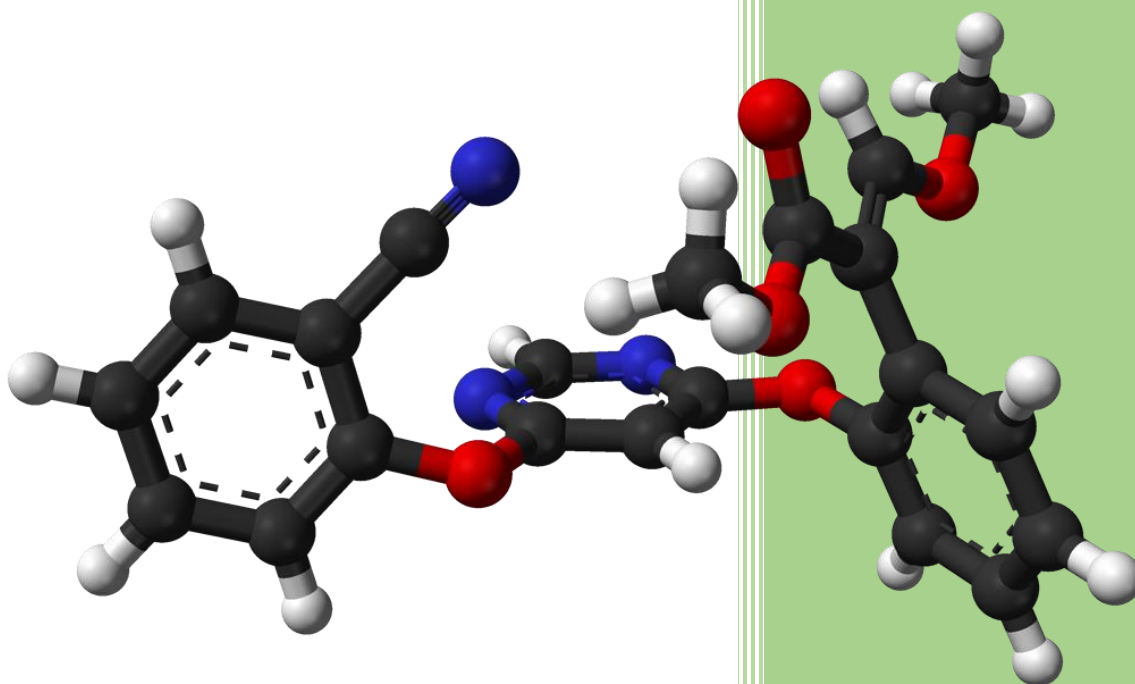


Ταυτοποίηση Χαρακτηριστικών Ομάδων Φυτοφάρμακου με τη Φασματοσκοπία FT-IR



Πορλού Χρήστος & Μαραγκόπουλος Ηλίας
Επιβλέποντες: Βιργιλίου Χ., Συμεωνίδης Κ.
Τμήμα Χημικών Μηχανικών ΑΠΘ, 2023-24

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ.....	1
1.2. FT-IR	2
2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	2
2.1. ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ FT-IR ΣΕ ΠΑΡΟΜΟΙΕΣ ΕΡΕΥΝΕΣ.....	2
2.2. ΧΡΗΣΗ ΑΛΛΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	3
3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ.....	4
3.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ FT-IR.....	4
3.1.1. Θεωρητικό Υπόβαθρο.....	4
Εικόνα 1: Ηλεκτρομαγνητικό Φάσμα & Περιοχή Ορατού Φωτός.....	4
Εικόνα 2: Ηλεκτρομαγνητικό Φάσμα & Περιοχή Υπερύθρου.....	5
Εικόνα 3: Σχεδιάγραμμα Απορρόφησης IR	6
Εικόνα 4: Είδη Δονήσεων	6
3.1.2. Πειραματική Διάταξη.....	7
Εικόνα 5: Τυπικό Φασματοφωτόμετρο (εξωτερικά).....	7
3.1.3. Συμβολόμετρο Michelson	8
Εικόνα 6: Τυπικό Φασματοφωτόμετρο (εσωτερικά)	8
Εικόνα 7: Πραγματική Απεικόνιση Συμβολόμετρου Michelson	9
Εικόνα 8: Σχεδιάγραμμα Συμβολόμετρου Michelson	9
3.1.4. Μετασχηματισμός Fourier	9
3.1.5. Φάσμα	10
Εικόνα 9: Τυπικές Περιοχές Δεσμών στο Φάσμα	10
Εικόνα 10: Τυπικές Περιοχές Δονήσεων Δεσμών στο Φάσμα	11
3.2. ΔΕΙΓΜΑ.....	11
Εικόνα 11: Απεικόνιση Azoxystrobin	12
3.3. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	12
Εικόνα 12: Πρέσα Εργαστηρίου (πανομοιότυπη).....	13
Εικόνα 13: Συσκευή Δημιουργίας Δισκίων KBr	13
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	13
4.1. ΦΑΣΜΑ ΟΥΣΙΑΣ	13
Εικόνα 14: Αποτέλεσμα Φάσματος IR Azoxystrobin	14
4.2. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣ	14
Table 1: Ερμηνεία Φάσματος ανά Κορυφή	14
Εικόνα 15: Φάσμα από FAO για Azoxystrobin	15
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	16
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (25).....	16
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: LAB REPORT	20

1. Εισαγωγή

1.1. Φυτοφάρμακα

Τα φυτοφάρμακα ορίζονται ως χημικές ή βιολογικές ουσίες που δρουν ως παράγοντες για τον έλεγχο παρασίτων (ή επιδημιών). Η Διεθνής Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (2002) ορίζει τον

όρο ως οποιαδήποτε ουσία (ή συνδυασμός ουσιών) προοριζόμενη για την πρόληψη εναντίον, την εξόντωση ή τον έλεγχο οποιουδήποτε παρασίτου (συμπεριλαμβανομένων ανθρώπινων και ζωικών ιών ή ανεπιθύμητης χλωρίδας ή πανίδας), το οποίο μπορεί να προκαλέσει ζημιά ή να παρεμβληθεί σε οποιοδήποτε στάδιο παραγωγής ενός προϊόντος (ιδίως κάθε λογής τροφίμων). Μπορεί να γίνει κατηγοριοποίηση ανάλογα με το είδος του οργανισμού που αντιμετωπίζουν, με τις τρεις σημαντικότερες να είναι τα εντομοκτόνα, τα ζιζανιοκτόνα και τα παρασιτοκτόνα.

1.2. FT-IR

Η μέθοδος φασματοσκοπίας υπερύθρου ή αλλιώς FT-IR είναι μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους ταυτοποίησης ενώσεων. Είναι μια αναλυτική τεχνική και οι ενώσεις μπορεί να είναι οργανικές, πολυμερικές ή και ανόργανες. Μεταξύ αυτών ενδέχεται να είναι κάποια φυτοφάρμακα. Ο εντοπισμός αυτός κρίνεται απαραίτητος από τη στιγμή που, παρά τη χρησιμότητά τους, τα φυτοφάρμακα δεν παύουν να είναι επιβλαβή για τον άνθρωπο (και όχι μόνο) πάνω από συγκεκριμένες ορισμένες ποσότητες. Στην παρούσα εργασία, λοιπόν, μέσω της μεθόδου FT-IR, ταυτοποιείται το φυτοφάρμακο εν ονόματι Azoxystrobin.

2. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

2.1. Χρησιμοποίηση της FT-IR σε παρόμοιες έρευνες

Η μέθοδος FT-IR βρίσκει πολλές εφαρμογές σε πολλούς κλάδους της Χημείας. Ένας από αυτούς είναι και η ταυτοποίηση φυτοφαρμάκων (όπως το Azoxystrobin). Για παράδειγμα, σε μια έρευνα παρόμοια με αυτήν που θα ακολουθήσει (χρήση πέλετ KBr), οι Cantor et al. εντόπισαν υπολείμματα φυτοφαρμάκων σε δείγματα τριαντάφυλλων (2021). Κομμάτι του πειράματος ήταν 6 διαφορετικά φυτοφάρμακα, μεταξύ των οποίων τα Topas και Shavit. Μπορεί να γίνει επίσης συνδυασμός με παλιότερες μεθόδους, όπως με την Attenuated Total Reflection (ATR), η οποία χρησιμοποιήθηκε για εντοπισμό του φυτοφάρμακου dinocap σε δείγματα εδάφους, οίνου και σταφυλιών (Calin et al., 2018). Οι έρευνες αυτές μπορούν να θεωρηθούν και ως επιβεβαίωση της μεθόδου για το επερχόμενο πείραμα.

2.2. Χρήση άλλων μεθόδων για εντοπισμό φυτοφαρμάκων

Ωστόσο, η FT-IR δεν αποτελεί τη μόνη μέθοδο που έχει χρησιμοποιηθεί για εντοπισμό φυτοφαρμάκων. Σε έρευνα για εντοπισμό ιχνών φυτοφαρμάκων ή άλλων μολυντών τροφίμων, χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος φασματοσκοπίας Raman (απλή ή η εξελιγμένη μορφή της SERS), η οποία μοιάζει με την FT-IR με την έννοια ότι δίνει ένα ξεχωριστό φάσμα για κάθε ένωση (Böhme, Barros-Velázquez and Calo-Mata, 2017). Βασίζεται στις δονήσεις και περιστροφές των δεσμών και, ειδικότερα, στη σκέδαση Raman, όπου η αλληλεπίδραση του φωτός με τα μόρια προκαλεί ανάκλαση των φωτονίων με διαφορετική συχνότητα και ενέργεια, δημιουργώντας το λεγόμενο φάσμα Raman της ένωσης. Για την ίδια μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ακόμη οι μέθοδοι LIBS και τις διάφορες MALDI MS.

