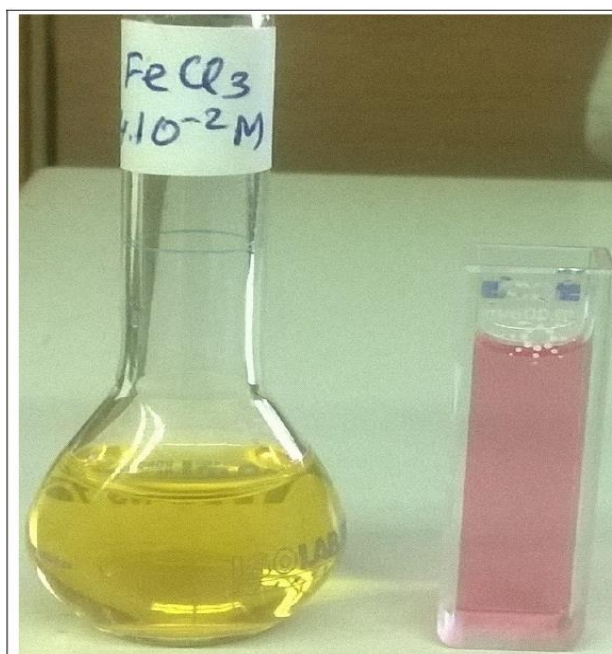
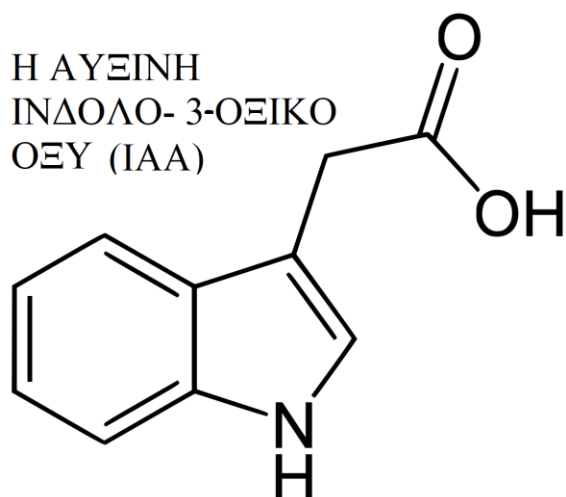


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΚΛΑΔΟΣ : ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Τσεκουράς Αναστάσιος- Γεράσιμος

“Μελέτη ινδολικών ενώσεων ”



Τριχλωριούχος  
σίδηρος ( $\text{FeCl}_3$ )

Αντιδραστήριο Salkowski  
( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{HClO}_4$ ) μαζί με IAA

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ :

Κωνσταντίνου Βιολέτα , Καθηγήτρια Γ.Π.Α

ΑΘΗΝΑ  
ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2019

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΚΛΑΔΟΣ : ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Τσεκουράς Αναστάσιος- Γεράσιμος**

**“Μελέτη ινδολικών ενώσεων ”**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ :**

**Κωνσταντίνου Βιολέτα , Καθηγήτρια Γ.Π.Α**

**ΑΘΗΝΑ  
ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2019**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΚΛΑΔΟΣ : ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Τσεκουράς Αναστάσιος - Γεράσιμος**

Γεωπόνος Φυτικής Παραγωγής

**“ Μελέτη ινδολικών ενώσεων ”**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Κωνσταντίνου Βιολέττα, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Ταραντίλης Πέτρος, Καθηγητής ΓΠΑ

Παπάς Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ**

**ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2019**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μεταπτυχιακή διατριβή που ακολουθεί εκπονήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών , στο τμήμα αξιοποίησης Φυσικών Προϊόντων κατά το ακαδημαϊκό έτος 2018-2019.

Η διατριβή αυτή έγινε εφικτή χάρις στην υποστήριξη του διδακτικού προσωπικού του εργαστηρίου χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

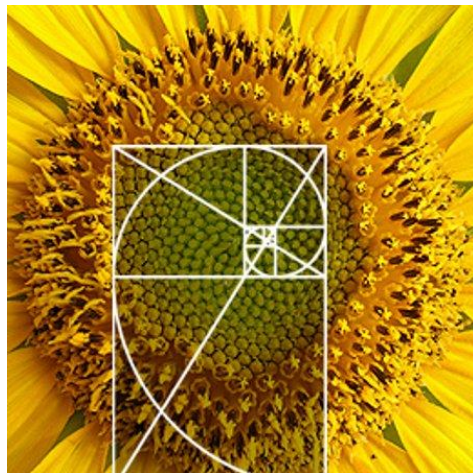
Οφείλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ταραντίλη Πέτρο, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παπά Χρήστο, τον Καθηγητή Κουλαδούρο Ηλία για την επιτυχημένη προσπάθεια μεταβίβασης του σώματος των γνώσεων που προαπαιτούνται για τη σύνταξη αυτής της μελέτης.

Ιδιαίτερα όμως οφείλω να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Βιολέτα Κωνσταντίνου που με καθοδήγησε σε αυτή τη μελέτη τόσο κατά την εκτέλεση των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή της.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τις συμφοιτήτριες του ΠΜΣ για την παραγωγική συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος.

Αθήνα, Φεβρουάριος του 2019

Τσεκουράς Αναστάσιος-Γεράσιμος



Ἡ Φύσις κρύπτεσθαι φιλεῖ,  
ἀρμονίῃ ἀφανῆς φανερῆς κρείττων.

*Ἡράκλειτος*

## Περίληψη

Το ίνδολο-3-οξικό οξύ είναι μια ορμόνη των φυτών που παίζει κρίσιμο ρόλο στο κύκλο ζωής τους. Το θέμα της διατριβής είναι οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ινδολικής ένωσης, ίνδολο-3-οξικού οξέος, καθώς και η αλληλεπίδραση του με δ/μα τρισθενούς σιδήρου σε υπερχλωρικό οξύ. Το αντιδραστήριο αυτό είναι γνωστό ως αντιδραστήριο Gordon-Weber και στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως αντιδραστήριο ανίχνευσης ινδολικών ενώσεων, με εκλεκτικότητα στο ίνδολο-3-οξικό οξύ 2-50 mg/L.

Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι η επιλογή του υπερχλωρικού οξέος ως διαλύτη δεν είναι τυχαία. Και τούτο επειδή για την αντίδραση ανίχνευσης παίζει ρόλο όχι μόνο το αντιδρών (εδώ ο τρισθενής σίδηρος), αλλά και ο διαλύτης στον οποίον βρίσκεται. Πιο συγκεκριμένα ο διαλύτης αυτός δίνει μεγαλύτερες απορροφήσεις για την αντίδραση ανίχνευσης στο φωτόμετρο. Το θέμα αυτό μελετήθηκε από τους Gordon Weber και αναλύεται στο θεωρητικό μέρος στην ενότητα 3.2

Ακόμη γίνεται προσπάθεια ανίχνευσης του ίνδολο-3-οξικού οξέος με το προαναφερθέν αντιδραστήριο σε φυτικό εκχύλισμα μπρόκολου. Η επιλογή αυτού του θέματος δικαιολογείται διότι στη βιβλιογραφία υπάρχουν ελάχιστες αναφορές για μελέτη αυτής της ένωσης με απλές αναλυτικές τεχνικές, ενώ η βιοχημική σημασία της για την ανάπτυξη των φυτών είναι κρίσιμη.

Πιο συγκεκριμένα στη μελέτη αυτή :

- α) Γίνεται μια σύντομη αναφορά στη βιοχημεία του ίνδολο-3-οξικού οξέος στα φυτά, καθώς και στη μελέτη των ιδιοτήτων της αντίδρασης Salkowski, η οποία χρησιμοποιείται ως αντίδραση ανίχνευσης ινδολικών ενώσεων.
- β) Γίνεται μελέτη του φάσματος UV του ίνδολο-3-οξικού οξέος, σε διάφορους διαλύτες, καθώς και συναρτήσει του pH.
- γ) Το ίνδολο-3-οξικό είναι σχεδόν αδιάλυτο στο νερό. Η τιμή του pKa του είναι γνωστή μόνο για οργανικούς διαλύτες. Στη μελέτη αυτή προσδιορίζεται η κρίσιμη συγκέντρωση μεθανόλης σε νερό, ώστε η τιμή της φυσικοχημικής σταθεράς pka του IAA, να είναι παραπλήσια με αυτή της τιμής pka του IAA που αναφέρεται στη βιβλιογραφία για οργανικούς διαλύτες.
- δ) Μελέτη της ικανότητας σχηματισμού συμπλόκου σιδήρου- ίνδολο-3-οξικού οξέος συναρτήσει του χρόνου και της συγκέντρωσης του υπερχλωρικού οξέος στο UV.
- ε) Προσδιορισμός στοιχειομετρικής αναλογίας του συμπλόκου σιδήρου – ίνδολο-3-οξικού οξέος με φωτόμετρο στη μισή κ'μιάμιση ώρα, σύμφωνα με τη μέθοδο γραμμομοριακού λόγου Yoe-Jones.
- ζ) Προσπάθεια ανίχνευσης ινδολοξέων σε λυοφιλιωμένο μπρόκολο, το αποτέλεσμα ήταν αρνητικό.

**Λέξεις κλειδιά :**

**Ίνδολο-3-οξικό οξύ (IAA), υπερχλωριούχος σίδηρος, υπερχλωρικό οξύ, UV φασματοσκοπία, pH του IAA, pka του IAA, ποτενσιομετρική ογκομέτρηση, Yoe Jones γραμμομοριακή μέθοδο, λυοφιλιωμένο μπρόκολο.**

## **Abstract**

Indole-3-acetic acid is an hormone of plants which plays a crucial role in their life cycle.

The subject of this thesis is the study of indole-3-acetic acid and its interactions with ferric iron solution in perchloric acid. This reagent is known as Gordon Weber and it is referred in bibliography as a suitable reagent for detection of indoles. The sensitivity range for indole-3-acetic acid of this reagent is 2-50 mg/L. The selection of perchloric acid as a solvent is justified by Gordon and Weber in their paper "Colorimetric estimation of indole acetic acid". These workers tested various reagents for the detection of indole-3-acetic acid and found that perchloric acid with ferric iron gives the highest absorbancy values in the photometer. After a short reference in the biochemistry of indole-3-acetic acid in plants, in this study are examined :

- The UV spectrums of indole-3-acetic acid in a few of the most common organic solvents employed in UV spectroscopy are examined , in order to find the most suitable solvent.
- The changes of the UV spectrum of indole-3-acetic acid in conjunction to pH. The solvent employed is acetonitrile. The findings are compared with the findings of other workers.
- Indole-3-acetic acid is nearly insoluble in water. Thus its pka value is known only in organic solvents. In this thesis is determined the mole fraction of methanol in aqueous solution, in order to find approximately the same pka value of the known for organic solvents. The method employed is potentiometric titration.
- The absorption values of the complex of ferric iron with indole-3-acetic acid are examined in conjunction with the volume of aqueous perchloric acid solution 35%, and in conjunction with time.
- The ratio of the complex of ferric iron (metal) and indole-3-acetic acid (ligand), is determined. The method employed is Yoe-Jones mole ratio method.
- Finally the Gordon- Weber reagent is applied in lyophilized broccoli for detection of indolic acids. The result was negative.

## **Key words :**

**indole-3-acetic acid (IAA), ferric chloride, perchloric acid, UV spectroscopy, pH of IAA, pka of IAA, potentiometric titration, Yoe Jones molar ratio method, lyophilized broccoli.**

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

**Σχήμα 1** : Χημικοί τύποι του ινδόλιου και του ίνδολο-3-οξικού οξέος (IAA)

**Σχήμα 2** : Μεταβολικές διεργασίες του ίνδολο-3-οξικού οξέος

**Σχήμα 3** : Απορροφήσεις του ίνδολο-3-οξικού οξέος στο φωτόμετρο για διάφορα αντιδραστήρια κατά τους Gordon & Weber

**Σχήμα 4** : Ηλεκτρονιακή δομή του τρισθενούς σιδήρου

**Σχήμα 5** : Φάσματα UV του ίνδολο-3-οξικού οξέος και της σύμπλοκης μορφής του με τρισθενή σίδηρο (σε νιτρικό οξύ) κατά τους Kamnev et al

**Σχήμα 6** : Διάταξη Φασματοσκοπίας UV

**Σχήμα 7** : Φαινόμενα μετατόπισης και απορρόφησης μήκους κύματος στο UV

**Σχήμα 8** : Μηχανισμός απορρόφησης των χημικών ενώσεων στην υπεριώδη και ορατή περιοχή

**Σχήμα 9** : Φάσμα του ινδόλιου σε 95 % αιθανόλη στο UV

**Σχήμα 10** : Ενεργειακό διάγραμμα ζωνών UV για το ινδόλιο

**Σχήμα 11** : Φάσμα UV του ίνδολο-3-οξικού οξέος σε 95 % αιθανόλη

**Σχήμα 12** : Φάσμα UV για IAA, 5-OH IAA και 4 -Cl IAA

**Σχήμα 13** : Ιονισμός ασθενούς οξέος συναρτήσει του pH

**Σχήμα 14** : Μεταβολή του pKa ινδολοξέων εν σχέσει με το κλάσμα της μεθανόλης σε νερό

**Σχήμα 15** : Διάταξη ποτενσιομετρίας

**Σχήμα 16** : Καμπύλες αναφοράς για σύμπλοκα 1: 1 και 1 : 2, με τη μέθοδο του γραμμομοριακού λόγου

**Σχήμα 17** : Τρόποι υπολογισμού του ισοδύναμου σημείου

**Σχήμα 18** : Καμπύλες ογκομέτρησης του IAA σε υδατικά δ/τα μεθανόλης 15 % και 30 %

**Σχήμα 19** : Καμπύλη αναφοράς για το σύμπλοκο τρισθενούς σιδήρου- ίνδολο-3-οξικού οξέος

(Τα σχήματα 1-17 προέρχονται από τη βιβλιογραφία)

(Τα σχήματα 18,19 είναι από πειράματα εργαστηρίου χημείας Γ.Π.Α)



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΦΑΣΜΑΤΩΝ (από πειράματα εργαστηρίου χημείας Γ.Π.Α)

**Φάσμα 1** : Απορρόφηση ακετονιτρίλιου

**Φάσμα 2** : 1 ppm IAA σε ακετονιτρίλιο

**Φάσμα 3** : Απορρόφηση μεθανόλης

**Φάσμα 4** : 1 ppm IAA σε μεθανόλη

**Φάσμα 5** : Απορρόφηση διχλωρομεθανίου

**Φάσμα 6** : 1 ppm IAA σε διχλωρομεθάνιο

**Φάσμα 7** : Απορρόφηση ακετόνης

**Φάσμα 8** : 1 ppm IAA σε υδατικό δ/μα μεθανόλης 30%

**Φάσμα 9** : IAA  $10^{-5}$  M σε ακετονιτρίλιο, σε όξινο περιβάλλον (HCl 0,1 M)

**Φάσμα 10** : IAA  $10^{-5}$  M σε ακετονιτρίλιο σε βασικό περιβάλλον (NaOH 0,1 M)

**Φάσμα 11** : IAA  $10^{-5}$  M σε ακετονιτρίλιο

**Φάσμα 12** : IAA  $10^{-4}$  M σε ακετονιτρίλιο

**Φάσμα 13** : Η αντίδραση συμπλοκοποίησης IAA- Fe<sup>3+</sup> με προσθήκη 600 μl HClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 35% (aq)

**Φάσμα 14** : Η αντίδραση συμπλοκοποίησης IAA- Fe<sup>3+</sup> με προσθήκη 700 μl HClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 35% (aq)

**Φάσμα 15** : Η αντίδραση συμπλοκοποίησης IAA- Fe<sup>3+</sup> με προσθήκη 800 μl HClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 35% (aq)

**Φάσμα 16** : Η αντίδραση συμπλοκοποίησης IAA- Fe<sup>3+</sup> με προσθήκη 800 μl HClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 35% (aq), μετά από 25 λεπτά

**Φάσμα 17** : Απορρόφηση συμπλόκου IAA- Fe<sup>3+</sup> με προσθήκη 800 μl HClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 35% (aq), μετά από 1 ώρα στα 530 nm.

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ – ΠΙΝΑΚΩΝ

**Φωτό 1** : Η μέθοδος του γραμμομοριακού λόγου Yoe-Jones για την αντίδραση συμπλοκοποίησης IAA- Fe<sup>3+</sup>

**Φωτό 2** : Δ/μα FeCl<sub>3</sub> και η αντίδραση του με IAA, παρουσία υπερχλωρικού οξέος μετά από 25 λεπτά και μετά από 1 ώρα

**Φωτό 3** : Εκχύλιση φυτικού ιστού, και διαχωρισμός φάσεων

**Πίνακας 1** : Πολικότητα και τιμές UVcutoff για τους συνηθέστερους διαλύτες στο UV

**Πίνακας 2** : Ζώνες απορρόφησης ινδόλιου και ινδόλο-3-οξικού οξέος

**Πίνακας 3** : Φυσικοχημικές σταθερές διαλυτών

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	I
Abstract.....	II
Κατάλογος σχημάτων.....	III
Κατάλογος φασμάτων, φωτό και πινάκων.....	IV

## I ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Εισαγωγή – σκοπός της μελέτης.....	σελ.3
<b>2 Μεταβολισμός του ινδολο-3-οξικού οξέος (IAA) στα φυτά</b>	
2.1 Εισαγωγικά.....	σελ.4
2.2 Μορφές αυξίνης στα φυτά.....	σελ.4
2.2.1 Ενεργές μορφές αυξίνης.....	σελ.5
2.2.2 Κύρια πρόδρομα του IAA.....	σελ.7
2.2.3 Αποθηκευτικές μορφές του IAA.....	σελ.7
2.2.4 Καταβολικές μορφές του IAA.....	σελ.7
<b>3. Το αντιδραστήριο Salkowski, &amp; άλλα αντιδραστήρια</b>	
3.1 Η αντίδραση ανίχνευσης ινδολικών ενώσεων Salkowski.....	σελ.8
3.2 Άλλα αντιδραστήρια ανίχνευσης.....	σελ.9
3.3 Προϊόντα της αντίδρασης τρισθενούς σιδήρου ( $Fe^{3+}$ ) με το IAA.....	σελ.10
3.3.1 Ηλεκτρονιακή δομή τρισθενούς σιδήρου ( $Fe^{3+}$ ).....	σελ.11
3.3.2 Τα σύμπλοκα $Fe^{3+}$ - IAA.....	σελ.12
<b>4. Φασματοσκοπία UV</b>	
4.1. Εισαγωγικά.....	σελ.12
4.2 Αρχή λειτουργίας.....	σελ.12
4.3 Φαινόμενα μετατόπισης και ζώνες απορρόφησης στο UV.....	σελ.13
4.4 Επιλογή κατάλληλου διαλύτη για τη λήψη φάσματος.....	σελ.14
4.5 Φάσματα IAA, ινδολίου.....	σελ. 15

4.5.1 Ζώνες απορρόφησης στο UV.....σελ.	15
4.5.2 Φαινόμενα μετατόπισης για υποκατεστημένο ΙΑΑ.....σελ.	17

## **5. Προσδιορισμός της φυσικοχημικής παραμέτρου pKa**

5.1. Εισαγωγή.....σελ.	18
5.2 pKa Ίνδολο-3-οξικού οξέος.....σελ.	18
5.3 Ποτενσιομετρία αρχή λειτουργίας.....σελ.	19

## **6. Μελέτη στοιχειομετρικής αναλογίας συμπλόκου $Fe^{3+}$ - ΙΑΑ.....σελ.**

20

## **II ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **7. Μελέτη φασμάτων UV του ΙΑΑ**

7.1 Επιλογή του διαλύτη και παρασκευή δ/των.....σελ.	21
7.2 Επίδραση του pH στο φάσμα του ίνδολο-3-οξικού οξέος.....σελ.	25
7.3 Επίδραση της συγκέντρωσης του ίνδολο-3-οξικού οξέος στο φάσμα UV.....σελ.	28

### **8. Μελέτη της φυσικοχημικής σταθεράς του pKa**

8.1 Χρήση ποτενσιομετρίας στον προσδιορισμό των τιμών pKa.....σελ.	29
8.2 Επιλογή κατάλληλου διαλύτη.....σελ.	30
8.3 Υδατικά διαλύματα οργανικών διαλυτών.....σελ.	31
8.4 Αποτελέσματα.....σελ.	32

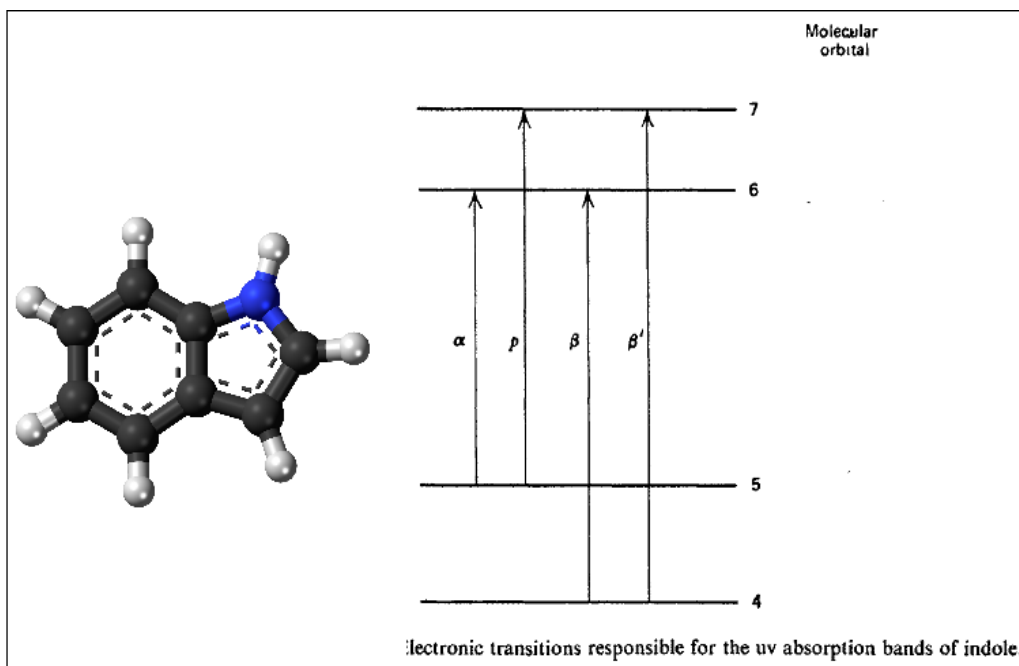
### **9. Μελέτη συμπλόκων τρισθενούς σιδήρου με ΙΑΑ**

9.1 Μελέτη σχηματισμού συμπλόκων συναρτήσει του χρόνου και του όγκου $HClO_4^-$ .....σελ.	37
9.2 Συμπλοκομετρία (προσδιορισμός στοιχειομετρικής αναλογίας) με τη μέθοδο του γραμμομοριακού λόγου.....σελ.	40
9.3 Προσδιορισμός ΙΑΑ και λοιπών ινδολικών ενώσεων σε εκχύλισμα μπρόκολου.....σελ.	41

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

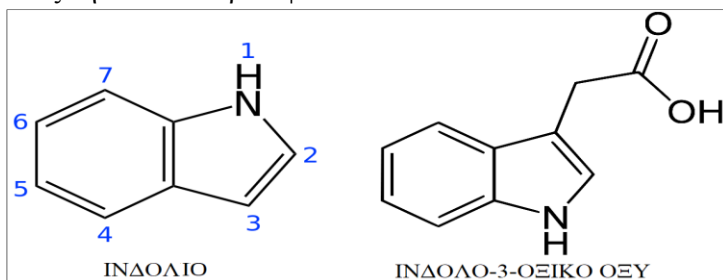
# ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## 1. Εισαγωγή – Σκοπός της μελέτης

Το ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA) αποτελεί τον κύριο εκπρόσωπο της ομάδας των αυξινών.

Οι αυξίνες στη πλειονότητά τους, δεν είναι τίποτε άλλο από υποκατεστημένα ινδολοξέα στη θέση 3 του πυρολικού δακτυλίου όπως φαίνεται στο σχήμα 1. Σήμερα είναι γενικά παραδεκτό ότι το IAA αποτελεί τη κύρια αυξίνη των ανώτερων φυτών.



**Σχήμα 1 :** Χημικοί τύποι ινδολίου και ινδολο-3-οξικού οξέος

Η αυξίνη προέρχεται από τη λέξη “αύξηση” και παρουσιάζει γεωπονικό ενδιαφέρον, διότι αποτελεί ορμόνη η οποία ρυθμίζει την αύξηση των φυτών σε πάρα πολύ μικρές συγκεντρώσεις (<0,001 M).

Πάνω από μια ορισμένη συγκέντρωση αντί να προάγει εμποδίζει την ανάπτυξη του φυτικού ιστού.

Εκμεταλλούμενοι αυτή τους την ιδιότητα οι χημικοί έχουν συνθέσει πολύ ισχυρά ζιζανιοκτόνα όπως το 2,4 D. (Γεωργική Φαρμακολογία Ζιώγας & Μαρκόγλου)

Το ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA) βρίσκεται στα έμβρυα των σπερμάτων και τα νεαρά φύλλα.

Ακόμη απαντάται σε πολλούς μικροοργανισμούς όπως το πρωτόζωο *Plasmodiophora brassicae*, τους μύκητες *Phytophthora infestans*, *Ustilago maydis*, *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense*, *Gymnosporangium fuscum*, *Verticillium dahliae* ως και τα βακτήρια *Pseudomonas* pv. *Savastanoi* και *Ralstonia Solanacearum*.

Τα παραπάνω όχι μόνο συμβάλλουν στην αύξηση των επιπέδων IAA στα φυτά, αλλά είναι ικανά μόνα τους να παράγουν IAA. (Τζάμος, Φυτοπαθολογία Β έκδοση).

