

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

6

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΛΑΡΙΣΑΣ

Π.Σ.Ε. ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Ημερομ. 29/10/02
Αριθ. Πρωτ. 2393

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ B₁₂
(ΚΟΒΑΛΑΜΙΝΗΣ) ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ

ΦΟΙΤΗΤΗΣ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΛΑΦΗΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

ΛΑΡΙΣΑ 2002

αρ. εισ. 6/2002



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 656/1
Ημερ. Εισ.: 31/1/2003
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ
2002
ΚΩΝ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

• ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
• ABSTRACT.....	3
• ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
• ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5 - 15
• ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	16 - 21
• ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	22 - 33
• ΠΙΘΑΝΕΣ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΕΥΝΕΣ	34 - 35
• ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	36 - 37
• ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	38 - 39



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι να μετρήσουμε συγκεντρώσεις της υδατοδιαλυτής βιταμίνης B₁₂ μέσω του μετάλλου του ενεργού της κέντρου, του κοβαλτίου. Για τις μετρήσεις μας εφαρμόστηκε η μεθόδους της ατομικής απορρόφησης με φλόγα και η κλασσική μέθοδος μέτρησης του κοβαλτίου.

Πιο συγκεκριμένα, κατασκευάσαμε καμπύλη αναφοράς για ελεύθερο κοβάλτιο και για το κοβάλτιο που εμπεριέχεται στην βιταμίνη B₁₂ χρησιμοποιώντας και τις δύο μεθόδους έτσι ώστε να δούμε καταρχήν αν μπορούμε να υπολογίσουμε ελεύθερο κοβάλτιο με ακρίβεια με αυτές τις μεθόδους και στην συνέχεια να δούμε αν μπορούμε να εκτιμήσουμε την ποσότητα του κοβαλτίου που περιέχεται στην βιταμίνη B₁₂ συγκρίνοντας τις μετρήσεις αυτές με τις αντίστοιχες μετρήσεις του ελεύθερου κοβαλτίου σε κάθε μία μέθοδο. Το όριο ανιχνευσιμότητας του κοβαλτίου με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα βρέθηκε ίσο με 0,004 mg/l, ενώ με την κλασσική μέθοδο προσδιορισμού του κοβαλτίου βρέθηκε ίσο με 0,004 mg/l.

Επίσης μετρήσαμε και το ιχνοστοιχείο σελήνιο σε ελεύθερη μορφή με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα κατασκευάζοντας καμπύλη αναφοράς, για να διαπιστώσουμε αν μπορούμε να ανιχνεύσουμε το σελήνιο με αυτήν την μέθοδο. Το όριο ανιχνευσιμότητας της μεθόδου για το σελήνιο είναι ίσο με 0,012 mg/l.

ABSTRACT

The purpose of this study is to develop a method for measuring the water soluble vitamin B₁₂ by detecting its metal center, namely cobalt. For our measurements we used the method of flame atomic absorbance spectrometry and the standard method of cobalt determination.

A calibration curve for cobalt was constructed as a free element and as a component of vitamin B₁₂ by using the two methods. Initially, in order to establish if we can calculate cobalt as a free element with these two methods and subsequently whether cobalt can be detected as a component of vitamin B₁₂, the two methods agreed when correlated against each other providing the feasibility of the procedure under development. The limit of detection for cobalt with the flame atomic absorbance spectrometry was found to be 0,004 mg/l and with the standard method of cobalt was 0,004 mg/l.

In addition the method was extended for selenium determination as a free element with the method of flame atomic absorbance spectrometry by constructing a calibration. The limit of detection of this method for selenium is 0,012 mg/l.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας, πολύτιμη ήταν η βοήθεια των παρακάτω, τους οποίους και ευχαριστώ θερμά.

- Τον κύριο Μηνά Αναστάσιο, Τμηματάρχη του Κτηνιατρικού Εργαστηρίου Λάρισας, που μου παρείχε την δυνατότητα να χρησιμοποιήσω το μηχάνημα της ατομικής απορρόφησης που υπάρχει στο εργαστήριό του,
- Τον συμφοιτητή μου Ζαρογιάννη Σωτήριο, που μου έμαθε την λειτουργία του μηχανήματος της ατομικής απορρόφησης,
- Όλο το προσωπικό του Κτηνιατρικού Εργαστηρίου Λάρισας για την συνεργασία του
- Τον κύριο Βαλλιάκο Ηλία και την κυρία Νούσιου Ευαγγελία, προσωπικό της γραμματείας του Π.Σ.Ε. Ιατρική Βιοχημεία για τις διευκολύνσεις που μου παρείχανε και
- Τον κύριο Λάφη Σπυρίδωνα, υπεύθυνο καθηγητή αυτής της διπλωματικής εργασίας για την συμβουλευτικού χαρακτήρα πολύτιμη βοήθειά του τόσο στο πειραματικό μέρος όσο και στην συγγραφή αυτής της εργασίας.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πιο αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση μετάλλων σε πολύ μικρές ποσότητες είναι η φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης, η οποία σήμερα χρησιμοποιείται σε πολύ μεγάλο βαθμό για αυτόν τον σκοπό. Εφαρμόζοντας αυτή την μέθοδο ανιχνεύσαμε το κοβάλτιο που περιέχεται στον δακτύλιο κορρίνης της βιταμίνης B₁₂ αντιπαραθέτοντας τα αποτελέσματα που πήραμε με αντίστοιχης συγκέντρωσης πρότυπο διάλυμα κοβαλτίου.

Για να επιβεβαιώσουμε την αξιοπιστία της μεθόδου, ακολουθήσαμε την ίδια διαδικασία (προσδιορισμός κοβαλτίου σαν ελεύθερο στοιχείο και σαν συστατικό της βιταμίνης B₁₂) ακολουθώντας την κλασσική μέθοδο προσδιορισμού κοβαλτίου.

Ο λόγος που επιλέξαμε την βιταμίνη B₁₂ για τις μετρήσεις μας είναι επειδή έχει πολύ μεγάλη βιολογική σημασία και γιατί περιέχει το κοβάλτιο που είναι ένα από τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία για τον ανθρώπινο οργανισμό.

Ένα άλλο πολύ σημαντικό ιχνοστοιχείο είναι και το σελήνιο το οποίο και μετρήσαμε με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα σαν ελεύθερο στοιχείο. Σκοπός μας ήταν να μετρήσουμε το σελήνιο και σε πραγματικά δείγματα ώστε να κάνουμε τις απαραίτητες συγκρίσεις όπως και με το κοβάλτιο αλλά ο περιορισμένος χρόνος που είχαμε την διάθεσή μας δεν μας το επέτρεψε.

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ

Με τον όρο ατομική φασματοσκοπία χαρακτηρίζεται ένα σύνολο φασματοσκοπικών τεχνικών ανάλυσης, που βασίζονται στην αλληλεπίδραση ατόμων με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Η ατομική φασματοσκοπία βασίζεται στην ατομοποίηση του δείγματος σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ατόμων με μέτρηση είτε της απορρόφησης (φασματομετρία ατομικής απορρόφησης-AAS), της εκπομπής (φασματομετρία εκπομπής) ή του φθορισμού (φασματομετρία ατομικού φθορισμού) στο χαρακτηριστικό μήκος κύματος του κάθε στοιχείου [1,2].

Η φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης εισήχθη από τον Walsh και τους συνεργάτες του στην Αυστραλία το 1955 [1]. Σήμερα, η φασματομετρία ατομικής απορρόφησης αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές για τον προσδιορισμό

στοιχείων σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις και σε μεγάλη ποικιλία δειγμάτων.

Ένα φασματόμετρο ατομικής απορρόφησης αποτελείται βασικά από δύο τμήματα: το μηχανικό τμήμα της παραγωγής των ατόμων από το δείγμα και το οπτικό τμήμα, όπου γίνεται η ατομική απορρόφηση της εξωτερικής πηγής ακτινοβολίας [1,2].

Αρχικά το δείγμα υποβάλλεται σε ατομοποίηση, δηλαδή παίρνει την μορφή ατόμων. Για να συμβεί αυτό, το δείγμα αναρροφάται στον εκνεφωτή και παίρνει την μορφή λεπτότατων σταγόνων. Τα σταγονίδια μετά από μια σειρά εμποδίων και απωλειών (χάνεται περίπου το 90% της αρχικής τους ποσότητας [1]) εισέρχονται στην φλόγα. Τα άτομα που σχηματίζονται στην φλόγα, τα περισσότερα των οποίων είναι στην θεμελιώδη τους κατάσταση, διαπερνούν την οπτική δέσμη μιας πηγής ακτινοβολίας και διεγείρονται. Η απορρόφησή τους καταγράφεται με τη βοήθεια ενός συστήματος μονοχρωμάτορα και ανιχνευτή [1,2].

Η απορρόφηση της ακτινοβολίας είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του στοιχείου που προσδιορίζουμε, σύμφωνα με το νόμο των Lambert-Beer:

$$A = \lg (P_0/P) = kc$$

Όπου,

A : η απορρόφηση της ακτινοβολίας

P_0 : η ισχύς της ακτινοβολίας που προσπίπτει στο νέφος των ατόμων

P : η ισχύς της εξερχόμενης ακτινοβολίας, μετά τη διόδο από το νέφος

k : ο συντελεστής αναλογίας ο οποίος εξαρτάται από τις πειραματικές συνθήκες

c : η συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου στοιχείου στο εισαγόμενο δείγμα.

Στη φασματομετρία ατομικής απορρόφησης δεν χρησιμοποιείται πηγή συνεχούς ακτινοβολίας επειδή οι ατομικές γραμμές απορρόφησης είναι πολύ στενές. Στην περίπτωση αυτή, το μεγαλύτερο μέρος της ακτινοβολίας θα κατέληγε στον ανιχνευτή με αποτέλεσμα να έχουμε μικρή ευαισθησία ανάλυσης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται γραμμικές πηγές ακτινοβολίας, όπως είναι οι λυχνίες κοίλης καθόδου [1].

Οι λυχνίες κοίλης καθόδου αποτελούνται από δύο ηλεκτρόδια σε γυάλινο σωλήνα που φέρει παράθυρο από χαλαζία στο ένα άκρο. Ο σωλήνας αυτός είναι γεμάτος με ένα ευγενές αέριο, συνήθως Ne ή Ar υπό πίεση λίγων Torr. Η κάθοδος είναι σε μορφή “κυπέλλου” και είναι κατασκευασμένη από το προσδιοριζόμενο

στοιχείο. Με εφαρμογή τάσεως μεταξύ της καθόδου και ανόδου, το αέριο της λυχνίας ιοντίζεται και τα θετικά ιόντα προσπίπτουν στην κάθοδο και προκαλούν εξάχνωση μέρους της καθόδου. Τα άτομα που παράγονται διεγείρονται, εκπέμποντας την επιθυμητή χαρακτηριστική ακτινοβολία. Η ακτινοβολία αυτή είναι της ίδιας συχνότητας με αυτή που απορροφούν τα άτομα του προσδιοριζόμενου στοιχείου στη φλόγα [1,2].

Οι λυχνίες που χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι είτε μονοστοιχειακές, οπότε επιτρέπουν την μέτρηση ενός μόνο στοιχείου είτε πολυστοιχειακές, οπότε είναι και κατάλληλες για μέτρηση περισσότερων του ενός στοιχείων. Εκτός από τις λυχνίες κοίλης καθόδου και με πολύ μικρότερο εύρος εφαρμογών, χρησιμοποιούνται οι λυχνίες εκκένωσης χωρίς ηλεκτρόδια, οι λυχνίες βαθμωτής θερμοκρασίας και οι λυχνίες τόξου Xe που είναι πηγές συνεχούς φάσματος [1,2].

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος ατομοποίησης του δείγματος είναι με φλόγα. Στα περισσότερα φασματόμετρα ατομικής απορρόφησης χρησιμοποιείται ο λύχνος προανάμιξης, στον οποίο το δείγμα, το οξειδωτικό και το καύσιμο αναμιγνύονται πριν την εισαγωγή τους στη φλόγα. Η θερμοκρασία της φλόγας εξαρτάται από το είδος του καυσίμου και του οξειδωτικού. Ο συνδυασμός που χρησιμοποιείται συνήθως είναι ακετυλένιο / αέρας με τον οποίο επιτυγχάνεται θερμοκρασία μέχρι 2550 °C [1]. Η θερμοκρασία της φλόγας θα πρέπει να διατηρείται κατά το δυνατόν χαμηλή, ώστε η πλειονότητα των ατόμων του προσδιοριζόμενου στοιχείου να είναι στην θεμελιώδη τους κατάσταση. Η ενέργεια όμως της φλόγας, θα πρέπει να επαρκεί για την ατομοποίηση του στοιχείου. Θεμελιώδης απαίτηση είναι η εισαγωγή του δείγματος στη φλόγα με σταθερό και ομοιόμορφο τρόπο. Αυτό επιτυγχάνεται με τον εκνεφωτή, στον οποίο το δείγμα αναμιγνύεται με το οξειδωτικό αέριο καθώς αυτό έρχεται από το τριχοειδές. Η μεγάλη ταχύτητα του αερίου καθώς αυτό εξέρχεται από το μικρό δακτυλιοειδές στόμιο, δημιουργεί τεράστια πίεση που διασπά το υγρό δείγμα σε πολύ μικρά σταγονίδια [2].