Όσον αφορά την πρώτη (Laser-Induced Breakdown Spectroscopy), είναι μια από τις πιο εξελιγμένες τεχνικές και βρίσκει εφαρμογή κυρίως στον έλεγχο ποιότητας τροφίμων που συμπεριλαμβάνει βέβαια και τον εντοπισμό ποσοτήτων φυτοφαρμάκων σε αυτά. Πιο συγκεκριμένα, μέσω αυτής της μεθόδου, έχει γίνει εντοπισμός 5 διαφορετικών φυτοφαρμάκων (μεταξύ των οποίων chlorpyrifos και carbendazim) σε ποικιλία παντζαριού (σέσκουλα) (Martino et al., 2021). Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από την εκπομπή λέιζερ, το οποίο θερμαίνει τόσο τα υλικά που αυτά διασπώνται σε μόρια ή άτομα. Αυτά τα στοιχεία πλέον (στη συγκεκριμένη έρευνα P, S, Cl, C), που βρίσκονται υπό τη μορφή ενός πλάσματος που εκπέμπει φως σε διάφορα μήκη κύματος, δίνουν το φάσμα της μεθόδου, το οποίο επιτρέπει ποιοτικό και ποσοτικό χαρακτηρισμό του δείγματος. Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ταχύτητά της, εφόσον μπορεί να αναλύσει πολλά δείγματα συγχρόνως, ενώ τα τελευταία χρόνια έχει συνδυαστεί και με πτυχές της φασματοσκοπίας Raman για καλύτερα αποτελέσματα (Martino et al., 2021).

Όσον αφορά τη δεύτερη (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization), έχει χρησιμοποιηθεί για την (ποσοτική κυρίως) ανάλυση του φυτοφαρμάκου chlordecone σε συκώτι ποντικιού (Mohammadi and Parastar, 2018), για την αναγνώριση (και σύγκριση σε διαφορετικά σύμπλοκα) του φυτοφάρμακου profenofos που ενώνεται συχνά με πρωτεΐνες (Chu et al., 2018). Είναι μια πολύ αποτελεσματική μέθοδος σε συνδυασμό με την FT-ICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance) για τον εντοπισμό πολλών φυτοφάρμακων πάνω σε φύλλα (Xinzhou et al., 2018). Δεν είναι εξάλλου σπάνιο φαινόμενο, μιας και σχεδόν πάντα αυτή η μέθοδος είναι συνδυασμένη με κάποια άλλη, ώστε να δίνει τελικά το φάσμα μάζας. Αυτό δημιουργείται μέσω της εκπομπής με

λείζερ που προκαλεί εξάτμιση των μορίων και ιοντισμό τους, χωρίς όμως να δημιουργεί θραύση. Όταν είναι συνδυασμένη (πιο σύνθητης περίπτωση) με την TOF (Time of Flight) γίνεται ένας διαχωρισμός στο φάσμα με βάση του λόγου μάζας προς φορτίο του κάθε ιόντος. Φυσικά αυτές είναι λίγες μόνο από τις εναλλακτικές της μεθόδου FT-IR για ταυτοποίηση φυτοφαρμάκων (ή χαρακτηριστικών ομάδων τους) και όχι μόνο (Rijal & Rijal, 2022).

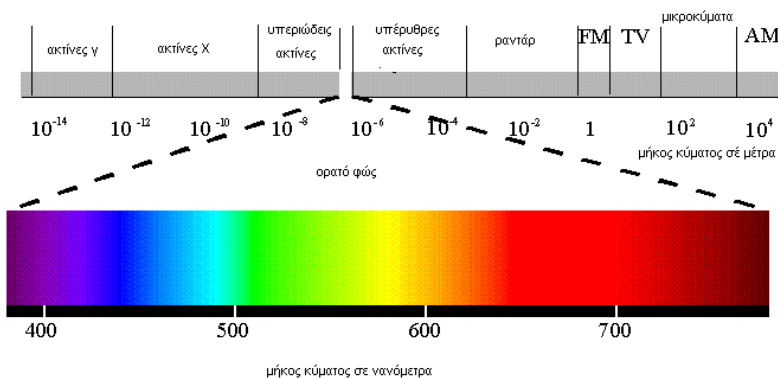
3. Μέθοδοι και Υλικά

Το πείραμα ταυτοποίησης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του ΑΠΘ στις 5/12/23. Το δείγμα ήταν μια μικρή ποσότητα του φυτοφαρμάκου Azoxystrobin.

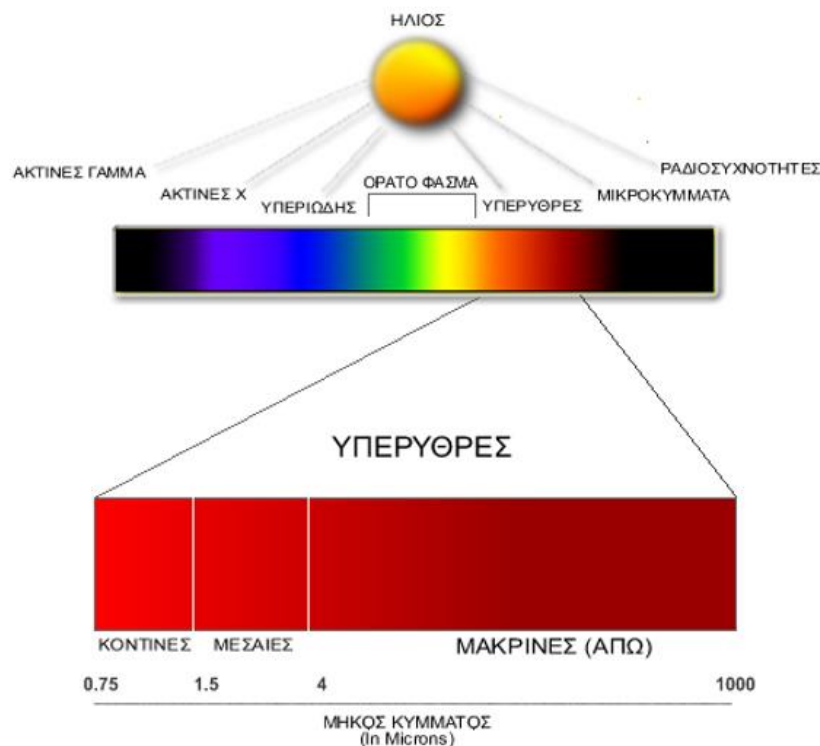
3.1. Μέθοδος Φασματοσκοπίας FT-IR

3.1.1. Θεωρητικό Υπόβαθρο

Για να περιγραφεί η μέθοδος πρέπει πρώτα να γίνει μια εισαγωγή για το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα. Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα είναι το σύνολο της ακτινοβολίας του φωτός που ταξιδεύει υπό μορφή κυμάτων με την ταχύτητα του φωτός. Κάθε ακτινοβολία έχει ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος λ (απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών κορυφών) και συσχρότητα ν . Το φάσμα χωρίζεται σε περιοχές ανάλογα με το είδος ακτινοβολίας. Η πιο χαρακτηριστική περιοχή είναι αυτή του ορατού φωτός, που αντιστοιχεί και στα χρώματα που μπορεί να δει ο άνθρωπος (The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2023). Ωστόσο, η περιοχή που βασίζεται η μέθοδος είναι η αμέσως επόμενη, που ονομάζεται υπέρυθρη. Δύο χαρακτηριστικές εικόνες του φάσματος φαίνονται παρακάτω.



Εικόνα 1: Ηλεκτρομαγνητικό Φάσμα & Περιοχή Ορατού Φωτός

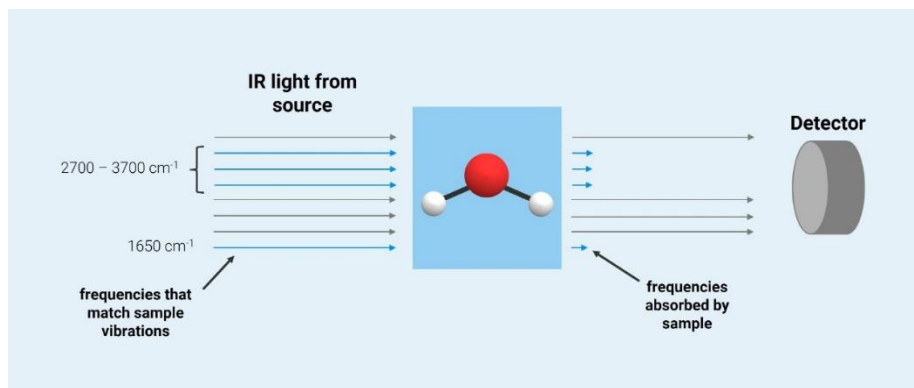


Εικόνα 2: Ηλεκτρομαγνητικό Φάσμα & Περιοχή Υπερύθρου

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 2, η περιοχή υπέρυθρης ακτιβολίας χωρίζεται περαιτέρω σε τρεις υποπεριοχές:

- Κοντινές Υπέρυθρες Ακτινοβολίες (Near-InfraRed ή N-IR)
- Μεσαίες Υπέρυθρες Ακτινοβολίες (Middle-InfraRed ή M-IR)
- Άνω ή Μακρινές Υπέρυθρες Ακτινοβολίες (Far-InfraRed ή F-IR)

Τα φασματοφωτόμετρα FT-IR συνηθίζεται να δουλεύουν στην περιοχή M-IR. Ανάλογα με τη βιβλιογραφική πηγή τα όρια της κάθε περιοχής (όπως και της ίδιας της συνολικής υπέρυθρης περιοχής) διαφέρουν. Στο συγκεκριμένο πείραμα, θεωρήθηκε ότι το φασματοφωτόμετρο δουλεύει στην περιοχή από 2.5 έως 25 μm (2500 με 25000 nm) (Λιαδάκης, 2021). Εναλλακτικά, ορίζεται και η μονάδα μέτρησης του κυματάριθμου (cm^{-1}), η οποία δίνεται από τη σχέση $2\pi/\lambda$. Λόγω της αντίστροφης φύσης του κυματάριθμου, συνηθίζεται σε διαγράμματα να απεικονίζεται αντίστροφα (από μεγαλύτερες προς μικρότερες τιμές). Όσον αφορά αυτή τη μονάδα μέτρησης, το πείραμα διεξήχθη μεταξύ 4000 cm^{-1} και 400 cm^{-1} . Τα φασματοφωτόμετρα βασίζονται ουσιαστικά στην απορρόφηση ορισμένων εκ των ακτίνων που εκπέμπονται από μια πηγή ακτινοβολίας με τις υπόλοιπες να διαπερνούν το δείγμα (Ποιμενίδης, 2010).