Τα τελευταία χρόνια ορισμένες ινδολικές ενώσεις μεταξύ αυτών και οι αυξίνες, οι οποίες απαντώνται σε ορισμένα φυτικά είδη κυρίως στα λάχανα, έχουν αποκτήσει και φαρμακευτικό ενδιαφέρον ως αντικαρκινικές ουσίες. Σε σταυρανθή όπως το μπρόκολο έχουν ανιχνευθεί δευτερογενείς ινδολικοί μεταβολίτες όπως η ινδολο-3-καρβινόλη.

Οι Bandurski και Schulze (*Plant Physiol.* (1977) 60, 211-213) ανίχνευσαν IAA σε σπόρους δημητριακών, οσπρίων, σπόρους ηλιανθου, φαγόπυρου και ρυζιού.

Το θέμα της μελέτης αυτής, είναι η μελέτη της ένωσης IAA και της αντίδρασης της με το τρισθενή σίδηρο με απλά μέσα όπως τη φασματοσκοπία UV, καθώς και προσδιορισμός της φυσικοχημικής σταθεράς pKa σε υδρο-οργανικό διάλυμα (δηλαδή αραιό υδατικό διάλυμα οργανικού διαλύτη), με οργανικό διαλύτη τη μεθανόλη. Ακόμη γίνεται προσπάθεια ανίχνευσης των αυξινών με την υπό μελέτη αντίδραση σε φυτικό εκχύλισμα μπρόκολου.

Η αντίδραση αυτή με το τρισθενή σίδηρο είναι γνωστή ως αντίδραση Salkowski και χρησιμοποιείται στη μικροβιολογία για την ανίχνευση ινδολικών ενώσεων. Το δ/μα τρισθενούς σιδήρου με υπερχλωρικό οξύ θεωρείται ως παραλλαγή του αντιδραστήριου Salkowski, και είναι γνωστό ως αντιδραστήριο Gordon Weber.

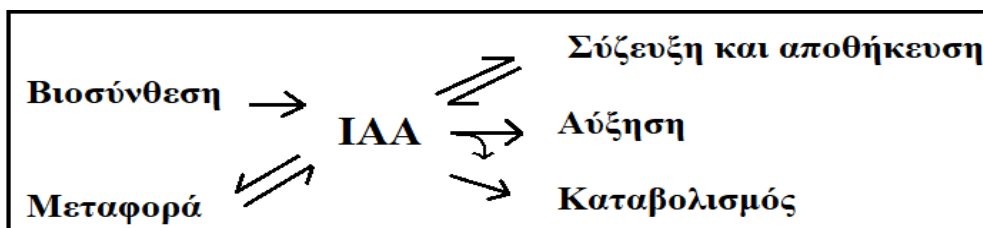
Στα φυτικά εκχυλίσματα υπάρχουν και άλλες ουσίες που δύναται να αντιδράσουν με το σίδηρο με κυριότερες τις φαινόλες. Γίνεται προσπάθεια να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα με κατάλληλη επεξεργασία του φυτικού ιστού.

## 2) Μεταβολισμός του ινδολο-3-οξικού οξέος στα φυτά

### 2.1 Εισαγωγικά

Η αυξίνη IAA στο φυτό ακολουθεί τις εξής κύριες μεταβολικές διεργασίες όπως φαίνεται από το σχήμα 2 :

- 1) Πρώτα γίνεται η βιοσύνθεση της αυξίνης IAA.  
Πρόδρομη ένωση όλων των αυξινών είναι το αμινοξύ τρυπτοφάνη.
- 2) Η αυξίνη χρησιμοποιείται από το φυτό είτε επιτόπου για την αύξηση των φυτικών ιστών, είτε μεταφέρεται σε άλλους φυτικούς ιστούς. Δεν υπάρχει συγκεκριμένο όργανο βιοσύνθεσης τους.
- 3) Η περίσσεια σε IAA είτε καταβολίζεται, είτε αποθηκεύεται.  
Η αποθήκευση και ο καταβολισμός γίνεται με σύζευξη αμινοξέων.  
Ορισμένα αμινοξέα δίνουν αποταμιευμένες μορφές IAA όταν συζευχθούν με αυτό, ενώ άλλα όχι.
- 4) Οι διαδικασίες της μεταφοράς και της αποθήκευσης βρίσκονται σε δυναμική χημική ισορροπία, εντός των φυτικών ιστών. Αντίθετα η βιοσύνθεση, αύξηση και καταβολισμός είναι μονόπλευρες αντιδράσεις.



**Σχήμα 2** : Μεταβολικές διεργασίες της αυξίνης ινδολο-3-οξικό οξύ  
(Το σχήμα είναι του συγγραφέα)

### 2.2 Μορφές της αυξίνης στο φυτό

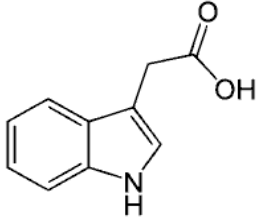
Οι αυξίνες βρίσκονται εντός των φυτικών ιστών σε 4 κύριες μορφές :

- α) Ενεργές αυξίνες (IAA, χλωριωμένες μορφές IAA, PAA)
- β) Πρόδρομες μορφές, (IPA σε όλα τα φυτά, IaOx στα σταυρανθή, TAM στις ποές)
- γ) Αποθηκευτικές μορφές (IBA, σύζευξη με σάκχαρα, αμινοξέα)
- δ) Καταβολικές μορφές, (κυρίως οξινδόλες, διοξινδόλες)

Τα είδη αυτά των αυξινών, μαζί με τις συντομογραφίες αναλύονται λεπτομερώς παρακάτω στην ενότητα 2.2.1

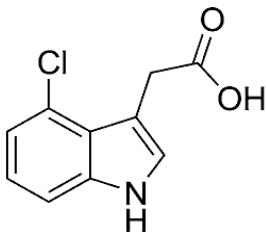
### 2.2.1 Ενεργές μορφές αυξίνης

Οι παρακάτω αυξίνες είναι οι φυσικές δραστικές αυξίνες, που απαντώνται στους φυτικούς ιστούς. Η μοναδική μη ινδολικής μορφής φυσική αυξίνη είναι το φαινόξυ-οξικό οξύ (PAA).



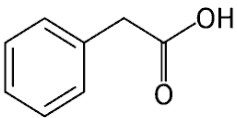
Είναι η κλασική αυξίνη, που απαντάται σχεδόν σε όλα τα φυτά, στη θέση 3 του πυρολικού δακτυλίου, φέρει μια καρβοξυλομάδα.

#### Ίνδολο-3- οξικό οξύ ( IAA)



Απαντάται κυρίως στα όσπρια (Leguminosae) : κουκιά ( *Vicia faba*), αρακάς ( *Pisum sativum*), φακή (*Lens culinaris*), μοσχομπίζελο (*Lathyrus odoratus*). Στον αρακά αλλά και σε άλλα είδη της οικογένειας Leguminosae παράγεται σε συνθήκες stress, και νεκρώνει το φυτό, θεωρείται ότι είναι μια “φυτοορμόνη θανάτου”. Προκαλείται νέκρωση του φυτού, και μεταφορά θρεπτικών στους σπόρους. Έχει ανιχνευθεί και στο πεύκο *Pinus sylvestris*.

#### 4- Χλωροΐνδολο-3- οξικό οξύ ( 4 -Cl IAA)

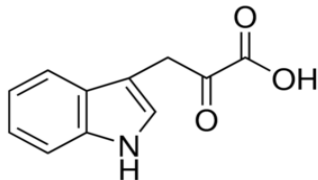


Η μόνη μη ινδολική φυσική αυξίνη, με ασθενή δράση, πιθανώς ρυθμίζει τα επίπεδα του ελεύθερου IAA στο φυτό. Απομόνωθηκε για πρώτη φορά σε βλαστούς τομάτας (*Lycopersicon esculentum*). Αντίθετα με τις ινδολικές αυξίνες που βιοσυντίθενται από το αμινοξύ τρυπτοφάνη (Trp), το PAA βιοσυντίθεται από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη (Phe).

#### Φαινυλοοξικό οξύ (PAA)

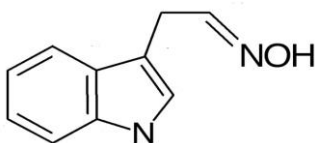
## 2.2.2 Κύρια πρόδρομα του IAA

Με τον όρο “ κύρια πρόδρομα”, εννοούμε τα μεταβολικά ενδιάμεσα που δίνουν τα βιοχημικά μονοπάτια βιοσύνθεσης του ίνδολο-3-οξικού οξέος.



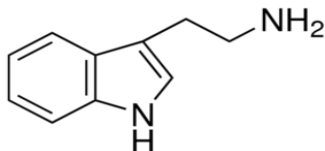
Κύρια πρόδρομη μορφή του ίνδολο-3-οξικού οξέος, απαντάται στα περισσότερα φυτά, αλλά και στα βακτήρια. Το ίνδολο-3-πυροσταφυλικό (IPA) βρίσκεται σε χημική ισοροπία με το ίνδολο-3-γαλακτικό οξύ (ILA) στο φυτό. Η μόνη διαφορά του ILA από το IPA είναι μια υδροξυλομάδα, αντί για κετονομάδα.

### IPA (Ινδολο-3-πυροσταφυλικό)



Πρόδρομη μορφή των σταυρανθών (Cruciferae), και των κολεόπτλων καλαμποκιού (Zea mays). Είναι πρόδρομο για τη βιοσύνθεση IAA. Χρησιμοποιείται επίσης για τη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών άμυνας όπως καμαλεξίνες (camalexins) και γλυκοσινολικά οξέα (glucosinolates).

### Iaox (Ινδολο-3-ακεταλδοξίμη)



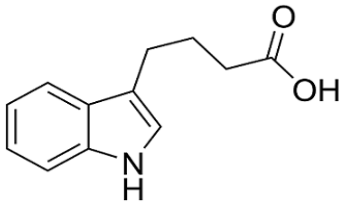
Πρόδρομη μορφή IAA για τα ποώδη φυτά (Poaceae ή Graminae). Σε υψηλές συγκεντρώσεις απαντάται και στην ακακία (Acacia sp.). Χρησιμοποιείται και για τη βιοσύνθεση ινδολικών αλκαλοειδών. Γνωστή ψυχοτρόπος ουσία.

### TAM (Τρυπταμίνη)



### 2.2.3 Αποθηκευτικές μορφές του IAA

#### A) Χημικές ενώσεις

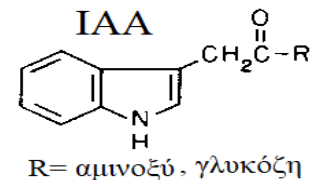


Χρησιμοποιείται ως ορμόνη ριζοβολίας μοσχευμάτων στη γεωπονία. Ανιχνεύθηκε πρώτα σε κονδύλους πατάτας (*Solanum tuberosum*). Μετατρέπεται σε ίνδολο-3-οξικό οξύ στα φυτά μέσω του ακετυλοσυνενζύμου Α (CoA) κατά την αντίδραση :  $IBA-CoA \rightleftharpoons IAA-CoA$ , μια διαδικασία παρόμοια με τη β-οξείδωση στα ζώα.

#### IBA (Ινδολο-3-βουτυρικό οξύ)

#### B) Συζεύγματα ινδολοξέων

- Το **IAA** αποθηκεύεται κάνοντας εστέρα, με τα εξής αμινοξέα : Μεθειονίνη (**Me**), Αλανίνη (**Ala**), Λευκίνη (**Leu**). Ακόμη συζευγνύεται με το σάκχαρο γλυκόζη (**Gluc**).

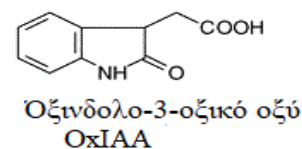


- Το **IBA** αποθηκεύεται με σύζευξη του κάνοντας εστέρα, με το αμινοξύ αλανίνη (**Ala**), το σάκχαρο γλυκόζη (**Gluc**).

### 2.2.4 Καταβολικές μορφές του IAA

- Το ίνδολο-3-οξικό οξύ (IAA) απενεργοποιείται κάνοντας εστέρα, με τα αμινοξέα ασπαρτικό (Asp) και γλουταμινικό (Glu). Ακόμη οξειδώνεται προς όξινδολο-3-οξικό οξύ.

- Το όξινδολο-3-οξικό οξύ (OxIAA) κάνει εστέρα με το αμινοξύ ασπαρτικό (Asp) και το σάκχαρο γλυκόζη (Gluc).

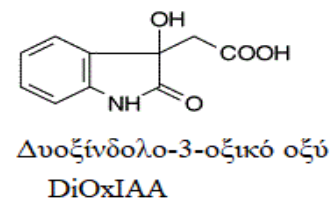


Όξινδολο-3-οξικό οξύ  
OxIAA

- Αν και έχουν ανιχνευθεί και άλλες μορφές καταβολιτών στα φυτά, όπως ίνδολο-ακετυλ-ασπαρτικό στη σόγια (*Glycine max*), οι κυριότεροι καταβολίτες είναι τα συζεύγματα του ίνδολο-3-οξικού οξέος και των οξινδολών.

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι μόνο στο ρύζι (*Oryza sativa*) έχουν ανιχνευθεί και οι 2 μορφές οξινδολών, το όξινδολο-3-οξικό (OxIAA) και το δυοξινδολο-3-οξικό (DiOxIAA).

Οι πληροφορίες για τη βιοχημεία του IAA στα φυτά, προέρχονται από το σύγγραμμα Γεωργικής Φαρμακολογίας των Ζιώγα & Μαρκόγλου Πηγή (16)



Δυοξινδολο-3-οξικό οξύ  
DiOxIAA

### 3. Το αντιδραστήριο Salkowski, & άλλα αντιδραστήρια

#### 3.1 Η αντίδραση Salkowski

Το αντιδραστήριο αυτό πήρε το όνομα του, απο τον βιοχημικό Ernst- Leopold Salkowski.

Αποτελείται από τρισθενή σίδηρο και οξύ, και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ινδολικών ενώσεων.

Μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός της αντίδρασης, με τα ινδολοξέα.

Αντιδρά δίνοντας κόκκινο-ροζ χρώμα στα 530 nm.

Δεν πρέπει να συγγέεται με το αντιδραστήριο Salkowski το οποίο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση τερπενίων και το οποίο δεν περιέχει σίδηρο.

Το αντιδραστήριο είναι ιδιαίτερα εκλεκτικό για το IAA.

Η ευαισθησία ανίχνευσης του IAA κυμαίνεται απο 2 έως 50 mg/ L.

Το χρώμα είναι σταθερό στο σκοτάδι, αλλά σε διάχυτο φως η ένταση του χρώματος είναι μικρότερη ενώ στον ήλιο ξεθωριάζει γρήγορα. Σε αναγωγικές ουσίες όπωςθειώδες νάτριο και ασκορβικό οξύ το χρώμα καταστρέφεται. Ακόμη η τανίνη διαταράσσει την αντίδραση χρώματος.

Οι αλκοόλες αυξάνουν την ένταση του χρώματος. Το φαινόμενο αυτό αυξάνει με την εξής σειρά :  
μεθανόλη<αιθανόλη<ισοπροπανόλη<ισοβουτανόλη

Γι' αυτό συνίσταται η προσθήκη 1 ml ισοβουτανόλης στο δείγμα εκτός απο το αντιδραστήριο, ιδιαίτερα εάν πρόκειται να προσδιοριστούν μικρής ποσότητας αυξίνες.

Για την ανίχνευση IAA δύο είναι οι εκδοχές του αντιδραστηρίου Salkowski που χρησιμοποιούνται : το Tang & Bonner και Gordon & Weber. Και τα δύο αντιδραστήρια περιέχουν τρισθενή σίδηρο.

Η διαφορά μεταξύ των δύο αντιδραστηρίων είναι στο οξύ που προσθέτουμε κάθε φορά το οποίο χρειάζεται για να γίνει η αντίδραση. Για το Tang & Bonner χρησιμοποιείταιθειικό οξύ ( $H_2SO_4$ ), ενώ για το Gordon Weber υπερχλωρικό οξύ ( $HClO_4^-$ ).

Παρακάτω παρατίθενται οι ποσότητες σε ml και οι συγκεντρώσεις των δύο αντιδραστηρίων.

Όσον αφορά τη συγκέντρωση του ίνδολο-3-οξικού οξέος, μπορεί να ανιχνευθεί σε συγκεντρώσεις απο 2 έως 50 mg/L.

#### Αντιδραστήριο Tang & Bonner

1 ml 0,5 M  $FeCl_3$   
30 ml  $H_2SO_4$  (Sp.gr. 1.84)  
50 ml  $H_2O$  απεσταγμένο

#### Αντιδραστήριο Gordon Weber

1 ml 0,5 M  $FeCl_3$   
50 ml 35%  $HClO_4^-$

Σε 4 ml αντιδραστηρίου Tang- Bonner προσθέτουμε 1 ml ίνδολο-3-οξικού οξέος και διαβάζουμε την τιμή απορρόφησης του φωτόμετρου στα 15', στα 530 nm, Εναλλακτικά προσθέτουμε ίδια ποσότητα ίνδολο-3-οξικού οξέος και 1,5 ml αντιδραστηρίου και διαβάζουμε την τιμή απορρόφησης στα 75' στα 525 nm.

Σε 2 ml αντιδραστηρίου Gordon-Weber προσθέτουμε 1 ml ίνδολο-3-οξικού οξέος και διαβάζουμε την τιμή απορρόφησης στα 25' στα 530 nm.



Ernst Leopold Salkowski  
(1844-1923)

### 3.2 Άλλα αντιδραστήρια ανίχνευσης

Εκτός απο το αντιδραστήριο Salkowski, οι Gordon & Weber μελέτησαν διαλύματα υπερχλωρικού οξέος με άλλα μέταλλα , όπως κοβαλτίου και υδραργύρου. Ακόμη μελέτησαν την αντίδραση νιτρώδους άλατος με το ίνδολο-3-οξικό οξύ.

Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι καλύτερα αποτελέσματα δίνει η αντίδραση Salkowski με το υπερχλωρικό οξύ, όπως φαίνεται και απο το σχ.3.

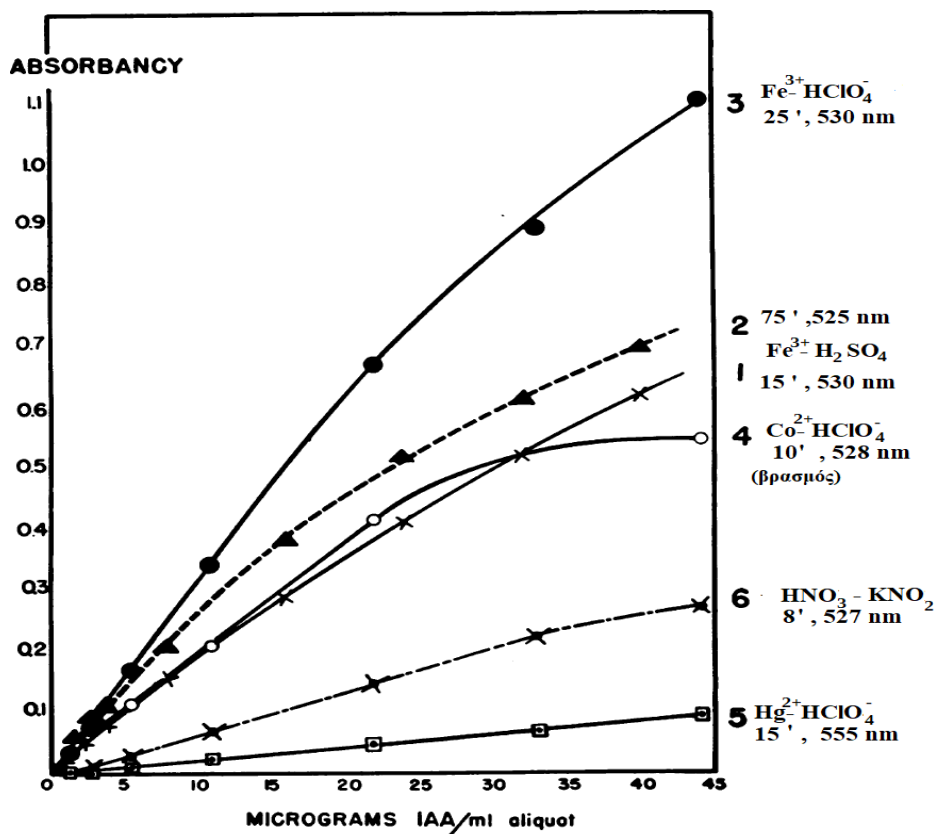
Παρακάτω παρατίθενται τα συστατικά και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων αυτών :

Αντιδραστήριο Κοβαλτίου	Αντιδραστήριο Υδραργύρου	Αντιδραστήριο Νιτρώδους άλατος
1 ml 0,5 M $\text{Co}_2\text{F}_6 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 50 ml 35 % $\text{HClO}_4^-$	1 ml 0,5 M $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 50 ml 35% $\text{HClO}_4^-$	0,05 ml 2,5 % αραβικό κόμμι 0,025 ml 0,5 % $\text{KNO}_2$ 0,04 ml $\text{HNO}_3$ conc.

Για το αντιδραστήριο κοβαλτίου, προσθέτουμε 1 ml ίνδολο-3-οξικού οξέος και 2 ml αντιδραστηρίου. Ακολουθεί βρασμός για 10 ' και ψύξη. Διαβάζουμε τη τιμή απορρόφησης στα 528 nm.

Για το αντιδραστήριο υδραργύρου, προσθέτουμε 1 ml ίνδολο-3-οξικού οξέος και 2 ml αντιδραστηρίου. Διαβάζουμε τη τιμή απορρόφησης στα 15 ' στα 555 nm.

Για το αντιδραστήριο νιτρώδους , σε 5 ml ίνδολο-3-οξικού οξέος προσθέτουμε ξεχωριστά τα συστατικά του αντιδραστηρίου με τελευταίο το νιτρικό οξύ. Διαβάζουμε τη τιμή απορρόφησης στα 8' στα 527 nm.



Σχήμα 3 : Καμπύλες απορρόφησης του IAA για κάθε αντιδραστήριο

Απο : Gordon-Weber , Colorimetric Estimation of Indole Acetic Acid

Όπως φαίνεται στο σχήμα 3, μεγαλύτερες απορροφήσεις για το ίνδολο-3-οξικό οξύ, δίνει ο τρισθενής σίδηρος, με υπερχλωρικό οξύ (3) . Ακολουθεί ο τρισθενής σίδηρος με το θειικό οξύ (1), (2), και τέλος το διάλυμα κοβαλτίου με υπερχλωρικό οξύ (4).

Το δ/μα υδραργύρου υπερχλωρικού οξέος (5) και η αντίδραση με το νιτρικό οξύ (6) χωρίς τη προσθήκη μετάλλου δίνουν αμελητέες σχεδόν απορροφήσεις.

Οι καμπύλες στο γράφημα του σχήματος 3 είναι 6 ενώ τα αντιδραστήρια 5, διότι οι καμπύλες (1) και (2) αναφέρονται στο δ/μα σιδήρου με θειικό οξύ, με διαφορετική ποσότητα του οξέος κάθε φορά. Προσθέτοντας αντιδραστήριο Tang& Bonner όγκου 4 ml εμφανίζονται ελαφρώς μικρότερες απορροφήσεις δηλ της καμπύλης 2, εν σχέσει με τη καμπύλη 1, όπου χρησιμοποιήθηκε το ίδιο αντιδραστήριο όγκου 1 ml.

Συνεπώς απο το σχήμα 3 συμπεραίνουμε ότι το πιο εκλεκτικό αντιδραστήριο για το ίνδολο-3-οξικό οξύ είναι το Gordon-Weber, δηλ διάλυμα τρισθενούς σιδήρου και υπερχλωρικού οξέος. Αυτό είναι και το αντιδραστήριο που θα μελετηθεί στη παρούσα εργασία.

Τόσο το διάγραμμα του σχήματος 3, όσο και τα συστατικά των αντιδραστηρίων ανίχνευσης λήφθηκαν από το άρθρο Colorimetric estimation of indole acetic acid, Solon A.Gordon and Robert P.Weber Plant Physiol. 1951 Jan; 26 (1) : 192-195. Πηγή (4)

### 3.3 Προϊόντα της αντίδρασης Salkowski με το IAA

#### 3.3.1 Ηλεκτρονιακή δομή του ιόντος του τρισθενούς σιδήρου

Ένα σύμπλοκο ιόν ή μια σύμπλοκη ένωση αποτελείται από ένα κεντρικό μεταλλοϊόν ή ουδέτερο άτομο μετάλλου, το οποίο ανήκει κατά κανόνα στα μεταβατικά στοιχεία, δηλ τα στοιχεία μετάπτωσης του τομέα d του περιοδικού πίνακα. Τα ιόντα των μεταβατικών στοιχείων έχουν μεγάλη πυκνότητα φορτίου και κενά d-ατομικά τροχιακά, με συνέπεια το κεντρικό μεταλλοϊόν των διάφορων σύμπλοκων ιόντων να ανήκει κατά κανόνα στα στοιχεία αυτά. Τα μεταβατικά στοιχεία χρησιμοποιούν για τη δημιουργία δεσμού d-ατομικά τροχιακά, τα οποία ανήκουν στην (n-1) ηλεκτρονική στιβάδα και αυτό γιατί η ενέργεια των (n-1)d τροχιακών διαφέρει ελάχιστα από τις ενέργειες των ns και np τροχιακών.



Σχήμα 4 : Ηλεκτρονιακή δομή του τρισθενούς σιδήρου

Στον τρισθενή σίδηρο απουσιάζουν 3 ηλεκτρόνια. όπως φαίνεται από το σχήμα 4 όπου απεικονίζονται οι ηλεκτρονιακές δομές του ηλεκτρικά ουδέτερου σιδήρου και του τρισθενούς σιδήρου. Για το σχηματισμό δεσμών με άλλα μόρια, δεν χρησιμοποιείται η στιβάδα 3d , αλλά οι κενές στιβάδες 4s, 4p,4d.