Όταν το διάλυμα του υπό ανάλυση δείγματος εισαχθεί στη φλόγα υπό μορφή σταγονιδίων, μέσω του εκνεφωτή, γίνεται μια σειρά διεργασιών:

- 1 . εξάτμιση του διαλύτη
- 2 . εξάχνωση της προσδιοριζόμενης ουσίας
- 3 . διάσπαση μορίων σε άτομα
- 4 . διέγερση ορισμένου αριθμού ατόμων

5 . πιθανός σχηματισμός οξειδίων που οδηγεί σε παρεμποδίσεις.

Η βελτιστοποίηση της φλόγας (π.χ. είδος καυσίμου και οξειδωτικού) αποβλέπει στη δημιουργία του μέγιστου αριθμού ατόμων από το στοιχείο που προσδιορίζουμε, χωρίς να σχηματίζονται οξείδια αυτού.

Όμως, πολλές φορές η ατομοποίηση με φλόγα δεν είναι επαρκής. Τα βασικά μειονεκτήματα της φλόγας εντοπίζονται:

- 1 . στις χημικές παρεμποδίσεις
- 2 . στον ελάχιστο χρόνο παραμονής του δείγματος στην οπτική δέσμη του μονοχρωμάτορα
- 3 . στη μη δυνατότητα ανάλυσης στερεών δειγμάτων
- 4 . στην αδυναμία ανάλυσης μικρών δειγμάτων, καθώς μεγάλο ποσοστό του δείγματος δεν ατομοποιείται.

Η ατομοποίηση του δείγματος γίνεται επίσης με άλλους δύο τρόπους, σε φούρνο γραφίτη, θερμαινόμενο ηλεκτρικά, σε ατμόσφαιρα αδρανούς αερίου ή επίσης μπορεί να γίνει και χημικά, δηλαδή με τον σχηματισμό πτητικού προϊόντος με το υπό προσδιορισμό στοιχείο [1,2].

Με τη βοήθεια του μονοχρωμάτορα επιλέγεται και απομονώνεται η κύρια φασματική γραμμή από το φάσμα που εκπέμπει η πηγή ακτινοβολίας. Οι μονοχρωμάτορες που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό είναι περιθλαστικά φράγματα, που είναι ανακλαστικές επιφάνειες με πολυάριθμες χαραγές ή κλιμακωτά φράγματα [1].

Κατά κανόνα, το σύστημα ανίχνευσης είναι ένας φωτοπολλαπλασιαστής. Ο φωτοπολλαπλασιαστής είναι ένας σωλήνας στον οποίο εκπέμπονται ηλεκτρόνια από μια φωτοευαίσθητη, αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια, όταν πέσει σε αυτήν ορατή ή υπεριώδης ακτινοβολία. Τα ηλεκτρόνια αυτά επιταχύνονται από ένα ηλεκτρικό πεδίο και προκαλούν την εκπομπή άλλων ηλεκτρονίων, καθώς προσκρούουν σε άλλη επιφάνεια. Έτσι, τα ηλεκτρόνια πολλαπλασιάζονται και τελικά συλλέγονται 1.000.000 ηλεκτρόνια για κάθε φωτόνιο που προσπίπτει στην αρχική επιφάνεια [1].

Η ατομική φασματοσκοπία αποτελεί βασική τεχνική ανάλυσης μεγάλου αριθμού μετάλλων σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις και σε μεγάλη ποικιλία δειγμάτων. Βρίσκει πολυάριθμες εφαρμογές:

- 1 . στην περιβαλλοντική χημική ανάλυση
- 2 . τον έλεγχο τροφίμων
- 3 . στη γεωλογία
- 4 . στην πετροχημεία
- 5 . στην ανάλυση βιομηχανικών προϊόντων κ.λ.π.

Η μέθοδος της ατομικής απορρόφησης, όπως είναι φυσικό παρουσιάζει και πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα σε σχέση με άλλες μεθόδους μετρήσεως διαφόρων δειγμάτων. Το σημαντικότερο ίσως πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου, είναι ότι παρουσιάζει πολύ χαμηλό όριο ανιχνευσιμότητας, το οποίο κυμαίνεται από 0,01 έως 0,1 mg/l [2]. Με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα είμαστε σε θέση να μετρήσουμε ακόμη και ίχνη κάποιας ποσότητας. Αυτή την δυνατότητα δεν την έχουμε με όλες τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους μετρήσεως.

Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών ειδών παρεμποδίσεων, τις φασματικές, τις ιοντικές και τις χημικές. Το θετικό είναι ότι παρά την ύπαρξη τριών διαφορετικών ειδών παρεμποδίσεων, αυτές είναι πάρα πολύ μικρές και η πιθανότητα εμφάνισής τους είναι πολύ μειωμένη [2]. Έτσι ο επηρεασμός των μετρήσεών μας από αυτές τις παρεμποδίσεις δεν υφίσταται ή υφίσταται σε πάρα πολύ μικρό βαθμό, τέτοιο που να μην επηρεάζει την αξιοπιστία τους.

Τέλος ένα χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι ότι είναι κατάλληλη για την ανάλυση μόνο υγρών δειγμάτων. Έτσι είμαστε υποχρεωμένοι όλα μας τα δείγματα να τα φέρουμε σε υγρή κατάσταση. Αυτό προϋποθέτει την διενέργεια περαιτέρω διεργασιών για την υγροποίηση των στερεών και αερίων δειγμάτων, γεγονός που συνεπάγεται περισσότερο κόπο και χρόνο. Από την άλλη όμως αυτό μπορεί να θεωρηθεί ως πλεονέκτημα της μεθόδου γιατί μας δίνει την δυνατότητα να αναλύσουμε κάθε είδους δείγμα.

ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα διάφορα ανόργανα στοιχεία του ανθρώπινου οργανισμού όπως το κοβάλτιο, ο χαλκός, το χρώμιο, το φθόριο, το ιώδιο, το μαγγάνιο ο ψευδάργυρος και το σελήνιο αποτελούν τα ιχνοστοιχεία διότι απαιτούνται σε πολύ μικρές ποσότητες αν και είναι εξίσου απαραίτητα όπως και άλλα ανόργανα στοιχεία (νάτριο, μαγνήσιο, φώσφορος, χλώριο, κάλιο και ασβέστιο) που βρίσκονται σε σαφώς μεγαλύτερες

ποσότητες στον ανθρώπινο οργανισμό [3]. Ως ιχνοστοιχείο θεωρείται, αυθαιρέτως, κάθε στοιχείο που οι απαιτήσεις του οργανισμού μας σε αυτό είναι μικρότερες των 25 χιλιοστών του γραμμαρίου [4]. Η έλλειψη ή η ανεπάρκεια πολλών από τα ιχνοστοιχεία, προκαλεί στον ανθρώπινο οργανισμό σοβαρότατες ανωμαλίες, που μπορεί να οδηγήσουν ακόμη και στον θάνατο. Τα ιχνοστοιχεία αυτά είναι γνωστά ως απαραίτητα ιχνοστοιχεία. Για παράδειγμα η ανεπάρκεια ελαχίστων mg ενός ιχνοστοιχείου μπορεί να έχει τα ίδια δυσμενή αποτελέσματα όπως και η ανεπάρκεια εκατοντάδων mg κάποιου από τα άλλα ανόργανα στοιχεία. Επίσης, πρόσληψη μεγάλων ποσοτήτων από μερικά ιχνοστοιχεία μπορούν να προκαλέσουν δηλητηριάσεις, κατάσταση που εμφανίζεται σπάνια γιατί όταν η ποσότητα ενός ιχνοστοιχείου είναι αρκετά μεγάλη τότε ο οργανισμός φροντίζει για την «αποθήκευσή» του και την χρησιμοποίησή του σε περιόδους έλλειψής του [3,4]. Τα ιχνοστοιχεία (όπως και οι βιταμίνες) δεν παράγονται στον οργανισμό μας, αλλά τα προμηθευόμαστε από εξωτερικές πηγές και δεν βρίσκονται ελεύθερα στον οργανισμό αλλά αποτελούν το ενεργό κέντρο πολλών ουσιών όπως ενζύμων και αξιοποιούν τις οξειδοαναγωγικές ή οξειδοαναγωγικές ιδιότητές τους. Συμπεράσματα που έχουν βγει από διεθνή συνέδρια [4], δείχνουν ότι κάθε άτομο ή ομάδες ατόμων έχουν για γενετικούς λόγους, διαφορετικές απαιτήσεις σε ορισμένα ιχνοστοιχεία.

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΟΒΑΛΤΙΟΥ

Το κοβάλτιο είναι ένα μέταλλο που εμφανίζει στην φύση δύο οξειδωτικές βαθμίδες, Co^{2+} και Co^{3+} . Το κοβάλτιο αποτελεί ένα βασικό ιχνοστοιχείο για τον ανθρώπινο οργανισμό, στον οποίο βρίσκεται συνήθως με την μορφή της βιταμίνης B₁₂. Υπό την μορφή αυτή χρησιμοποιείται για να ενεργοποιήσει ορισμένα ένζυμα και για την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων [3].

Πρόσφατες μελέτες [5] μας πρόσφεραν πληροφορίες για την βιοχημεία και την βιοανόργανη χημεία αρκετών πρωτεϊνών που περιέχουν κοβάλτιο. Μέχρι σήμερα [5], έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί οκτώ ένζυμα που περιέχουν κοβάλτιο εκτός του δακτυλίου κορρίνης, (μεθειονίνη αμινοπεπτιδάση, προλιδάση, νιτριλυδρατάση, γλυκόζη ισομεράση, μεθυλομαλόνυλο-CoA καρβοξυμεταφοράση, αλδεϋδική δεκαρβονυλάση, λυσίνη-2-3-αμινομουτάση και βρωμοϋπεροξειδάση). Συγκεκριμένα, η μεθειονίνη αμινοπεπτιδάση έχει δύο άτομα κοβαλτίου στο ενεργό της κέντρο και μπορούμε να την βρούμε σε ζώα, σε ζυμομύκητες και σε βακτήρια [5,6]. Η

προλιδάση βρίσκεται παντού στην φύση και έχει απομονωθεί από βακτήρια. Έχει βρεθεί ότι η προλιδάση έχει μόνο ένα άτομο κοβαλτίου σε κάθε υπομονάδα της [5,7]. Η νιτριλυδρατάση βρίσκεται σε ακτινομύκητες και σε βακτήρια και περιέχει ένα άτομο κοβαλτίου σε κάθε α-υπομονάδα της [5]. Η γλυκόζη ισομεράση βρίσκεται σε ακτινομύκητες και περιέχει ένα άτομο κοβαλτίου για κάθε τέσσερις υπομονάδες της [5]. Την μεθυλομαλόνυλο-CoA καρβοξυμεταφοράση την βρίσκουμε στα βακτήρια και γνωρίζουμε ότι περιέχει ένα άτομο κοβαλτίου σε κάθε υπομονάδα της [5]. Αλδεϋδική δεκαρβονυλάση βρίσκουμε στο φυτοπλαγκτόν και περιέχει ένα άτομο κοβαλτίου για κάθε αβ-υπομονάδα [5,8]. Τέλος η λυσίνη-2-3-αμινομουτάση και η βρωμοϋπεροξειδάση που βρίσκονται σε βακτήρια [5], περιέχουν η μεν λυσίνη-2-3-αμινομουτάση ένα με δύο άτομα κοβαλτίου για κάθε διμερές υπομονάδων του [5], η δε βρωμοϋπεροξειδάση περίπου 0,35 άτομα κοβαλτίου για κάθε δύο υπομονάδες του [5]. Ο λειτουργικός ρόλος του κοβαλτίου που περιέχεται σε κάθε ένα από αυτά τα ένζυμα, είναι διαφορετικός.