Εικόνα 3: Σχεδιάγραμμα Απορρόφησης IR

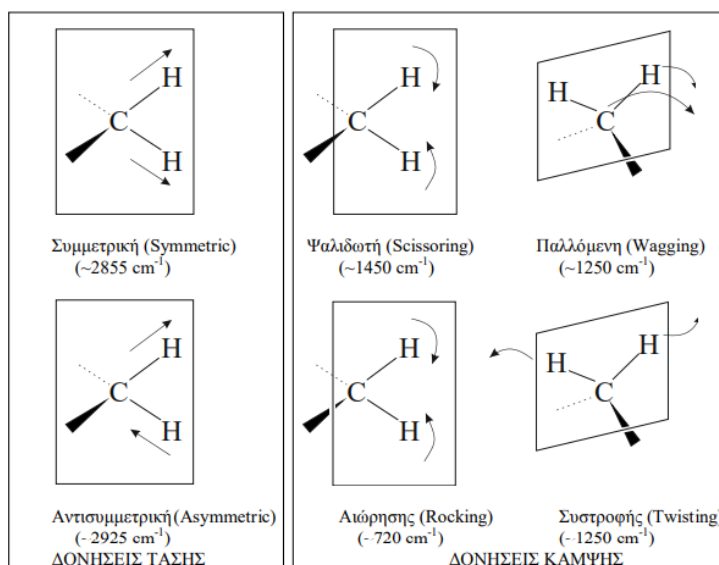
Αυτή η απορρόφηση γίνεται από τους δεσμούς που υπάρχουν στην ουσία που φασματοφωτομετρείται. Αυτοί οι δεσμοί στη συνέχεια διεγείρονται και χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες δονήσεις, που δίνουν και το σήμα της μέτρησης. Οι δονήσεις μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε:

1. Τάσης

- a) Συμμετρικές (*Symmetric*)
- b) Αντισυμμετρικές (*Antisymmetric*)

2. Κάμψης

- a) Ψαλιδωτές (*Scissoring*)
- b) Παλλόμενες (*Wagging*)
- c) Συστροφής (*Twisting*)
- d) Αιώρησης (*Rocking*)



Εικόνα 4: Είδη Δονήσεων

Το όνομα της δόνησης περιγράφει και σε κάθε περίπτωση την κίνησή της. Το είδος της δόνησης εξαρτάται τόσο από τα στοιχεία του δεσμού, όσο και από τους δεσμούς του περιβάλλοντα χώρου. Βιβλιογραφικά απορροφούν ακτινοβολία σε συγκεκριμένα μήκη κύματος (Ποιμενίδης, 2010).

Η πρώτη μέτρηση έγινε από τον Peter-Fellgett το 1949, με την μέθοδο να γίνεται πιο ευρέως διαδεδομένη τις δεκαετίες του 50' και 60' που ακολούθησαν. Με την χρησιμοποίηση του H/Y, τα φασματοφωτόμετρα εξελίχθηκαν, ενώ εισήχθη και η έννοια του μετασχηματισμού Fourier, ώστε να υπάρχουν ξεκάθαρα αποτελέσματα σήματος, δηλαδή τα φάσματα. Πλέον τα

φασματοφωτόμετρα FT-IR αποκαλούνται 3^{ης} γενιάς και συνδυάζουν όλα τα παραπάνω και περισσότερα σε συνδυασμό με το κατάλληλο λογισμικό (Deepak, 2015) (τέτοιο ήταν και αυτό που χρησιμοποιήθηκε). Βρίσκουν εφαρμογές σε πολλούς τομείς, όπως τα φάρμακα, τα τρόφιμα, η εγκληματολογία, κ.ά (RTI Laboratories, 2022). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται για:

- Αναγνωρισμό και χαρακτηρισμό αγνώστων υλικών (όπως φιλμ, σκόνες, στερεά, υγρά)
- Εντοπισμό μόλυνσης πάνω ή μέσα σε υλικά (όπως σωματίδια, ίνες, σκόνες, υγρά)
- Εντοπισμό πρόσθετων μετά από εξαγωγή πολυμερών
- Αναγνώριση οξειδωμένων, αποσυντιθεμένων ή μη βουλκανισμένων πολυμερών σε έρευνες εσφαλμένης ανάλυσης

3.1.2. Πειραματική Διάταξη

Ένα φασματοφωτόμετρο 3^{ης} γενιάς αποτελείται από:

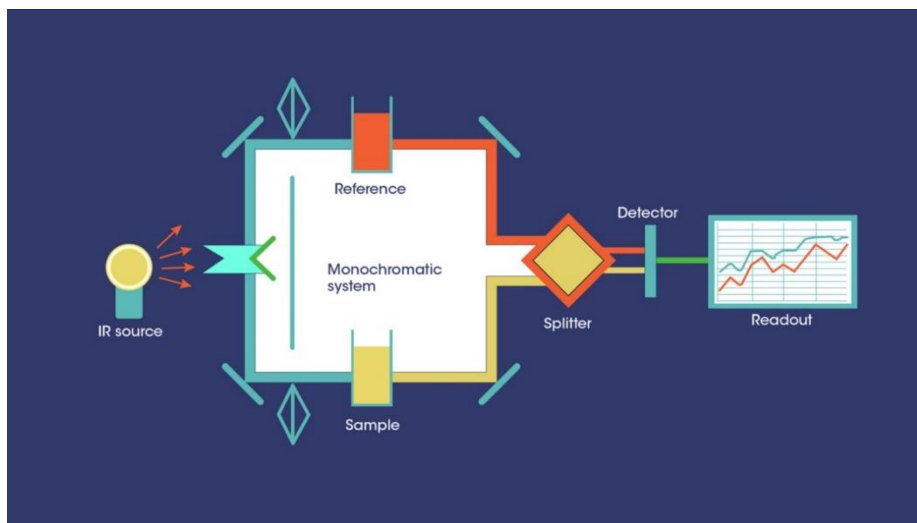
- Πηγή ακτινοβολίας IR που κατευθύνεται προς μια διαχωριστική πλάκα
- Μονοχρωμάτωρα (εμπεριέχει και το συμβολόμετρο Michelson) που αναλύει την ακτινοβολία του φωτός στις περιοχές της
- Διαχωριστή Ακτινοβολίας
- Ανιχνευτή
- Συσκευή Ανάγνωσης (H/Y με κατάλληλο λογισμικό)



Εικόνα 5: Τυπικό Φασματοφωτόμετρο (εξωτερικά)

Πραγματοποιείται συγχρόνως μέτρηση ενός πρότυπου δείγματος (η ουσία μόνη της) και του μετρούμενου δείγματος. Η σύγκριση των δύο φασμάτων επιτρέπει την ποιοτική ανάλυση, δηλαδή αν υπάρχει η εν λόγω ουσία (φυτοφάρμακο) στο μετρούμενο δείγμα (Libretexts, 2023).

Στο παρόν πείραμα, έγινε μέτρηση ουσιαστικά μόνο για το πρότυπο, δηλαδή δεν έλαβε χώρα κάποια ανάλυση δείγματος.



Εικόνα 6: Τυπικό Φασματοφωτόμετρο (εσωτερικά)

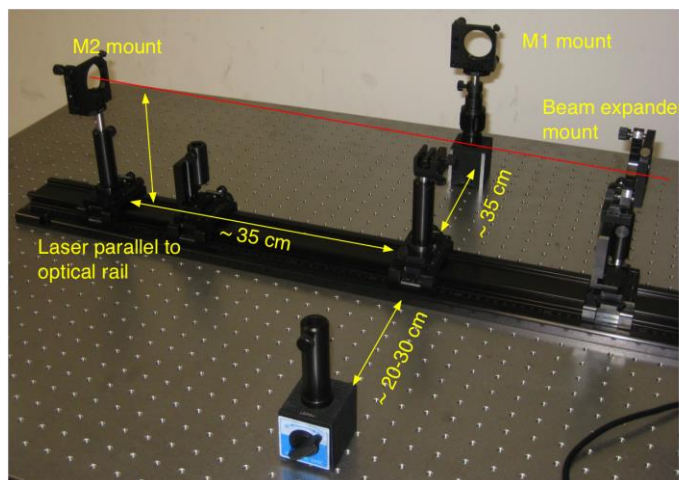
3.1.3. Συμβολόμετρο Michelson

Το συμβολόμετρο Michelson είναι μια διάταξη κατασκευασμένη από KBr με στόχο να ενισχύσει την ακτινοβολία, άρα και το σήμα. Αποτελείται από:

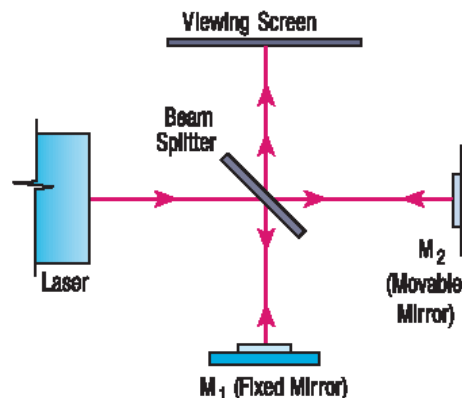
- Διαχωριστική Πλάκα
- Κινούμενο κάτοπτρο
- Σταθερό κάτοπτρο

