορυφών), ο αναλυτής είναι έτοιμος να δεχτεί δείγμα.



Φωτογραφία 13.4 Έλεγχος της καλής λειτουργίας του αναλυτή με λήψη φάσματος πολυστυρενίου.

17. Μετά την εξασφάλιση της καλής λειτουργίας του αναλυτή, τοποθετείται στην εγκοπή του δειγματοφορέα δισκίο του δείγματος και λαμβάνεται το φάσμα διαπερατότητας ή απορρόφησης.
18. Το φάσμα του δείγματος εμφανίζεται στην οθόνη από την πρώτη κιάλας σάρωση και ενδεχομένως μεταβάλλεται (όχι αισθητά) κατά τη διάρκεια των σαρώσεων. Στη Φωτογραφία 13.5 δίνεται ένα τυπικό φάσμα ουρολίθου, που έχει ληφθεί με το φασματοφωτόμετρο FT-IR Shimadzu 8300.



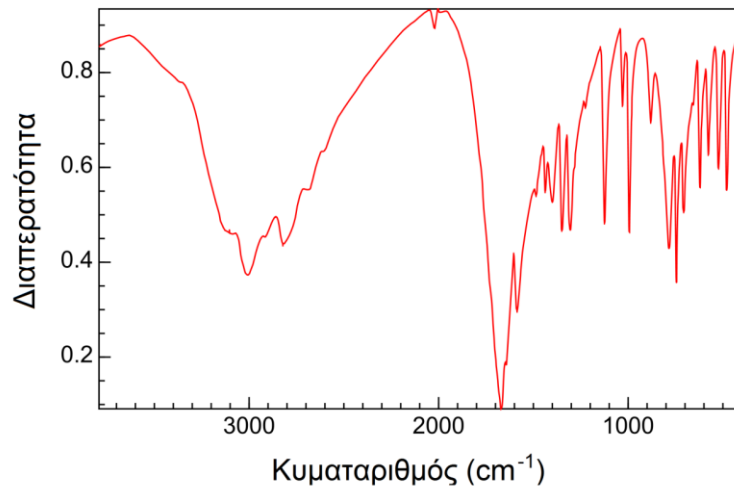
Φωτογραφία 13.5 Τυπικό φάσμα ουρολίθου στην οθόνη υπέρυθρου φασματογράφου (Shimadzu 8300).

19. Η αποθήκευση του φάσματος σε αρχείο .irs. Το φάσμα μπορεί να αποθηκευθεί και σε αρχείο ASCII.txt, προκειμένου να γίνει περαιτέρω επεξεργασία σε προγράμματα όπως το Microsoft Excel ή το Microcal Origin.
20. Τα βήματα 6-10 επαναλαμβάνονται για όλα τα δείγματα.