ΣΕΛΗΝΙΟ

Το σελήνιο είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο, θεμελιώδους σημασίας για τον ανθρώπινο οργανισμό. Σαν συστατικό των σεληνοπρωτεϊνών, το σελήνιο έχει δομικό και ενζυμικό ρόλο και σύμφωνα με τις τελευταίες μελέτες [9] είναι γνωστό σαν ένα αντιοξειδωτικό και καταλύτης για την παραγωγή της ενεργούς θυροειδικής ορμόνης. Το σελήνιο χρειάζεται για την σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και φαίνεται να είναι ένα διατροφικό κλειδί στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης ασθενειών καθώς επίσης και στην παρεμπόδιση της εξέλιξης του HIV σε AIDS [9]. Είναι απαραίτητο για την κινητικότητα του σπέρματος και μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο της αδυναμίας για αναπαραγωγή [9]. Έλλειψή του, έχει συνδεθεί με άσχημες ψυχολογικές καταστάσεις. Διάφορα ευρήματα [9] έθεσαν σε αμφιβολία το κατά πόσο μπορεί να συνδεθεί το σελήνιο με τον κίνδυνο ύπαρξης καρδιακών ασθενειών παρά το ότι άλλες καταστάσεις όπως το οξειδωτικό στρες και η φλεγμονή φαίνεται να παρεμποδίζονται από την ύπαρξη υψηλών επιπέδων σεληνίου. Αυξημένη πρόσληψη σεληνίου μπορεί να συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο για πρόκληση καρκίνου [9]. Τέλος όσον αφορά τις επιδράσεις του στην υγεία, χαμηλά ή μειωμένα επίπεδα σεληνίου σε ορισμένα σημεία της γης και ιδιαίτερα σε ορισμένες ευρωπαϊκές χώρες, μας δίνουν έναν καλό λόγο για να ανησυχούμε. Η απαραίτητη ημερήσια ποσότητα



πρόσληψης σεληνίου για έναν ενήλικο είναι 70 µg. Επειδή δεν παρατηρείται ανεπάρκειά του στα κοινά διαιτολόγια από φυσικά τρόφιμα, πρόβλημα υπάρχει μόνο σε όσους διατρέφονται τεχνητά επί μακρό χρόνο χωρίς χορήγηση σεληνίου [9]. Μακρόχρονη χρησιμοποίηση πρόσθετων που περιέχουν σελήνιο προκαλεί τριχόπτωση, διάρροια και νευρικές διαταραχές [3].

Η μέτρηση του σεληνίου σε διάφορα δείγματα βιολογικά ή μη γίνεται με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης, η οποία είναι η πλέον ενδεδειγμένη μέθοδος για την μέτρηση μετάλλων σε πολύ μικρές ποσότητες.

BITAMINH B₁₂ (ΚΟΒΑΛΑΜΙΝΗ)

Για την καλή υγεία, ανάπτυξη και αναπαραγωγή εκτός από πρωτεΐνες, λίπη, υδατάνθρακες και ανόργανα στοιχεία ο άνθρωπος έχει απόλυτη ανάγκη και από ορισμένες άλλες οργανικές ουσίες σε πολύ μικρές ποσότητες και χωρίς θερμίδες οι οποίες ρυθμίζουν τις λειτουργίες του οργανισμού του και είναι γνωστές ως βιταμίνες. Ανεπάρκεια βιταμινών προκαλεί ποικίλες δυσλειτουργίες και καχεκτικότητα ενώ στα παιδιά περιορίζει επιπλέον και την ανάπτυξή τους. Οι βιταμίνες διαχωρίζονται σε δύο ομάδες τις λιποδιαλυτές και τις υδατοδιαλυτές [3,10].

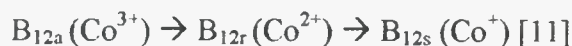
Μία από τις πιο σημαντικές υδατοδιαλυτές βιταμίνες είναι η βιταμίνη B₁₂, λόγω της μεγάλης βιολογικής σημασίας της και λόγω του ότι στην μορφή της βιταμίνης B₁₂ το κοβάλτιο παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές λειτουργίες [5].

Η βιταμίνη B₁₂ (κοβαλαμίνη) υπήρξε ένα προκλητικό πρόβλημα στη βιοχημεία και την ιατρική, από την ανακάλυψη των George Minot και William Murphy το 1926 [11] ότι η μεγαλοβλαστική ή κακοήθης αναιμία μπορεί να θεραπευθεί εάν η διατροφή του ασθενούς περιλαμβάνει μεγάλες ποσότητες ήπατος. Για πρώτη φορά η βιταμίνη B₁₂ απομονώθηκε το 1948, κρυσταλλώθηκε δε στη συνέχεια από την Dorothy Hodgkin η οποία και προσδιόρισε την τρισδιάστατη δομή της το 1956 [11]. Έχει τον πιο περίπλοκο χημικό τύπο από όλες τις βιταμίνες με μοριακό βάρος 1355 [3,10]. Σε διαλύματα έχει χρώμα κόκκινο, αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες και τα υδατικά της διαλύματα είναι πιο σταθερά σε pH 4-6. Ο πυρήνας της βιταμίνης B₁₂ αποτελείται από έναν δακτύλιο κορρίνης με ένα κεντρικό άτομο κοβαλτίου. Ο δακτύλιος αυτός, όπως και στις πορφυρίνες, περιέχει τέσσερις

πυρρολικούς δακτυλίους. Δύο από αυτούς (δακτύλιοι A και D) είναι απ' ευθείας συνδεδεμένοι μεταξύ τους, ενώ οι άλλοι είναι ενωμένοι με μεθενικές γέφυρες όπως στις πορφυρίνες [11].

Ένα άτομο κοβαλτίου είναι συνδεδεμένο με τα τέσσερα πυρρολικά άτομα αζώτου. Ο πέμπτος υποκαταστάτης είναι ένα παράγωγο του διμέθυλο-βενζιμιδαζολίου το οποίο περιέχει 3-φωσφορική ριβόζη και αμινοϊσοπροπανόλη. Ένα από τα άτομα του αζώτου του διμέθυλο-βενζιμιδαζολίου συνδέεται με το κοβάλτιο. Η αμινομάδα της αμινοϊσοπροπανόλης είναι σε αμιδικό δεσμό με μια πλευρική αλυσίδα του δακτυλίου A της κορρίνης. Ο έκτος υποκαταστάτης του κοβαλτίου μπορεί να είναι $-CH_3$, ή OH^- ή μία δεοξυαδενοσυλο-μονάδα [11].

Το άτομο του κοβαλτίου στην βιταμίνη B_{12} μπορεί να έχει βαθμό οξειδωσης +1, +2 ή +3. Στην υδροξυκοβαλαμίνη το άτομο του κοβαλτίου βρίσκεται στην κατάσταση οξειδωσης +3 (με το OH^- να καταλαμβάνει την έκτη θέση συναρμογής). Η μορφή αυτή που καλείται B_{12a} (Co^{3+}), ανάγεται σε μία δισθενή κατάσταση που ονομάζεται B_{12r} (Co^{2+}) από μία αναγωγή με δομή φλαβινοπρωτεΐνης. Η μορφή B_{12r} (Co^{2+}) ανάγεται από μία δεύτερη αναγωγή με δομή φλαβινοπρωτεΐνης σε B_{12s} (Co^+). Το αναγωγικό μέσο και στις δύο αντιδράσεις είναι το NADH.



Η μορφή B_{12s} είναι το υπόστρωμα για την τελική ενζυμική αντίδραση από την οποία προκύπτει το ενεργό συνένζυμο. Το Co^+ προσβάλλει τον 5'-άνθρακα του ATP και αντικαθιστά την τριφωσφορική ομάδα για να σχηματιστεί η 5'-δεοξυαδενοσυλοκοβαλαμίνη, γνωστή και ως συνένζυμο B_{12} . Αυτή η ένωση είναι αξιοσημείωτη στο ότι έχει δεσμό μετάλλου-άνθρακα, τον μοναδικό γνωστό σε βιομόριο. Άλλο σύνηθες γνώρισμα της αντίδρασης είναι ότι ο 5'-μεθυλενικός άνθρακας του ATP, και όχι το α- ή β άτομο φωσφόρου, είναι ο στόχος της πυρηνόφιλης προσβολής. Ο σχηματισμός της S-αδενοσυλο-μεθειονίνης είναι η μόνη άλλη βιοχημική αντίδραση κατά την οποία μία πυρηνόφιλη ένωση υποκαθιστά την τριφωσφορική ομάδα του ATP [11].

Τα ένζυμα της βιταμίνης B_{12} καταλύουν τρεις τύπους αντιδράσεων: (1) ενδομοριακές μεταθέσεις, (2) μεθυλίωσεις όπως στη σύνθεση μεθειονίνης και (3) αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων σε δεοξυριβονουκλεοτίδια. Η μετατροπή του L-μεθυλομηλόνυλο-CoA σε ηλεκτρυλο-CoA (μία ενδομοριακή μετάθεση) και ο σχηματισμός μεθειονίνης από τη μεθυλίωση της ομοκυστεΐνης είναι οι μόνες γνωστές αντιδράσεις που εξαρτώνται από το συνένζυμο B_{12} στα θηλαστικά [11].

Η βιταμίνη B₁₂ απορροφάται από ένα εξειδικευμένο σύστημα μεταφοράς. Ο στόμαχος εκκρίνει μία γλυκοπρωτεΐνη που ονομάζεται εσωτερικός παράγοντας η οποία ενώνεται με την βιταμίνη B₁₂ στον εντερικό σωλήνα. Το σύμπλοκο αυτό ακολούθως ενώνεται με έναν ειδικό υποδοχέα στα τοιχώματα του ειλεού. Το σύμπλοκο βιταμίνης B₁₂ και εσωτερικού παράγοντα διασπάται τότε από έναν απελευθερωτικό παράγοντα και μεταφέρεται ενεργά δια μέσου της μεμβράνης του ειλεού στο αίμα [11]. Η μεγαλοβλαστική αναιμία προκαλείται από την έλλειψη του εσωτερικού παράγοντα που οδηγεί σε αδυναμία απορρόφησης της βιταμίνης B₁₂ [3,11,12]. Επομένως, η σύνθεση των πουρινών και της θυμίνης σταματά. Η ασθένεια αυτή αρχικά θεραπευόταν με δίαιτα πλούσια σε ήπαρ, το οποίο περιέχει μεγάλες ποσότητες βιταμίνης B₁₂, ώστε αρκετή βιταμίνη να απορροφάται ακόμη και χωρίς τον εσωτερικό παράγοντα. Η πιο αξιόπιστη θεραπεία είναι μία ενδομυϊκή ένεση βιταμίνης B₁₂ κάθε μήνα, έτσι ώστε να παρακάμπτεται το στομάχι [11,13,14]. Εκτός από μεγαλοβλαστική αναιμία, η ανεπάρκεια της βιταμίνης B₁₂ δημιουργεί και φθορά των νευρών [10,15].

Τα ζώα και τα φυτά είναι ανίκανα να συνθέσουν βιταμίνη B₁₂. Αυτή η βιταμίνη είναι μοναδική στο ότι συντίθεται μόνο από μικροοργανισμούς, ειδικά από αναερόβια βακτήρια [11,16,17]. Ένα φυσιολογικό άτομο χρειάζεται λιγότερο από 10 μg βιταμίνης B₁₂ ημερησίως [11]. Έλλειψή της από το διαιτολόγιο είναι σπάνια, γιατί υπάρχει σχεδόν σε όλους τους ζωικούς ιστούς και κυρίως στο βοδινό ήπαρ. Επίσης, υπάρχει στο αυγό, στα ψάρια, στο γάλα, στο τυρί, στους νεφρούς, στα μύδια και στα στρείδια [10,15]. Όπως γίνεται κατανοητό υπάρχει έλλειψη της βιταμίνης B₁₂ σε αποκλειστικά χορτοφάγους τα συμπτώματα της οποίας όμως αργούν να εμφανιστούν λόγω της ικανότητάς της να αποθηκεύεται αποτελεσματικότερα από τις άλλες υδατοδιαλυτές βιταμίνες [3,10,15]. Έλλειψη επίσης B₁₂ εμφανίζεται σε περιπτώσεις όπως η νόσος του κρόνου, γαστρεκτομή και βακτήρια στο έντερο. Άλλες περιπτώσεις που δημιουργείται ανεπάρκεια βιταμίνης B₁₂ είναι η συγγενής έλλειψη της τρανσκοβαλαμίνης II και επίκτητη ανωμαλία στο μεταβολισμό της B₁₂ σε ασθενείς με παρατεταμένη αναισθησία με υποξείδιο του αζώτου. Συμπτώματα ανεπάρκειας της βιταμίνης B₁₂ μπορεί να είναι χρόνια κόπωση, σύγχυση, δυσκοιλιότητα, κατάθλιψη, ζαλάδες, διόγκωση του ήπατος, παραισθήσεις, πονοκέφαλοι, απώλεια μνήμης, νευρική νευρίτιδα, ψύχωση, εκφυλισμό σπονδυλικής στήλης και φλεγμονή της γλώσσας [10].