Καθώς μία δέσμη φωτός από την πηγή φτάνει στην διαχωριστική πλάκα, αυτή διασπάται σε δύο ίσα μέρη (50% ανάκλαση) τα οποία κατευθύνονται προς τα δύο κάτοπτρα. Καθώς οι δέσμες επιστρέφουν στην διαχωριστική πλάκα έχουν διανύσει διαφορετική απόσταση, έτσι κατά την επανένωσή τους, θα προκαλέσουν καταστροφική ή εποικοδομητική παρέμβαση (Ποιμενίδης, 2010). Ως αποτέλεσμα, η νέα δέσμη θα έχει διαφορετικά μήκη κύματος κάθε φορά, ανάλογα με το που βρίσκεται το κινούμενο κάτοπτρο. Μπορεί κανείς να υπολογίσει το αναμενόμενο μήκος κύματος γνωρίζοντας την απόσταση που διένυσε η κάθε δέσμη. Για τον κινούμενο καθρέπτη, στο φασματοφωτόμετρο του εργαστηρίου, χρησιμοποιείται ένα λείζερ το οποίο, λόγω του σταθερού μήκους κύματός του, δίνει στο συμβολογράφημα εναλλαγές μεταξύ μαύρου και κόκκινου. Μετρώντας τις εναλλαγές στο συμβολογράφημα, και γνωρίζοντας ότι ο κινούμενος καθρέπτης έχει σταθερή ταχύτητα υπολογίζεται η μετατόπιση του για κάθε χρόνο (ο οποίος επίσης μετρείται) (Hariharan, 2007). Γνωρίζοντας την μετατόπιση του μπορεί κανείς να υπολογίσει το μήκος κύματος της νέας δέσμης και έτσι να βρεθεί η απορροφημένη ακτινοβολία από το δείγμα λόγω

της διαφοράς της υπολογιζόμενης ακτινοβολίας, μέσω του μήκους κύματος, με την ακτινοβολία που μέτρησε ο ανιχνευτής (Deepak, 2021).



Εικόνα 7: Πραγματική Απεικόνιση Συμβολόμετρου Michelson



Εικόνα 8: Σχεδιάγραμμα Συμβολόμετρου Michelson

3.1.4. Μετασχηματισμός Fourier

Ο μετασχηματισμός Fourier βρίσκει πολλές εφαρμογές σε μηχανική και φυσική. Μετατρέπει μία συνάρτηση χρόνου σε συχνότητα με μονάδες κύκλου ανά δευτερόλεπτο. Η συνάρτηση που προκύπτει είναι αντιστρέψιμη και μπορεί να υπολογισθεί η αρχική της. Επομένως, η μετασχηματισμένη συνάρτηση και η αρχική της αναπαριστούν το ίδιο γεγονός, η μία στο πεδίο του χρόνου και η άλλη στο πεδίο των συχνοτήτων. Όσον αφορά την μετασχηματισμένη συνάρτηση, το μιγαδικό της κομμάτι αναπαριστά το πλάτος και την συνιστώσα της συχνότητας.

Για μία ολοκληρώσιμη συνάρτηση f ο μετασχηματισμός Φουριέρ στο πεδίο των συχνοτήτων δίνεται από το ακόλουθο ολοκλήρωμα:

$$f_{\text{fourier}} = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \cdot e^{-2\pi \cdot i \cdot t \cdot \xi} dt, \text{ για κάθε πραγματικό αριθμό } \xi$$

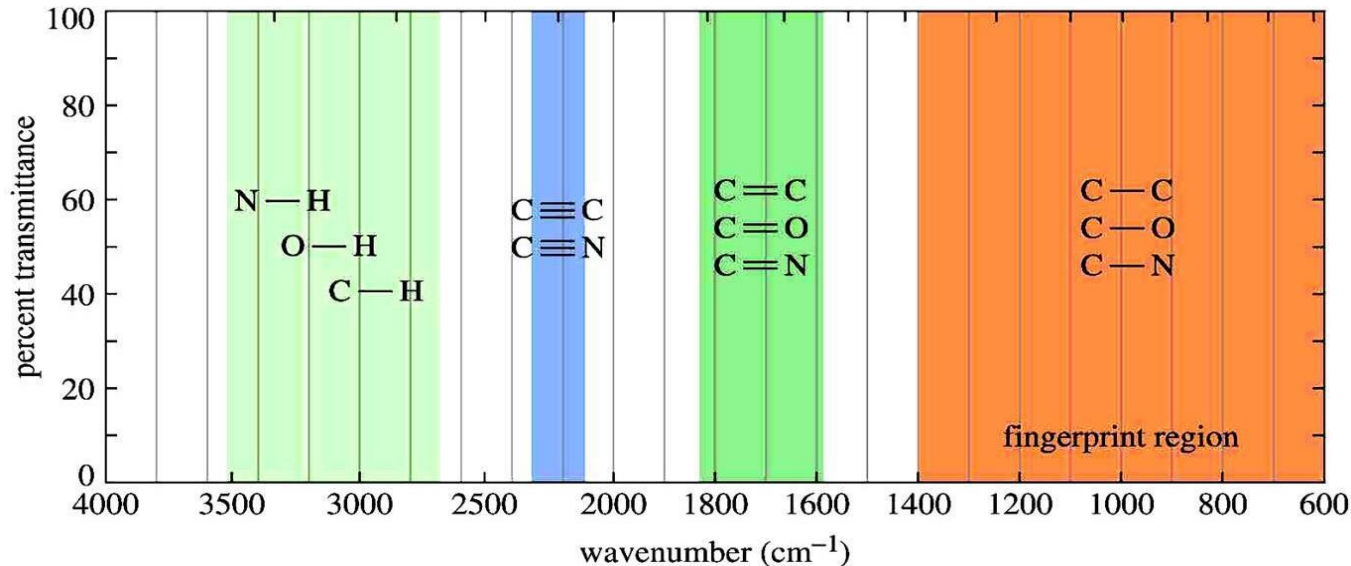
Ουσιαστικά η μετασχηματισμένη συνάρτηση αναπαριστά την σειρά Fourier, η οποία είναι μία σχέση ημιτόνων και συνημιτόνων, επιμηκυμένη στο άπειρο (Khare et al., 2023).

Στο φασματοφωτόμετρο FT-IR το παραγόμενο συμβολογράφημα δέχεται μετασχηματισμό φουριερ με σκοπό η συνάρτηση έντασης και χρόνου να γίνει συχνότητας ώστε να είναι ευκολότερη η εξαγωγή συμπερασμάτων από τον αναλυτή (Libretexts, 2023).

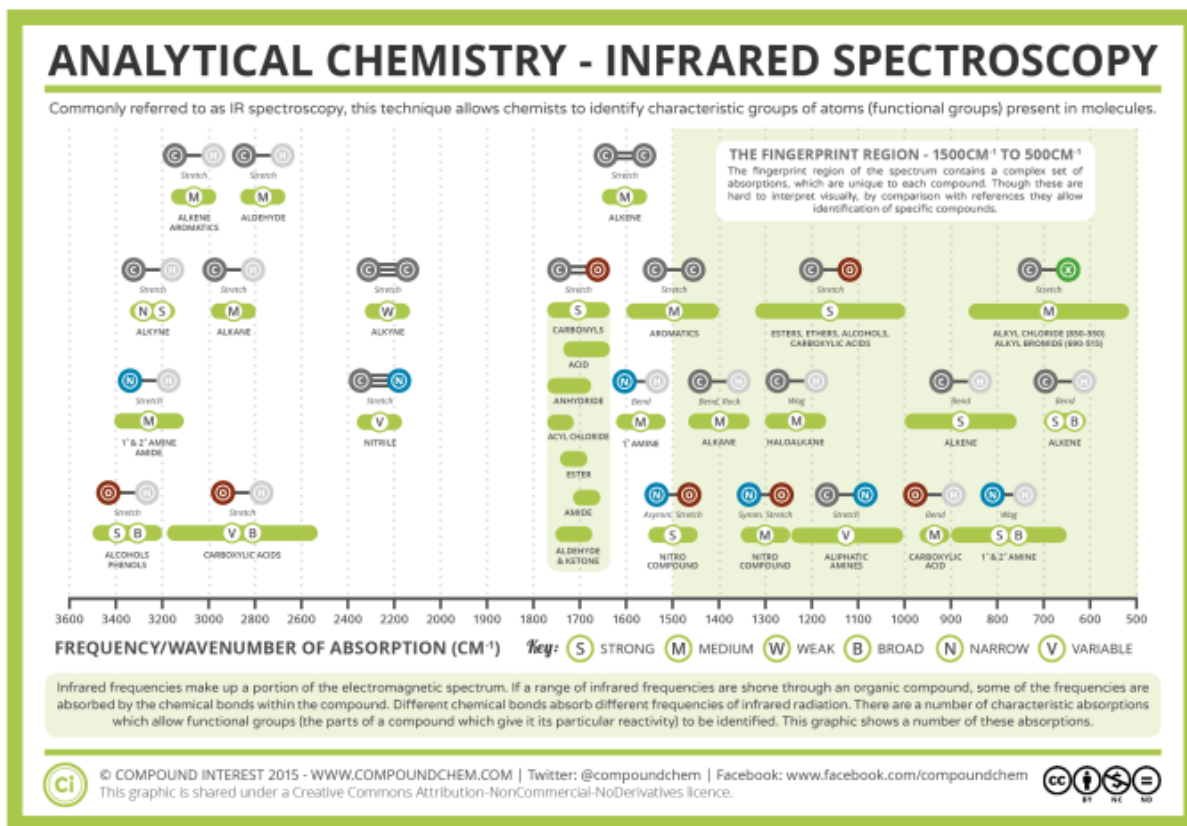
3.1.5. Φάσμα

Αφότου η ακτινοβολία περάσει από το συμβολόμετρο Michelson και το σήμα επιδεχθεί μετασχηματισμό Fourier, λαμβάνεται το τελικό φάσμα. Αυτό το διάγραμμα έχει ως άξονα x τον κυματάρημο σε cm^{-1} (ή/και το μήκος κύματος) και στον y την ποσοστιαία διαπερατότητα. Όταν ένας δεσμός απορροφά ακτινοβολία, τότε η διαπερατότητα μειώνεται (ένα «τυφλό» δείγμα θα έδινε θεωρητικά μια ευθεία στο 100%). Έτσι, η κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε έναν δεσμό. Υπάρχουν καθορισμένες περιοχές που εντοπίζονται συγκεκριμένες δονήσεις ή συγκεκριμένοι δεσμοί.