Το κεντρικό μεταλλοϊόν συναρμόζεται με καθορισμένο αριθμό άλλων ιόντων ή ουδέτερων μορίων που ονομάζονται συμπλεκτικά μέσα (complexing agents) ή ligands. Τα ligands αποτελούν δότες ηλεκτρονίων.

Η διευθέτηση των ligands γύρω από το κεντρικό μεταλλοϊόν είναι συμμετρική .

Το σύνολο των ligands που προσδένονται στο κεντρικό μεταλλοϊόν ονομάζεται αριθμός συναρμογής (coordination number). Ο αριθμός συναρμογής συνήθως είναι από 2 έως 9.

Ο μέγιστος αριθμός συναρμογής για ένα συγκεκριμένο μέταλλο εξαρτάται από την ηλεκτρονιακή δομή του ιόντος του, και πιο συγκεκριμένα από τον αριθμό των κενών τροχιακών.

Ακόμη ο αριθμός συναρμογής εξαρτάται από την αναλογία και το μέγεθος των ligands και του μεταλλικού ιόντος.

Οι παραπάνω πληροφορίες προέρχονται από το σύγγραμμα Ανόργανης Χημείας της **Πηγής (11)**.

### 3.3.2 Τα σύμπλοκα $Fe^{3+}$ - IAA

Τα προϊόντα του ίνδολο-3-οξικού οξέος με τρισθενή σίδηρο, είναι σύμπλοκα σύμφωνα με τους Kovacs et al, Kamnev et al. Οι Kovacs et al, με φασματοσκοπία Moessbauer με ραδιενεργό σίδηρο  $^{57}Fe$  προσδιόρισαν το ποσό του τρισθενούς και δισθενούς σιδήρου, σε διαλύματα ακετόνης pH 2-3 τρισθενούς σιδήρου με ίνδολο-αλκανοϊκά οξέα. Πιο συγκεκριμένα πήραν φάσματα των ινδολοξέων IAA (ίνδολο-3-οξικό), ICA (ίνδολο-3-καρβοξυλικό) , IPA (ίνδολο-3-πυροσταφυλικό), IBA (ίνδολο-3-βουτυρικό) με τρισθενή σίδηρο, στα 15 λεπτά και μετά από 2 ημέρες.

Ήδη στα 15 λεπτά ανιχνεύθηκαν κάποιες ποσότητες δισθενούς σιδήρου.

Μετά από 2 ημέρες για το IAA ανιχνεύθηκε μόνο δισθενής σίδηρος, ενώ για τα υπόλοιπα ινδολοξέα ανιχνεύθηκαν ίχνη τρισθενούς σιδήρου.

Επομένως αυτά τα ινδολοξέα ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο ( $Fe^{3+}$ ) σε δισθενή ( $Fe^{2+}$ ).

Ακόμη οι ερευνητές προσδιόρισαν τη διάταξη τρισθενούς σιδήρου με IAA μέσω της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X σε διάλυμα μεθανόλης. και βρήκαν ότι έχει μορφή συμπλόκου με τύπο  $L_2 M < (OH)_2 > M L_2$ , **Πηγή (10)**

Πιο συγκεκριμένα δύο αποπρωτονιομένα ίνδολο-3-οξικά οξέα, αντιστοιχούν για κάθε ένα άτομο τρισθενούς σιδήρου.

Το σύμπλοκο εμφανίζει οκταεδρική συμμετρία.

Για κάθε άτομο σιδήρου αντιστοιχούν 6 άτομα οξυγόνου.

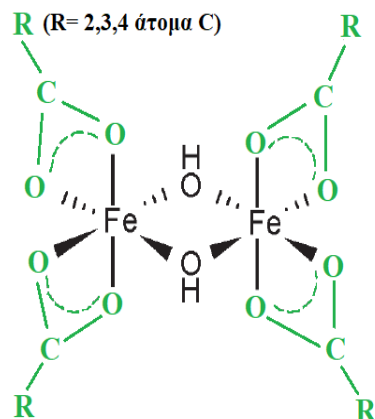
Μια διυδρόξυ-γέφυρα ενώνει τα δύο άτομα σιδήρου.

Η διάταξη του συμπλόκου κατά τους Kovacs et al παρατίθεται στο διπλανό χημικό τύπο.

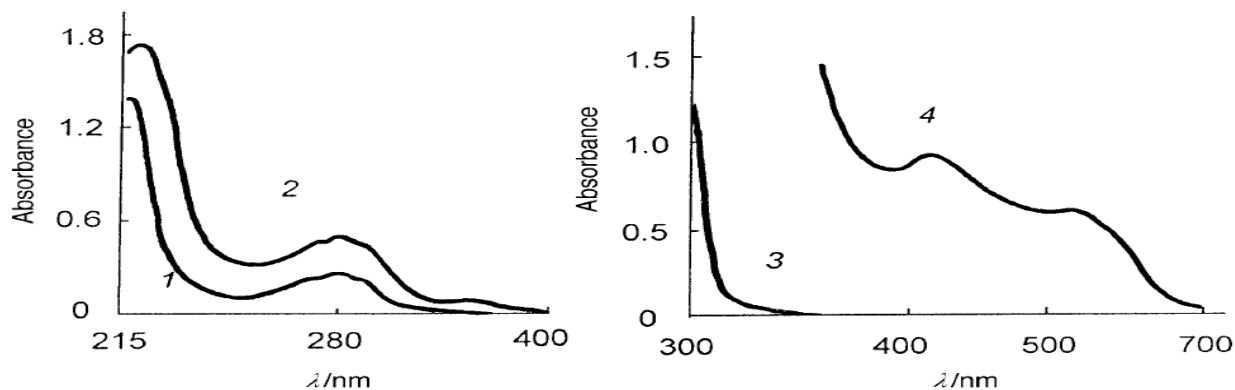
όπου L : το ligand , M : τρισθενές άτομο σιδήρου

Το ligand είναι ίνδολο-3-οξικό οξύ (IAA) ή ίνδολο-3-προπιονικό οξύ (IPA) ή ίνδολο-3-βουτυρικό οξύ (IBA).

Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι κάτω υπό διαφορετικές όξινες συνθήκες με νιτρικό οξύ, σύμφωνα με τους Kamnev, Shchelochkov, Tarantilis, Polissiou και Perfiliev, **Πηγή (9)** σχηματίζεται μονομερές σύμπλοκο τύπου  $L_3M$ . Το tris-(indole-3acetato) iron (III), με μοριακό τύπο  $FeC_{30}H_{24}N_3O_6$ , και πιθανό συντακτικό τύπο  $Fe[(C_8H_6N)CH_2COO]_3$  σχηματίστηκε σε pH 4,5 με τρισθενή σίδηρο διαλυμένο σε 50 %  $HNO_3$ .



**Σύμπλοκο  $Fe^{3+}$  Ίνδολο-3-οξέων**  
 $L_2Fe <(OH)_2>FeL_2$  (Κατά Kovacs et al)



**Σχήμα 5 :** Φάσματα UV, του ίνδολο-3οξικού οξέος (1,3) και της σύμπλοκης ένωσης tris-indole-acetato iron (2,4) , κατά τους A.A. Kamnev et al στη περιοχή 215-400 nm και συγκέντρωση  $2 \cdot 10^{-5}$  M . Οι ίδιες ενώσεις στη περιοχή 300-700 nm και συγκέντρωση  $10^{-3}$  M. Πηγή (9)

Παρατηρούμε μια υπερχρωμική μετατόπιση του συμπλόκου, εν σχέσει με το ίνδολο-3-οξικό οξύ, και μια νέα ζώνη στα 337 nm σε συγκέντρωση  $2 \cdot 10^{-5}$  M.

Στη περιοχή 300-700 nm και σε συγκέντρωση  $10^{-3}$  M, παρατηρούμε δύο ζώνες απορρόφησης στα 410 nm και 516 nm, που οφείλονται και αυτές στο κατιόν του τρισθενούς ατόμου σιδήρου.

Εδώ να σημειωθεί ότι και στη παρούσα μελέτη οι τιμές απορρόφησης για το σύμπλοκο ήταν παρόμοιες στα 337 nm και 530 nm, (βλ φάσματα 14,15,16,17).

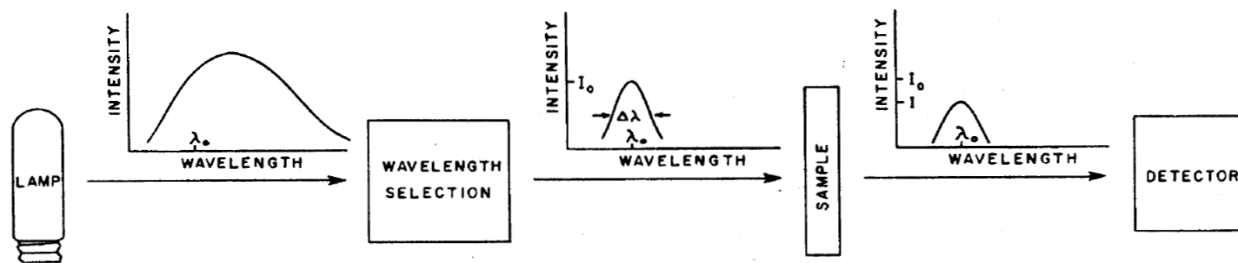
## 4. Φασματοσκοπία UV

### 4.1. Εισαγωγικά

Μετρήσεις που βασίζονται στην απορρόφηση της ορατής και υπεριώδους ακτινοβολίας χρησιμοποιούνται ευρύτατα για τον προσδιορισμό δεκάδων χιλιάδων ανόργανων και οργανικών ενώσεων.

Οι μέθοδοι απορρόφησης στο ορατό και το υπεριώδες είναι οι πιο ευκολόχρηστες και οι πλέον διαδεδομένες από όλες τις άλλες τεχνικές χημικής ανάλυσης, σε όλους τους τομείς της αναλυτικής χημείας.

### 4.2 Αρχή λειτουργίας



**Σχήμα 6 :** Διάταξη φασματοσκοπίας UV Πηγή : (1)

Για τη λήψη ενός φάσματος χρησιμοποιούνται αραιά διαλύματα της ουσίας ( $=10^{-5}$  mol/l) με κατάλληλους διαλύτες (ύδωρ, μεθανόλη, εξάνιο κλπ.). Τα διαλύματα περιέχονται σε δοχεία χαλαζία (κυψελίδες) και είναι διαφανή στο υπεριώδες φως. Η μορφή των φασμάτων όπως καταγράφονται από το φασματοφωτόμετρο είναι μεταβολή της απορρόφησης A (Absorbance) συναρτήσει του μήκους κύματος ( $\lambda$ ).

Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο σχ. 6, ακτινοβολία από τη λάμπα UV, πέφτει στο δείγμα μας και από εκεί στον ανιχνευτή, αφού προηγουμένως επιλέξουμε μήκος κύματος. Συχνά τα φάσματα αποδίδονται και σαν μεταβολές του μοριακού συντελεστή απόσβεσης  $\epsilon$  συναρτήσει του μήκους κύματος.

Η απορρόφηση A συνδέεται με τον μοριακό συντελεστή απορρόφησης σύμφωνα με την εξίσωση Beer-Lambert, που ισχύει στις περιοχές των  $\lambda_{max}$ :

$$\log(I_p / I_0) = A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

- όπου :  $I_p$  προσπίπτουσα ακτινοβολία
- $I_0$  διερχόμενη ακτινοβολία
- d πάχος κυψελίδας
- c συγκέντρωση (mol/l)
- A απορρόφηση ή οπτική πυκνότητα
- $\epsilon$  συντελεστής μοριακής απορρόφησης (molar extinction coefficient)

Αντί της γραφικής παραστάσεως ενός φάσματος, πολλές φορές αναφέρονται μόνο οι τιμές  $\lambda_{max}$  και σε παρένθεση οι τιμές  $\epsilon_{max}$ . Μεγάλη εφαρμογή βρίσκουν τα φάσματα UV σε κινητικές μελέτες αντιδράσεων. Ακόμη χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό της σταθεράς διάστασης οξέων και βάσεων.

Τέλος χρησιμοποιούνται και σε αναλυτικούς προσδιορισμούς όπως μελέτες σχηματισμού ασταθών ενδιάμεσων προϊόντων π.χ. στα σύμπλοκα. Στους αναλυτικούς προσδιορισμούς δεν ενδιαφέρει ολόκληρο το φάσμα όπως στις κινητικές μελέτες αντιδράσεων, αλλά μόνο η μεταβολή της οπτικής πυκνότητας στο  $\lambda_{max}$  που είναι γνωστό.

Για τους αναλυτικούς προσδιορισμούς συνήθως χρησιμοποιούνται φωτόμετρα (φασματοφωτόμετρα ανάγνωσης για την ορατή περιοχή) και από την οπτική πυκνότητα υπολογίζεται η συγκέντρωση.

### 4.3 Φαινόμενα μετατόπισης και ζώνες απορρόφησης στο UV

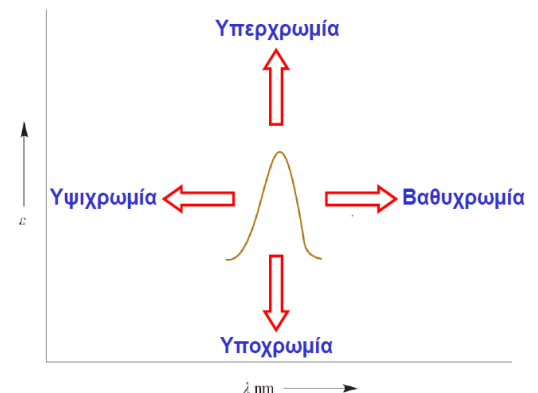
Γενικά στη φασματοσκοπία UV παρατηρούνται τα εξής φαινόμενα όπως φαίνεται από το σχ.7 :

Βαθυχρωμία : μετατόπιση προς υψηλότερα μήκη κύματος

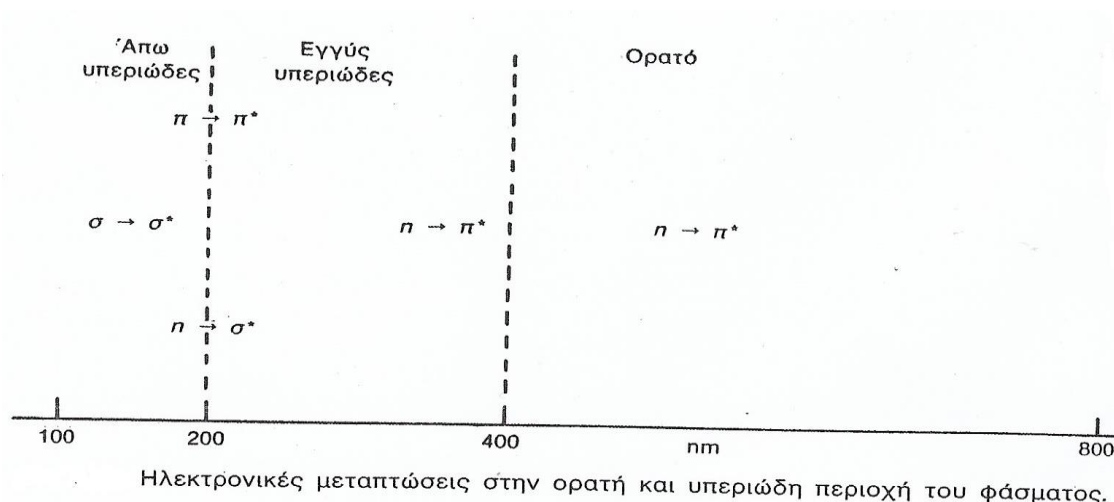
Υψιχρωμία : μετατόπιση προς μικρότερα κύματος

Υπερχρωμία : αύξηση της έντασης απορρόφησης

Υποχρωμία : μείωση της έντασης απορρόφησης



Σχήμα 7 : Φαινόμενα μετατόπισης απορρόφησης και μήκους κύματος στο UV



**Σχήμα 8 : Ζώνες απορρόφησης των χημικών ενώσεων στο UV Πηγή (3)**

Όπως φαίνεται στο σχήμα 8, οι χημικές ενώσεις απορροφούν σε συγκεκριμένη περιοχή του UV ανάλογα με το είδος των δεσμικών και αντιδεσμικών ηλεκτρονίων τους. Τα αντιδεσμικά ηλεκτρόνια συμβολίζονται με \*.

Για τη πλειονότητα των οργανικών μορίων τα ηλεκτρόνια κατατάσσονται σε 3 κατηγορίες :

Τα σ -ηλεκτρόνια, τα π - ηλεκτρόνια και τα n- ηλεκτρόνια ή μη δεσμικά (non bonding). Η ποσότητα ενέργειας που απαιτείται για τη διέγερση των ηλεκτρονίων ανταποκρίνεται στην εμφάνιση απορροφήσεων στη περιοχή UV και Vis. Ανάλογα με τη ποσότητα της ενέργειας που απαιτείται για κάθε ηλεκτρονιακή μετάπτωση, αυτή εμφανίζεται σε μια ορισμένη περιοχή του φάσματος.

- Έτσι η μετάβαση  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  η οποία απαιτεί και τη περισσότερη ενέργεια, πέφτει στη περιοχή της **άπω υπεριώδους** ακτινοβολίας (far-UV).

Οι μεταβάσεις  $\pi \rightarrow \pi^*$  και  $n \rightarrow \sigma^*$  εμφανίζονται στη **διαχωριστική γραμμή της άπω υπεριώδους ακτινοβολίας** (far UV) και κυρίως ακτινοβολίας (UV).

- Η μετάβαση  $n \rightarrow \pi^*$  εμφανίζεται στην ορατή (Vis) περιοχή (400-880 nm). Κάθε ένωση που απορροφά στην **ορατή περιοχή** (400-800 nm) εμφανίζεται έγχρωμη.

Οι απλές χρωμοφόρες ομάδες με διπλούς και τριπλούς δεσμούς απορροφούν σε μικρά μήκη κύματος UV ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ).

Αυξόχρωμες χρωμοφόρες ομάδες όπως OH, NH<sub>2</sub>, Cl με μη δεσμικά e- απορροφούν σε μεγαλύτερα μήκη κύματος άνω των 190 nm, όταν προσδεθούν σε χρωμοφόρα ομάδα.

Χρωμοφόρα ομάδα είναι οποιαδήποτε ένωση η οποία απορροφά περισσότερο στο UV από απλές χρωμοφόρες ομάδες, π.χ το βενζόλιο, το ινδόλιο κλπ.

**Τα φάσματα UV δεν χαρακτηρίζουν συνολικά το μόριο αλλά δίνουν πληροφορίες για ορισμένες ομάδες (χρωμοφόρες) που απορροφούν ακτινοβολία.**



#### 4.4 Επιλογή κατάλληλου διαλύτη για τη λήψη φάσματος

**Ο Διαλύτης :** Για την επιλογή του διαλύτη πρέπει να ληφθεί υπόψη η διαπερατότητα του και φυσικά να μην απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην ίδια περιοχή με το φάσμα της ουσίας που θέλουμε να μελετήσουμε. Για τους περισσότερους οργανικούς διαλύτες υπάρχει στη βιβλιογραφία μια ορισμένη τιμή αποκοπής UV cutoff. Κάτω από αυτή τη τιμή ο οργανικός διαλύτης δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί διότι απορροφά πολύ ισχυρά.

Επιπλέον οι θέσεις των μέγιστων απορρόφησης ( $\lambda_{max}$ ) μιας ουσίας επηρεάζονται από τη φύση του διαλύτη (πολικός, άπολος, μέτρια πολικός)

Κατά συνέπεια θα πρέπει να χρησιμοποιείται ο ίδιος διαλύτης, όταν συγκρίνονται φάσματα με σκοπό τη ταυτοποίηση ενώσεων. Οι συνηθέστεροι διαλύτες για τη φασματοσκοπία υπεριώδους- ορατού παρατίθενται στον πίνακα 1.

Για την ορατή περιοχή, κάθε μη έγχρωμος διαλύτης είναι κατάλληλος.

#### ΠΙΝΑΚΑΣ 1

ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ Κ' ΤΙΜΕΣ UV CUTOFF ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΣΥΝΗΘΕΣΤΕΡΟΥΣ ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΣΤΟ UV

ΔΙΑΛΥΤΗΣ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ (UV cutoff) (nm)	ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ (relative polarity)
Ύδωρ	190	9
Ακετονιτρίλιο	190	5,8
Αιθανόλη	210	5,2
Ακετόνη	330	5,1
Μεθανόλη	205	5,1
1,4- Διοξάνιο	220	4,8
Διχλωρομεθάνιο	235	3,1
Διαθυλαιθέρας	210	2,8
Κυκλοεξάνιο	210	0,2

#### 4.5 Φάσματα ΙΑΑ και ινδόλιου

##### 4.5.1 Ζώνες απορρόφησης στο UV

Οι αυξίνες, είναι ίνδολο-3-αλκανοϊκά οξέα και αποτελούν ουσιαστικά υποκατεστημένες με καρβοξυλομάδα ινδόλες στη θέση 3. Γι' αυτό και το υπεριώδες φάσμα τους έχει παρόμοιες ζώνες απορρόφησης με το μόριο του ινδόλιου. Πιο συγκεκριμένα στη περιοχή του κυρίως υπεριώδους για το ινδόλιο, το οποίο έχει 10 π ηλεκτρόνια, τα μέγιστα απορρόφησης είναι τα 270 nm ( μέγιστο La) και τα 286 nm (μέγιστο Lb) στη περιοχή του υπεριώδους. Ακόμη υπάρχουν τα μέγιστα απορρόφησης στα 216 nm (μέγιστο Bb) και 196 nm (μέγιστο Ba) στη περιοχή του άπω υπεριώδους. Οι παραπάνω τιμές ισχύουν για διάλυμα αιθανόλης-νερού 1% v/v.

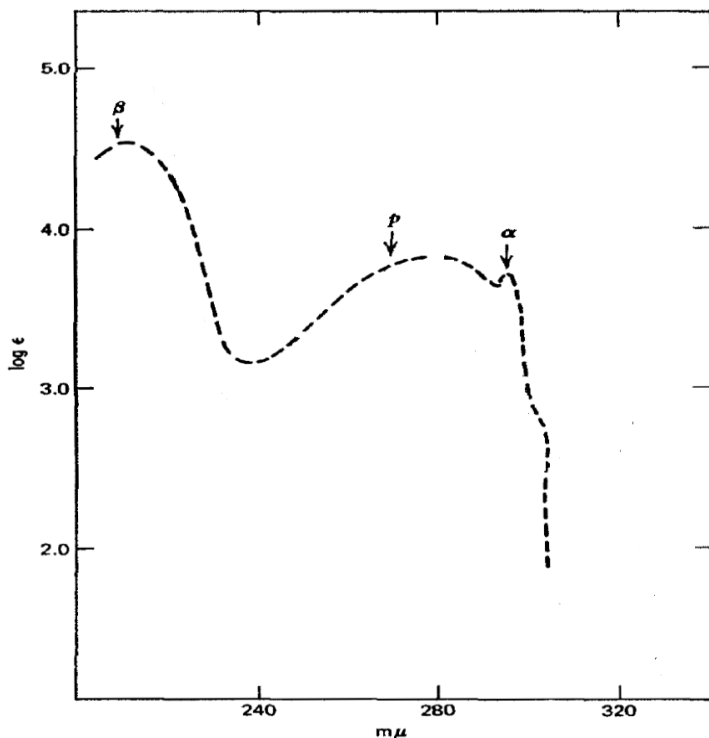
Σε καθαρή αιθανόλη 95 % δεν παρατηρείται η ζώνη απορρόφησης Ba όπως φαίνεται από το σχήμα 9. Αυτό εξηγείται διότι η αιθανόλη έχει μεγαλύτερη τιμή UV cutoff (210 nm) από ότι το νερό UV cutoff (190 nm). Οι απορροφήσεις αυτές οφείλονται σε ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις όταν στο διάλυμα ινδόλιου προσπίπτει υπεριώδης ακτινοβολία. Το ηλεκτρόνιο με απορρόφηση ακτινοβολίας μεταπίπτει από χαμηλότερη σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη, δίνοντας μια ζώνη απορρόφησης στο UV. Στο σχήμα 10 παρατίθεται το ενεργειακό διάγραμμα ζωνών για το ινδόλιο.

Το ενεργειακό διάγραμμα του ινδόλιου έχει 4 ζώνες απορρόφησης  $\alpha$ ,  $\rho$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ .

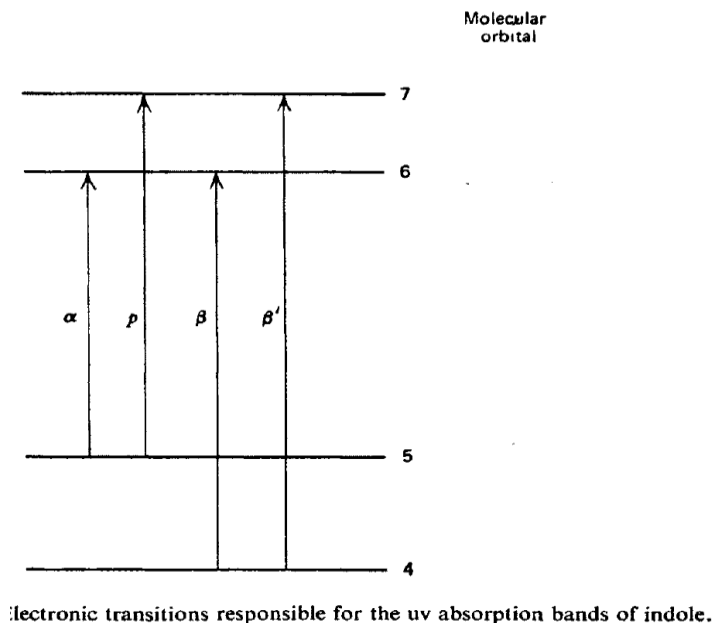
Οι τιμές τους είναι 288 nm για την  $\alpha$  (ζώνη Lb), 262 nm για την  $\rho$  (ζώνη La), 220 nm για την  $\beta$  (ζώνη Bb) και η  $\beta'$  της οποίας η τιμή δεν έχει υπολογιστεί στην vacuum UV region. Οι τιμές αυτές έχουν υπολογισθεί μέσω προγράμματος με θεωρητικούς κβαντομηχανικούς υπολογισμούς μέσω της μεθόδου Hartree-Fock.