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της βιταμίνης B₁₂ γίνεται με διάφορες μεθόδους, όπως για παράδειγμα το φιλτράρισμα μέσω γέλης (gel filtration) και η CM χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής [18,19,]. Με αυτές της μεθόδους μπορούμε να προσδιορίσουμε την βιταμίνη B₁₂ αποφεύγοντας τις παρεμποδίσεις που είναι πιθανό να εμφανιστούν στις μετρήσεις μας με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης. Επίσης, σε αντίθεση με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα ο προσδιορισμός της βιταμίνης B₁₂ είναι άμεσος. Στην ατομική απορρόφηση ο προσδιορισμός της βιταμίνης B₁₂ γίνεται μέσω του κοβαλτίου που περιέχεται σε αυτήν. Από την άλλη όμως με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης έχουμε την δυνατότητα να υπολογίσουμε και πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις της βιταμίνης, λόγω του χαμηλού ορίου ανιχνευσιμότητας της μεθόδου, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες μεθόδους που οι ποσότητες που μετρούνται είναι σαφώς μεγαλύτερες. Τέλος, με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης μπορούμε να μετρήσουμε παντός είδους δείγματα αρκεί μόνο να τα υγροποιήσουμε προηγουμένως. Στις άλλες μεθόδους δεν έχουμε αυτή την δυνατότητα και περιοριζόμαστε μόνο στα υγρά δείγματα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας προερχόμενα από την εταιρεία SIGMA Hellas πλην ορισμένων εξαιρέσεων που αναφέρονται παρακάτω.

ΜΕΡΟΣ Α' : ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΟΒΑΛΤΙΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕ ΦΛΟΓΑ

Για την μέτρηση κοβαλτίου χρησιμοποιήσαμε πρότυπο διάλυμα κοβαλτίου της εταιρείας "FISONS Scientific Equipment". Το συγκεκριμένο πρότυπο διάλυμα ήταν παρασκευασμένο σε HNO_3 , η χρησιμότητα του οποίου είναι σαν μέσο οξίνισης ώστε να φέρουμε το pH σε επιθυμητά επίπεδα και είχε συγκέντρωση κοβαλτίου ίση με 1000 mg/l (1000 ppm).

Όλα τα διαλύματα περιείχαν διάλυμα HNO_3 περιεκτικότητας 0,01 M και με pH ίσο περίπου με 2. Το διάλυμα HNO_3 το παρασκευάσαμε χρησιμοποιώντας μικρή ποσότητα πυκνού διαλύματος HNO_3 με περιεκτικότητα 65 %.

Η επιθυμητή συγκέντρωση επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας διάφορες ποσότητες από το πρότυπο διάλυμα κοβαλτίου και προσθέτοντας HNO_3 κάθε φορά τόσο ώστε να συμπληρώνεται ο τελικός όγκος του πρότυπου διαλύματος που παρασκευάζουμε στα 10 ml, παρασκευάσαμε 10 πρότυπα διαλύματα κοβαλτίου γνωστής αλλά διαφορετικής συγκεντρώσεως το καθένα. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων κοβαλτίου που παρασκευάσαμε κυμαίνονταν από 2 έως 20 mg/l.

Αυτά τα 10 πρότυπα διαλύματα κοβαλτίου τα μετρήσαμε σε μηχάνημα μέτρησης της ατομικής απορρόφησης με φλόγα, της εταιρείας "UNICAM Analytical Systems", μοντέλο UNICAM 939, χρησιμοποιώντας ως τυφλό το διάλυμα HNO_3 που έχουμε παρασκευάσει. Στο ενδιάμεσο των μετρήσεων των πρότυπων διαλυμάτων κοβαλτίου ξεπλέναμε το σύστημα με το τυφλό. Συγκεκριμένα για τις μετρήσεις μας χρησιμοποιήσαμε πολυστοιχειακή λυχνία Co – Cu – Fe – Mn και προσαρμόσαμε το μήκος κύματος στα 240,7 nm έτσι ώστε να μετρήσουμε αποκλειστικά κοβάλτιο. Η φλόγα προερχότανε από μίγμα αέρα και ακετυλενίου 80 %. Πρέπει να αναφέρουμε ότι για τις ποσότητες κοβαλτίου που επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν λάβαμε υπόψη το όριο ανιχνευσιμότητας του κοβαλτίου με αυτή την μέθοδο το οποίο είναι ίσο με 0,081 mg/l σύμφωνα με τον κατασκευαστή.

Για την μέτρηση κοβαλτίου περιεχομένου σε φαρμακευτικό σκεύασμα το οποίο περιείχε βιταμίνη B₁₂, χρησιμοποιήθηκε το φαρμακευτικό σκεύασμα "NEUROBION" της εταιρείας "MERCK" και μάλιστα το ενέσιμο σκεύασμα. Το "NEUROBION" είναι ένα σύμπλεγμα των βιταμινών B₁, B₆ και B₁₂. Κάθε φύσιγγα του σκευάσματος έχει όγκο 3 ml και περιέχει 100 mg βιταμίνη B₁ (θειαμίνη), 100 mg βιταμίνη B₆ (πυριδοξόλη) και 1000 μg (333.333 mg/l) βιταμίνη B₁₂ (κοβαλαμίνη). Επίσης περιέχει και τα παρακάτω έκδοχα, κυανιούχο κάλλιο, βενζυλική αλκοόλη και υδροξείδιο του νατρίου.

Κατασκευάσαμε δύο καμπύλες αναφοράς του κοβαλτίου που περιέχεται σε αυτό το σκεύασμα και πιο συγκεκριμένα στην βιταμίνη B₁₂ αυτού του σκευάσματος, μία για χαμηλές συγκεντρώσεις και άλλη μία για υψηλότερες συγκεντρώσεις αυτού του κοβαλτίου. Πειραματικά ακολουθήσαμε την εξής διαδικασία. Παρασκευάσαμε 10 διαλύματα τελικού όγκου 5 ml το καθένα, χρησιμοποιώντας διαφορετικές ποσότητες από το φαρμακευτικό σκεύασμα για το καθένα. Οι ποσότητες αυτές κυμαίνονταν από 0,1 έως 1 ml. Ο όγκος των 5 ml συμπληρωνότανε κάθε φορά από το διάλυμα HNO₃ που έχουμε παρασκευάσει. Οι τελικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων που παρασκευάσαμε κυμαίνονταν από 0,29 έως 2,9 mg/l. Τα διαλύματα αυτά τα μετρήσαμε στην συνέχεια με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα κάνοντας τις ίδιες ρυθμίσεις που κάναμε και για την καμπύλη αναφοράς του κοβαλτίου. Το τυφλό που χρησιμοποιήσαμε και σε αυτή την περίπτωση ήταν το διάλυμα HNO₃ που είχαμε παρασκευάσει και το οποίο χρησιμοποιούταν επίσης και για ξέπλυμα μεταξύ της κάθε μέτρησης. Στην συνέχεια παίρνοντας 1 ml από το κάθε διάλυμα που έχουμε παρασκευάσει και προσθέτοντας 9 ml HNO₃ κάθε φορά, παρασκευάσαμε 10 καινούργια διαλύματα. Όλες οι ποσότητες και του σκευάσματος και του διαλύτη λήφθηκαν με πιπέτα Gillson. Έτσι στο τέλος είχαμε 10 νέα διαφορετικά διαλύματα σκευάσματος με τελικές συγκεντρώσεις κοβαλτίου που κυμαίνονταν από 0,029 έως και 0,29 mg/l, τα οποία και τα μετρήσαμε με τον ίδιο τρόπο για να πάρουμε την καμπύλη αναφοράς κοβαλτίου που αντιστοιχεί σε μικρές συγκεντρώσεις αυτού στο σκεύασμα.

ΜΕΡΟΣ Β΄: ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΟΒΑΛΤΙΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΟΒΑΛΤΙΟΥ

Για να πάρουμε το φάσμα απορρόφησης του κοβαλτίου ακολουθήσαμε την μέθοδο του κοβαλτίου [1]. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήσαμε ήταν, το πρότυπο διάλυμα κοβαλτίου της “FISONS Scientific Equipment”, το οποίο χρησιμοποιούσαμε και στα πειράματά μας με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα, διάλυμα NH_4SCN περιεκτικότητας 10000 mg/l, το οποίο παρασκευάσαμε ζυγίζοντας 1 gr στερεού NH_4SCN και διαλύοντάς το με ανάδευση σε 100 ml απιονισμένου νερού, και διάλυμα μεθανόλης 20 %, το οποίο παρασκευάσαμε χρησιμοποιώντας διάλυμα μεθανόλης 100 % και αραιώνοντάς το με νερό. Το διάλυμα NH_4SCN παρασκευαζόταν καθημερινά λόγω του ότι είναι φωτοευαίσθητο και η αλλοίωσή του είναι πιθανό να επηρεάσει τις μετρήσεις μας.

Σύμφωνα με την μέθοδο του κοβαλτίου, χρησιμοποιώντας 3,75 ml κοβαλτίου και προσθέτοντας 1,25 ml από το διάλυμα NH_4SCN που παρασκευάσαμε καθώς και 2-3 σταγόνες από το διάλυμα μεθανόλης 20 % έτσι ώστε να αυξήσουμε τον συντελεστή μοριακής απορρόφησης, πραγματοποιείται η παρακάτω αντίδραση:



Αυτό που μετράμε εμείς φωτομετρικά είναι το σύμπλοκο $[\text{Co}(\text{SCN})_4]^{2-}$ που σχηματίζεται από την παραπάνω αντίδραση.

Για να πάρουμε το φάσμα απορρόφησης του κοβαλτίου, φωτομετρήσαμε το διάλυμα που παρασκευάσαμε σε διάφορα μήκη κύματος από 340 έως 700 nm χρησιμοποιώντας ως τυφλό το διάλυμα HNO_3 περιεκτικότητας 0,01 M και pH περίπου 2 που είχαμε παρασκευάσει και το οποίο χρησιμοποιούσαμε και για τα πειράματά μας με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα.

Στην συνέχεια, εξετάσαμε φωτομετρικά την κινητική της παραπάνω αντίδρασης. Παρασκευάσαμε ένα διάλυμα το οποίο περιείχε 15 ml από το πρότυπο διάλυμα κοβαλτίου, 3 ml διαλύματος NH_4SCN , 2 ml αραιού διαλύματος HNO_3 για όσο το δυνατόν πιο καλή προσέγγιση της μεθόδου της ατομικής απορρόφησης με φλόγα που είχαμε χρησιμοποιήσει προηγουμένως, καθώς επίσης και 5 σταγόνες από το διάλυμα μεθανόλης 20 %. Αφού αναδεύσαμε πολύ καλά το διάλυμα στην συνέχεια το φωτομετρήσαμε σε μήκος κύματος ίσο με 515 nm. Την χρονική στιγμή της ανάδευσης θεωρήσαμε ότι ο χρόνος t είναι ίσος με μηδέν. Η μέτρηση

επαναλαμβανόταν κάθε 2 λεπτά περίπου ενώ κατά την διάρκεια των μετρήσεων κρατούσαμε τον χρόνο. Οι μετρήσεις συνεχίστηκαν μέχρις ότου να σταθεροποιηθεί η τιμή της απορρόφησης, δηλαδή μέχρι να σταματήσει η αντίδραση.

Αφού πήραμε το φάσμα απορρόφησης του κοβαλτίου και την κινητική της αντίδρασης που πραγματοποιείται με την προσθήκη σε αυτό θειοκυανιούχου αμμωνίου, στην συνέχεια κατασκευάσαμε πρότυπη καμπύλη αναφοράς για το κοβάλτιο, ακολουθώντας και πάλι την μέθοδο του κοβαλτίου και μετρώντας φωτομετρικά. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιώντας και πάλι το πρότυπο διάλυμα κοβαλτίου φτιάξαμε 17 διαφορετικά διαλύματα κάθε ένα από τα ποία είχε διαφορετική ποσότητα κοβαλτίου. Οι όγκοι του κοβαλτίου κυμαίνονταν από 0,5 έως 15 ml. Στην συνέχεια σε κάθε ένα από αυτά τα διαλύματα προσθέσαμε 3 ml από το διάλυμα NH_4SCN που έχουμε παρασκευάσει. Τέλος, σε κάθε διάλυμα προσθέσαμε και HNO_3 τόση ποσότητα ώστε ο τελικός όγκος του κάθε διαλύματος να είναι 20 ml, καθώς και από 5 με 6 σταγόνες διαλύματος μεθανόλης 20 %. Οι τελικές συγκεντρώσεις κοβαλτίου των διαλυμάτων που παρασκευάσαμε ήταν διαφορετικές για το καθένα και κυμαίνονταν από 25 έως 750 mg/l. Και τα 17 διαλύματα στην συνέχεια τα φωτομετρήσαμε σε μήκος κύματος ίσο με 515 nm, το οποίο είναι το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης για το κοβάλτιο, όπως το βρήκαμε προηγουμένως όταν πήραμε το φάσμα απορρόφησης του κοβαλτίου. Σαν τυφλό για τις μετρήσεις μας, χρησιμοποιήσαμε το διάλυμα HNO_3 που χρησιμοποιήσαμε και για την παρασκευή των διαλυμάτων. Η φωτομέτρηση για κάθε διάλυμα έγινε μέσα σε 8 λεπτά από την παρασκευή του διαλύματος.