Για παράδειγμα, όπως φαίνεται και στην εικόνα, δεσμοί με υδρογόνο (για δονήσεις τάσης) εντοπίζονται μεταξύ 3500 και 2700 cm^{-1} περίπου, τριπλοί δεσμοί με άνθρακα μεταξύ 2300 και 2100 cm^{-1} (δονήσεις τάσης) και διπλοί δεσμοί με άνθρακα μεταξύ 1800 και 1600 cm^{-1} (δονήσεις τάσης). Από 1400 cm^{-1} και ύστερα υπάρχει η λεγόμενη περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος της ένωσης. Αυτή η περιοχή αποτελείται από απλούς δεσμούς με άνθρακα και είναι αυτή που κάνει το φάσμα ιδανικό για την κάθε ένωση, οδηγώντας στην ταυτοποίησή της. Στην εικόνα φαίνεται μια αναλυτικότερη απεικόνιση, βασισμένη αυτή τη φορά σε όλες τις δονήσεις των δεσμών και σε ποιες περιοχές αναμένεται να δώσουν κορυφή, αν υπάρχουν (Λιοδάκης, 2021).



Εικόνα 9: Τυπικές Περιοχές Δεσμών στο Φάσμα



Εικόνα 10: Τυπικές Περιοχές Δονήσεων Δεσμών στο Φάσμα

3.2. Δείγμα

Το δείγμα συνιστά το φυτοφάρμακο γνωστό ως azoxystrobin. Το azoxystrobin παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην Γερμανία το 1977 κατά μία προσπάθεια απομόνωσης μυκητοκτόνων από τον μύκητα *Strobilurus tenacellus*. Μέσα στον επόμενο χρόνο διαπιστώθηκαν οι μυκητοκτόνες δράσεις του και στην συνέχεια το ICI προσπάθησε να το συνθέσει, κάτι που κατάφερε μετά από αρκετές προσπάθειες (Schramm et al., 1978).

Το azoxystrobin ανήκει στην γνωστή (για τις μυκητοκτόνες δράσεις τους) οικογένεια των στρομπιλουρινών. Δρα εμποδίζοντας την ανάπτυξη σπορίων του μύκητα, τα οποία είναι για πολλούς η μέθοδος πολλαπλασιασμού τους. Αυτό επιτυγχάνεται εμποδίζοντας την μεταφορά ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια και έτσι την σύνθεση ATP. Καθώς ξεκινάει να υπάρχει έλλειψη ATP, ο μύκητας σταματάει την ανάπτυξη σπορίων και ακολούθως πεθαίνει (Becker et al., 1981).

Όσον αφορά την ασφάλεια για τον άνθρωπο, έχει βρεθεί ότι η θανατηφόρα δόση LD50, η οποία είναι η δόση στην οποία ο μισός πληθυσμός ενός δείγματος θηλαστικών πεθαίνει, είναι μεγαλύτερη από 5000 mg/kg σωματικού βάρους. Βέβαια η κατάποσή του και η επαφή σε μεγάλες ποσότητες στο δέρμα προκαλούν ερεθισμούς και πονοκεφάλους. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι η αποβολή του από το σώμα είναι αργή, προκαλώντας συσσώρευση στο σώμα, και έτσι έχει τεθεί σαν μέτρο ημερήσιας κατανάλωσης τα 0.2 mg/kg σωματικού βάρους (FAO, 2008).

Οι περιβαλλοντικές του επιπτώσεις δεν είναι πολύ μεγάλες καθώς έχει βρεθεί ότι δεν επηρεάζει δραματικά την βιοποικιομορφία. Βέβαια πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι είναι μέτρια τοξικό για μέλισσες και ψάρια. Όμως μπορεί να προκαλέσει καταστροφές, εφόσον περάσει στον υδροφόρο ορίζοντα και στην συνέχεια στην θάλασσα, σε καρκινοειδή. Αυτό γίνεται λόγω της υδρόλυσης του μεθυλεστέρα του σε καρβοξυλικό οξύ, το οποίο επηρεάζει την συσσώρευση ασβεστίου στο κέλυφος των οργανισμών αυτών (Lewis et al., 2016).

Το azoxystrobin που φαίνεται στη διπλανή εικόνα, μπορεί να αναλυθεί στους παρακάτω δεσμούς:

- Τριπλός C-N
- Διπλός C-N
- Απλός C-N
- C-H
- Αρωματικός Δακτύλιος
- Απλός C-O (αιθέρας)
- Διπλός C-O (εστέρας)
- -COOH
- Απλός C-C
- Διπλός C-C



Εικόνα 11: Απεικόνιση Azoxystrobin

3.3. Προκατεργασία Δείγματος

Πολλά φασματοφωτόμετρα (όπως και το συγκεκριμένο) έχουν την ικανότητα να δέχονται στερεά, υγρά ή και αέρια δείγματα. Στην περίπτωση του πειράματος, πρόκειται για στερεό δείγμα, αφού το azoxystrobin είναι υπό τη μορφή κόκκων. Στο φασματοφωτόμετρο υπάρχει κατάλληλος υποδοχέας, στον οποίο μπαίνει ένα δισκίο που περιέχει τόσο την ένωση, όσο και αρκετά μεγαλύτερη ποσότητα KBr για ενίσχυση του σήματος (εξάλλου και το συμβολόμετρο Michelson είναι φτιαγμένο από το ίδιο υλικό).

Αρχικά, ζυγίζεται με αναλυτικό ζυγό ποσότητα 200 mg KBr (αφότου προηγηθεί μηδενισμός του). Η ζυγισμένη ποσότητα τοποθετείται σε γουδοχέρι και γίνεται άλεση των κόκκων με το χέρι, ώστε να γίνουν εντελώς σκόνη. Στη συνέχεια, προστίθεται και πολύ μικρή ποσότητα azoxystrobin (περίπου 1 mg), η οποία αναμιγνύεται με το KBr και επαναλαμβάνεται συγχρόνως διάσπαση των κρυστάλλων με το γουδί. Όταν το δείγμα είναι σε ικανοποιητικά μικρό μέγεθος κόκκων, δημιουργείται κενό με τη βοήθεια κατάλληλων μεταλλικών πλακών (φαίνονται στην εικόνα παρακάτω) και εναποθέτησης σε πρέσα. Έτσι, απομακρύνονται ίχνη εργασίας, ενώ ασκείται και πίεση περίπου 10-12 τόνων για την τελική δημιουργία του δισκίου. Το δισκίο έχει διάμετρο περίπου 13 mm και πάχος περίπου 0.3 mm και τίθεται στον υποδοχέα, δίνοντας σε H/Y με κατάλληλο λογισμικό το τελικό φάσμα (Ποιμενίδης, 2010).



Εικόνα 13: Συσκευή Δημιουργίας Δισκίων KBr

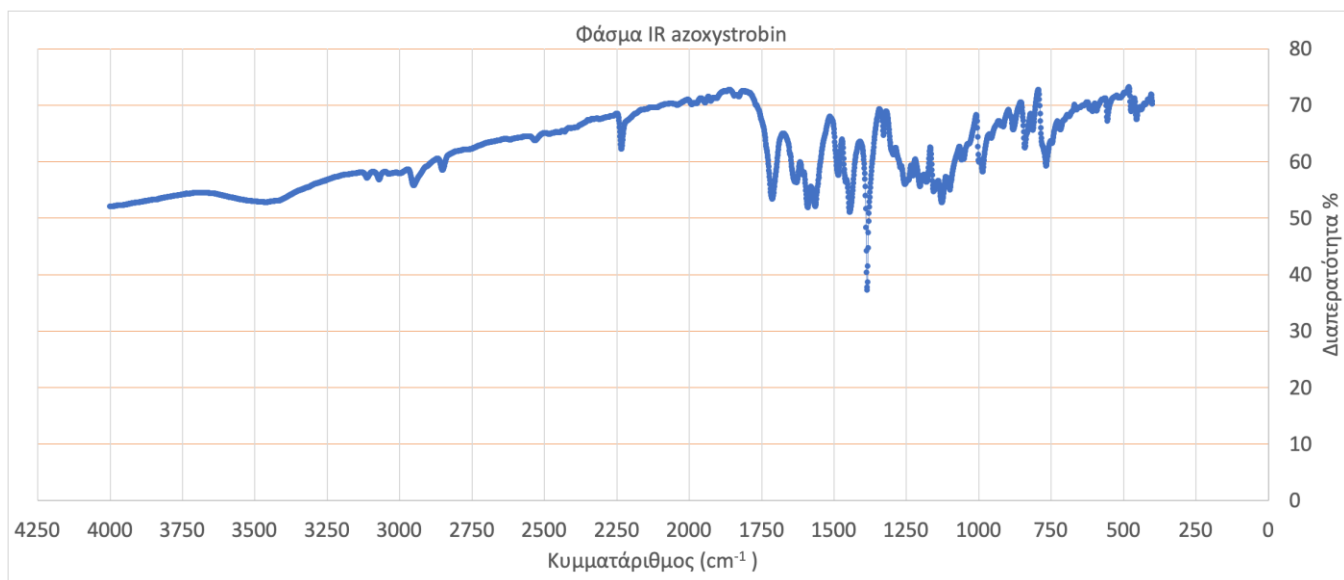


Εικόνα 12: Πρέσα Εργαστηρίου (πανομοιότυπη)

4. Αποτελέσματα

4.1. Φάσμα ουσίας

Μετά την ολοκλήρωση της μέτρησης για το Azoxystrobin λαμβάνεται το φάσμα σε κατάλληλους άξονες όπως αυτοί περιγράφηκαν στη θεωρία.