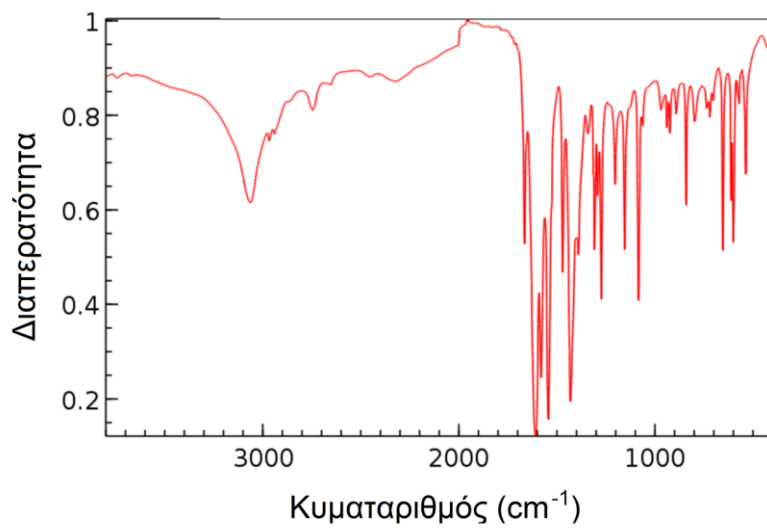
13.3.3 Αξιολόγηση φασμάτων FTIR

Τα περισσότερα φασματοφωτόμετρα FTIR έχουν, στο λογισμικό τους, ενσωματωμένες βιβλιοθήκες, με τις οποίες μπορεί να γίνει σύγκριση και ταυτοποίηση. Σε περίπτωση όπου δεν υπάρχει τέτοια δυνατότητα, ο χρήστης θα πρέπει να αναζητήσει φάσματα γνωστών ενώσεων σε ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες στο διαδίκτυο. Μερικές από αυτές τις βιβλιοθήκες δίνονται παρακάτω:

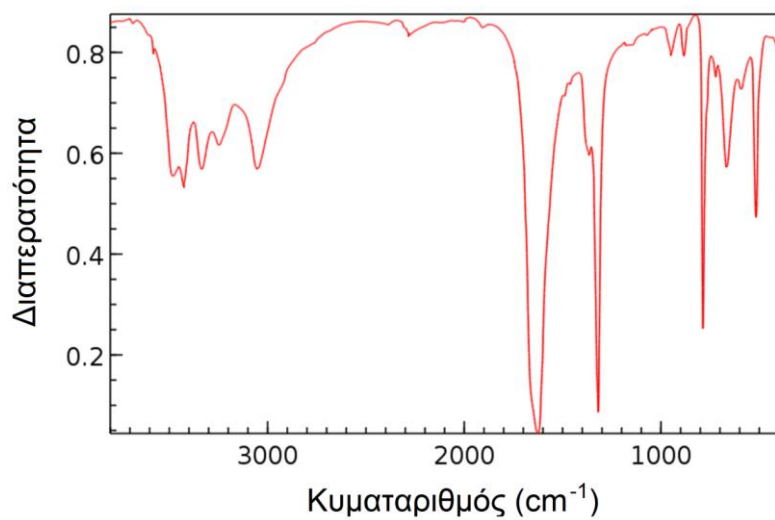
- <http://www.fdmspectra.com>
- <http://www.ansyco.de/CMS/frontend/index.php?idcatside=124&letter=A>
- http://www.molinstincts.com/home/index/demo_order/main.html
- <http://www.knowitall.com/academic/default.asp> http://www.ir-spectra.com/2012/indexes/index_d.htm
- <http://www.ftirsearch.com>
- http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi
- <http://speclab.cr.usgs.gov/spectral.lib06/>



Σχήμα 13.9 Το φάσμα απορρόφησης του ουρικού οξέος.



Σχήμα 13.10 Το φάσμα απορρόφησης του κιτρικού οξαλικού νατρίου.



Σχήμα 13.11 Το φάσμα απορρόφησης του μονοϋδρικού οξαλικού ασβεστίου.

Βίντεο που δημιουργήθηκε για αυτό το Κεφάλαιο



Η ανάλυση ουρόλιθου σε υπέρυθρο φασματογράφο, καθώς και όλα τα στάδια προετοιμασίας του δείγματος, <https://youtu.be/VujI8foF8tk>, <https://youtu.be/VujI8foF8tk?t=86>