Για να πάρουμε φάσμα απορρόφησης για το φαρμακευτικό σκεύασμα “NEUROBION” παρασκευάσαμε ένα διάλυμα το οποίο αποτελούταν από 2 ml από το φαρμακευτικό σκεύασμα και από 2 ml από το διάλυμα HNO_3 συγκεντρώσεως 0,01 M και με pH περίπου 2 το οποίο παρασκευάσαμε μόνοι μας. Στην συνέχεια αυτό το διάλυμα που παρασκευάσαμε, το φωτομετρήσαμε σε διάφορα μήκη κύματος, χρησιμοποιώντας ως τυφλό το ίδιο διάλυμα HNO_3 . Το μήκος κύματος στο οποίο μετρήσαμε κυμαινόταν από 380 έως 700 nm. Οι μετρήσεις έγιναν σε φωτόμετρο της εταιρείας CECIL, λόγω του ότι δεν χρησιμοποιήσαμε μεθανόλη, οπότε είχαμε την δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε πλαστικές κυψελίδες.

Τέλος, κατασκευάσαμε καμπύλη αναφοράς για το φαρμακευτικό σκεύασμα “NEUROBION”. Για αυτόν τον σκοπό παρασκευάσαμε 5 διαφορετικά διαλύματα κάθε ένα από τα οποία περιείχε διαφορετική ποσότητα από το φαρμακευτικό

σκεύασμα. Πιο συγκεκριμένα κάθε διάλυμα περιείχε μία ποσότητα από το φαρμακευτικό σκεύασμα η οποία κυμαινόταν από 0,2 έως 1 ml, 3 ml διαλύματος NH_4SCN , τόση ποσότητα HNO_3 ώστε πάντα ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 5 ml, καθώς και 2 με 3 σταγόνες διαλύματος μεθανόλης περιεκτικότητας 20 %. Η τελική συγκέντρωση των διαλυμάτων αυτών σε κοβάλτιο κυμαινόταν από 0,58 έως 2,9 mg/l. Τα διαλύματα αυτά στην συνέχεια, χρησιμοποιώντας ως τυφλό το διάλυμα HNO_3 τα φωτομετρήσαμε στα 515 nm, στο μήκος κύματος δηλαδή που το κοβάλτιο παρουσιάζει την μέγιστη απορρόφηση. Η φωτομέτρηση έγινε στο συγκεκριμένο μήκος κύματος και όχι στο μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης του φαρμακευτικού σκευάσματος "NEUROBION" γιατί αυτό που μας ενδιαφέρει από το σκεύασμα είναι το κοβάλτιο που υπάρχει στην βιταμίνη B_{12} αυτού. Όπως και προηγουμένως οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν μέσα σε 8 λεπτά από την παρασκευή του κάθε διαλύματος. Λόγω της παρουσίας μεθανόλης οι φωτομετρήσεις γίνανε σε φωτόμετρο της εταιρείας "MILTON ROY COMPANY" το οποίο δέχεται γυάλινες κυψελίδες.

ΜΕΡΟΣ Γ': ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΕΛΗΝΙΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕ ΦΛΟΓΑ

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του σεληνίου χρησιμοποιήσαμε πρότυπο διάλυμα σεληνίου, επίσης της εταιρείας "FISONS Scientific Equipment" το οποίο ήταν όπως και το πρότυπο διάλυμα κοβαλτίου παρασκευασμένο σε HNO_3 και είχε και αυτό συγκέντρωση 1000 mg/l (1000ppm).

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του σεληνίου, παρασκευάσαμε 5 διαφορετικά διαλύματα. Σε κάθε ένα από αυτά προσθέταμε διαφορετική ποσότητα σεληνίου και συμπληρώναμε από το HNO_3 συγκεντρώσεως 0,01 M και pH περίπου 2, ποσότητα τόση ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι πάντοτε 10 ml. Όπως και στα προηγούμενα πειράματα όλες οι ποσότητες λήφθηκαν με πιπέτα Gillson. Οι τελικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων σεληνίου που παρασκευάσαμε ήταν πάντοτε γνωστές και κυμαίνονταν από 20 έως 100 mg/l.

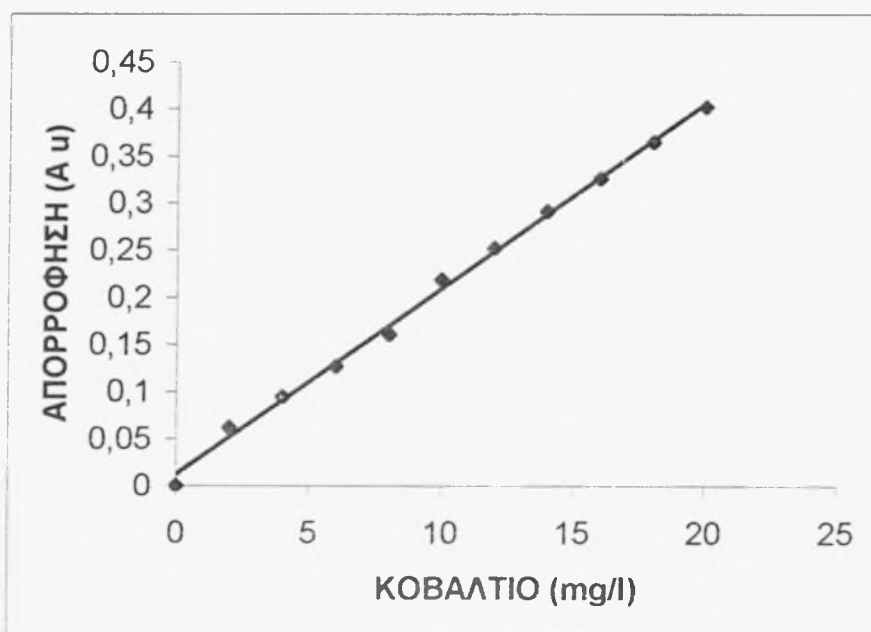
Τις μετρήσεις μας τις πραγματοποιήσαμε χρησιμοποιώντας ως τυφλό το παρασκευασθέν διάλυμα HNO_3 το οποίο χρησιμοποιήθηκε επίσης και για ξέπλυμα στο ενδιάμεσο των μετρήσεων. Αυτή την φορά χρησιμοποιήσαμε μονοστοιχειακή λυχνία σεληνίου η οποία λειτουργεί σε μήκος κύματος 196 nm. Η φλόγα αυτή τη

φορά προερχότανε από μίγμα αέρα, ακετυλενίου και μονοξειδίου του αζώτου 90 %.
Τέλος το όριο ανιχνευσιμότητας για το σελήνιο με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα είναι 0,29 mg/l όπως έχει οριστεί από τον κατασκευαστή και με βάση αυτή την τιμή καθορίσαμε και τις ποσότητες του σεληνίου που χρησιμοποιήσαμε προκειμένου να παρασκευάσουμε τα προς μέτρηση διαλύματά μας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΜΕΡΟΣ Α΄: ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΟΒΑΛΤΙΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕ ΦΛΟΓΑ

Ακολουθώντας την πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, και με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα κατασκευάσαμε καμπύλη αναφοράς κοβαλτίου. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε πολλές φορές κατά την διάρκεια των πειραμάτων και σίγουρα τουλάχιστον μία φορά την ημέρα, μέχρις ότου κάθε μέρα να παίρνουμε μία αξιόπιστη καμπύλη αναφοράς κοβαλτίου, με συντελεστή συσχέτισης r^2 μεγαλύτερο του 0,995. Η καμπύλη αναφοράς κοβαλτίου που πήραμε, είναι αυτή που φαίνεται στο σχήμα 1.



Σχήμα 1: Καμπύλη αναφοράς κοβαλτίου με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης, η οποία περιγράφεται από την εξίσωση $y = 0,0197x + 0,0121$ και έχει συντελεστή συσχέτισης $r^2 = 0,9971$.

Η παραπάνω καμπύλη αναφοράς κοβαλτίου περιγράφεται από την εξίσωση $y = 0,0197x + 0,0121$, έχει συντελεστή συσχέτισης $r^2 = 0,9971$ και παρουσιάζει συστηματικό σφάλμα 0,0121 Au το οποίο οφείλεται σε πιθανά πειραματικά σφάλματα. Το όριο ανιχνευσιμότητας του κοβαλτίου με βάση την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα είναι ίσο με 0,004 mg/l.

Η εξίσωση που περιγράφει την παραπάνω καμπύλη αναφοράς καθώς και ο συντελεστή συσχέτισης r^2 υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα στατιστικής επεξεργασίας "Excel". Με τον ίδιο τρόπο υπολογίζονται και για τις υπόλοιπες καμπύλες αναφοράς. Το όριο ανιχνευσιμότητας υπολογίστηκε με βάση τον τύπο

$$O.A. = M.O. + 3 S.D. [2]$$

Όπου:

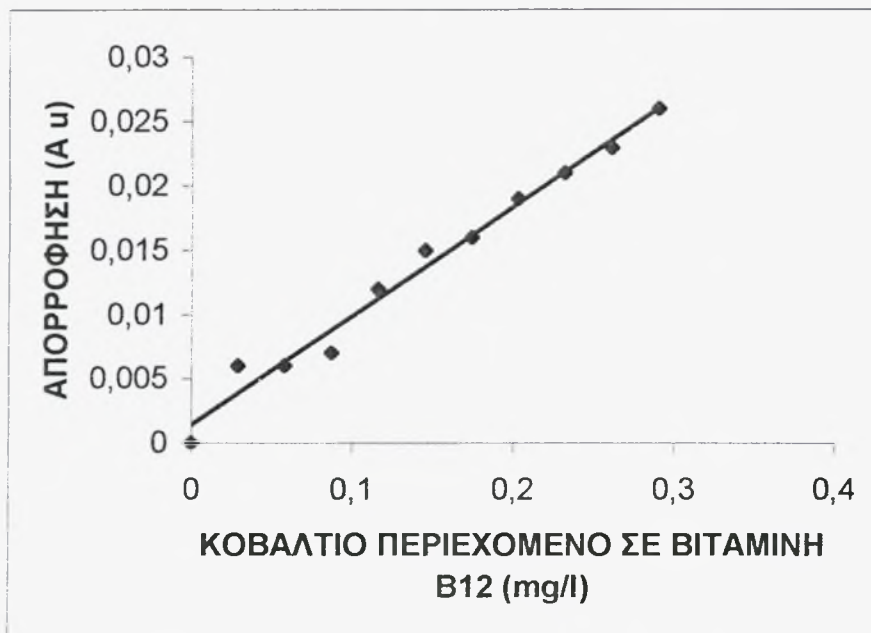
O.A.: το όριο ανιχνευσιμότητας

M.O.: ο μέσος όρος των μετρήσεων του τυφλού

S.D.: η τυπική απόκλιση των μετρήσεων του τυφλού

Από την καμπύλη αναφοράς που φαίνεται στο σχήμα 1 μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα, ότι η μέτρηση κοβαλτίου τελικής συγκεντρώσεως από 0,004 έως 20 mg/l, μπορεί να επιτευχθεί με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα. Η γραμμικότητα της καμπύλης αναφοράς κοβαλτίου συνεχίζεται και για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλλά το εύρος που μας ενδιαφέρει καλύπτεται από την συγκεκριμένη καμπύλη αναφοράς. Βέβαια θα πρέπει να πούμε ότι σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις κοβαλτίου η γραμμικότητα της καμπύλης χάνεται.