Εικόνα 14: Αποτέλεσμα Φάσματος IR Azoxystrobin

4.2. Ερμηνεία Φάσματος

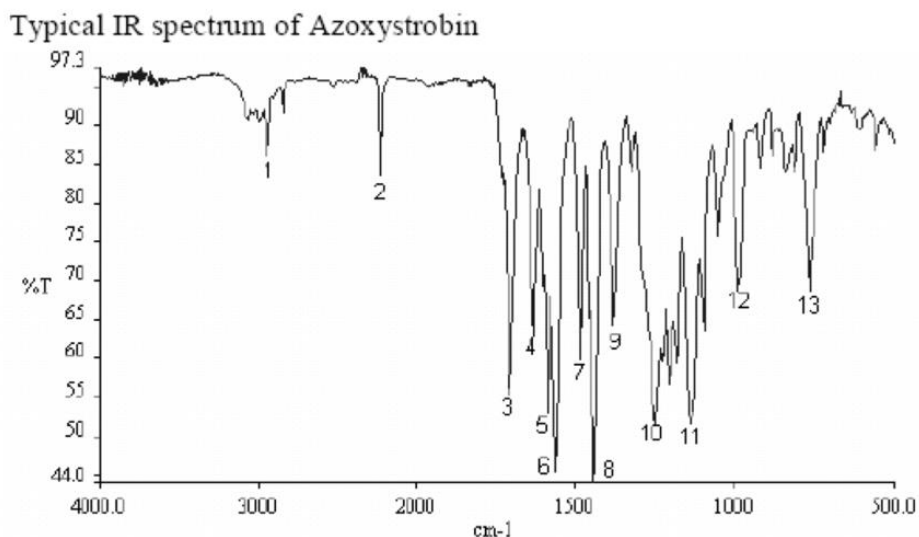
Η περιοχή που ενδιαφέρει για την ερμηνεία φάσματος είναι μεταξύ 4000 cm^{-1} και 400 cm^{-1} (αν και στην πραγματικότητα δεν λαμβάνονται υπόψη κορυφές πιο κάτω από τα 700 cm^{-1}). Μετά από μελέτη των κορυφών, εντοπίστηκαν συνολικά 14 κορυφές, οι οποίες αντιστοιχήθηκαν με πιθανούς τύπους δεσμών που θα μπορούσαν να δώσουν αυτό το σήμα (βάση η εικόνα). Δημιουργήθηκε, λοιπόν, ο πίνακας με το σύνολο των κορυφών και την ερμηνεία τους. Παρουσιάζει ενδιαφέρον πως εμφανίζεται ο δεσμός άνθρακα-υδρογόνου σε δύο πολύ διαφορετικές κορυφές ως πιθανή ερμηνεία (ομοίως και οι κετόνες και εστέρες). Βέβαια, σε υψηλότερους κυματάριθμους πρόκειται για δονήσεις τάσης, ενώ για χαμηλότερους κυματάριθμους είναι υπεύθυνες δονήσεις κάμψης. Φαίνεται, ακόμη, πως για αρκετές κορυφές υπάρχουν δύο ή τρεις διαφορετικές ερμηνείες (οι οποίες δεν αποκλείεται να ισχύουν και συγχρόνως). Εξάλλου αρκετοί δεσμοί μπορεί να συνεισφέρουν και σε περισσότερες από μία κορυφές.

Table 1: Ερμηνεία Φάσματος ανά Κορυφή

Peak (cm^{-1})	Ερμηνεία
2950	-COOH/C-H (δόνηση τάσης)
2233	-COOH/C-N (τριπλός δεσμός)

1712	C-O (διπλός δεσμός) (κετόνη/εστέρας)/C-N (διπλός δεσμός)
1630	
1591	C-O (διπλός δεσμός) (κετόνη/εστέρας)/ C-N (διπλός δεσμός)
1564	Αρωματικός Δακτύλιος (δόνηση κάμψης)
1484	
1445	C-H (δόνηση κάμψης)
1385	
1252	C-O/C-N (απλός δεσμός) (δόνηση τάσης) Εστέρας/Αιθέρας (δόνηση τάσης)
1241	
1129	C-C/C-O/C-N (απλός δεσμός) (δόνηση τάσης)
986	
769	Αλκένιο (τύπου C=C-H)

Παρόλο που δεν υπάρχει κάποια βιβλιοθήκη για την μέθοδο FT-IR, κατά τη βιβλιογραφική έρευνα βρέθηκε ένα πανομοιότυπο διάγραμμα με την ίδια μέθοδο (FAO, 2017). Το παρακάτω φάσμα προσομοιάζει το φάσμα των αποτελεσμάτων, με όλες τις κορυφές να είναι σχεδόν ταυτόσημες.



Εικόνα 15: Φάσμα από FAO για Azoxystrobin

5. Συμπεράσματα

Αρχικά, όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές που εντοπίστηκαν έχουν μια πιθανή ερμηνεία βασισμένη στη θεωρία. Επιπρόσθετα, αν παρατηρήσει κανείς την εικόνα και τους δεσμούς που περιέχονται σε αυτήν σε σύγκριση με την ερμηνεία φάσματος του πίνακα 1, εξάγεται το συμπέρασμα πως όλοι οι δεσμοί μπορούν να αντιστοιχηθούν τουλάχιστον σε μία από τις παρατηρούμενες κορυφές. Συνεπώς, μπορεί να χαρακτηριστεί επιτυχής η ποιοτική ανάλυση του azoxystrobin με τη μέθοδο FT-IR. Αυτό σημαίνει πως το παρόν δείγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά ως πρότυπο για μελλοντικές έρευνες σε σύγκριση με δείγματα οίνου, νερού, εδάφους ή άλλων, στα οποία επιθυμείται η εξακρίβωση ύπαρξης του φυτοφάρμακου azoxystrobin. Ένα ακόμη συμπέρασμα είναι μερικές από τις δονήσεις που παρατηρήθηκαν ανάλογα με τους αντίστοιχους κυματάρθρους (βάση σύγκρισης η εικόνα). Φυσικά υπάρχουν και δονήσεις κάμψης και τάσης, αλλά, πιο συγκεκριμένα, αναμένεται να υπάρχουν δονήσεις παλλόμενες (1250 cm^{-1}), συστροφής (1250 cm^{-1}), ψαλιδωτές (1450 cm^{-1}) και αντισυμμετρικές (2925 cm^{-1}). Οι αιώρησης και συμμετρικές, επίσης δεν απέχουν πολύ από κάποιες κορυφές, αλλά δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

6. Βιβλιογραφία (25)

admin. (2022, August 16). *FTIR Analysis* / RTI Laboratories. RTI Laboratories.

<https://rtilab.com/techniques/ftir-analysis/>

Becker, W., Von Jagow, G., Anke, T., & Steglich, W. (1981). Oudemansin, strobilurin A, strobilurin B and myxothiazol: new inhibitors of the bc1 segment of the respiratory chain with an E-β-methoxyacrylate system as common structural element. *FEBS Letters*, 132(2), 329–333. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(81\)81190-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(81)81190-8)

Böhme, K., Barros-Velázquez, J., & Calo-Mata, P. (2017). Fingerprinting for detecting contaminants in food. In *Elsevier eBooks* (pp. 15–42). <https://doi.org/10.1016/b978-1-78242-251-8.00002-3>

Călin, C., Grigoriu, N., Scăteanu, G. V., Madjar, R. M., Lungu, R. M., & Epure, G. (2018).

MONITORING THE BREAKDOWN OF DINOCAP IN SPIKED SOIL, WINE AND

- GRAPE SAMPLES BY GC/MS AND FTIR/ATR. *Environmental Engineering and Management Journal*. <https://doi.org/10.30638/eej.2018.216>
- Cantor, M., Buta, E., Conțiu, I., Ștefan, R., Crișan, I., & Buru, T. H. (2022). Identification of biochemical composition and pesticides residue in ten rose cultivars leaves using FT-IR spectroscopy. *Emirates Journal of Food and Agriculture*.
<https://doi.org/10.9755/ejfa.2021.v33.i11.2781>
- Chu, S., Baker, M. R., Leong, G., Letcher, R. J., & Li, Q. X. (2018). Covalent binding of the organophosphate insecticide profenofos to tyrosine on α - and β -tubulin proteins. *Chemosphere*, 199, 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.003>
- Deepak. (2015, May 16). FT-IR Spectroscopy. *Lab-Training.com*. <https://lab-training.com/evolution-of-ft-ir-spectroscopy/>
- Deepak. (2021, March 18). Contributions of Michelson Interferometer to FT-IR spectroscopy. *Lab-Training.com*. <https://lab-training.com/contributions-of-michelson-interferometer-to-ft-ir-spectroscopy/>
- Food and Agriculture Organization. (n.d.). *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides*. Hundred and Twenty-third Session of the FAO Council in November 2002, Rome.
- Food and Agriculture Organization. (2008). *Azoxystrobin: Evaluation of data for acceptable daily intake and acute dietary intake for humans, maximum residue levels and supervised trial median residue values*.
- Guide to FT-IR Spectroscopy*. (n.d.). Bruker. <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html>