Στη μέθοδο αυτή γίνεται η παραδοχή ότι υπό μελέτη ουσία δεν αλληλεπιδρά με άλλες ουσίες.

Στη πράξη στο εργαστήριο οι τιμές αυτές εμφανίζουν κάποια απόκλιση ανάλογα με τον διαλύτη που χρησιμοποιείται.



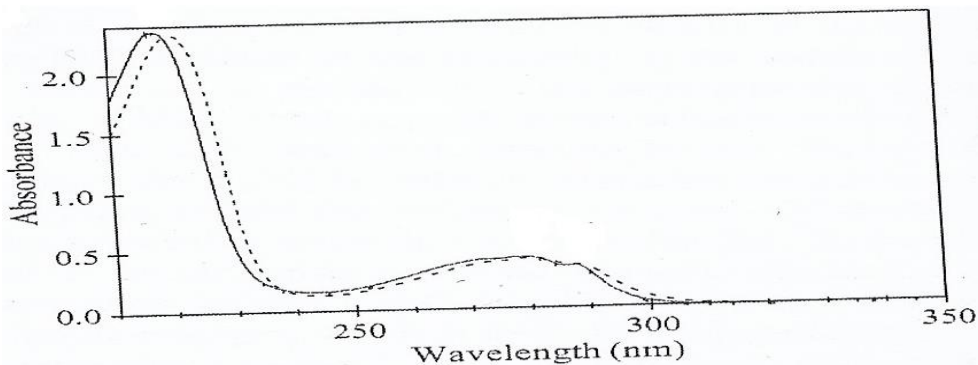
**Σχήμα 9** : φάσμα του ινδόλιου σε 95 % αιθανόλη και ζώνες απορρόφησης



**Σχήμα 10** : ενεργειακό διάγραμμα ζωνών UV απορρόφησης (τροχιακών) για το ινδόλιο

Τα παραπάνω διαγράμματα προέρχονται από το βιβλίο Chemistry of heterocyclic compounds, Indoles Wiley, Edited by William J.Houlihan. Part one p.20,25 **Πηγή (18)**

Αντίθετα με το ινδόλιο το οποίο είναι διαλυτό στο νερό (3560 mg/ml), το ίνδολο-3-οξικό οξύ είναι πρακτικά αδιάλυτο στο νερό (>26,3 ug/ml). Συγκρίνοντας τα σχήματα 9 και 11 δεν παρατηρούμε σημαντικές διαφορές στα φάσματα των δύο ενώσεων.



**Σχήμα 11** : Φάσμα UV του ίνδολο-3-οξικού οξέος σε 95% αιθανόλη με συγκέντρωση  $c = 7,535 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , σε  $\text{pH}=2$ , πρωτονιομένη μορφή (συνεχής γραμμή) και  $\text{pH} = 7$  αποπρωτονιομένη μορφή (διακεκομμένη γραμμή). **Πηγή (5)**

Πιο συγκεκριμένα σύμφωνα με το σχ 11, τα μέγιστα απορρόφησης που αναφέρονται στο UV για το ίνδολο-3-οξικό οξύ για τη πρωτονιομένη του μορφή σε  $\text{pH}=2$ , στη περιοχή 250-320 nm είναι τα : 272,3 nm (ζώνη La), η περιοχή “ώμου” στα 287,3 (ζώνη Lb) καθώς και ένα μέγιστο στα 278,7 nm. Ακόμη στην χαμηλότερη περιοχή του υπεριώδους παρατηρείται μια μεγάλη κορυφή στα 218,1 nm (ζώνη Bb).

Η περιοχή 250-320 nm θεωρείται το δακτυλικό αποτύπωμα (fingerprint) του ίνδολο-3-οξικού οξέος στο UV.

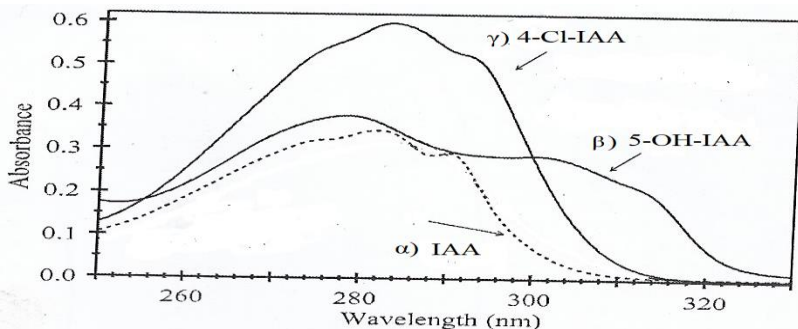
Στην μη πρωτονιομένη τους μορφή σε  $\text{pH}=7$  τα μέγιστα απορρόφησης είναι μετατοπισμένα προς τα δεξιά, εν σχέσει με τα μέγιστα απορρόφησης σε πρωτονιομένη μορφή δηλ σε  $\text{pH} < 7$ .

Τα φάσματα των σχημάτων 9,11 προέρχονται από τη βιβλιογραφία και έχουν ληφθεί σε αιθανόλη 95% .

Στη παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε και η ζώνη απορρόφησης  $\text{Ba} = 193 \text{ nm}$  του ίνδολο-3-οξικού οξέος σε όξινες συνθήκες (HCl 0,1 M) με διαλύτη το ακετονιτρίλιο (βλ. Φάσμα 9). Το ακετονιτρίλιο έχει UV cutoff 190 nm.

#### 4.5.2 Φαινόμενα μετατόπισης για υποκατεστήμενο IAA

Σύμφωνα με τους Caric et al, υποκατάσταση με Cl στη θέση 4 προκαλεί μετατόπιση προς τα πάνω (υπερχρωμία). Μέσω UV λοιπόν μπορούμε εύκολα να ξεχωρίσουμε τις χλωριώμενες αυξίνες που απαντώνται στη φύση. Υποκατάσταση με υδροξυλομάδα στη θέση 5, προκαλεί βαθυχρωμία.



**Σχήμα 12** : Περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος σε 95% αιθανόλη για :

α) Ινδολο-3-οξικό οξύ ,  $c = 6.032 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , β) 5-υδροξυλο-ίνδολο-3-οξικού οξέος  $c = 7.027 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$   
 γ) 4-χλώρο-ίνδολο-3-οξικού οξέος,  $c = 1.003 \cdot 10^{-4} \text{ ml dm}^{-3}$  , **Πηγή (5)**

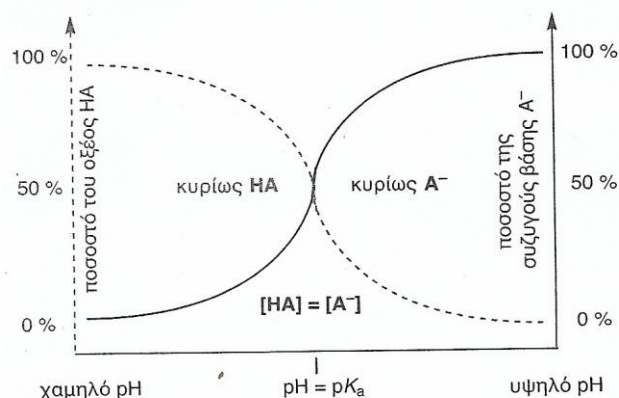
## 5. προσδιορισμός της φυσικοχημικής παραμέτρου pka σε υδατικό δ/μα μεθανόλης

### 5.1. Εισαγωγικά

Η σταθερά διάστασης ή σταθερά ιοντισμού μιας ουσίας, είναι μια θεμελιώδης φυσικοχημική παράμετρος.

**Μας επιτρέπει να προβλέψουμε τη συμπεριφορά μιας ουσίας σε ένα διαλύτη και πιο συγκεκριμένα το βαθμό ιοντισμού.**

Πιο συγκεκριμένα για ένα ασθενές οξύ HA διαλυμένο σε νερό όπως το ίνδολο-3-οξικό οξύ έχουμε :



$$k_a = \frac{[\text{A}^-] * [\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{HA}]}$$

Σχήμα 13 : Ιοντισμός ασθενούς οξέος Πηγή (12)

όπου  $k_a$  σταθερά ιοντισμού

ο λόγος  $r_A$  των δύο μορφών του οξέος, ιοντισμένη και μη ιοντισμένης γράφεται ως :

$$r_A = \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = \frac{k_a}{[\text{H}_3\text{O}^+]}$$

$$\text{ή } \log r_A = -\log k_a + \text{pH} = \text{pH} - \text{p}k_a,$$

Όταν  $[\text{A}^-] = [\text{HA}]$  τότε  $r_A = 1$ ,  $\text{pH} = \text{p}k_a$ , άρα  $1 = \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$  συνεπώς  $[\text{A}^-] = [\text{HA}]$ , δηλαδή έχει ιονισθεί το 50% του ασθενούς οξέος.

Όταν το pH αυξηθεί του  $pka$  κατά δύο μονάδες, δηλ  $\text{pH} = \text{p}k_a + 2$  τότε

$$\log r_A = \text{p}k_a + 2 - \text{p}k_a = 2, \log(100) = 2$$

$$\text{άρα } r_A = 100, \text{ άρα } 100 = \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \text{ συνεπώς } 100 [\text{A}^-] = [\text{HA}]$$

δηλαδή έχει ιονισθεί το 100% του ασθενούς οξέος.

Όταν το pH μειωθεί του  $pka$  κατά δύο μονάδες, δηλ  $\text{pH} = \text{p}k_a - 2$  τότε

$$\log r_A = \text{p}k_a - 2 - \text{p}k_a = -2, \log(0,01) = -2$$

$$\text{άρα } r_A = 0,01, \text{ άρα } 0,01 = \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \text{ συνεπώς } [\text{A}^-] = 0,01 [\text{HA}]$$

δηλαδή έχει ιονισθεί το 1% του ασθενούς οξέος.

Τα παραπάνω φαίνονται και στο σχήμα 13.

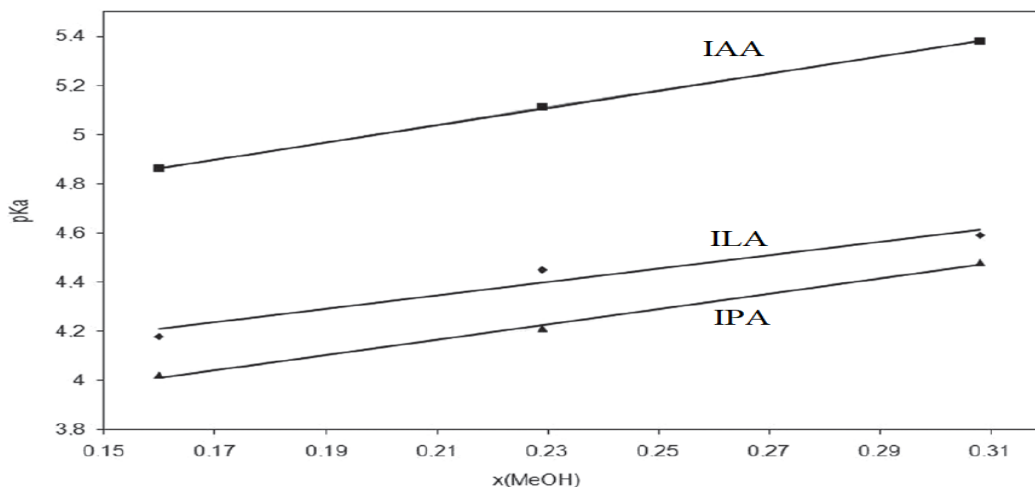
### 5.2 pka ίνδολο-3-οξικού οξέος

Στη παρούσα μελέτη θα προσδιοριστεί η σταθερά ιοντισμού, της φυτικής ορμόνης ίνδολο-3-οξικό οξύ, σε αραιά υδατικά διαλύματα μεθανόλης 30% και 15%. Η σταθερά ιοντισμού του ίνδολο-3-οξικού οξέος είναι γνωστή μόνο για οργανικούς διαλύτες. Στο νερό η ουσία αυτή είναι σχεδόν αδιάλυτη,

**Σύμφωνα με το Merck Index “ An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals” το ίνδολο-3-οξικό οξύ έχει  $pka = 4,75$  διαλύεται ελάχιστα σε νερό ή γλωροφόρμιο.**

**Είναι ελεύθερα διαλυτό σε ακετόνη, αλκοολικά διαλύματα, αιθέρα”.**

Οι Kelen και Sanli μελέτησαν τη μεταβολή του  $pK_a$  του ίνδολο-3-οξικού (IAA), ίνδολο-3-γαλακτικού (ILA), και ίνδολο-3-πυροσταφυλικού (IPA), εν σχέσει με το ποσοστό της μεθανόλης σε υδατικό διάλυμα (βλ σχήμα 14) και βρήκαν ότι αυξάνονται αναλόγως. Σκοπός μας είναι να βρούμε τη συγκέντρωση οργανικού διαλύτη σε νερό, η οποία μας δίνει σταθερά ιοντισμού ( $k_a$  ή  $pK_a$ ), παρόμοια με αυτή που αναφέρεται στο Merck index για οργανικούς διαλύτες. Η γνώση αυτή, -όπως αναφέρουν και οι Kelen, Sanli - θα μπορούσε να βρει εφαρμογή σε τεχνικές διαχωρισμού στο εργαστήριο όπως η υγρή χρωματογραφία. Είναι γνωστό ότι στην υγρή χρωματογραφία (LC) ο χρόνος κατακράτησης μιας ουσίας (retention time RT), επηρεάζεται από το  $pK_a$  της ουσίας και το pH του διαλύτη.



**Σχήμα 14 :** Μεταβολή του  $pK_a$  εν σχέσει με το κλάσμα μεθανόλης νερού κατά Kelen, Sanli Πηγή (7)

### 5.3 Ποτενσιομετρία αρχή λειτουργίας

Οι τιμές  $pK_a$  προσδιορίστηκαν ποτενσιομετρικά.

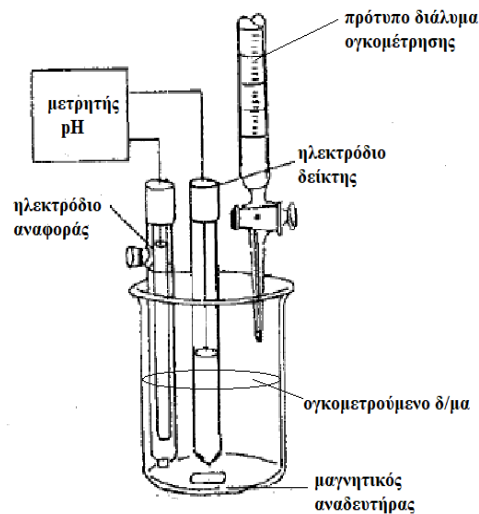
Η ποτενσιομετρία αποτελεί τη μέτρηση του δυναμικού, ενός κατάλληλου ηλεκτροδίου δείκτη, σε σχέση με ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς ως συνάρτηση του όγκου του πρότυπου διαλύματος (τίτλου), όπως φαίνεται και στο σχήμα 15.

Οι ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις παρέχουν πιο αξιόπιστα δεδομένα εν σχέσει με αυτές που χρησιμοποιούν χημικούς δείκτες.

Η ογκομέτρηση αποτελεί τη καταγραφή δυναμικού (σε μονάδες millivolts ή pH) μετά από σταδιακή προσθήκη πρότυπου διαλύματος. Το πρότυπο διάλυμα προστίθεται σε μεγάλες ποσότητες στην αρχή και σταδιακά ελαττώνεται καθώς προσεγγίζεται το τελικό σημείο. Πρέπει να δοθεί επαρκής χρόνος για την επίτευξη ισορροπίας μετά από κάθε προσθήκη αντιδραστηρίου με συνεχή ανάδευση.

Γι' αυτό χρησιμοποιείται ένας μαγνητικός αναδευτήρας.

Το όριο ανίχνευσης με συμβατικά ηλεκτρόδια είναι περίπου  $10^{-5}$  έως  $10^{-6}$  M. Στη διαδικασία βαθμονόμησης (calibration) χρησιμοποιούνται συνήθως έτοιμα υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα γνωστού pH που παρέχονται από τον κατασκευαστή.



**Σχήμα 15 :** Διάταξη ποτενσιομετρίας

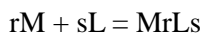
## 6. Μελέτη στοιχειομετρικής αναλογίας συμπλόκου $Fe^{3+}$ - IAA

Προσδιορίστηκε η στοιχειομετρική αναλογία του συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου με ίνδολο-3-οξικό οξύ με την φωτομετρική μέθοδο Yoe-Jones, γνωστή και ως μέθοδο του γραμμομοριακού λόγου.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η απλότητα της και η εξοικονόμηση χρόνου.

Παρακάτω περιγράφεται όσο το δυνατόν πιο συνοπτικά η αρχή της μεθόδου.

Έστω το σύμπλοκο  $M_rL_s$  που σχηματίζεται σύμφωνα με την αντίδραση :



όπου L υποκαταστάτης και M το μέταλλο

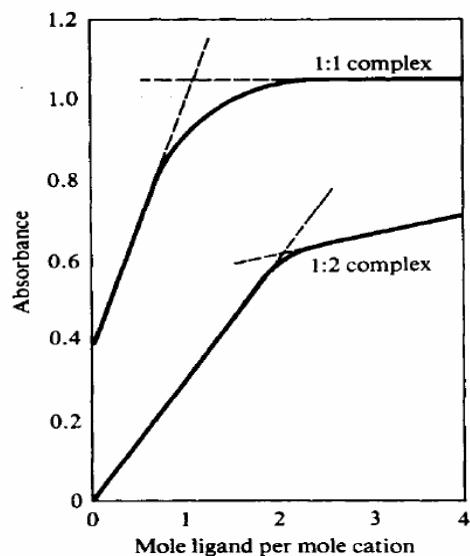
Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της αναλογίας υποκαταστάτη-μεταλλοϊόντος,  $s/r$ , μπορεί να προσδιορισθεί με φωτόμετρο με τη μέθοδο του γραμμομοριακού λόγου, γνωστή και ως μέθοδο Yoe-Jones. Στη μέθοδο αυτή παρασκευάζεται σειρά διαλυμάτων στα οποία η συγκέντρωση του ενός από τα δύο αντιδραστήρια (συνήθως του μετάλλου) διατηρείται σταθερή, ενώ του άλλου μεταβάλλεται, ώστε ο λόγος των συγκεντρώσεων  $[L] / [M]$  να πάρει διάφορες τιμές. Μετρούνται οι απορροφήσεις των παραπάνω διαλυμάτων, συνήθως στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης του συμπλόκου  $M_rL_s$ , και χαράσσεται η καμπύλη αναφοράς  $A = f([L] / [M])$ , δηλαδή ο γραμμομοριακός λόγος συναρτήσει της απορρόφησης του συμπλόκου στο μέγιστο μήκος κύματος. Η απορρόφηση αυξάνεται γραμμικά μέχρι σχεδόν το στοιχειομετρικό σημείο, στο οποίο ισχύει η σχέση  $[L] / [M] = s / r$  και το M βρίσκεται ποσοτικά σχεδόν μόνο υπό τη μορφή  $M_rL_s$ , ενώ μετά από αυτό η απορρόφηση παραμένει πρακτικώς σταθερή και η γραμμή οριζοντιώνεται.

Αυτό πρακτικά φαίνεται και από τη φωτό 1 του πειράματος. Ο χρωματισμός του διαλύματος αυξάνεται προοδευτικά καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του υποκαταστάτη (δηλ του ίνδολο-3-οξικού οξέος) και μετά σταθεροποιείται. Στη περιοχή του στοιχειομετρικού σημείου παρατηρείται καμπύλωση, το μέγεθος της οποίας αυξάνεται, όταν αυξάνεται η σταθερά ασταθείας  $K_{inst}$  του συμπλοκου.

Παρά τη καμπύλωση, η τιμή του λόγου  $s / r$  και ο στοιχειομετρικός τύπος του συμπλόκου μπορούν να βρεθούν με προέκταση των ευθυγράμμων τμημάτων της καμπύλης. Για σύμπλοκα αναλογίας 1 : 1 όπου η καμπύλωση δεν είναι υπέρμετρα μικρή η μεγάλη, μπορεί να γίνει υπολογισμός και της σταθεράς ασταθείας  $k_{inst}$ . Αυτό όμως δεν ισχύει για πολυπλοκότερα σύμπλοκα όπως 1 : 2, βλ σχ.16.



Φωτό 1 : Η μέθοδος του γραμμομοριακού λόγου για το σύμπλοκο ίνδολο-3-οξικού οξέος με τρισθενή σίδηρο



Σχήμα 16 : καμπύλες αναφοράς για σύμπλοκα 1:1 (ML), 1 : 2 (ML<sub>2</sub>)

Η μέθοδος περιγράφεται στη Πηγή (1), η φωτό είναι από το πείραμα, το σχ.16 προέρχεται από τη Πηγή (18).

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## 7. ΜΕΛΕΤΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ UV ΤΟΥ ΙΑΑ

### 7.1 Επιλογή του διαλύτη και παρασκευή διαλύματων

1) Ανάλογα με τη πολικότητα του διαλύτη : Αλλάζει και η ένταση απορρόφησης, δηλ. όσο πιο πολικός είναι ο διαλύτης τόσο το φάσμα μετατοπίζεται προς τα πάνω. Άρα όσο πιο πολικός είναι ο διαλύτης παρατηρούνται μεγαλύτερες τιμές απορρόφησης. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται υπερχρωμία.

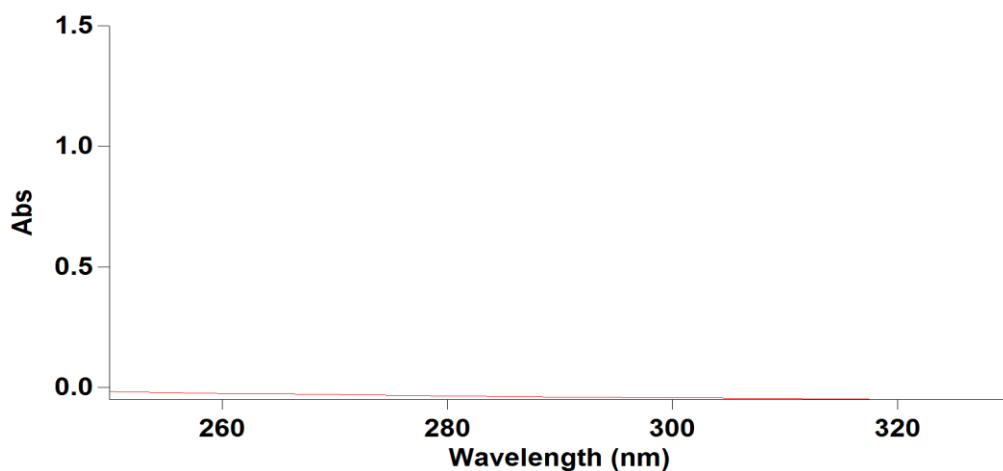
2) Το εύρος του φάσματος επηρεάζεται ανάλογα με τη τιμή UV cutoff του διαλύτη. Εάν δηλαδή ο διαλύτης απορροφά στην ίδια περιοχή με την υπό μελέτη ουσία τότε δεν μπορούμε να λάβουμε μια καλή εικόνα του φάσματος για την ουσία αυτή .

#### Παρασκευή διαλυμάτων

α) Τα διαλύματα του 1 ppm ΙΑΑ στους οργανικούς διαλύτες παρασκευάστηκαν ως εξής : πρώτα παρασκευάστηκε διάλυμα stock των 1000 ppm (1 mg ΙΑΑ/ 1 ml διαλύτη) και έπειτα με διαδοχικές αραιώσεις με οργανικό διαλύτη φτάνουμε στα 100 ppm και μετά στο 1 ppm.

β) Το υδατικό διάλυμα μεθανόλης 30% παρασκευάστηκε με 10 μl διαλύματος stock των 1000 ppm ΙΑΑ, 2990 μl μεθανόλης και 7000 μl νερού.