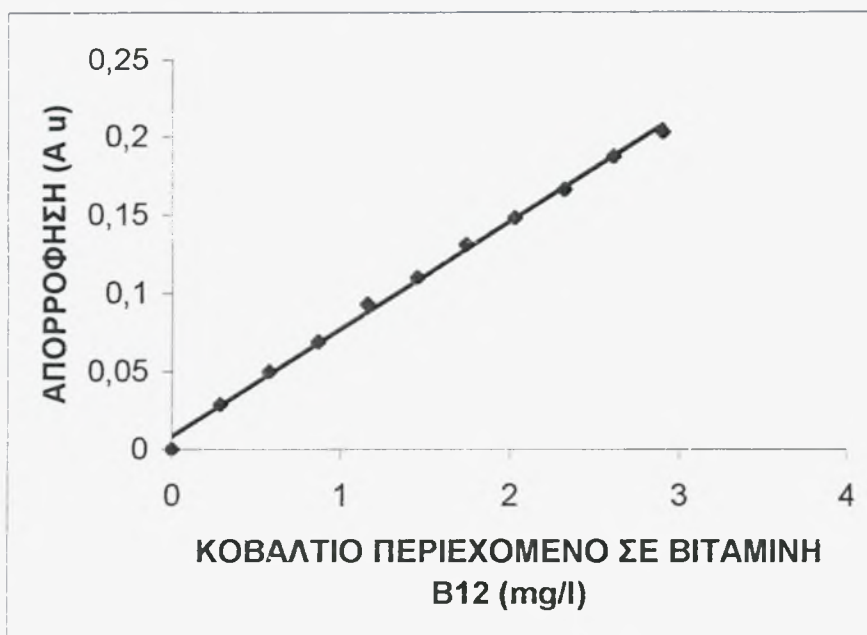
Στην συνέχεια χρησιμοποιώντας το φαρμακευτικό σκεύασμα NEUROBION, το οποίο περιέχει βιταμίνη B₁₂, κατασκευάσαμε δύο καμπύλες αναφοράς για το κοβάλτιο, το οποίο περιέχεται στην βιταμίνη B₁₂, ακολουθώντας την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης. Η πρώτη ήταν πάνω σε μικρές συγκεντρώσεις κοβαλτίου ενώ η δεύτερη βασιζόταν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αυτού. Ο λόγος που κάνουμε τις καμπύλες αναφοράς του κοβαλτίου για το σκεύασμα, είναι να δούμε αν όλο το κοβάλτιο της βιταμίνης B₁₂, είναι ελεύθερο να αποκριθεί με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα. Η καμπύλη αναφοράς κοβαλτίου εμπεριεχομένου σε βιταμίνη B₁₂ που αντιστοιχεί σε μικρές συγκεντρώσεις κοβαλτίου, είναι αυτή που απεικονίζεται στο σχήμα 2.



Σχήμα 2 : Καμπύλη αναφοράς κοβαλτίου εμπεριεχομένου σε βιταμίνη B₁₂ με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης, η οποία περιγράφεται από την εξίσωση $y = 0,0085x + 0,0014$ και έχει συντελεστή συσχέτισης $r^2 = 0,9816$.

Η καμπύλη αναφοράς κοβαλτίου εμπεριεχομένου σε βιταμίνη B₁₂ που απεικονίζεται στο σχήμα 2, περιγράφεται από την εξίσωση $y = 0,085x + 0,0014$, έχει συντελεστή συσχέτισης $r^2 = 0,9816$ και παρουσιάζει συστηματικό σφάλμα 0,0014 Au το οποίο οφείλεται σε πιθανά σφάλματα κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Στο σχήμα 3 που ακολουθεί απεικονίζεται η καμπύλη αναφοράς κοβαλτίου εμπεριεχομένου σε βιταμίνη B₁₂ που αντιστοιχεί σε μεγαλύτερες από ότι στο σχήμα 2 συγκεντρώσεις.



Σχήμα 3: Καμπύλη αναφοράς κοβαλτίου εμπεριεχομένου σε βιταμίνη B₁₂ με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα, η οποία περιγράφεται από την εξίσωση $y = 0,0687x + 0,0082$ και έχει συντελεστή συσχέτισης $r^2 = 0,9969$

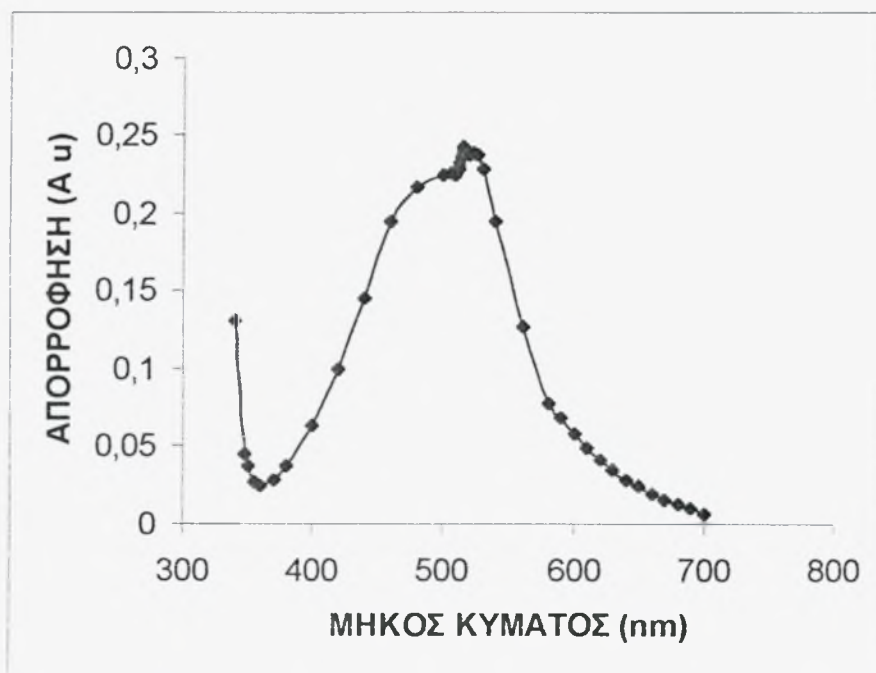
Η καμπύλη αναφοράς κοβαλτίου εμπεριεχομένου σε βιταμίνη B₁₂ που φαίνεται παραπάνω περιγράφεται από την εξίσωση $y = 0,0687x + 0,0082$ έχει συντελεστή συσχέτισης $r^2 = 0,9969$ και παρουσιάζει συστηματικό σφάλμα ίσο με 0,0082 Au το οποίο πιθανώς οφείλεται σε πειραματικά σφάλματα.

Από τα σχήματα 2 και 3, βλέπουμε ότι είναι εφικτή η παρακολούθηση της συγκέντρωσης κοβαλτίου στο φαρμακευτικό σκεύασμα NEUROBION με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα. Ωστόσο θα πρέπει να επισημάνουμε ότι η αξιοπιστία της μεθόδου μικραίνει όσο μεγαλύτερες είναι οι συγκεντρώσεις του κοβαλτίου που μετράμε.

Οι τελικές συγκεντρώσεις κοβαλτίου στα δείγματα που μετρήθηκαν και φαίνονται στα σχήματα 1, 2 και 3 αντιστοιχούν σε απορρόφηση σχεδόν όμοια. Έτσι μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι η μεταβολή της απορρόφησης στα σχήματα 2 και 3 οφείλεται στην παρουσία κοβαλτίου και επομένως το κοβάλτιο είναι ελεύθερο να αποκριθεί ολόκληρο με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα.

ΜΕΡΟΣ Β΄: ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΟΒΑΛΤΙΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΚΟΒΑΛΤΙΟΥ

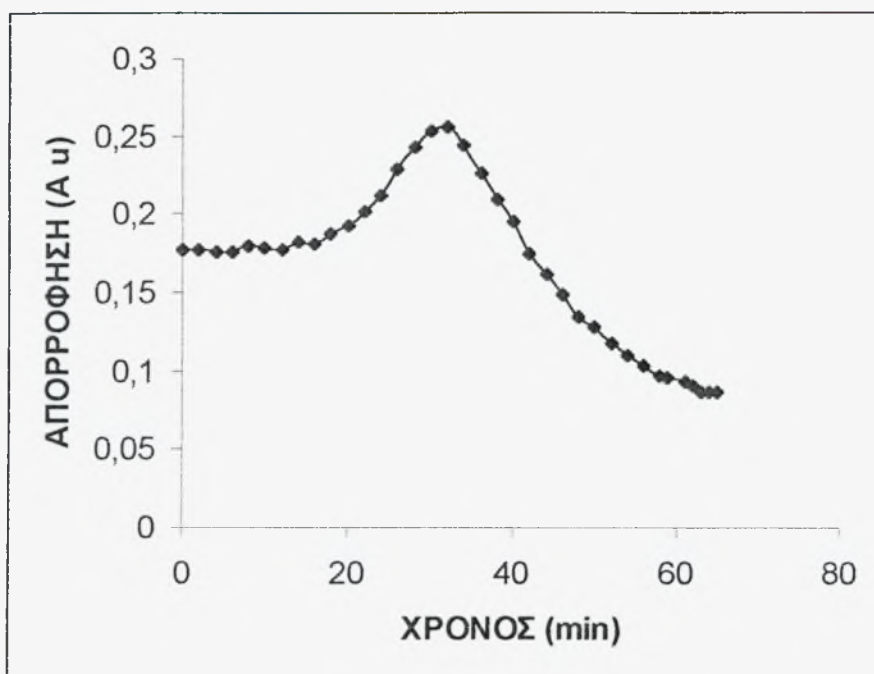
Χρησιμοποιώντας την φωτομετρική μέθοδο και ακολουθώντας την μέθοδο του κοβαλτίου πήραμε φάσμα απορρόφησης για το κοβάλτιο. Το φάσμα απορρόφησης που πήραμε απεικονίζεται στο σχήμα 4.



Σχήμα 4: Φάσμα απορρόφησης για το κοβάλτιο. Το μήκος κύματος στο οποίο παρουσιάζει την μέγιστη απορρόφηση είναι τα 515 nm.

Το φάσμα απορρόφησης που πήραμε για το κοβάλτιο και το οποίο απεικονίζεται στο παραπάνω σχήμα, μας δείχνει ότι το κοβάλτιο παρουσιάζει την μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος ίσο με 515 nm.

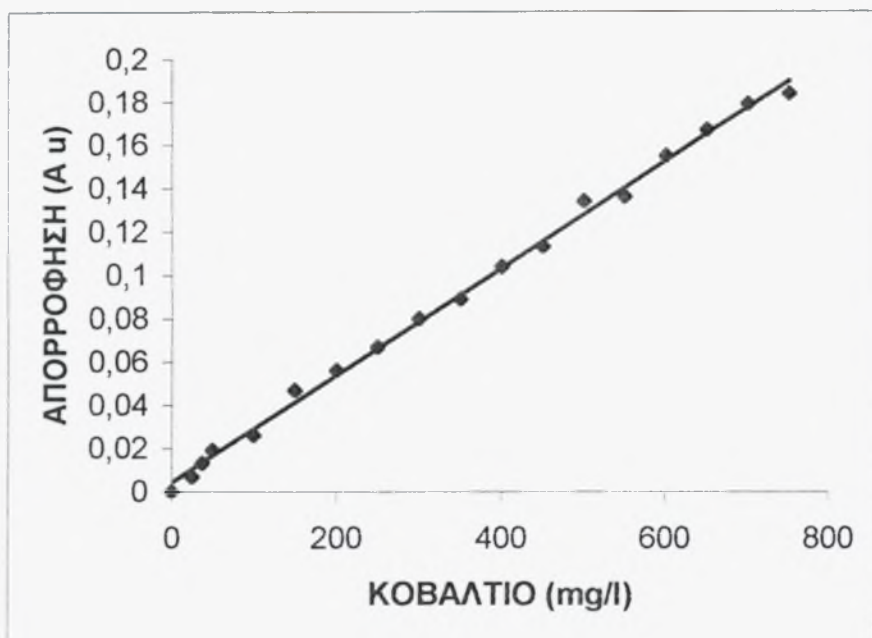
Η πορεία της αντίδρασης που πραγματοποιείται μεταξύ του κοβαλτίου και του θειοκυανιούχου αμμωνίου παρουσία μεθανόλης, φαίνεται παραστατικά στο σχήμα 5.



Σχήμα 5: Απεικόνιση της κινητικής της αντίδρασης κοβαλτίου με θειοκυανιούχο αμμώνιο παρουσία μεθανόλης.

Το προϊόν της αντίδρασης $\text{Co}^{2+} + 4\text{SCN}^- \rightleftharpoons [\text{Co}(\text{SCN})_4]^{2-}$ σχηματίζεται άμεσα και παραμένει σταθερό για περίπου 16 λεπτά. Μετά τον χρόνο αυτό σχηματίζεται ένα παρεμποδίζον σώμα, πιθανόν άλλο σύμπλοκο του κοβαλτίου το οποίο είναι ασταθές και καταστρέφεται μέσα σε περίπου μία ώρα από την έναρξη της αντίδρασης, όπως φαίνεται από την πτώση της καμπύλης. Για τον λόγο αυτό τα πειράματα γίνονται μέσα σε οκτώ λεπτά από την ανάμειξη των αντιδραστηρίων.