- Hariharan, P. (2007). Two-Beam interferometers. In *Elsevier eBooks* (pp. 13–22).
<https://doi.org/10.1016/b978-012373589-8/50005-5>
- Khare, K., Butola, M., & Rajora, S. (2023). Fourier Series and Transform. In *Springer eBooks* (pp. 9–31). https://doi.org/10.1007/978-3-031-18353-9_2
- Lewis, K.A., Tzilivakis, J., Warner, D. and Green, A. (2016) An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(4), 1050-1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>
- Libretexts. (2023, April 10). *How an FTIR spectrometer operates*. Chemistry LibreTexts.
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/How_an_FTIR_Spectrometer_Operates](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/How_an_FTIR_Spectrometer_Operates)
- Martino, L., D'Angelo, C. A., Marinelli, C., & Cepeda, R. (2021). Identification and detection of pesticide in chard samples by laser-induced breakdown spectroscopy using chemometric methods. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 177, 106031.
<https://doi.org/10.1016/j.sab.2020.106031>
- Mohammadi, S., & Parastar, H. (2018). Quantitative analysis of multiple high-resolution mass spectrometry images using chemometric methods: quantitation of chlordecone in mouse liver. *Analyst*, 143(10), 2416–2425. <https://doi.org/10.1039/c7an02059g>
- Rijal, N., & Rijal, N. (2022, September 27). *MALDI-TOF Mass Spectrometry: Principle, Applications in Microbiology*. Microbe Online. <https://microbeonline.com/maldi-tof-ms-principle-applications-microbiology/>
- Schramm, G., Steglich, W., Anke, T., & Oberwinkler, F. (1978). Antibiotika aus Basidiomyceten, III. Strobilurin A und B, antifungische Stoffwechselprodukte aus

- Strobilurus tenacellus. *Chemische Berichte*, 111(8), 2779–2784.
<https://doi.org/10.1002/cber.19781110806>
- The Editors of Encyclopaedia Britannica. (2023, November 17). *Electromagnetic spectrum / Definition, Diagram, & Uses*. Encyclopedia Britannica.
<https://www.britannica.com/science/electromagnetic-spectrum>
- Wu, X., Li, W., Guo, P., Zhang, Z., & Xu, H. (2018). Rapid trace detection and isomer quantitation of pesticide residues via Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization fourier transform ion Cyclotron resonance Mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(15), 3966–3974. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00427>
- Άπω υπέρυθρη ακτινοβολία. (n.d.). Em-ecologic. <https://www.em-ecologic.com.cy/---chb2>
- Λιοδάκης, Σ. (2021). Οπτικές Τεχνικές Ανάλυσης. In *Αναλυτική Χημεία* (2nd ed., pp. 215–220). Παπασωτηρίου.
- Ποιμενίδης, Σ. (2010). *Εργαστήριο Εμβάθυνσης στην Ενόργανη Ανάλυση: Υπέρυθρη Φασματοσκοπία*. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Τσίτσας, Ν. (2015). *Εφαρμοσμένα Μαθηματικά*. Εκδόσεις Κάλλιπος.

Παράρτημα: Lab Report

Αναλυτής 1: Μαραγκόπουλος Ηλίας

Αναλυτής 2: Πορλού Χρήστος

Ημερομηνία Έναρξης: 7/11/2023

Ημερομηνία Ολοκλήρωσης: 5/12/2023

Δείγμα: 30 mL οίνου

Κωδικός Δείγματος: 07-11-EA 13

Υλικά:

- 1 Ποτήρι ζέσεως των 50 mL
- 2 Φιαλίδια τύπου Eppendorf όγκου 2 mL
- 1 Φιαλίδιο τύπου HS-SPME και καπάκι
- 2 Φιαλίδια ανάλυσης HPLC
- 1 Φιαλίδιο τύπου Falcon

Διαλύτες:

- HNO₃, 68% w/w
- MeOH, HPLC Grade
- ACN, HPLC Grade
- NaCl

1. Φυσικοχημικές Μετρήσεις

pH: Πριν την μέτρηση του δείγματος θα πρέπει να πραγματοποιηθεί βαθμονόμηση του πεχαμέτρου. Μεταφέρετε 25 mL του δείγματος σε 1 ποτήρι ζέσεως των 50 mL. Σημειώστε τα αποτελέσματα της μέτρησης. Πραγματοποιήθηκε βαθμονόμηση στις **7/11/23** και το pH βρέθηκε ίσο με **3.25**.

Αγωγιμότητα: Στο ίδιο ποτήρι ζέσεως μετρήθηκε η αγωγιμότητα και καταγράφηκε η τιμή του δείγματος. Πραγματοποιήθηκε βαθμονόμηση στις 7/11/23 και η αγωγιμότητα βρέθηκε ίση με $4410 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$.

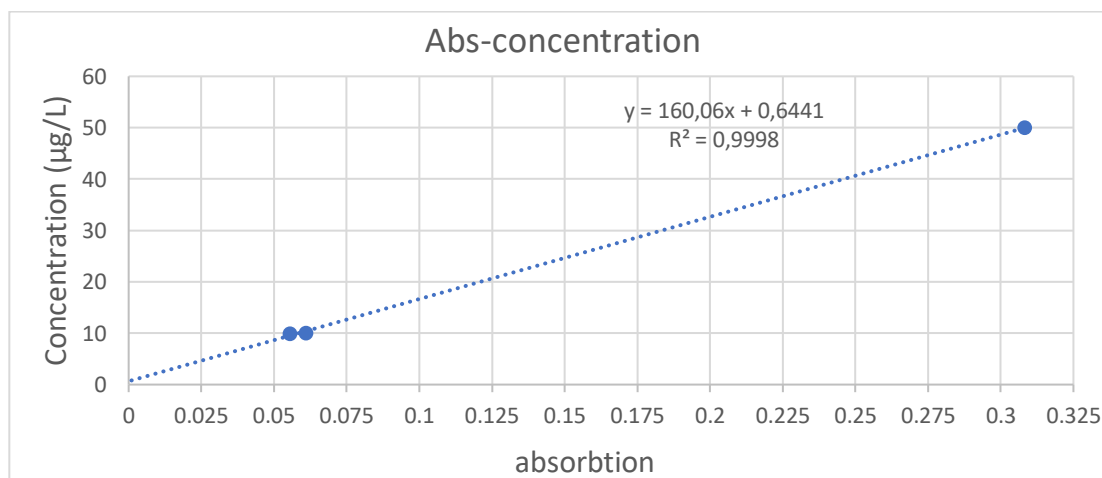
Θολρότητα: 0.43 ntu

2. Προσδιορισμός Μετάλλων (As)

Μέτρηση	Συγκέντρωση ($\mu\text{g/L}$)	Απορρόφηση
Τυφλό	-	-0.0045
C1	10	0.0609
C2	50	0.3082
Δείγμα	9.8	0.0554