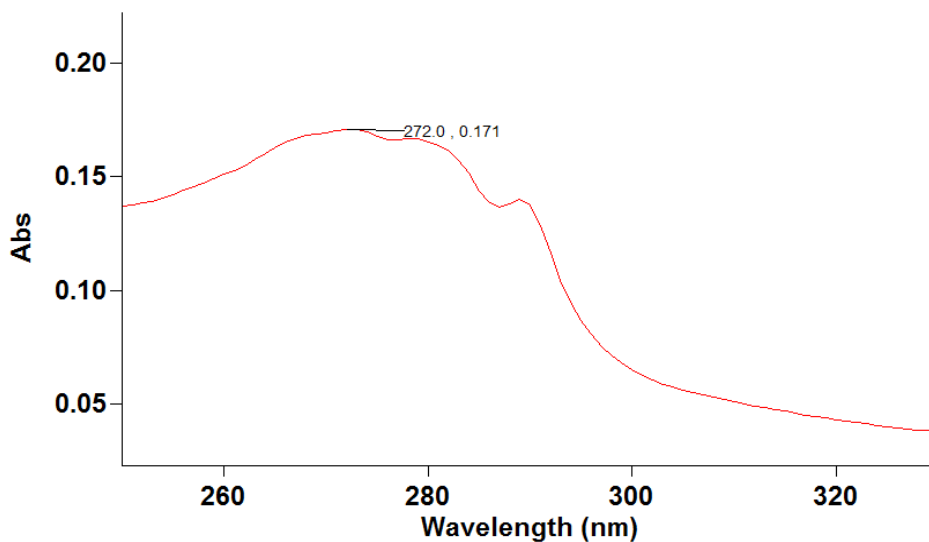
Παρατίθενται τα φάσματα UV του ίνδολο-3οξικού οξέος σε τρεις διαλύτες ( εργαστήριο), καθώς και τα φάσματα των διαλυτών (BLANK) στη περιοχή απορρόφησης 250 -320 nm :



#### ΦΑΣΜΑ 1 : Απορρόφηση ακετονιτριλίου (BLANK)

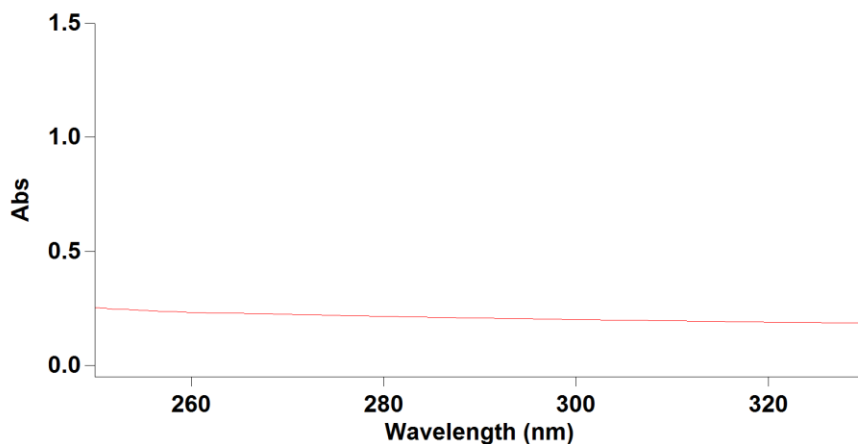
Το ακετονιτρίλιο όπως φαίνεται από το φάσμα της στη περιοχή 250-330 nm, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης στο UV, διότι στη συγκεκριμένη περιοχή εμφανίζει μηδενική σχεδόν απορρόφηση.





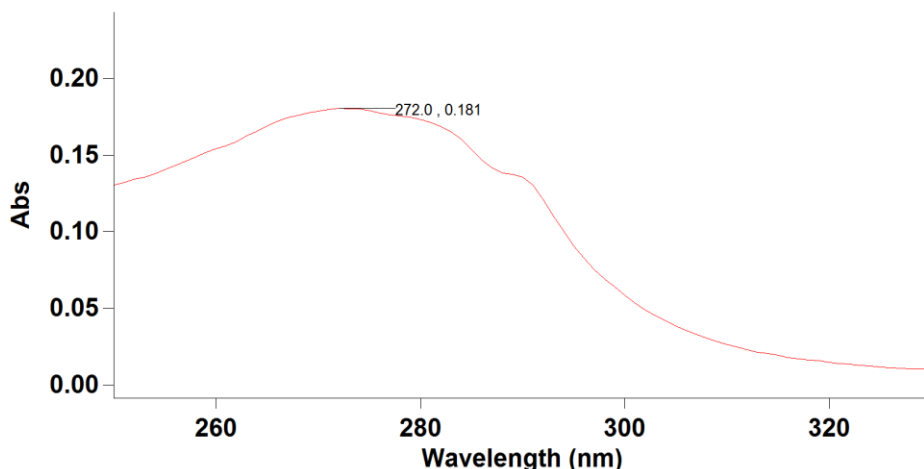
### ΦΑΣΜΑ 2 : 1 ppm IAA σε ακετονιτρίλιο

Στο φάσμα με διαλύτη το ακετονιτρίλιο, παίρνουμε ένα ευδιάκριτο φάσμα, όπου σημειώνονται και οι τρεις μέγιστες τιμές απορρόφησης, οι οποίες είναι :  $\lambda_{max} = 272.0171 \text{ nm}$  ,  $\lambda_{max} = 280 \text{ nm}$  και ο “ώμος” στα 289 nm.



### ΦΑΣΜΑ 3 : Απορρόφηση μεθανόλης (BLANK)

Η μεθανόλη όπως φαίνεται απο το φάσμα της στη περιοχή 250-330 nm, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης στο UV, διότι στη συγκεκριμένη περιοχή εμφανίζει μια σταθερή τιμή πολύ μικρής απορρόφησης (0,3 Abs).



#### ΦΑΣΜΑ 4 : 1 ppm IAA σε μεθανόλη

Και πάλι στο φάσμα με διαλύτη τη μεθανόλη εμφανίζονται τα δύο χαρακτηριστικά μέγιστα απορρόφησης του ίνδολο-3-οξικού οξέος, στα 272.0181 nm και ο ώμος στα 289 nm.

Συγκρίνοντας το φάσμα με διαλύτη τη μεθανόλη και το φάσμα με διαλύτη το ακετονιτρίλιο, δεν παρατηρούνται μεγάλες διαφορές διότι οι δύο αυτοί διαλύτες εμφανίζουν παρόμοια πολικότητα.

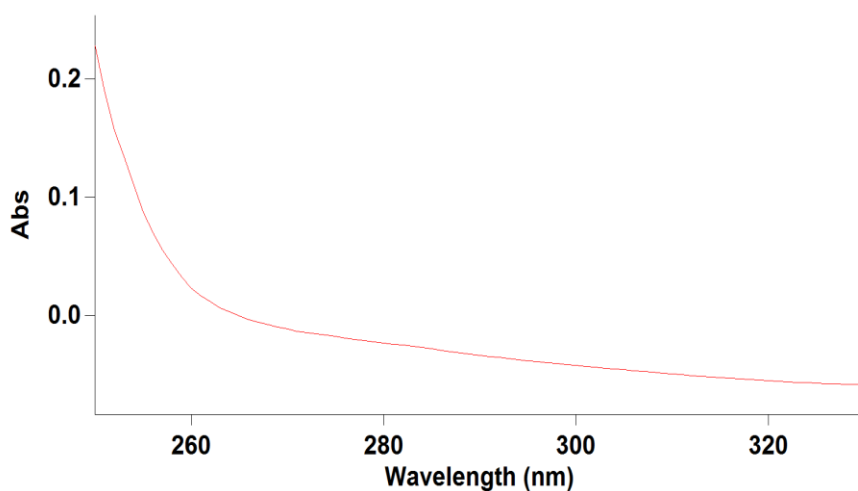
Το δεύτερο μέγιστο στα 280 nm χάνεται, ενώ το πρώτο μέγιστο είναι μετατοπισμένο κατά 0,01 nm.

Η πιο αξιοσημείωτη διαφορά είναι το τρίτο μέγιστο, ο “ώμος” στα 289 nm.

Ο ώμος εμφανίζεται λιγότερο καθαρά από ότι στο φάσμα με διαλύτη το ακετονιτρίλιο.

Το φαινόμενο αυτό μάλλον οφείλεται στη φύση του διαλύτη. Κάθε διαλύτης μπορεί να επηρεάσει το σχήμα του φάσματος, καθώς και την ένταση απορρόφησης των λmax.

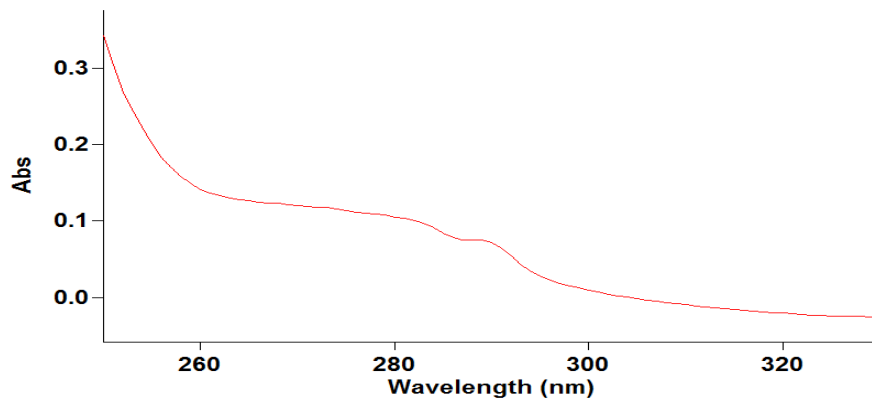
Γενικά οι αλκοόλες ως οργανικοί διαλύτες τείνουν να δώσουν φάσματα με πιο λειασμένες κορυφές από ότι άλλοι διαλύτες.



#### ΦΑΣΜΑ 5 : Απορρόφηση διχλωρομεθανίου (BLANK)

Το διχλωρομεθάνιο όπως φαίνεται από το φάσμα 5 στη περιοχή 250 -330 nm, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης στο UV, διότι εμφανίζει απορρόφηση 0,2 Abs στα 250 nm, η οποία σταδιακά ελαττώνεται.

Στη βιβλιογραφία η τιμή UV cutoff που αναφέρεται για το διχλωρομεθάνιο είναι 235 nm, (βλ. Πίνακα 1).



#### ΦΑΣΜΑ 6 : 1 ppm IAA σε διχλωρομεθάνιο

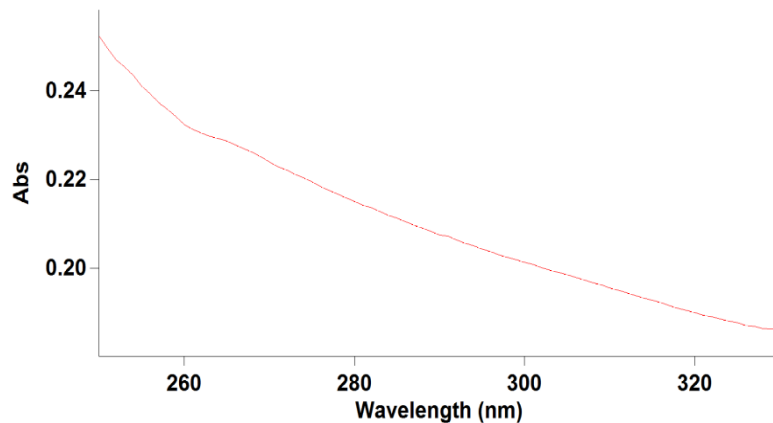
Στο φάσμα απορρόφησης με διαλύτη το διχλωρομεθάνιο παρατηρούμε μόνο τον ώμο στα 289 nm. Στη υπόλοιπη περιοχή απορροφά ισχυρά ο διαλύτης, παραμορφώνοντας την εικόνα του φάσματος.

Ο “ώμος” είναι πιο πλατύς και ευδιάκριτος εν σχέσει με τα φάσματα των διαλυτών της μεθανόλης και του ακετονιτρίλιου.

Ακόμη η τιμή απορρόφησης του “ώμου” η οποία ισούται με 0,09 Abs είναι χαμηλότερη στο διχλωρομεθάνιο εν σχέσει με τους άλλους δύο διαλύτες μεθανόλη και ακετονιτρίλιο.

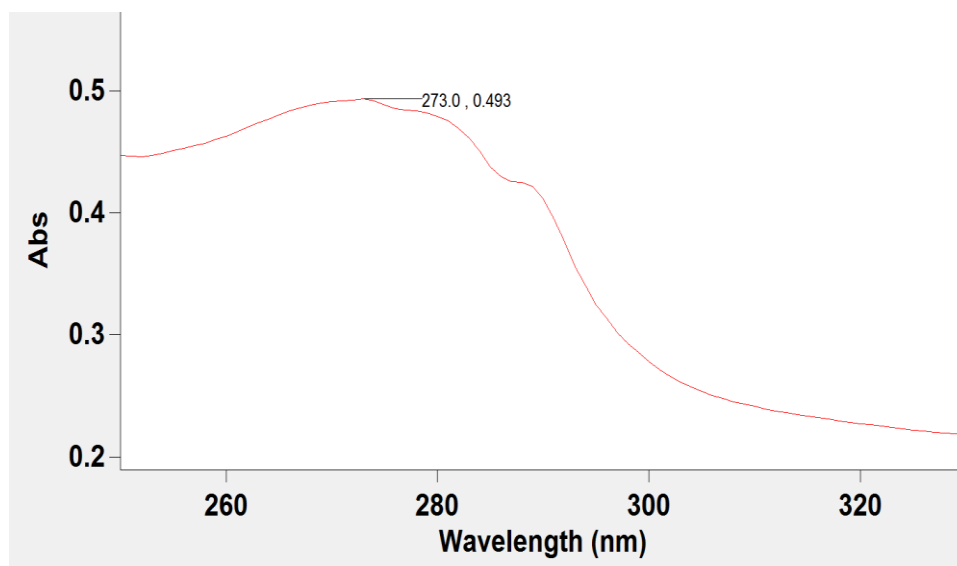
Ο ώμος για μεθανόλη και ακετονιτρίλιο είναι κοντά στα 0,14 Abs.

Αυτό εξηγείται διότι το διχλωρομεθάνιο είναι λιγότερο πολικός διαλύτης από το ακετονιτρίλιο και τη μεθανόλη (βλ πίνακα 1). Παρατηρείται δηλαδή το φαινόμενο της υποχρωμίας.



#### ΦΑΣΜΑ 7 : Απορρόφηση ακετόνης (BLANK)

Η ακετόνη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης, διότι έχει UV cutoff 330 nm, απορροφά δηλαδή ισχυρά κάτω από τα 330 nm όπως φαίνεται από το φάσμα 7.



#### ΦΑΣΜΑ 8 : 1 ppm IAA σε υδατικό διάλυμα μεθανόλης 30%

Τέλος πρέπει να σημειωθεί ότι και η συγκέντρωση του διαλύτη παίζει ρόλο.

Όσο πιο αραιή είναι η συγκέντρωση του διαλύτη τόσο οι τιμές των λ<sub>max</sub> μετατοπίζονται προς τα δεξιά.

Για παράδειγμα σε φάσμα ίνδολο-3-οξικού 1ppm με διαλύτη μεθανόλη 30% σε νερό το πρώτο μέγιστο λ<sub>max</sub> που παρατηρούμε είναι 273.0493 nm , αντί για 272.0181 nm.

Η τιμή 272.0181 nm παρατηρείται πάλι με διαλύτη μόνο τη μεθανόλη για την ίδια συγκέντρωση ίνδολο-3-οξικού οξέος. Ακόμη εμφανίζεται υπερχρωμία, η απορρόφηση στο υδατικό διάλυμα μεθανόλης είναι 0,45 Abs ενώ στο διάλυμα όπου έχουμε μόνο τον οργανικό διαλύτη η απορρόφηση είναι κοντά στα 0,15 Abs. Αυτό συμβαίνει διότι το νερό είναι πολικός διαλύτης (βλ πίνακα 1) και αυξάνει τις τιμές απορρόφησης (Abs) στο φάσμα. Παρατηρείται δηλαδή το φαινόμενο της υπερχρωμίας.

### 7.2 Επίδραση του pH στο φάσμα του ίνδολο-3-οξικού οξέος

Με την αλλαγή του pH, η κυριότερη επίδραση του φάσματος του ίνδολο-3-οξικού οξέος, είναι μια βαθμιαία βαθυχρωμική μετατόπιση, η οποία πρακτικά ολοκληρώνεται σε pH=7.

Για τη περιοχή κοντά στο άπω υπεριώδες η αλλαγή αυτή είναι μεγαλύτερη (ζώνη Bb), από ότι στη περιοχή κοντά στο εγγύς υπεριώδες (ζώνη La, Lb), βλ. σχ.11 . Η αλλαγή αυτή στο φάσμα μεταφράζεται ως αποπρωτονίωση της καρβοξυλομάδας, του ίνδολο-3-οξικού οξέος, με αύξηση του pH.

Παρακάτω στο πίνακα 2 παρατίθενται οι ζώνες απορρόφησης στο UV, για το ινδόλιο σε νερό, καθώς και του ίνδολο-3-οξικού οξέος σε όξινο και βασικό περιβάλλον, με διαλύτη αιθανόλη και ακετονιτρίλιο.

Η ζώνη απορρόφησης Ba (193 nm) δεν μπορεί να παρατηρηθεί με διαλύτη αιθανόλη στο UV, διότι η αιθανόλη έχει τιμή UV cutoff =210. Η ζώνη Ba μπορεί να παρατηρηθεί με διαλύτη το ακετονιτρίλιο στο UV, διότι το ακετονιτρίλιο έχει τιμή UV cutoff = 190, (βλ. Πίνακα 1). Η ζώνη απορρόφησης Ba, εμφανίζεται μόνο σε όξινες συνθήκες, διότι αύξηση του pH προκαλεί μεγάλη βαθυχρωμική μετατόπιση στη περιοχή 190-220 nm, όπως φαίνεται απο το σχήμα 11, και τα φάσματα 9,10,11.

Τέλος οι ζώνες απορρόφησης για το ινδόλιο και το ίνδολο-3-οξικό οξύ παρατίθενται στο πίνακα 2.

Για το ίνδολο-3-οξικό οξύ παρατίθενται και οι ζώνες απορρόφησης συναρτήσει του pH.

Οι τιμές για το ινδόλιο, και το ίνδολο-3-οξικό οξύ σε αιθανόλη, προέρχονται από τη βιβλιογραφία, ενώ οι τιμές για το ίνδολο-3-οξικό οξύ σε ακετονιτρίλιο προέρχονται από το πείραμα. Η συγκέντρωση του ινδόλιου ( $c = 3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) καθώς και όλες οι συγκεντρώσεις του ίνδολο-3-οξικού οξέος ( $c = 7,535 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  για αιθανόλη και  $c = 10^{-5} \text{ M}$  για ακετονιτρίλιο) ήταν παρόμοιες κοντά στα  $10^{-5} \text{ M}$ .

## ΠΙΝΑΚΑΣ 2

### ΖΩΝΕΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΙΝΔΟΛΗΣ ΚΑΙ ΙΝΔΟΛΟ-3-ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ UV

#### ΖΩΝΕΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΣΤΟ UV

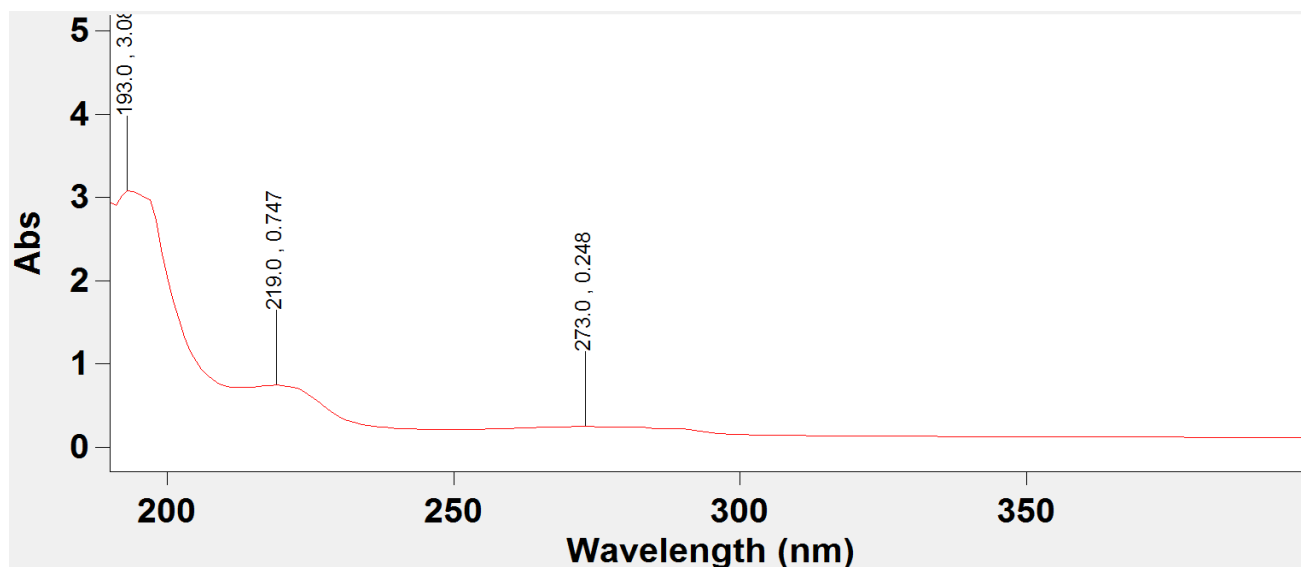
Ινδόλιο	Ba	Bb	La	Lb	δ/της	
	196 nm	216 nm	270 nm	286 nm	νερό ή αιθανόλη-νερό 1% v/v	
Ίνδολο-3-οξικό οξύ	-	218,1 nm	273,1 nm	287,3 nm	αιθανόλη - pH 2 (HCl 1 M)	κατά Caric et al
	-	220,8 nm	274,3 nm	287,3 nm	αιθανόλη - pH 12 (NaOH 1 M)	
	-	220,8 nm	274,4 nm	287,5 nm	αιθανόλη - pH 7 (ρυθμιστικό δ/μια)	
	-	219,0 nm	272 nm	289 nm	ακετονιτρίλιο	τιμές απο πείραμα
	193 nm	219,0 nm	273,0 nm	-	ακετονιτρίλιο- HCl 0,1 M	
	-	224,0 nm	274,0 nm	-	ακετονιτρίλιο-NaOH 0,1 M	

Τα δεδομένα για το ινδόλιο είναι από τη **Πηγή (5)**, για το ίνδολο-3-οξικό οξύ σε αιθανόλη από τη **Πηγή (6)**.

Οι τιμές για το ίνδολο-3-οξικό οξύ σε ακετονιτρίλιο είναι από το πείραμα.

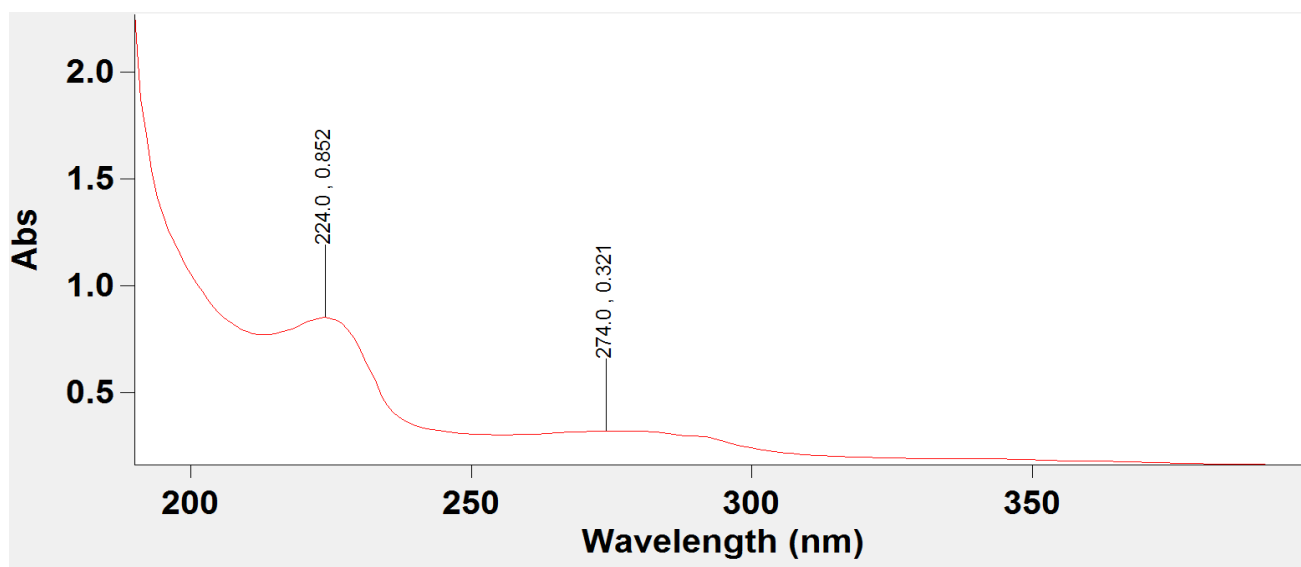
Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα του ίνδολο-3-οξικού οξέος σε συγκέντρωση  $10^{-5} \text{ M}$  με διαλύτη το ακετονιτρίλιο, σε όξινες συνθήκες (φάσμα 9), βασικές συνθήκες (φάσμα 10) και μόνο με διαλύτη (φάσμα 11). Ακόμη παρατίθεται το φάσμα του ίνδολο-3-οξικού οξέος σε συγκέντρωση  $10^{-4} \text{ M}$ , με διαλύτη το ακετονιτρίλιο (φάσμα 12).

Σε όξινες συνθήκες παρατηρούμε τη ζώνη Ba στα 193 nm. Η ζώνη αυτή παρατηρείται και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση ινδολο-3-οξικού οξέος (βλ φάσμα 12).