Στην συνέχεια στο συγκεκριμένο μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης του κοβαλτίου, δηλαδή στα 515 nm και μέσα σε οκτώ λεπτά από την παρασκευή των διαλυμάτων μας, κατασκευάζουμε καμπύλη αναφοράς του κοβαλτίου ακολουθώντας την μέθοδο του κοβαλτίου όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Η καμπύλη αναφοράς κοβαλτίου που πήραμε απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 6).

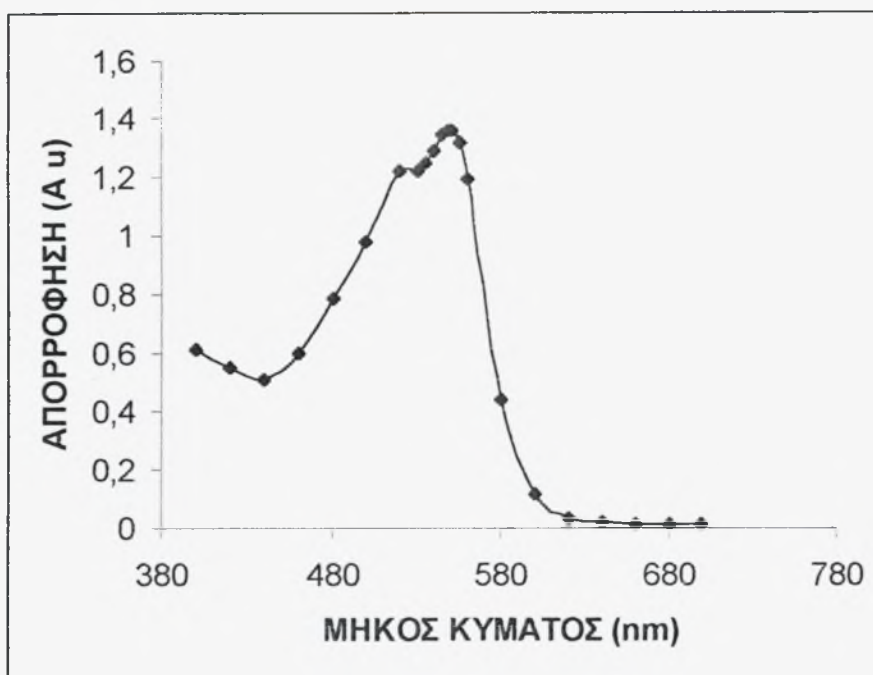


Σχήμα 6: Καμπύλη αναφοράς κοβαλτίου με φωτομετρία η οποία περιγράφεται από την εξίσωση $y = 0,0002x + 0,0041$ και έχει συντελεστή συσχέτισης $r^2 = 0,997$.

Η καμπύλη αναφοράς κοβαλτίου που απεικονίζεται στο σχήμα 6 περιγράφεται από την εξίσωση $y = 0,0002x + 0,0041$, έχει συντελεστή συσχέτισης $r^2 = 0,997$ και παρουσιάζει συστηματικό σφάλμα 0,0041 Au το οποίο οφείλεται σε πιθανά σφάλματα κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Το όριο ανιχνευσιμότητας του κοβαλτίου με βάση την φωτομετρική μέθοδο είναι 0,004 mg/l.

Παρατηρώντας την καμπύλη αναφοράς του κοβαλτίου που φαίνεται στο σχήμα 6, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η μέτρηση κοβαλτίου τελικής συγκεντρώσεως από 0,004 έως 750 mg/l με την φωτομετρική μέθοδο είναι εφικτή. Αντίθετα από ότι στην ατομική απορρόφηση, η γραμμικότητα της καμπύλης αναφοράς συνεχίζει και για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κοβαλτίου.

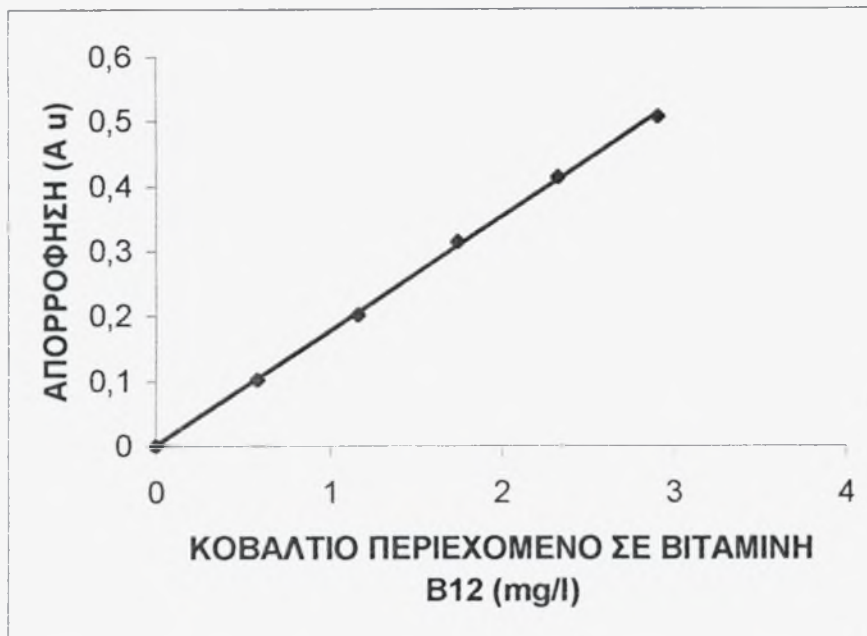
Έπειτα και πάλι με την φωτομετρική μέθοδο πήραμε φάσμα απορρόφησης για το φαρμακευτικό σκεύασμα NEUROBION το οποίο περιέχει μεταξύ των άλλων και βιταμίνη B₁₂. Στο σχήμα 7 εμφανίζεται το φάσμα απορρόφησης που πήραμε.



Σχήμα 7: Φάσμα απορρόφησης για το φαρμακευτικό σκεύασμα NEUROBION το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 550 nm.

Το φάσμα απορρόφησης του φαρμακευτικού σκευάσματος NEUROBION παρουσιάζει την μέγιστη απορρόφηση στο μήκος κύματος των 550 nm.

Τέλος κατασκευάσαμε καμπύλη αναφοράς για το φαρμακευτικό σκεύασμα NEUROBION σε μήκος κύματος ίσο με 515 nm. Η καμπύλη αναφοράς που πήραμε φαίνεται στο σχήμα 8.



Σχήμα 8: Καμπύλη αναφοράς κοβαλτίου εμπεριεχομένου σε βιταμίνη B₁₂ με την φωτομετρική μέθοδο η οποία περιγράφεται από την εξίσωση $y = 0,1763x + 0,0005$ και έχει συντελεστή συσχέτισης $r^2 = 0,9994$.

Η καμπύλη αναφοράς κοβαλτίου εμπεριεχομένου σε βιταμίνη B₁₂ που φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, περιγράφεται από την εξίσωση $y = 0,1763x + 0,0005$, έχει συντελεστή συσχέτισης $r^2 = 0,9994$ και παρουσιάζει ελάχιστο συστηματικό σφάλμα 0,0005 Au το οποίο οφείλεται σε πιθανά πειραματικά σφάλματα.

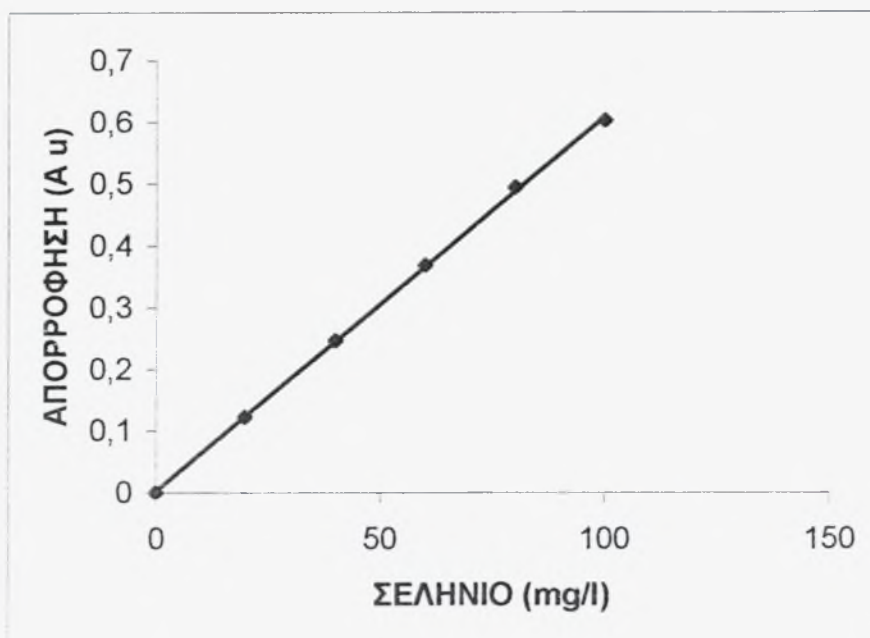
Η ποσότητα του κοβαλτίου στο σκεύασμα σύμφωνα με τον κατασκευαστή είναι ίση με 14,5 mg/l. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς του κοβαλτίου στο σκεύασμα (σχήμα 8), δεν αντιστοιχεί στην πρότυπη καμπύλη αναφοράς του κοβαλτίου που φαίνεται στο σχήμα 6. Μπορούμε λοιπόν να συμπεράνουμε ότι το κοβάλτιο του σκευάσματος δεν είναι ελεύθερο να αποκριθεί ολόκληρο στην κλασσική μέθοδο προσδιορισμού.

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη τόσο το μέρος Α' όσο και το μέρος Β', μπορούμε να πούμε ότι το κοβάλτιο που εμπεριέχει η βιταμίνη B₁₂ μπορεί να ανιχνευθεί μόνο με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης και όχι με την κλασσική μέθοδο. Με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης υπήρχε αρκετά μεγάλη συμφωνία μεταξύ της καμπύλης αναφοράς κοβαλτίου στο σκεύασμα και της πρότυπης καμπύλης αναφοράς κοβαλτίου. Αυτή η συμφωνία δεν ήταν εφικτή με την κλασσική μέθοδο προσδιορισμού.

Επιπλέον θα πρέπει να τονίσουμε και κάποια άλλα πλεονεκτήματα της μεθόδου της ατομικής απορρόφησης με φλόγα σε σχέση με την κλασική μέθοδο προσδιορισμού κοβαλτίου, που έχουν να κάνουν με την ευχρηστία της μεθόδου. Οι μετρήσεις με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης είναι σαφώς πιο γρήγορες και λιγότερο κοπιαστικές. Ακόμη όμως πιο σημαντικό είναι να τονίσουμε ότι το όριο ανιχνευσιμότητας της μεθόδου της ατομικής απορρόφησης με φλόγα κυμαίνεται σε αρκετά χαμηλά επίπεδα και μας δίνει την δυνατότητα να μετρήσουμε ακόμη και πολύ μικρές ποσότητες.

ΜΕΡΟΣ Γ': ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΕΛΗΝΙΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕ ΦΛΟΓΑ

Με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης κατασκευάσαμε καμπύλη αναφοράς και για το σελήνιο. Στο σχήμα 9 φαίνεται η καμπύλη αναφοράς για το σελήνιο.



Σχήμα 9: Καμπύλη αναφοράς σεληνίου με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης η οποία περιγράφεται από την εξίσωση $y = 0,0061x + 0,002$ και έχει συντελεστή συσχέτισης $r^2 = 0,9996$.

Η καμπύλη αναφοράς σεληνίου που απεικονίζεται στο σχήμα 9, περιγράφεται από την εξίσωση $y = 0,0061x + 0,002$, έχει συντελεστή συσχέτισης $r^2 = 0,9996$ και παρουσιάζει συστηματικό σφάλμα ίσο με 0,002 Au το οποίο οφείλεται σε πιθανά πειραματικά σφάλματα. Το όριο ανιχνευσιμότητας του σεληνίου με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης είναι ίσο με 0,012 mg/l.

Από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς του σεληνίου που φαίνεται στο σχήμα 9, φαίνεται ότι είναι εφικτή η μέτρηση σεληνίου τελικής συγκεντρώσεως από 0,012 έως 100 mg/l. Η γραμμικότητα της πρότυπης καμπύλης αναφοράς συνεχίζει και για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σεληνίου αλλά το εύρος που μας ενδιαφέρει καλύπτεται από το εύρος της πρότυπης καμπύλης του σχήματος 9. Όπως και για το κοβάλτιο

όμως, έτσι και για το σελήνιο η γραμμικότητα της πρότυπης καμπύλης χάνεται σε πάρα πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις του.