Γραμμικότητα: 0.9998

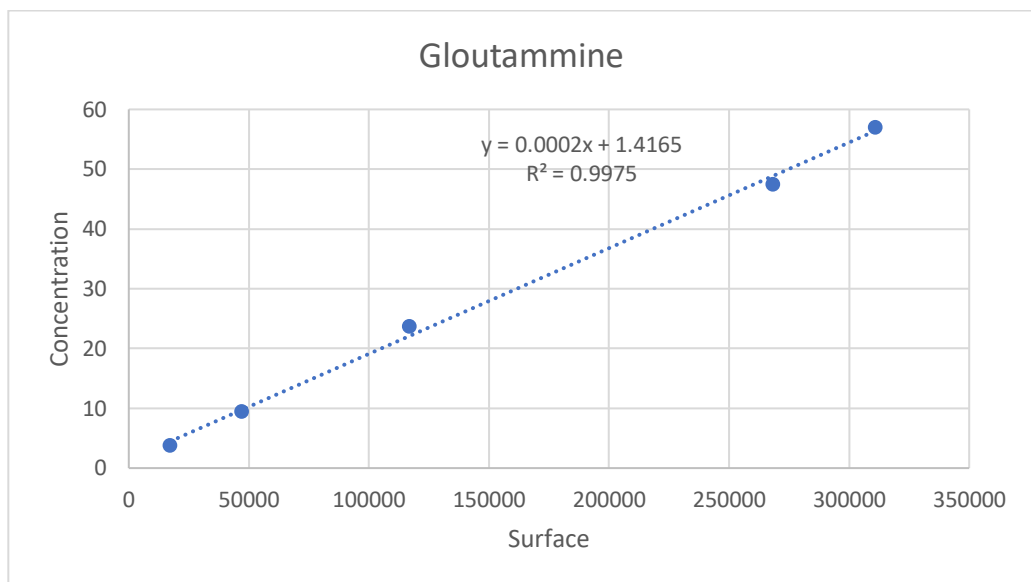
Συγκέντρωση: 9.8 $\mu\text{g/L}$



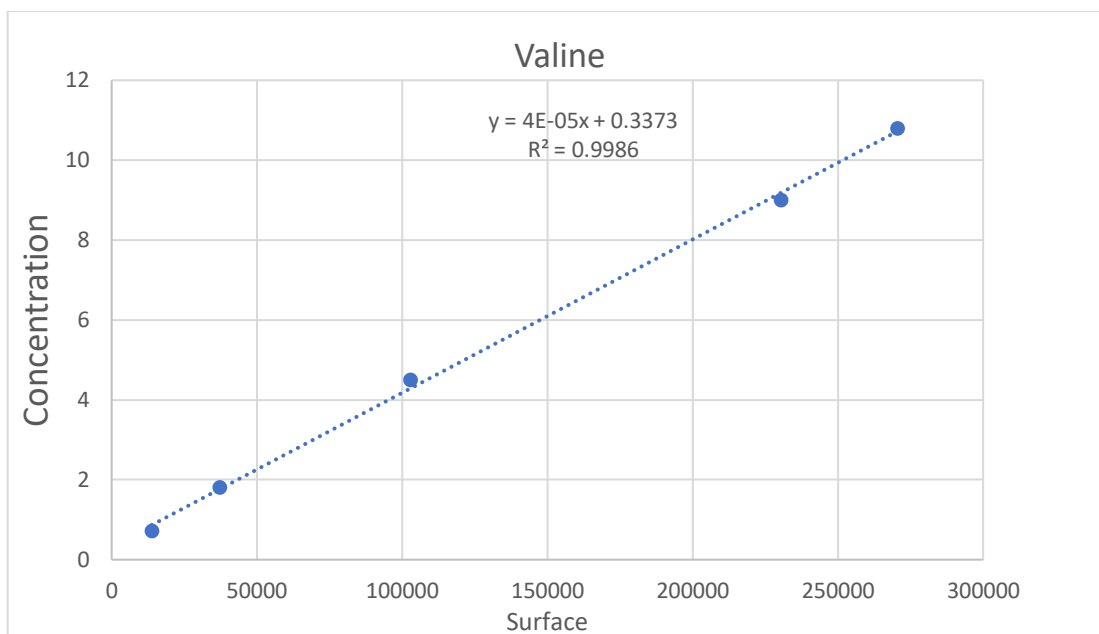
3. Προσδιορισμός Αμινοξέων

Γλουταμίνη	Εμβαδό	Συγκέντρωση
Τυφλό	-	-
C1	17245	3.8

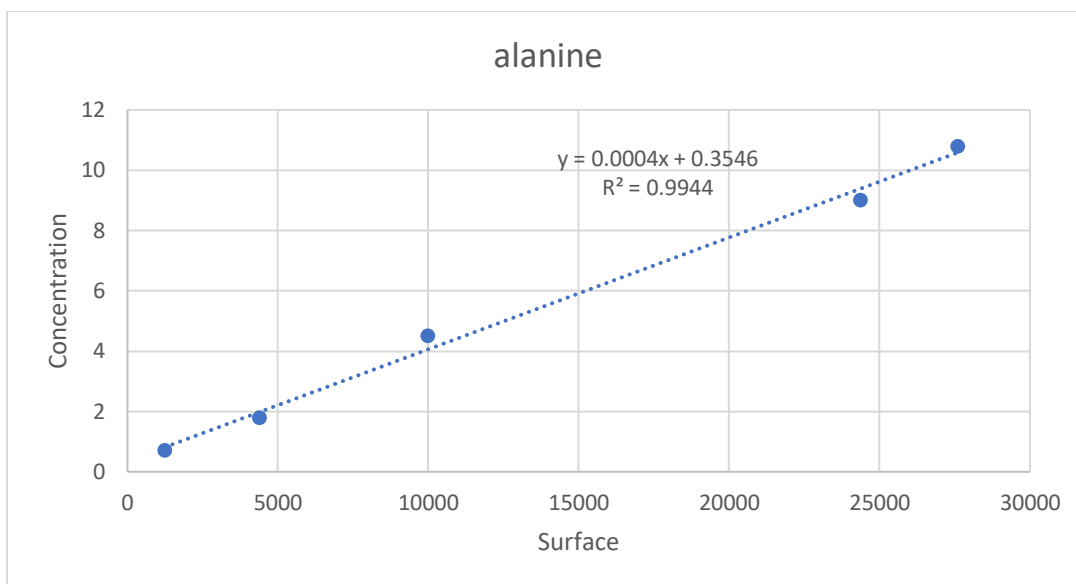
C2	47152.6	9.5
C3	116959.9	23.75
C4	268174.2	47.5
C5	310863.9	57
Δείγμα	117630.9	24.9



Βαλίνη	Εμβαδό	Συγκέντρωση
Τυφλό	-	-
C1	13766.89	0.72
C2	37202.8	1.8
C3	102717	4.5
C4	230444.3	9
C5	270545.9	10.8
Δείγμα	50168.5	2.4



Αλανίνη	Εμβαδό	Συγκέντρωση
Τυφλό	-	-
C1	1233,2	0.72
C2	4383,1	1.8
C3	9983,4	4.5
C4	24371,6	9
C5	27599,7	10.8
Δείγμα	46216,1	18.8



4. Ταυτοποίηση Αρωματικών Ενώσεων

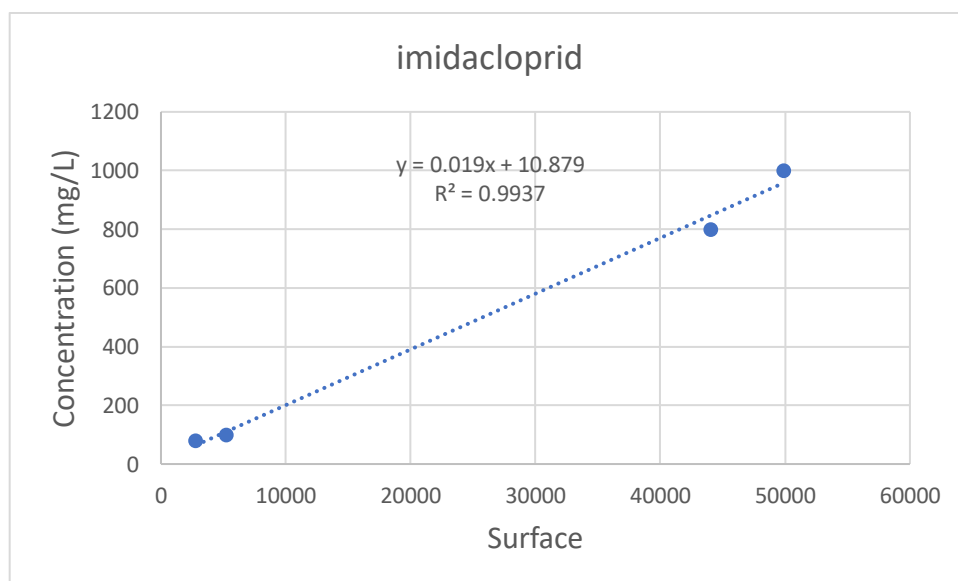
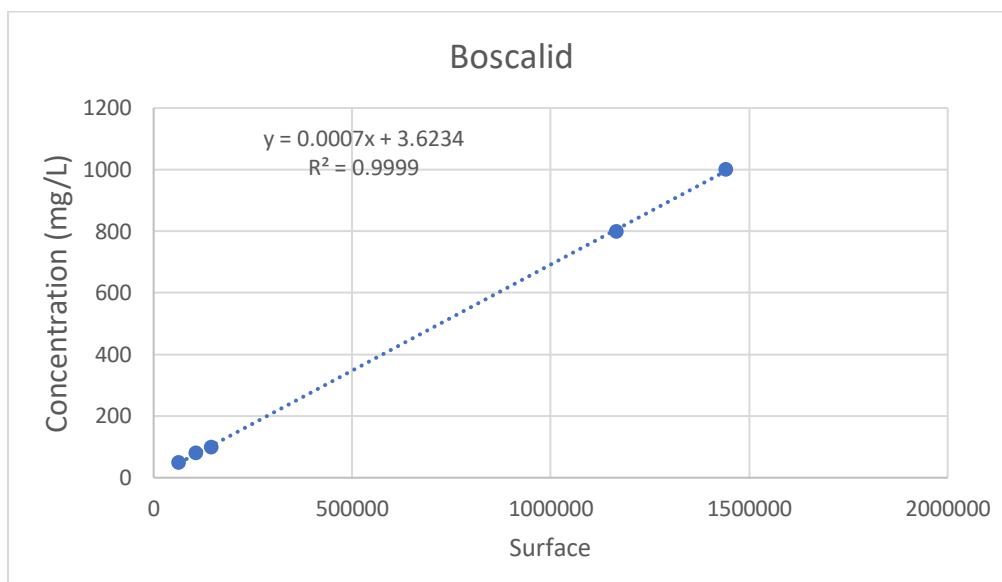
Ενώσεις	+/-	Εμβαδόν	Χρόνος Έκλυσης	Θραύσματα (MAX 3)	MS	NIST Match
copaene	-	-	-	161, 119, 105		copaene
terpineol	+	3,7E+06	24,1	43, 81, 93		Terpineol
2 nonanol	+	5,3E+08	17,8	45, 55, 69		2-nonanol
Ethyl-dodecanate	+	1,9E+09	22,1	88, 101, 183		Ethyl-dodecanate

5. Προσδιορισμός Φαρμάκων με HPLC-UV

Δραστική	+/-	Απορρόφηση (nm)	Εμβαδόν	Συγκέντρωση (mg/L)
Imidacloprid	+	265	12734	252.82
Boscalid	+	220	313098	222.79

Μέτρηση	Συγκέντρωση (mg/L)	Εμβαδό	
		Boscalid	Imidacloprid
Τυφλό			

C1	50	64290	
C2	80	107414	2800
C3	100	145292	5257
C4	800	1165608	44035
C5	1000	1441197	49914
Δείγμα	Boscalid	Imidacloprid	
	222.79	252.82	313098
			12734



6. Προσδιορισμός χαρακτηριστικών ομάδων με IR

Οι δεσμοί απορροφούν ακτινοβολία IR και διεγείρονται (δονούνται), με αποτέλεσμα να δίνουν ένα σήμα που δέχεται μετασχηματισμό Fourier πριν δώσει το τελικό φάσμα. Σε αυτό το φάσμα, κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε έναν δεσμό, άρα και μια χαρακτηριστική ομάδα, οδηγώντας στην ταυτοποίηση του εκάστοτε φυτοφαρμάκου. Η μέτρηση γίνεται μέσα σε δισκίο KBr.