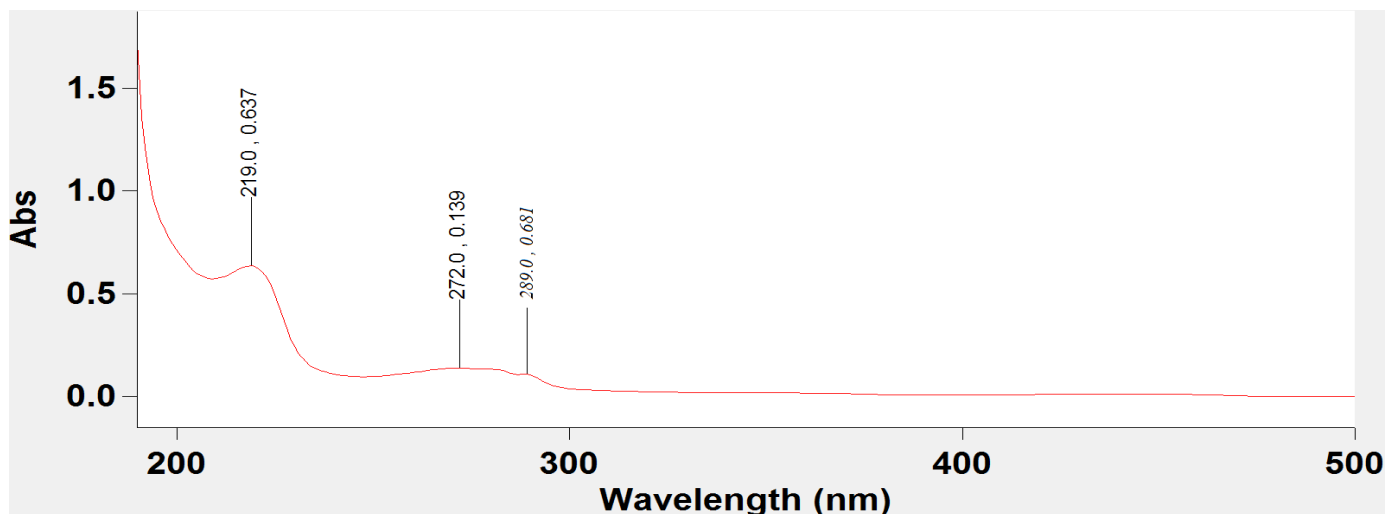
**ΦΑΣΜΑ 9 :** Φάσμα του Ίνδολο-3-οξικού οξέος  $10^{-5}$  M, σε ακετονιτρίλιο και HCl 0,1 M

Σε βασικές συνθήκες παρατηρούμε την έντονη βαθυχρωμική μετατόπιση για τη ζώνη Bb, από 219 nm στα 224 nm. Η βαθυχρωμική μετατόπιση είναι πολύ μικρότερη για τη ζώνη La η οποία εμφανίζει τη τιμή 274 nm.



**ΦΑΣΜΑ 10 :** Φάσμα του Ίνδολο-3-οξικού οξέος  $10^{-5}$  M, σε ακετονιτρίλιο και NaOH 0,1 M

Ο “ώμος” στα 289 nm, εμφανίζεται μόνο στο φάσμα με το διαλύτη, δεν παρατηρείται σε όξινες ή βασικές συνθήκες.



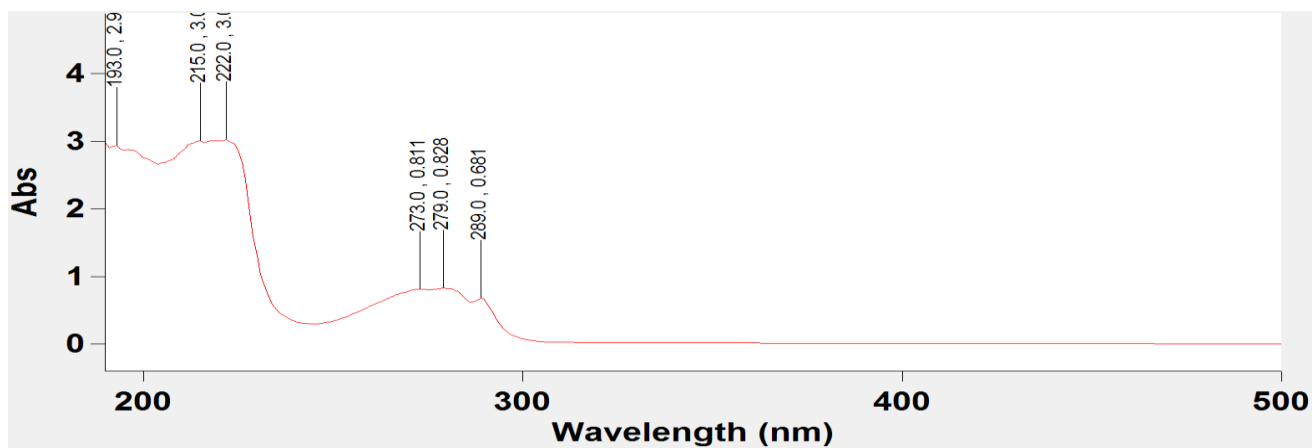
**ΦΑΣΜΑ 11 :** Φάσμα του Ίνδολο-3-οξικού οξέος  $10^{-5}$  M, σε ακετονιτρίλιο

Παρόμοιες είναι οι τιμές των φασμάτων των Caric et al, οι οποίοι μελέτησαν το ίνδολο-3-οξικό οξύ με διαλύτη την αιθανόλη όπως φαίνεται από τον πίνακα 2 και το σχήμα 11.

Πιο συγκεκριμένα με τον διαλύτη αιθανόλη παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση στη ζώνη Bb από τα 218,1 nm σε pH=2, στα 220,8 nm σε pH=7 και pH=12.

Η βαθυχρωμική μετατόπιση που παρατηρείται για τις ζώνες La, Lb είναι αμελητέα.

### 7.3 Επίδραση της συγκέντρωσης του ίνδολο-3-οξικού οξέος στο φάσμα UV



**ΦΑΣΜΑ 12 :** Φάσμα του Ίνδολο-3-οξικού οξέος  $10^{-4}$  M, σε ακετονιτρίλιο

Στο φάσμα UV, παράγοντας που παίζει ρόλο δεν είναι μόνο ο διαλύτης, αλλά και η συγκέντρωση του αναλύτη, δηλ της ουσίας που μελετάται στο UV. Η εικόνα του φάσματος UV του IAA σε συγκέντρωση  $10^{-4}$  M (φάσμα 12) αλλάζει εν σχέσει με το φάσμα UV της ίδιας ουσίας, στον ίδιο διαλύτη αλλά στη πιο αραιή συγκέντρωση  $10^{-5}$  M (φάσμα 11).

Πιο συγκεκριμένα στο φάσμα με τη πιο πυκνή συγκέντρωση, παρατηρούμε το μέγιστο 279 nm, ο “ώμος” στα 289 nm είναι πιο έντονος. Ακόμη παρατηρούμε τη ζώνη απορρόφησης Ba = 193 nm, καθώς και δύο μέγιστα απορρόφησης στη ζώνη Bb.

## 8. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΗΣ ΣΤΑΘΕΡΑΣ pKa

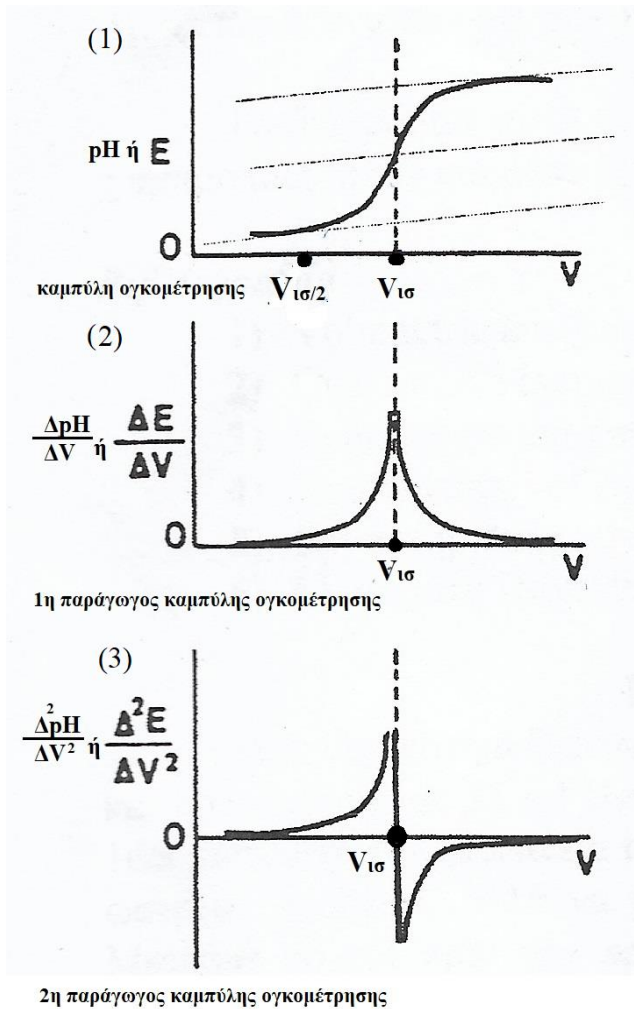
### 8.1 Χρήση ποτενσιομετρίας στον προσδιορισμό των τιμών pKa

Η ποτενσιομετρική ογκομέτρηση προτιμήθηκε ως μέθοδος από την κλασική ογκομέτρηση με χημικούς δείκτες διότι δίνει πιο ακριβή αποτελέσματα.

Κατασκευάζουμε τη καμπύλη ογκομέτρησης δηλ μεταβολή του pH ή του ηλεκτρικού δυναμικού E συναρτήσει του όγκου του πρότυπου διαλύματος της βάσης που καταναλώθηκε, και βρίσκουμε το ισοδύναμο σημείο. Στο ισοδύναμο σημείο πάνω από το 99% του οξέος έχει ιονισθεί, αφού έχει αντιδράσει πλήρως με το πρότυπο διάλυμα. Έπειτα βρίσκουμε τη σταθερά ιονισμού  $K_a$ , μέσω του pKa. Αυτό είναι το σημείο όπου το οξύ και η συζυγής βάση του βρίσκονται σε ποσοστό 50%, άρα στον μισό όγκο πρότυπου διαλύματος από αυτόν του ισοδύναμου σημείου.

#### Τρόποι υπολογισμού του Ι.Σ.

1) Γραφικά από τη καμπύλη ογκομέτρησης, πιο συγκεκριμένα μετράμε την απόσταση μεταξύ των δύο άκρων της όξινης και της βασικής περιοχής της καμπύλης, και φέρνουμε δύο παράλληλες ευθείες εφαπτόμενες σε αυτά τα άκρα. Το μέσο της μεταξύ τους απόστασης είναι το σημείο του ισοδύναμου σημείου, τραβάμε μια τρίτη μεσοπαράλληλο και το σημείο τομής της με τον άξονα του pH, μας δίνει τη τιμή του pH του ισοδύναμου σημείου.



Σχήμα 17 : Τρόποι υπολογισμού του Ι.Σ. Πηγή (2)

2) Με την 1η παράγωγο : Βρίσκουμε το σκαλοπάτι της καμπύλης ογκομετρήσεως ως εξής : Διαφορά pH / Διαφορά όγκων του πρότυπου διαλύματος =  $\Delta pH / \Delta V$  και φτιάχνουμε το διάγραμμα της συνάρτησης  $\Delta pH / \Delta V = f(V \text{ πρότυπου } \delta/\text{τος})$ . Το ισοδύναμο σημείο βρίσκεται εκεί που το σκαλοπάτι  $\Delta pH / \Delta V$  είναι μέγιστο.

3) Με τη 2η παράγωγο : Βρίσκουμε τα  $\Delta^2 pH / \Delta V^2$  και φτιάχνουμε το διάγραμμα σε συνάρτηση με τον όγκο του πρότυπου διαλύματος ογκομέτρησης. Το σημείο μηδενισμού της δεύτερης παραγώγου δίνει το ισοδύναμο σημείο. Η δεύτερη παράγωγος υπολογίζεται ως η διαφορά των τιμών της πρώτης παραγώγου, διαιρούμενη με την αντίστοιχη μεταβολή του όγκου του πρότυπου διαλύματος. Τα παραπάνω φαίνονται συνοπτικά και στο σχήμα 17.



## 8.2 Επιλογή κατάλληλου διαλύτη

Για να επιλέξουμε το κατάλληλο διαλύτη, θα πρέπει να μελετήσουμε τις ιδιότητες των οργανικών διαλυτών και του νερού, καθώς και την επίδραση τους στον ιονισμό των ουσιών.

Αμφιπρωτονικοί διαλύτες : ως διαλύτης μπορεί να δεχθεί ή να προσφέρει ένα πρωτόνιο δηλαδή να δράσει ως βάση ή ως οξύ κατά Brønsted–Lowry.

Απρωτονικοί διαλύτες : Δεν εμφανίζουν όξινες ή βασικές ιδιότητες, δηλαδή δεν συμμετέχουν σε αντιδράσεις ανταλλαγής πρωτονίων, είναι χημικώς αδρανείς, έχουν μικρή διηλεκτρική σταθερά  $\epsilon$ , για αυτό δεν υποβοηθούν τον ιονισμό των ουσιών.

Βασικοί διαλύτες : πρωτονιοδότες δηλαδή βάσεις κατά Brønsted–Lowry. Έχουν μικρότερη σταθερά αυτοπρωτολύσεως από αυτή του ύδατος ( $K_s < K_w$ ).

Όξινοι διαλύτες : πρωτονιοδέκτες δηλαδή οξέα κατά Brønsted–Lowry. Έχουν μεγαλύτερη σταθερά αυτοπρωτολύσεως από αυτή του ύδατος ( $K_s > K_w$ ).

Π.χ. μυρμηκικό οξύ  $K_s = 6 \cdot 10^{-7}$ , θειικό οξύ  $K_s = 1,4 \cdot 10^{-4}$ .

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3**  
ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΣΤΑΘΕΡΕΣ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

Διαλύτης	Σταθερά αυτοπρωτολύσεως, $pK_s$	Διηλεκτρική σταθερά, $\epsilon$
<i>Αμφιπρωτονικοί διαλύτες</i>		
Αιθανόλη	19,5	24,3
Αιθυλενοδιαμίνη	15,3	12,9
Ακετονιτρίλιο	32,2	36,0
Αμμωνία <sup>α</sup>	33	22
Μεθανόλη	16,7	32,6
Όξινο οξύ	14,45	6,1
Ύδωρ	14,00	78,5
<i>Απρωτονικοί διαλύτες</i>		
Βενζόλιο	-	2,3
Διοξάνιο	-	2,2
κ-Εξάνιο	-	1,9
<i>Βασικοί διαλύτες</i>		
Διμεθυλοφωσραμίδιο	-	36,7
Μεθυλοίσοβουτυλοκετόνη	-	13,1
Πυριδίνη	-	12,3

<sup>α</sup> στους  $-50^\circ\text{C}$ .

Πηγή (2)

### Κριτήρια επιλογής διαλύτη

- Σταθερά αυτοπρωτολύσεως  $K_s$ , όσο το δυνατόν μικρότερη

- Διηλεκτρική σταθερά  $\epsilon$ , όσο το δυνατόν μεγαλύτερη

- Δεν θα πρέπει να πραγματοποιούνται δευτερεύουσες αντιδράσεις μεταξύ του διαλύτη και της ογκομετρούμενης ένωσης ή του πρότυπου διαλύματος.

- Διαλύτης μη τοξικός, φτηνός και να μπορεί να καθαριστεί εύκολα από τις προσμίξεις.

**Από τα παραπάνω και το πίνακα 3 συμπεραίνουμε ότι καλύτερος διαλύτης του ΙΑΑ, για ογκομέτρηση είναι η μεθανόλη, δεύτερη καλύτερη επιλογή είναι το ακετονιτρίλιο.**

### 8.3 Υδατικά διαλύματα οργανικών διαλυτών

Σε υδατικά διαλύματα οργανικών διαλυτών, όσο μεγαλύτερη η περιεκτικότητα (%) του οργανικού διαλύτη στο νερό, αυξάνεται το pKa της ογκομετρούμενης ουσίας.

Απο το pH του υδατικού διαλύματος του οργανικού διαλύτη όπου περιέχει το ίνδολο-3-οξικό οξύ, με σταδιακή προσθήκη υδροξειδίου του νατρίου, καταγράφουμε τις αλλαγές του pH του διαλύματος μας.

Αφού γίνει η καταγραφή των τιμών του pH κατασκευάζεται η καμπύλη ογκόμετρησης και υπολογίζεται το pKa του ίνδολο-3-οξικού οξέος. Αν χρειαστεί διορθώνουμε τη τιμή pKa με έναν εμπειρικό συντελεστή δ.

Αυτό εξαρτάται από το τρόπο μέτρησης του pH του υδροοργανικού διαλύματος.

Τρεις διαδικασίες υπάρχουν για τη μέτρηση του pH υδροοργανικών διαλυμάτων :

#### 1) Βαθμονόμηση των ηλεκτροδίων σε έτοιμα υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα, και έπειτα μέτρηση του pH του υδατικού διαλύματος της ογκομετρούμενης ουσίας πριν την ανάμειξη του με τον οργανικό διαλύτη.

Έτσι η τιμή pH λαμβάνεται στη κλίμακα  $^w_w$  pH. Η κλίμακα αυτή δεν είναι ακριβής αφού το pH αλλάζει μετά την ανάμειξη με οργανικό διαλύτη.

#### 2) Βαθμονόμηση των ηλεκτροδίων σε ρυθμιστικά διαλύματα με υδατικό διάλυμα οργανικού διαλύτη ίδιας συγκέντρωσης με αυτό που χρησιμοποιείται για την ογκομετρούμενη ουσία.

Έτσι η τιμή pH λαμβάνεται στη κλίμακα  $^s_s$  pH.

Η κλίμακα αυτή αν και πολύ ακριβής δεν συνίσταται διότι είναι χρονοβόρα και τα ρυθμιστικά διαλύματα αναφοράς δεν υπάρχουν στο εμπόριο.

#### 3) Βαθμονόμηση των ηλεκτροδίων σε έτοιμα υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα και μέτρηση απευθείας στην ογκομετρούμενη ουσία. Η ογκομετρούμενη ουσία είναι διαλυμένη σε υδατικό διάλυμα οργανικού διαλύτη.

Έτσι η τιμή pH λαμβάνεται στη κλίμακα  $^s_w$  pH. Η κλίμακα αυτή είναι αρκετά ακριβής και συνίσταται για την απλότητα της μεθόδου.

Ας σημειωθεί ότι οι δύο τελευταίες κλίμακες είναι μετατρέψιμες από τη σχέση :  $^s_w$  pH =  $^s_s$  pH + δ  
όπου δ : μια σταθερά για τη σύνθεση της κινητής φάσης,  
s : το υδροοργανικό διάλυμα, w: το υδατικό διάλυμα

Δηλαδή η σχέση μεταξύ  $^s_s$  pH,  $^s_w$  pH εξαρτάται μόνο από το κλάσμα του οργανικού διαλύτη στο μίγμα. Το κλάσμα αυτό ορίζεται ως ο λόγος του όγκου του οργανικού διαλύτη προς το άθροισμα των όγκων όλων των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν πριν την ογκομέτρηση.

Η διαφορά της κλίμακας  $^w_w$  pH από τις  $^s_s$  pH,  $^s_w$  pH εξαρτάται και από τη σύνθεση των υδατικών ρυθμιστικών διαλυμάτων, οπότε για τη κλίμακα  $^w_w$  pH δεν μπορεί να γίνει διόρθωση με το συντελεστή δ.

5) Ο συντελεστής δ για υδατικά διαλύματα μεθανόλης υπολογίζεται εμπειρικά, από την εξής εξίσωση μέσω του κλάσματος Φ της μεθανόλης :

όπου  $\Phi_{\text{MeOH}} = V_{\text{MeOH}} / \sum V_i$ ,

$V_{\text{MeOH}}$  = όγκος της μεθανόλης και

$V_i$  = όγκος κάθε συστατικού πριν την ογκομέτρηση.

$$\delta = \frac{0.09\phi_{\text{MeOH}} - 0.11\phi_{\text{MeOH}}^2}{1 - 3.15\phi_{\text{MeOH}} + 3.51\phi_{\text{MeOH}}^2 - 1.35\phi_{\text{MeOH}}^3}$$

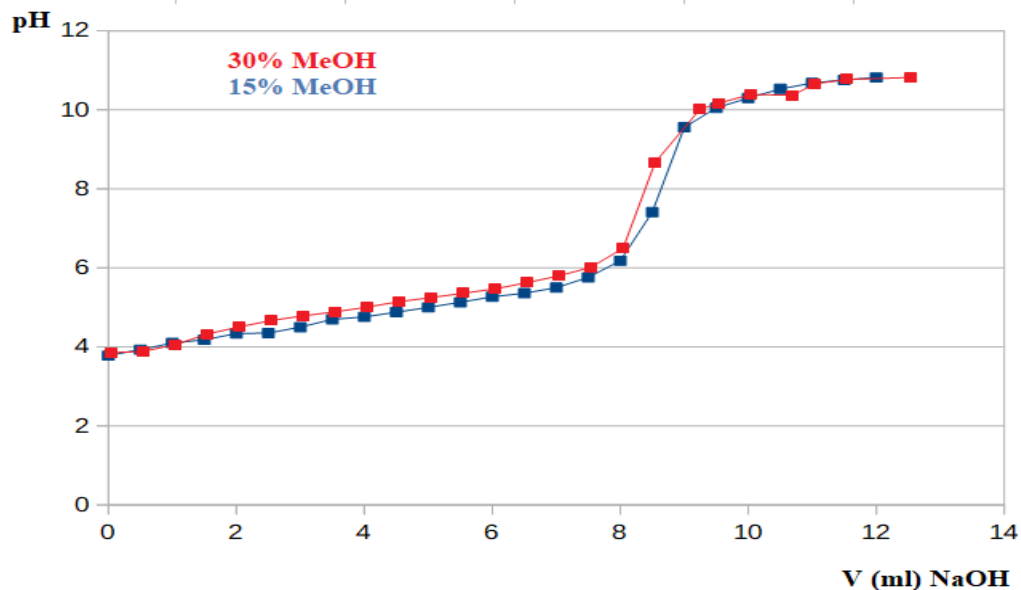
6) Ομοίως, για υδατικά διαλύματα ακετονιτριλίου

Όλη η παράγραφος 8.3, προέρχεται από τη Πηγή (8)

$$\delta = \frac{-0.446\phi_{\text{MeCN}}^2}{1 - 1.316\phi_{\text{MeCN}} + 0.433\phi_{\text{MeCN}}^2}$$

## 8.4 Αποτελέσματα

### A) Καμπύλες ογκομέτρησης



Σχήμα 18 : Ογκομετρήσεις του ίνδολο-3-οξικού οξέος σε 15% και 30 % μεθανόλη

Για να βρούμε τη σταθερά ιοντισμού  $K_a$ , πρέπει να ξέρουμε τη τιμή του ισοδύναμου σημείου.

Οι 2 καμπύλες ογκομέτρησης εξαιτίας της μικρής διαφοράς τους στη περιεκτικότητα οργανικού διαλύτη σχεδόν ταυτίζονται όπως φαίνεται και από το σχήμα 18, άρα η εύρεση του ισοδύναμου σημείου, δηλ του μέσου του διαστήματος της απότομης μεταβολής είναι δυνατόν να βρεθεί μόνο με τη μέθοδο των παραγώγων.

Η παρασκευή των διαλυμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν στην ογκομέτρηση έγινε ως εξής :

A) Για το υδατικό δ/μα μεθανόλης 30%

Για το πρότυπο διάλυμα : 25 ml NaOH 0,1 M, 75 ml MeOH, 150 ml H<sub>2</sub>O απιονισμένο

Για το διάλυμα IAA : 13 mg IAA, 7,5 ml MeOH, 17,5 ml H<sub>2</sub>O απιονισμένο

B) Για το υδατικό δ/μα μεθανόλης 15%

Για το πρότυπο διάλυμα : 25 ml NaOH 0,1 M, 37,5 ml MeOH, 187,5 ml H<sub>2</sub>O απιονισμένο

Για το διάλυμα IAA: 13 mg IAA, 3,75 ml MeOH, 21,25 ml H<sub>2</sub>O απιονισμένο

Πριν τις μετρήσεις με το ποτενσιόμετρο, έγινε ρύθμιση του οργάνου (calibration), με έτοιμα υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα των pH= 4 και pH = 10. Στην αρχή για την όξινη περιοχή έγινε ρύθμιση με το 4 και όταν η ένδειξη στο ποτενσιόμετρο έφτασε τη τιμή pH 7 έγινε ρύθμιση με το διάλυμα pH 10. Απο τις πειραματικές τιμές του ποτενσιόμετρου χαράχτηκε η καμπύλη ογκομέτρησης.

Άρα η κλίμακα των μετρήσεων που χρησιμοποιήθηκε για τη χάραξη της καμπύλης είναι η  $s_w$  pH.

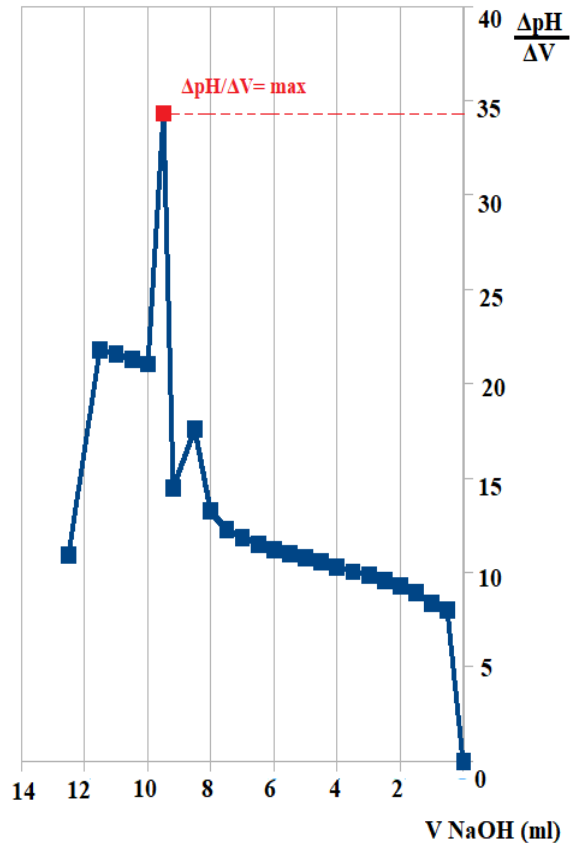
Αφού υπολογίσουμε το  $pK_a$  με τη μέθοδο των παραγώγων για κάθε καμπύλη ογκομέτρησης, κάνουμε διόρθωση με τον εμπειρικό συντελεστή  $\delta$ , που υπολογίζεται από την αντίστοιχη εξίσωση για τη μεθανόλη (βλ παράγραφο 8.3).