Πηγές φωτογραφιών με προέλευση το διαδίκτυο

- **Σχήμα 13.1**
https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Kidney_stones#/media/File:Blausen_0595_KidneyStones.png (τελευταία προσπέλαση 1/9/2015).
- **Σχήμα 13.2**
https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Electromagnetic_spectrum_illustrations#/media/File:Electromagnetic-Spectrum.png (τελευταία προσπέλαση 10/9/2015).
- **Σχήμα 13.4** <http://chemistry.elmhurst.edu/vchembook/images/irCO2.JPEG> (τελευταία προσπέλαση 10/9/2015)
- **Σχήμα 13.5** <http://chemistry.elmhurst.edu/vchembook/images/irwater.JPEG> (τελευταία προσπέλαση 10/9/2015)
- **Σχήμα 13.6**
https://en.wikipedia.org/wiki/Fourier_transform_infrared_spectroscopy#/media/File:FTIR_Interferometer.png (τελευταία προσπέλαση 10/9/2015)
- **Σχήμα 13.7** <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:FTIR-interferogram.svg> (τελευταία προσπέλαση 8/9/2015).
- **Σχήμα 13.9**
<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Spec=C69932&Index=0&Type=IR&Large=on&SVG=on> (τελευταία προσπέλαση 10/9/2015).
- **Σχήμα 13.10**
<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Spec=B6006721&Index=0&Type=IR&Large=on> (τελευταία προσπέλαση 10/9/2015).
- **Σχήμα 13.11**
<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Spec=B6007233&Index=0&Type=IR&Large=on> (τελευταία προσπέλαση 10/9/2015).

Σχετικό οπτικό υλικό στο διαδίκτυο

- Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα: <https://www.youtube.com/watch?v=hXe7EVv1y0Q> (τελευταία προσπέλαση 10/9/2015)
- Τύποι δονήσεων μορίων: <https://www.youtube.com/watch?v=ZWwLCnuYRys> (τελευταία προσπέλαση 5/7/2015)
- Δονήσεις μορίου H₂O: <https://www.youtube.com/watch?v=1uE2lvVkKW0> (τελευταία προσπέλαση 5/7/2015)
- Δονήσεις μορίου CO₂: <https://www.youtube.com/watch?v=W5gimZlFY6I> (τελευταία προσπέλαση 5/7/2015)
- Φασματοσκοπία υπερύθρου (διάλεξη): <https://www.youtube.com/watch?v=u2IBdtINsrQ> (τελευταία προσπέλαση 3/6/2015)
- Συμβολόμετρο Michelson: <https://www.youtube.com/watch?v=zaxYZxQS0yc>
- <https://www.youtube.com/watch?v=j-u3IEgcTiQ>
- http://www.optics-vision.gr/files/items/2/26/tsiapa_eirini_2008.pdf (τελευταία προσπέλαση 10/9/2015).
- **Animation δονήσεων μορίων:**
 - http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Vibrational_Modes (τελευταία προσπέλαση 5/7/2015)
 - <https://www.youtube.com/watch?v=W5gimZlFY6I> (τελευταία προσπέλαση 5/7/2015)
 - <https://www.youtube.com/watch?v=1uE2lvVkKW0> (τελευταία προσπέλαση 5/7/2015)

Αναφορές

1. ΒΑΛΑΒΑΝΙΔΗΣ, Α. (2006). *Φασματοσκοπία οργανικών ενώσεων*, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας.
2. DRACH, W. (1992, pp. 2091-2101) *Urinary Lithiasis: Etiology, Diagnosis, and Medical Management*. In: Campbell's Urology, 6th edition, New York: W.B. Saunders Company.
3. FLEISH, H., ROBERSTON, G. (1976, pp. 5-23). *The kinetics of crystal growth and renal stone formation* In: Urolithiasis Research. New York: Plenum Press.
4. HARIHARAN, P. (2007) *Basics of Interferometry*. New York: Elsevier.
5. MICHELSON, A., MORLEY, E. (1887). On the Relative Motion of the Earth and the Luminiferous Ether. *American Journal of Science*, 34(203), p. 333–45.
6. SKOOG, A., HOLLER, J., CROUCH, R. (2014). *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης* (μετάφραση 6ης έκδοσης). Αθήνα: Εκδόσεις Κωσταράκη.
7. SMITH, D, MORGAN, L., LOEWENSTEIN, V. (1968). Comparison of the Radiance of Far-Infrared Sources. *J Opt Soc Am*, 58, p. 433–4.
8. WHITE, R. (1990) *Chromatography/Fourier transform infrared spectroscopy and its applications*. New York: Marcel Dekker.