ΠΙΘΑΝΕΣ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΕΥΝΕΣ

Τα χρονικά όσο και τα οικονομικά πλαίσια μέσα στα οποία μπορεί να κινηθεί κανείς για την εκπόνηση μίας διπλωματικής εργασίας, καθώς και τα υλικοτεχνικά μέσα τα οποία διαθέτει, είναι αρκετά στενά τόσο ώστε να μην επιτρέπουν την διενέργεια περισσότερων πειραμάτων και την διεύρυνση του πεδίου έρευνας μέσα στο οποίο μπορεί να κινηθεί κανείς. Φυσικό είναι ότι κατά την διάρκεια των πειραμάτων δημιουργούνται πολλές σκέψεις και ιδέες για περαιτέρω έρευνες.

Κάτι το οποίο θα μπορούσαμε να κάνουμε αν είχαμε την κατάλληλη υλικοτεχνική υποδομή, θα ήταν η διενέργεια των ίδιων πειραμάτων, δηλαδή κατασκευή καμπύλης αναφοράς κοβαλτίου, κοβαλτίου εμπιερισμένου στο φαρμακευτικό σκεύασμα “NEUROBION” και σεληνίου, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φούρνο γραφίτη. Με αυτή την μέθοδο μας δίνεται η δυνατότητα να κάνουμε τα ίδια πράγματα που κάναμε και με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα και μάλιστα να μελετήσουμε και ακόμη μικρότερες ποσότητες των μετρούμενων ουσιών, καθώς το όριο ανιχνευσιμότητας αυτής της μεθόδου βρίσκεται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα.

Επίσης, αν είχαμε περισσότερο χρόνο και περισσότερους πόρους, θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να δούμε αν και κατά πόσο μπορούμε να εκτιμήσουμε με ακρίβεια ποσότητες ενζύμων με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα. Όπως είναι γνωστό πολλά ένζυμα έχουν στο ενεργό τους κέντρο ένα μέταλλο, όπως για παράδειγμα, η φερριτίνη που έχει σίδηρο ή η αλκοόλη δεϋδρογενάση και η καρβονική ανυδράση που έχουσε ψευδάργυρο. Αυτό λοιπόν που εμείς σκεφτήκαμε είναι το κατά πόσο είναι εφικτό να υπολογίσουμε την ακριβή ποσότητα ενός ενζύμου από την ποσότητα του μετάλλου που έχει στο ενεργό του κέντρο την οποία έχουμε μετρήσει με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα.

Ακόμη, στην περίπτωση που είχαμε ευχέρεια χρόνου θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να προσδιορίσουμε τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά την ύπαρξη διαφόρων στοιχείων σε διάφορα πραγματικά δείγματα. Θα μπορούσαμε να επικεντρωθούμε είτε σε βιολογικά είτε σε άλλου είδους δείγματα (π.χ. τρόφιμα) τα οποία θα περιέχουν κάποια στοιχεία των οποίων η ύπαρξη ή η πρόσληψη στην περίπτωση των τροφίμων, να συσχετίζεται με διάφορες λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού. Τα αποτελέσματα των πειραματικών μας μετρήσεων θα μπορούσαμε να

τα συσχετίσουμε με την ύπαρξη κάποιων ασθενειών και να βγάλουμε έτσι ορισμένα χρήσιμα συμπεράσματα.

Τέλος, είναι γνωστό ότι το σελήνιο παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό και την φυσιολογική ανάπτυξη των σπερματοζωαρίων [9,20]. Έχει βρεθεί ότι ζώα που η διατροφή τους ήταν φτωχή σε σελήνιο, παρουσίαζαν δομικές ανωμαλίες στα σπερματοζωάρια τους οι οποίες συνδέονταν με την φτωχή τους κινητικότητα και με μία τάση της ουράς τους να κοπεί, αυξάνοντας έτσι ραγδαία τον κίνδυνο να μην είναι εφικτή η γονιμοποίηση [9,21]. Αυτό που εμείς σκεφτήκαμε ότι θα μπορούσαμε να κάνουμε είναι να μετρήσουμε το σελήνιο σε διάφορα δείγματα ανθρώπινου σπέρματος και να συσχετίσουμε τα ευρήματά μας με την γονιμότητα των δειγμάτων μας, με βάση τα στοιχεία που θα μας έδινε ένα κέντρο εξωσωματικής γονιμοποίησης, το οποίο θα ήταν και αυτό που θα μας παρείχε τα δείγματα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μετρήσαμε διαλύματα που περιέχουν καθαρό κοβάλτιο καθώς και διαλύματα των οποίων το κοβάλτιο εμπεριέχεται στην βιταμίνη B₁₂ του φαρμακευτικού σκευάσματος NEUROBION. Οι μετρήσεις μας έγιναν με δύο μεθόδους, με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα και με την κλασσική μέθοδο μέτρησης κοβαλτίου.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας, μας οδήγησαν σε ορισμένα χρήσιμα συμπεράσματα. Από την καμπύλη αναφοράς του κοβαλτίου διαπιστώνουμε ότι είναι εφικτή η μέτρηση κοβαλτίου με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα και αν συγκρίνουμε αυτή την καμπύλη με τις καμπύλες του κοβαλτίου που περιέχεται στην βιταμίνη B₁₂, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι με την συγκεκριμένη μέθοδο μας δίνεται η δυνατότητα να υπολογίσουμε και το κοβάλτιο που περιέχεται στην βιταμίνη B₁₂, καθώς φαίνεται ότι η μεταβολή της απορρόφησης σε αυτές τις δύο καμπύλες οφείλεται στην μεταβολή της συγκέντρωσης του κοβαλτίου. Το όριο ανιχνευσιμότητας του κοβαλτίου με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα βρέθηκε ότι είναι ίσο με 0,004 mg/l.

Αντίθετα, με την κλασσική μέθοδο μέτρησης κοβαλτίου διαπιστώνουμε ότι ναί μεν μπορούμε να μετρήσουμε το κοβάλτιο, αλλά μόνο όταν το έχουμε σε καθαρή μορφή. Οι μετρήσεις του κοβαλτίου με την κλασσική μέθοδο για το φαρμακευτικό σκεύασμα NEUROBION, μας έδωσαν καμπύλη η οποία δεν συμφωνεί με την καμπύλη αναφοράς του κοβαλτίου. Καταλήγουμε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι το κοβάλτιο που εμπεριέχεται στην βιταμίνη B₁₂ δεν είναι δυνατό να μετρηθεί με την κλασσική μέθοδο μέτρησης κοβαλτίου. Το όριο ανιχνευσιμότητας της κλασσικής μεθόδου προσδιορισμού του κοβαλτίου βρέθηκε και αυτό ίσο με 0,004 mg/l.

Αξιοσημείωτο είναι ότι στην αντίδραση που πραγματοποιείται κατά την κλασσική μέθοδο μέτρησης κοβαλτίου, φαίνεται ότι το προϊόν της σχηματίζεται αμέσως και παραμένει σταθερό για περίπου 16 λεπτά. Στην συνέχεια, φαίνεται ότι σχηματίζεται κάποιο σύμπλοκο το οποίο μία ώρα μετά την έναρξη της αντίδρασης φαίνεται να καταστρέφεται. Ο σχηματισμός αυτού του συμπλόκου επηρεάζει τις μετρήσεις μας, γεγονός που μας υποχρέωσε να πραγματοποιήσουμε τις υπόλοιπες μετρήσεις μας μέσα σε οκτώ λεπτά από την ανάμειξη των αντιδραστηρίων, για την μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων μας.

Επίσης, μετρήθηκαν και συγκεντρώσεις σεληνίου με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα. Από την καμπύλη αναφοράς που κατασκευάσαμε καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι είναι όντως εφικτή η μέτρηση σεληνίου με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα και μάλιστα με πολλή μεγάλη αξιοπιστία. Το όριο ανιχνευσιμότητας του σεληνίου με την μέθοδο της ατομικής απορρόφησης με φλόγα είναι ίσο με 0,012 mg/l. Λόγω έλλειψης χρόνου, δυστυχώς δεν καταφέραμε να μετρήσουμε σελήνιο και σε ορισμένα βιολογικά δείγματα, όπως για παράδειγμα σπέρμα, ώστε να συσχετίσουμε την συγκέντρωσή του με κάποιες ασθένειες ή δυσλειτουργίες του οργανισμού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Λιοδάκης Στυλιανός Αναλυτική Χημεία – Θέματα και προβλήματα, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, Αθήνα, 2001
2. Ebdon L., Evans H E., Fischer A., Hill J. S. An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry, John Wiley & Sons, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 1998
3. Ζερφυρίδης Κ. Γρηγόριος Διατροφή του ανθρώπου, Εκδόσεις Γιαχούδη – Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, 1998
4. Κουμπιτζής Θ., Σαμαρά – Κωνσταντίνου Κ. Έλεγχος Ρύπανσης Περιβάλλοντος, Ζήτη, Θεσσαλονίκη, 1994
5. Kobayasi Michihiko, Shimizu Sakayu Cobalt Proteins, European Journal of Biochemistry / FEBS, Volume 261, Issue 1, Pages 1-9 April 1999,
6. Roderick S.L. & Matthews B.W.: Structure of the cobalt-dependent methionine aminopeptidase from Escherichia Coli: a new type of proteolytic enzyme, Biochemistry, Volume 32, Pages 3907-3912, 1993
7. Ghosh M., Grunden A.M., Dunn D.M., Weiss R. & Adams M.W.: Characterization of native and recombinant forms of an unusual cobalt-dependent proline dipeptidase (prolidase) from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus, J. Bacteriology, Volume 180, Pages 4781-4789, 1998
8. Dennis M. & Kolattukudy P.E.: A cobalt-porphyrin enzyme converts a fatty aldehyde to a hydrocarbon and CO, Proc. Natl Acad. Sci. USA, Volume 89, Pages 5306-5310, 1992
9. Rayman P. Margaret: The importance of selenium to human health, The Lancet, Volume 356, Pages 233-241, July 15 2000
10. Μπέγας Ηλίας, Μαρούγκα Άννα, Νικούλης Δημήτριος, Βάιος Γεώργιος, Μενούνου Θεοδώρα: Βιβλιογραφική εργασία στο μάθημα της Διατροφής με θέμα “Σύνπλεγμα Βιταμινών Β”, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Ιατρική Σχολή Λάρισας, Π.Σ.Ε. Ιατρική Βιοχημεία, Ιούνιος 2001
11. Stryer Lubert, Μεταφραστές Αλετράς Αλέξης, Βαλκανά Θεώνη, Δραϊνάς Διονύσιος, Δραϊνάς Κωνσταντίνος, Κούβελας Ηλίας, Παπαδόπουλος Κ. Γιώργος, Παπαδόπουλος Γ. Μιχάλης, Φράγκου-Λαζαρίδη Μαρία: Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997
12. Κλωνιτζάκης Ι.: Μεγαλοβλαστικές αναιμίες Παπαδημητρίου Μ. (ed) εσωτερική

- παθολογία, University St Press, Θεσσαλονίκη, 1998
13. Dharmarajan T.S., Norkuw E.P.: Approaches to vitamin B₁₂ deficiency. Early treatment may prevent devastating complications, *Postgraduate Medicine*, Volume 110, Issue 1, Pages 99-105, July 2001
 14. Nilsson K. et all: Treatment of cobalamin deficiency in dementia, evaluated clinically and with cerebral blood flow measurements, *Aging (Milano)*, Volume 3, Pages 199-207, June 12 2000
 15. Τζιαμούρτας Αθανάσιος: Σημειώσεις για το μάθημα της Διατροφής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Ιατρική Σχολή Λάρισας, Π.Σ.Ε. Ιατρική Βιοχημεία, Ιούνιος 2001
 16. Martens J.H., Barg H., Warren M.J., Jahn D.: Microbial production of vitamin B₁₂, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 58, Issue 3, Pages 275-285, March 2002
 17. Battersby A.R.: Biosynthesis of vitamin B₁₂, *Acc. Chem. Res.*, Volume 26, Pages 15-21, 1993
 18. Fedosov N. Sergey, Petersen E. Torben, Nexø Ebba: Transcobalamin from cow milk: isolation and physico-chemical properties, *Biochimica et Biophysica Acta*, Volume 1292, Pages 113-119, 1996
 19. Kajal D., Patel M.S. and Lovelady A. Cheryl: Vitamin B₁₂ status of East Indian vegetarian lactating women living in the United States, *Nutrition Research*, Volume 18, Issue 11, Pages 1839-1846, 1998
 20. Behne D., Weiler H., Kyriakopoulos A.: Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats, *J. Reprod. Fertil.*, Volume 106, Pages 291-297, 1996
 21. Wu S.H., Oldfield J.E., Whanger P.D., Weswig P.H.: Effect of selenium, vitamin E and antioxidants on testicular function in rats, *Biol. Reprod.*, Volume 8, Pages 625-629, 1973



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

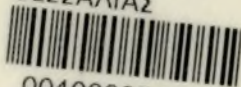
~~Τηλ.: 74.760-61~~ ΛΑΡΙΣΑ

2410-565077

565078



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057249