B. Υπολογισμός  $pK_a$  με τη μέθοδο των παραγώγων και διόρθωση με συντελεστή  $\delta$

### 1η παράγωγος

Για το υδατικό διάλυμα μεθανόλης 30%

V	pH	$\Delta pH$	$\Delta V$	$\frac{\Delta pH}{\Delta V}$
0	3,99	0	0	0
0,5	4,02	0,03	0,5	8,04
1	4,19	0,17	0,5	8,38
1,5	4,46	0,27	0,5	8,92
2	4,64	0,18	0,5	9,28
2,5	4,8	0,16	0,5	9,6
3	4,92	0,12	0,5	9,84
3,5	5,02	0,1	0,5	10,04
4	5,14	0,12	0,5	10,28
4,5	5,28	0,14	0,5	10,56
5	5,38	0,1	0,5	10,76
5,5	5,49	0,11	0,5	10,98
6	5,6	0,11	0,5	11,2
6,5	5,76	0,16	0,5	11,52
7	5,93	0,17	0,5	11,86
7,5	6,15	0,22	0,5	12,3
8	6,63	0,48	0,5	13,26
8,5	8,8	2,17	0,5	17,6
9,2	10,14	1,34	0,7	14,48571429
9,5	10,3	0,16	0,3	34,33333333
10	10,52	0,22	0,5	21,04
10,5	10,65	0,13	0,5	21,3
11	10,79	0,14	0,5	21,58
11,5	10,9	0,11	0,5	21,8
12,5	10,95	0,05	1	10,95



Παρ

ατηρούμε ότι το ισοδύναμο σημείο για το διάλυμα μεθανόλης 30%, βρίσκεται στα 9,5 ml NaOH, διότι ο λόγος  $\frac{\Delta pH}{\Delta V} = \max = 34,3$ . Άρα στον όγκο  $V/2 = 4,75$  ml NaOH του ισοδύναμου σημείου βρίσκεται η ζητούμενη τιμή  $pK_a = 5,33$ . Μαζί με τη διόρθωση του συντελεστή  $\delta$ , η καινούργια τιμή  $pK_a' = pK_a - \delta = 5,33 - 0,05 = 5,28$ .

Ο συντελεστής  $\delta$  υπολογίζεται ως εξής :

Πρώτα υπολογίζουμε το κλάσμα  $\Phi$  της μεθανόλης στο διάλυμα για το 1/2 του ισοδύναμου σημείου

$$\Phi_{\text{meOH}} = \frac{V_{\text{meOH}}}{\sum V_i} = \frac{V_{\text{meOH}}}{V_{\text{H}_2\text{O}} + V_{\text{NaOH}} + V_{\text{meOH}}} = 0,3$$

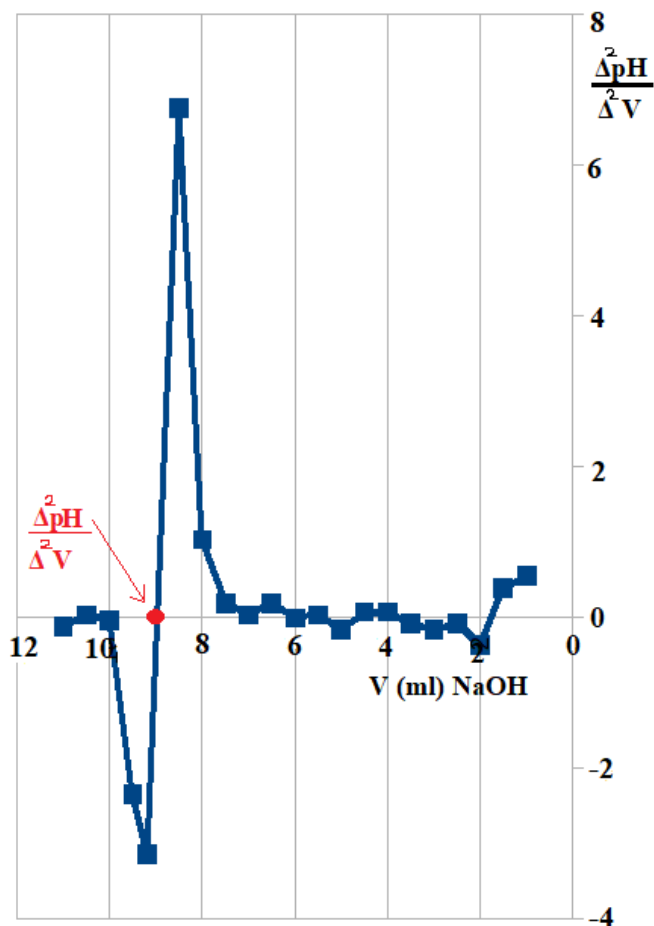
όπου  $V_i$  όγκος κάθε συστατικού πριν την ογκομέτρηση  
έπειτα βρίσκουμε το  $\delta$  από την εμπειρική εξίσωση που ισχύει για τα υδατικά διαλύματα της μεθανόλης

$$\delta = \frac{(0,09 \cdot \Phi - 0,11 \cdot \Phi^2)}{(1 - 3,15 \cdot \Phi + 3,51 \cdot \Phi^2 - 1,53 \cdot \Phi^3)} = 0,05$$

## 2η παράγωγος

Για το υδατικό διάλυμα μεθανόλης 30%

$\Delta(\Delta pH/\Delta V)$	$\Delta(\Delta pH/\Delta V) / \Delta V$	V	pH
		0	3,99
		0,5	4,02
0,28	0,56	1	4,19
0,2	0,4	1,5	4,46
-0,18	-0,36	2	4,64
-0,04	-0,08	2,5	4,8
-0,08	-0,16	3	4,92
-0,04	-0,08	3,5	5,02
0,04	0,08	4	5,14
0,04	0,08	4,5	5,28
-0,08	-0,16	5	5,38
0,02	0,04	5,5	5,49
-1,77636E-15	-3,55271E-15	6	5,6
0,1	0,2	6,5	5,76
0,02	0,04	7	5,93
0,1	0,2	7,5	6,15
0,52	1,04	8	6,63
3,38	6,76	8,5	8,8
-2,197142857	-3,13877551	9,2	10,3
-1,867857143	-2,334821429	10	10,52
-0,015	-0,03	10,5	10,65
0,02	0,04	11	10,79
-0,06	-0,12	11,5	10,9



Παρατηρούμε ότι το ισοδύναμο σημείο για το διάλυμα

μεθανόλης 30%, βρίσκεται περίπου στα 9 ml NaOH, διότι ο λόγος  $\Delta(\Delta pH/\Delta V) / \Delta V = 0$ .

Άρα στον όγκο  $V/2 = 4,5$  ml NaOH του ισοδύναμου σημείου βρίσκεται η ζητούμενη τιμή  $pka = 5,28$ .

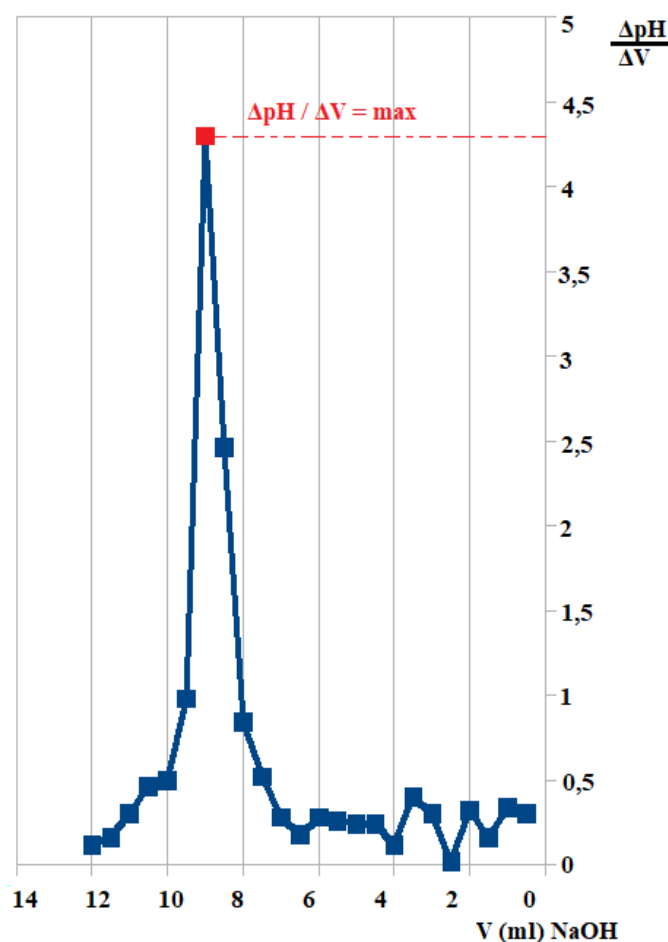
Μαζί με τη διόρθωση του συντελεστή  $\delta$ .

η καινούργια τιμή  $pka' = pka - \delta = 5,28 - 0,05 = 5,23$ .

## 1η παράγωγος

Για το υδατικό διάλυμα μεθανόλης 15%

V	pH	$\Delta V$	$\Delta pH$	$\frac{\Delta pH}{\Delta V}$
0	3,78	0	0	
0,5	3,93	0,5	0,15	0,3
1	4,1	0,5	0,17	0,34
1,5	4,18	0,5	0,08	0,16
2	4,34	0,5	0,16	0,32
2,5	4,35	0,5	0,01	0,02
3	4,5	0,5	0,15	0,3
3,5	4,7	0,5	0,2	0,4
4	4,76	0,5	0,06	0,12
4,5	4,88	0,5	0,12	0,24
5	5	0,5	0,12	0,24
5,5	5,13	0,5	0,13	0,26
6	5,27	0,5	0,14	0,28
6,5	5,36	0,5	0,09	0,18
7	5,5	0,5	0,14	0,28
7,5	5,76	0,5	0,26	0,52
8	6,18	0,5	0,42	0,84
8,5	7,41	0,5	1,23	2,46
9	9,56	0,5	2,15	4,3
9,5	10,05	0,5	0,49	0,98
10	10,3	0,5	0,25	0,5
10,5	10,53	0,5	0,23	0,46
11	10,68	0,5	0,15	0,3
11,5	10,76	0,5	0,08	0,16
12	10,82	0,5	0,06	0,12



Παρατηρούμε ότι το ισοδύναμο σημείο για το διάλυμα μεθανόλης 15%, βρίσκεται στα 9 ml NaOH, διότι ο λόγος  $\Delta pH / \Delta V = \max = 4,3$ . Άρα στον όγκο  $V / 2 = 4,5$  ml NaOH του ισοδύναμου σημείου βρίσκεται η ζητούμενη τιμή  $pka = 4,88$ . Μαζί με τη διόρθωση του συντελεστή  $\delta$ , η καινούργια τιμή  $pka' = pka - \delta = 4,88 - 0,02 = 4,86$ .

Ο συντελεστής  $\delta$  υπολογίζεται ως εξής :

Πρώτα υπολογίζουμε το κλάσμα  $\Phi$  της μεθανόλης στο διάλυμα για το 1/2 του ισοδύναμου σημείου

$$\Phi_{\text{meOH}} = \frac{V_{\text{meOH}}}{\sum V_i} = \frac{V_{\text{meOH}}}{V_{\text{H}_2\text{O}} + V_{\text{NaOH}} + V_{\text{meOH}}} = 0,15$$

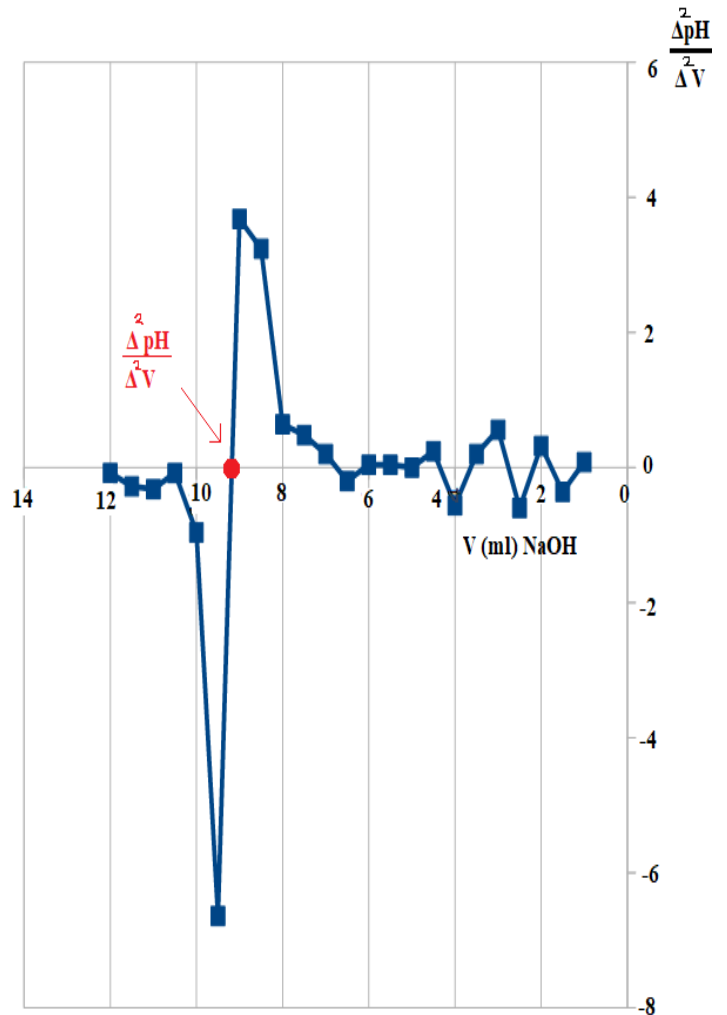
όπου  $V_i$  όγκος κάθε συστατικού πριν την ογκομέτρηση  
έπειτα βρίσκουμε το  $\delta$  απο την εμπειρική εξίσωση που ισχύει για τα υδατικά διαλύματα της μεθανόλης

$$\delta = (0,09 * \Phi - 0,11 * \Phi^2) / (1 - 3,15 * \Phi + 3,51 * \Phi^2 - 1,53 * \Phi^3) = 0,02$$

## 2η παράγωγος

Για το υδατικό διάλυμα μεθανόλης 15%

$\Delta(\Delta pH/\Delta V)$	$\Delta(\Delta pH/\Delta V) / V$	V	pH
		0	3,78
		0,5	3,93
0,04	0,08	1	4,1
-0,18	-0,36	1,5	4,18
0,16	0,32	2	4,34
-0,3	-0,6	2,5	4,35
0,28	0,56	3	4,5
0,1	0,2	3,5	4,7
-0,28	-0,56	4	4,76
0,12	0,24	4,5	4,88
0	0	5	5
0,02	0,04	5,5	5,13
0,02	0,04	6	5,27
-0,1	-0,2	6,5	5,36
0,1	0,2	7	5,5
0,24	0,48	7,5	5,76
0,32	0,64	8	6,18
1,62	3,24	8,5	7,41
1,84	3,68	9	9,56
-3,32	-6,64	9,5	10,05
-0,48	-0,96	10	10,3
-0,04	-0,08	10,5	10,53
-0,16	-0,32	11	10,68
-0,14	-0,28	11,5	10,76
-0,04	-0,08	12	10,82



Παρατηρούμε ότι το ισοδύναμο σημείο για το διάλυμα μεθανόλης 15%, βρίσκεται περίπου στα 9,2 ml NaOH, διότι ο λόγος  $\Delta(\Delta pH/\Delta V) / \Delta V = 0$ .

Άρα στον όγκο  $V/2 = 4,6$  ml NaOH του ισοδύναμου σημείου βρίσκεται η ζητούμενη τιμή  $pka = 4,89$ .

Μαζί με τη διόρθωση του συντελεστή  $\delta$ , η καινούργια τιμή  $pka' = pka - \delta = 4,89 - 0,02 = 4,87$ .

Οι τιμές  $pka = 4,86$  και  $4,87$  του ΙΑΑ για υδατικό διάλυμα μεθανόλης 15% είναι πολύ κοντά με αυτή του Merck Index όπου  $pka = 4,7$

## 9. Μελέτη συμπλόκων τρισθενούς σιδήρου με IAA

### 9.1 Μελέτη σχηματισμού συμπλόκων συναρτήσει του χρόνου και του $\text{HClO}_4^-$

Για τη λήψη φασμάτων, πραγματοποιήθηκε το εξής πείραμα :

#### ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Για τη παρασκευή του αντιδραστηρίου Gordon-Weber :

Παρασκευάστηκαν 10 ml  $\text{HClO}_4^-$  35 % , από αραιώση 5 ml  $\text{HClO}_4^-$  70% σε νερό.

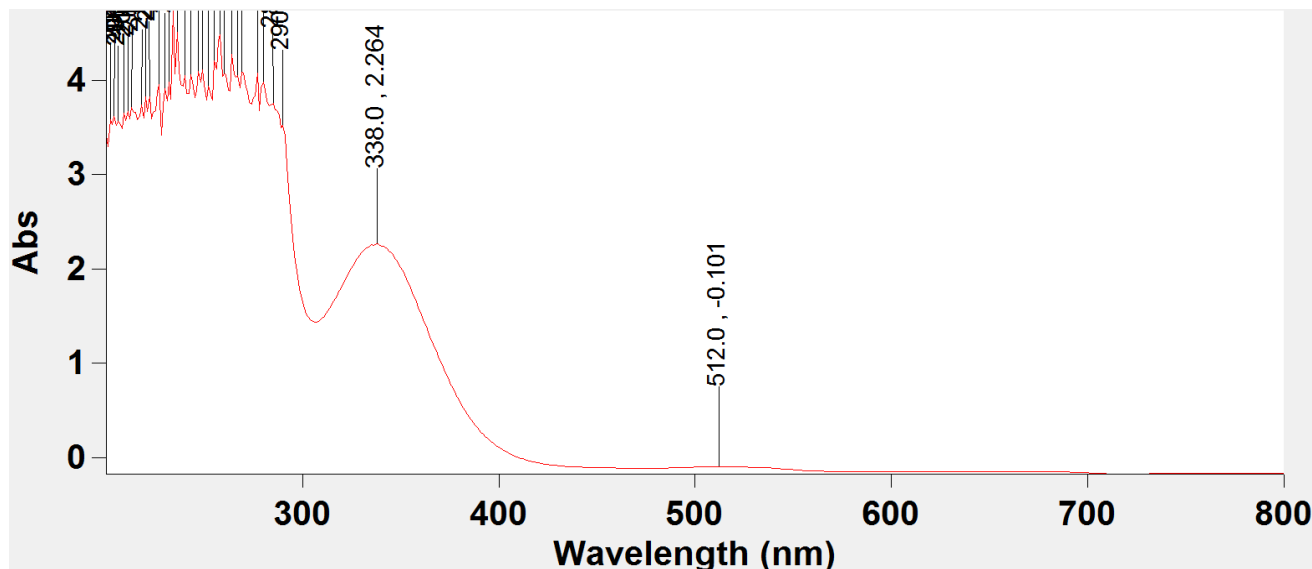
Παρασκευάστηκε δ/μα 10 ml, τριγλωριούχου σιδήρου 0,5 M σε νερό.

Παρασκευάστηκε δ/μα ίνδολο-3-οξικού οξέος  $10^{-2}$  M σε ακετονιτρίλιο.

Σε κυψελίδα αναμείχθηκαν 130 μl ίνδολο-3-οξικού οξέος με 100 μl υδατικού διαλύματος τριγλωριούχου σιδήρου. Ο υπόλοιπος όγκος της κυψελίδας συμπληρώθηκε με 1,8 ml ακετονιτρίλιο και 1,4 ml νερό.

Έπειτα λήφθηκαν φάσματα, με προσθήκη 600 μl  $\text{HClO}_4^-$  (φάσμα 13),  
700 μl  $\text{HClO}_4^-$  (φάσμα 14), και 800 μl  $\text{HClO}_4^-$  (φάσμα 15) .

Τέλος λήφθηκαν φάσματα μετά απο 25 min (φάσμα 16) και μετά απο 1 h (φάσμα 17) , μετά τη προσθήκη των 800 μl  $\text{HClO}_4^-$  .

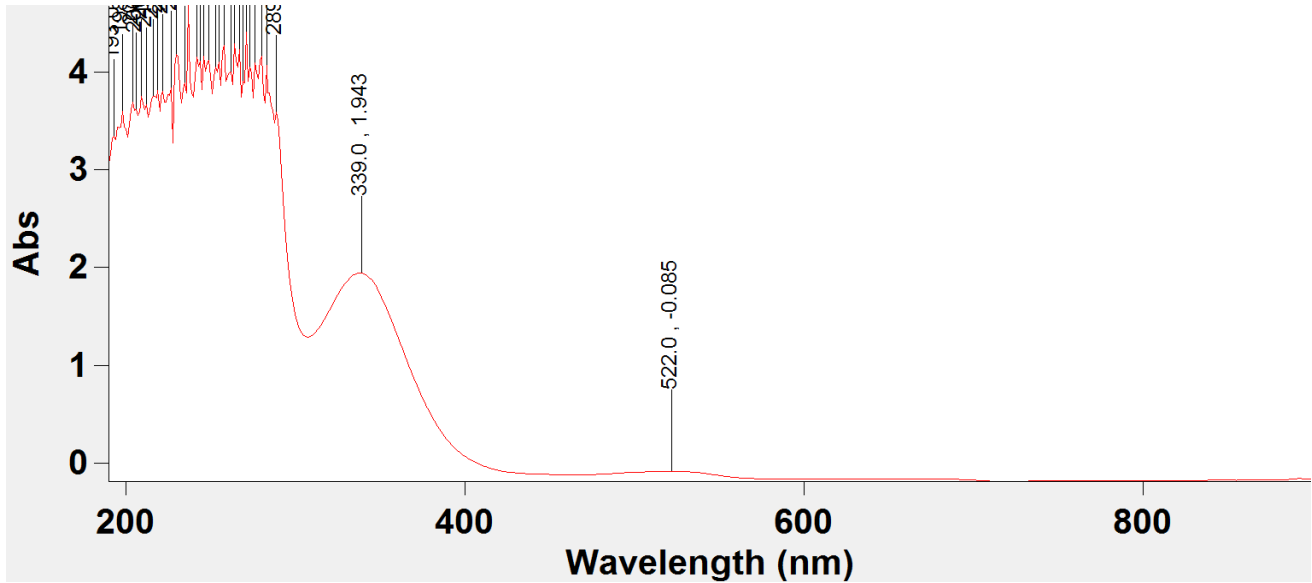


#### ΦΑΣΜΑ 13 : Η αντίδραση συμπλοκοποίησης με προσθήκη 600 μl $\text{HClO}_4^-$

Παρατηρούμε σε όλα τα φάσματα (13 έως 16) την κορυφή στα 338 nm, όπως και στο φάσμα του tris-indole acetato-iron (βλ σχ 5) . Η διαφορά με το φάσμα του tris-indole-acetato-iron είναι ότι στα φάσματα του πειράματος δεν παρατηρείται καθαρά η ζώνη του δακτυλικού αποτυπώματος στα 250-320 nm.

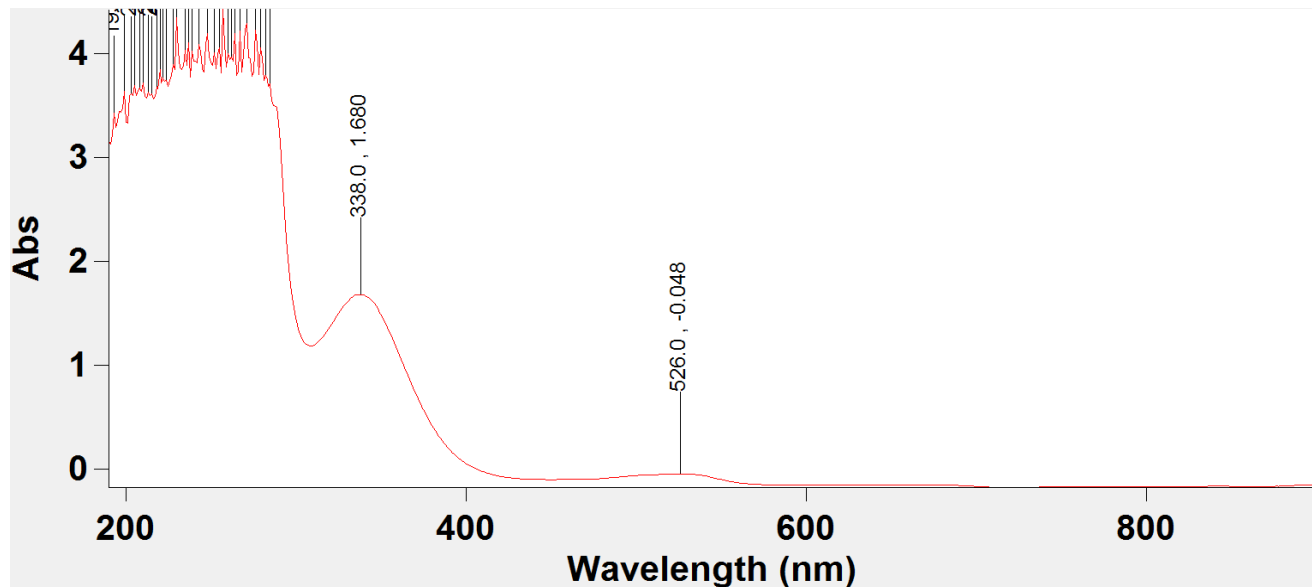
Ακόμη παρατηρούμε ότι η ποσότητα 600 μl  $\text{HClO}_4^-$  , δεν είναι ικανή για το σχηματισμό συμπλόκου, αφού έχουμε αρνητική απορρόφηση 0.101 Abs στα 512 nm. Το φάσμα του tris-indole-acetato-iron παρατίθεται στη παραγράφο 3.3.2





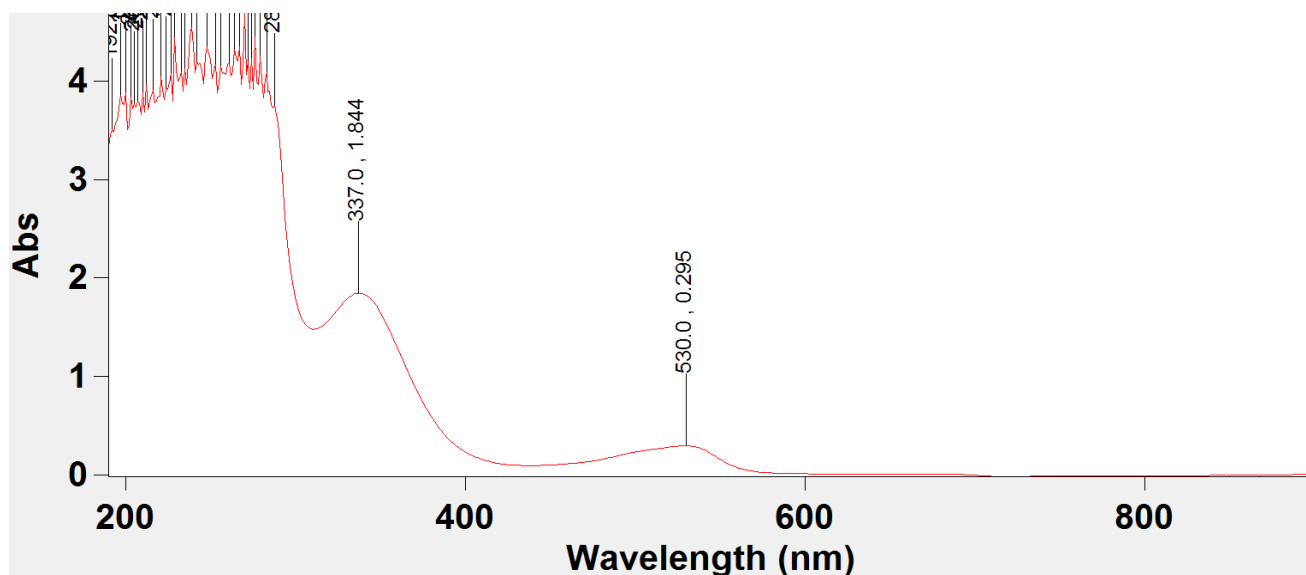
**ΦΑΣΜΑ 14 :** Η αντίδραση συμπλοκοποίησης με προσθήκη 700 μl  $\text{HClO}_4^-$

Παρατηρούμε ότι η ποσότητα 700 μl  $\text{HClO}_4^-$ , δεν είναι ικανή για το σχηματισμό συμπλόκου, αφού έχουμε αρνητική απορρόφηση -0.085 Abs στα 522 nm.



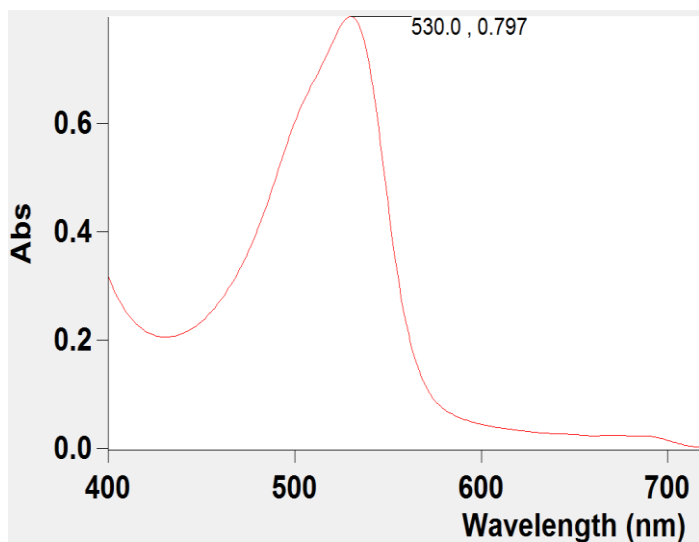
**ΦΑΣΜΑ 15 :** Η αντίδραση συμπλοκοποίησης με προσθήκη 800 μl  $\text{HClO}_4^-$

Παρατηρούμε ότι η ποσότητα 800 μl  $\text{HClO}_4^-$ , πλησιάζει το σχηματισμό συμπλόκου, αφού έχουμε μεγαλύτερη απορρόφηση -0.048 Abs στα 526 nm που είναι αρκετά κοντά στα 530 nm.



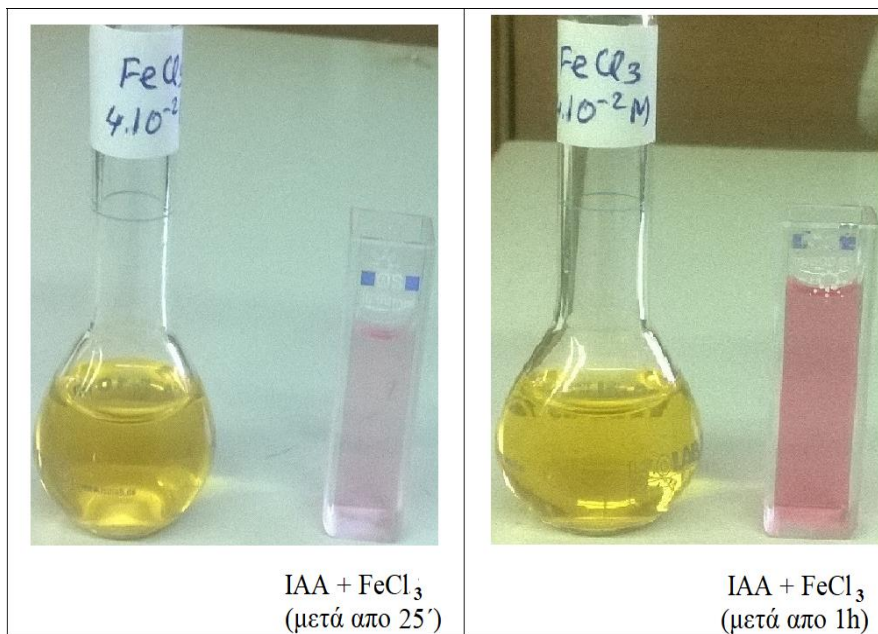
**ΦΑΣΜΑ 16 :** Η αντίδραση συμπλοκοποίησης με προσθήκη 800 μl μετά απο 25 λεπτά

Παρατηρούμε ότι εκτός από τη ποσότητα του  $\text{HClO}_4^-$ , αναγκαία συνθήκη είναι και ο χρόνος για το σχηματισμό συμπλόκου. Πράγματι μετά από 25 λεπτά απο τη προσθήκη 800 μl υπερχλωρικού έχουμε θετική απορρόφηση, 0,295 και μέγιστο 530 nm.



**ΦΑΣΜΑ 17 :** Η αντίδραση συμπλοκοποίησης με προσθήκη 800 μl μετά από 1 ώρα

Μετά από 1 ώρα απο τη προσθήκη 800 μl υπερχλωρικού έχουμε πολύ υψηλότερη απορρόφηση ( 0,797 Abs) εν σχέσει με την απορρόφηση μετά από 25 λεπτά (0,295) στα 530 nm. Αυτό φαίνεται και από τη φωτο 2, όπου παρατίθεται το υδατικό διάλυμα μετάλλου καθώς και το διάλυμα του σιδήρου-υπερχλωρικού μαζί με ίνδολο-3-οξικό οξύ μετά απο 25 λεπτά και μετά απο 1 ώρα. Παρατηρούμε ότι μετά απο 1 ώρα το διάλυμα είναι κατά πολύ σκουρότερο, εν σχέσει μετά απο 25 λεπτά.



**Φωτό 2 :** Δ/μα τριχλωριούχου σιδήρου, και η αντίδραση του με το ίνδολο-3-οξικό οξύ παρουσία  $\text{HClO}_4^-$ , μετά από 25 λεπτά και μετά απο 1 ώρα.

## 9.2 Συμπλοκομετρία με τη μέθοδο του γραμμομοριακού λόγου

Όπως ήδη αναφέρθηκε στην ενότητα 6 του θεωρητικού μέρους, μπορεί να γίνει μελέτη της στοιχειομετρικής αναλογίας υποκαταστάτη (L) - μετάλλου (M) ενός συμπλόκου με τη μέθοδο του γραμμομοριακού λόγου.

Στη μέθοδο αυτή γίνεται παρασκευή διαλυμάτων όπου η ποσότητα του μετάλλου μένει σταθέρη ενώ του υποκαταστάτη μεταβάλλεται. Ακολουθούν οι μετρήσεις των τιμών απορρόφησης στο φωτόμετρο για κάθε διάλυμα και κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς.

Απο το στοιχειομετρικό σημείο εκεί δηλ που κυρτώνει η καμπύλη, υπολογίζεται γραφικά η αναλογία L : M.

### ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Δ/ΜΑ Α :

100  $\mu\text{l}$   $\text{Fe}^{3+}$   $10^{-2}$  M, 3000  $\mu\text{l}$   $\text{HClO}_4^-$  35 %, 250  $\mu\text{l}$  ακετονιτρίλιο, 50  $\mu\text{l}$  IAA  $10^{-2}$  M

Δ/ΜΑ Β :

100  $\mu\text{l}$   $\text{Fe}^{3+}$   $10^{-2}$  M, 3000  $\mu\text{l}$   $\text{HClO}_4^-$  35 %, 200  $\mu\text{l}$  ακετονιτρίλιο, 100  $\mu\text{l}$  IAA  $10^{-2}$  M

Δ/ΜΑ Γ :

100  $\mu\text{l}$   $\text{Fe}^{3+}$   $10^{-2}$  M, 3000  $\mu\text{l}$   $\text{HClO}_4^-$  35 %, 150  $\mu\text{l}$  ακετονιτρίλιο, 150  $\mu\text{l}$  IAA  $10^{-2}$  M

Δ/ΜΑ Δ :

100  $\mu\text{l}$   $\text{Fe}^{3+}$   $10^{-2}$  M, 3000  $\mu\text{l}$   $\text{HClO}_4^-$  35 %, 100  $\mu\text{l}$  ακετονιτρίλιο, 200  $\mu\text{l}$  IAA  $10^{-2}$  M

Δ/ΜΑ Ε :

100  $\mu\text{l}$   $\text{Fe}^{3+}$   $10^{-2}$  M, 3000  $\mu\text{l}$   $\text{HClO}_4^-$  35 %, 50  $\mu\text{l}$  ακετονιτρίλιο, 250  $\mu\text{l}$  IAA  $10^{-2}$  M

Δ/ΜΑ ΣΤ :

100  $\mu\text{l}$   $\text{Fe}^{3+}$   $10^{-2}$  M, 3000  $\mu\text{l}$   $\text{HClO}_4^-$  35 %, -  $\mu\text{l}$  ακετονιτρίλιο, 300  $\mu\text{l}$  IAA  $10^{-2}$  M

Σε κάθε δ/μα κρατάμε σταθερό τον όγκο του μετάλλου στα 100 μl, και αυξάνουμε τον όγκο του υποκαταστάτη στα 50 μl κάθε φορά, από διαλύματα stock γνωστής συγκέντρωσης.

Τα διαλύματα αυτά είναι τριχλωριούχος σίδηρος  $10^{-2}$  M σε νερό, και διάλυμα ίνδολο-3-οξικού οξέος  $10^{-2}$  M σε ακετονιτρίλιο.

Ο όγκος του υπερχλωρικού οξέος είναι σταθερός στα 3000 μl, τέλος συμπληρώνουμε τον υπόλοιπο όγκο με ακετονιτρίλιο.

## ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Απο τη καμπύλη αναφοράς με άξονα των τεταγμένων τις απορρόφησεις (Abs) και άξονα τετμημένων τον γραμμομοριακό λόγο ligand / μετάλλου (εδώ IAA/Fe<sup>3+</sup>), μπορεί να υπολογισθεί γραφικά η στοιχειομετρική αναλογία ligand : μέταλλο.

Πριν τη χάραξη της συμπλοκομετρικής καμπύλης πρέπει να υπολογισθούν τα moles του μετάλλου και του ligand, και μετά διαιρώντας τα, παίρνουμε τη τιμή του γραμμομοριακού λόγου.

- Η ποσότητα του σιδήρου μένει σταθερή σε όλα τα διαλύματα και είναι  
 $n = c \cdot v = 10^{-2} \text{ M} \cdot 100 \text{ μl} = 10^{-6} \text{ moles}$

- Η ποσότητα του ίνδολο-3-οξικού οξέος μεταβάλλεται σε κάθε διάλυμα :

$$\Delta/\mu\alpha \text{ A} : n = c \cdot v = 10^{-2} \text{ M} \cdot 50 \text{ μl} = 5 \cdot 10^{-7}$$

$$\Delta/\mu\alpha \text{ B} : n = c \cdot v = 10^{-2} \text{ M} \cdot 100 \text{ μl} = 10^{-6}$$

$$\Delta/\mu\alpha \text{ Γ} : n = c \cdot v = 10^{-2} \text{ M} \cdot 150 \text{ μl} = 1,5 \cdot 10^{-6}$$

$$\Delta/\mu\alpha \text{ Δ} : n = c \cdot v = 10^{-2} \text{ M} \cdot 200 \text{ μl} = 2 \cdot 10^{-6}$$

$$\Delta/\mu\alpha \text{ E} : n = c \cdot v = 10^{-2} \text{ M} \cdot 250 \text{ μl} = 2,5 \cdot 10^{-6}$$

$$\Delta/\mu\alpha \text{ ΣΤ} : n = c \cdot v = 10^{-2} \text{ M} \cdot 300 \text{ μl} = 3 \cdot 10^{-6}$$

- Ο γραμμομοριακός λόγος είναι ο λόγος των moles του IAA προς τα moles του σιδήρου :

$$\Delta/\mu\alpha \text{ A} : \text{Γρ. Λόγος} = 5 \cdot 10^{-7} / 10^{-6} = 0,5$$

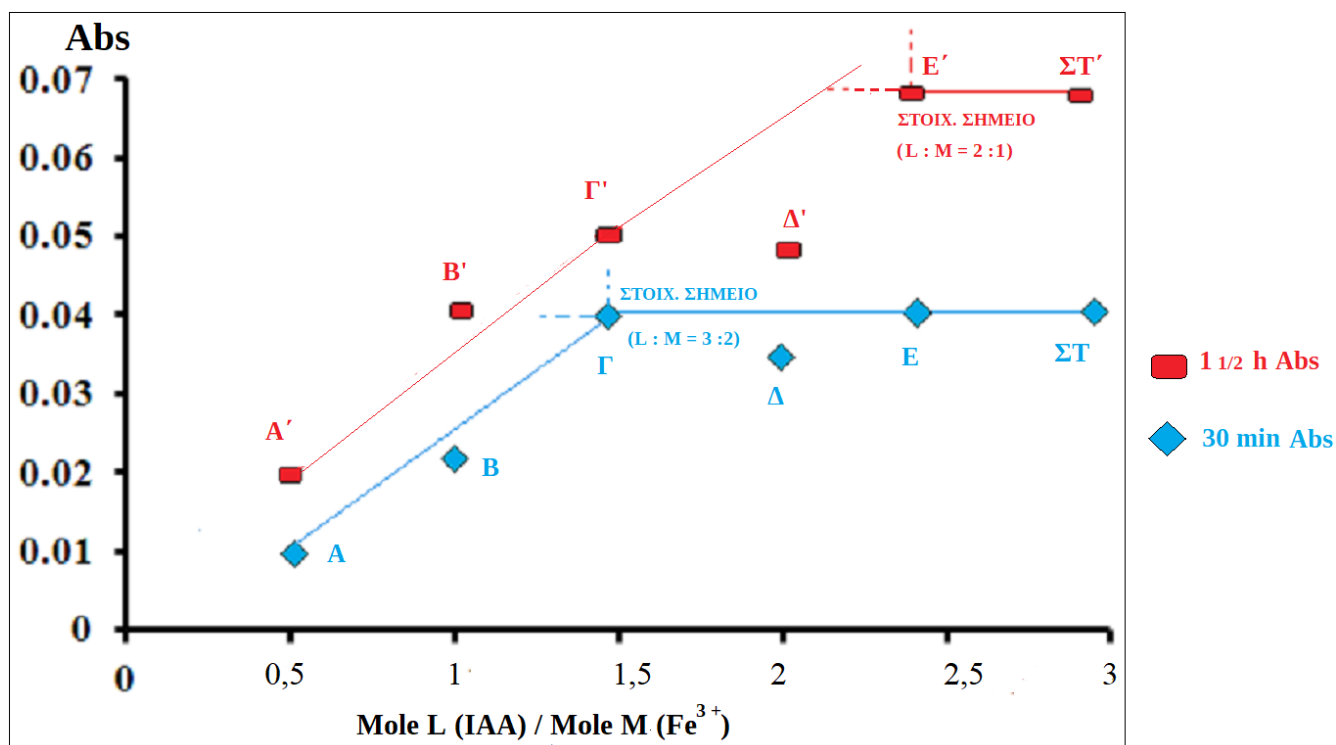
$$\Delta/\mu\alpha \text{ B} : \text{Γρ. Λόγος} = 10^{-6} / 10^{-6} = 1$$

$$\Delta/\mu\alpha \text{ Γ} : \text{Γρ. Λόγος} = 1,5 \cdot 10^{-6} / 10^{-6} = 1,5$$

$$\Delta/\mu\alpha \text{ Δ} : \text{Γρ. Λόγος} = 2 \cdot 10^{-6} / 10^{-6} = 2$$

$$\Delta/\mu\alpha \text{ E} : \text{Γρ. Λόγος} = 2,5 \cdot 10^{-6} / 10^{-6} = 2,5$$

$$\Delta/\mu\alpha \text{ ΣΤ} : \text{Γρ. Λόγος} = 3 \cdot 10^{-6} / 10^{-6} = 3$$



**Σχήμα 18 :** Καμπύλη αναφοράς για το σύμπλοκο της αντίδρασης Salkowski στα 30 min και 1<sup>1/2</sup> h.

Από τις καμπύλες αναφοράς παρατηρούμε ότι η στοιχειομετρική αναλογία υποκαταστάτη (L) – μετάλλου (M) του συμπλόκου είναι 3 : 2 στα 30 λεπτά , και 2 : 1 στη μιάμιση ώρα.

Στα 30 λεπτά ο γραμμομοριακός λόγος είναι 1,5 ενώ στη 1 1/2 h είναι περίπου 2, όπως φαίνεται από τα στοιχειομετρικά σημεία των καμπύλων αναφοράς στο σχήμα 18

Τα σημεία Δ και Δ' εμφανίζουν μικρότερη απορρόφηση από το αναμενόμενο.

Η μικρή απορρόφηση για το Δ' εξηγείται μάλλον από τον σχηματισμό νέων προϊόντων όσο περνάει ο χρόνος με μικρότερες τιμές απορρόφησης.

### 9.3 Προσδιορισμός των ινδολοξέων σε μπρόκολο

Στο φυτικό ιστό, υπάρχουν και φαινολικές ενώσεις οι οποίες μπορούν να δώσουν αντίδραση με τον σίδηρο. Με τον όρο φαινόλες, εννοείται η ομάδα χημικών ενώσεων με υδροξυλομάδα (-OH), προσδεμένη σε αρωματικό δακτύλιο. Οι φαινόλες συντίθενται από τα φυτά ως απόκριση σε μηχανικά τραύματα, προσβολές από μύκητες ή έντομα. Αν και έχουν ομοιότητες με τις αλκοόλες, αποτελούν διαφορετική κατηγορία χημικών ενώσεων.

Το πρόβλημα αυτό μπορεί να ξεπεραστεί με την εκχύλιση του φυτικού ιστού πρώτα με οργανικό διαλύτη μη αναμιξιμο με το νερό και μετά με υδατικό δ/μα ανθρακικού νατρίου  $\text{NaHCO}_3$  2%.

(Πηγή 15) Οι φαινόλες θα διαχωριστούν από τα υπόλοιπα συστατικά του φυτικού εκχυλίσματος και θα παραμείνουν στην οργανική φάση αφού είναι αδιάλυτες σε ανθρακικό νάτριο. Αντίθετα οι καρβοξυλομάδες που είναι διαλυτές σε ανθρακικό νάτριο θα πάνε στην υδατική φάση. Όπως φαίνεται και στη φωτο 3 στην οργανική φάση με οξικό αιθυλεστέρα εγκλωβίζονται οι ουσίες αδιάλυτες στο νερό όπως οι φαινόλες, ενώ στην υδατική φάση με ανθρακικό νάτριο εγκλωβίζονται οι ουσίες διαλυτές στο νερό όπως οι ενώσεις που φέρουν καρβοξυλομάδα, άρα και τα ινδολοξέα.



#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Η διαδικασία εκχύλισης έγινε ως εξής: 10 gr λυοφιλωμένου μπρόκολου τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη και προστέθηκαν 100 ml οξικού αιθυλεστέρα. Έγινε ανάδευση συνολικά για 2 h. Πιο συγκεκριμένα έγινε ανάδευση για 40 λεπτά, και 20 λεπτά λουτρό υπερήχων, δύο φορές. Στο εκχύλισμα προστέθηκαν συνολικά 40 ml υδατικού διαλύματος ανθρακικού νατρίου. Το διάλυμα ανθρακικού νατρίου παρασκευάστηκε από 2 gr  $\text{NaHCO}_3$  και 100 ml νερού.

**Φωτό 3 :**  
Οργανική και υδατική φάση σε φυτικό εκχύλισμα

#### ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- Παρασκευάζεται διάλυμα  $\text{FeCl}_3$  0,5 M, από 812 mg  $\text{FeCl}_3$  τα οποία διαλύονται σε 10 ml νερό.
- Παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα 10 ml  $\text{HClO}_4^-$  35 %, με αραιάωση 5 ml  $\text{HClO}_4^-$  70% στα 10 ml.
- Αναμιγνύονται 10 ml  $\text{HClO}_4^-$  με 0,2 ml  $\text{FeCl}_3$ , το μίγμα αυτό χρησιμοποιείται ως αντιδραστήριο .

#### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το άχρωμο υδατικό εκχύλισμα που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του IAA, απορρόφησε στα 530 nm πριν τη προσθήκη του διαλύματος του  $\text{FeCl}_3\text{-HClO}_4^-$ , παρά την απομάκρυνση των φαινολικών. Προσθήκη του αντιδραστήριου  $\text{FeCl}_3^- \text{HClO}_4^-$  δεν οδήγησε σε ιδιαίτερη αύξηση της απορρόφησης, ούτε παρατηρήθηκε αλλαγή χρώματος.

### III ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κυριότερα συμπεράσματα που μπορούμε να εξάγουμε από αυτή τη μελέτη είναι τα εξής :

A) Όσον αφορά την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη για τη λήψη φάσματος UV και την επίδραση των παραγόντων pH και συγκέντρωση του αναλύτη (ίνδολο-3-οξικού οξέος)

1) Για τη μελέτη του φάσματος του ίνδολο-3-οξικού οξέος στο UV, καλύτερη επιλογή αποτελεί το ακετονιτρίλιο και όχι η αιθανόλη. Η αιθανόλη έχει μεγαλύτερη τιμή UV cutoff (210 nm) από ότι το ακετονιτρίλιο (190 nm). Ως αποτέλεσμα δεν μπορούμε να δούμε την ζώνη απορρόφησης Ba με μέγιστο απορρόφησης τα 193 nm. Η ζώνη αυτή έγινε ορατή σε όξινες συνθήκες σε συγκέντρωση HCl 0,1 M, με διαλύτη το ακετονιτρίλιο και IAA  $10^{-5}$  M. Ακόμη η ζώνη αυτή έγινε ορατή σε διάλυμα IAA  $10^{-4}$  M σε ακετονιτρίλιο. (βλ. Πίνακα 2 και φάσματα 9, 12 ).

2) Τα μέγιστα απορρόφησης του φάσματος του ίνδολο-3-οξικού οξέος μετατοπίζονται ελαφρώς προς τα δεξιά σε βασικές συνθήκες (βαθυχρωμία), και ελαφρώς προς τα αριστερά σε όξινες συνθήκες απορρόφησης (υψηχρωμία).

3) Ο ώμος στα 289 nm δεν εμφανίζεται σε όξινες και βασικές συνθήκες.

4) Σε πυκνότερη συγκέντρωση ( $10^{-4}$  M αντί για  $10^{-5}$  M) η εικόνα του φάσματος εξακολουθεί να είναι ικανοποιητική. Η μόνη διαφορά είναι ότι εκτός από τη ζώνη απορρόφησης Ba (193 nm) στη ζώνη απορρόφησης Bb εμφανίζονται δύο μέγιστα απορρόφησης (215 nm, 222 nm).

B) Γίνεται προσδιορισμός του ποσοστού μεθανόλης (15%) που απαιτείται σε αραιό υδατικό διάλυμα ώστε η φυσικοχημική σταθερά  $\rho_{ka}$  του ίνδολο-3 οξικού οξέος σε υδρο-οργανικό διάλυμα να είναι ίδια με αυτή που έχει αναφερθεί για οργανικούς διαλύτες. Το ίνδολο-3-οξικό οξύ δεν διαλύεται εύκολα στο νερό.

Γ) Με λήψη φασμάτων UV, βρέθηκε ότι για την αντίδραση ανίχνευσης του ίνδολο-3-οξικού οξέος, κρίσιμη είναι και η συγκέντρωση υπερχλωρικού οξέος, εκτός από τον τρισθενή σίδηρο. Εάν η συγκέντρωση του υπερχλωρικού οξέος είναι πολύ μικρή δύσκολα θα γίνει η αντίδραση. Ακόμη διαπιστώθηκε ότι το προϊόν της αντίδρασης, το οποίο σχηματίζεται στα 530 nm, απορροφά περισσότερο όσο περνάει ο χρόνος, αυτό φαίνεται και από το δ/μα το οποίο γίνεται σκουρότερο, αλλά και από τη τιμή απορρόφησης στο UV στα 530 nm μετά από 1 ώρα. (βλ φωτό 2, φάσματα 16, 17)

Δ) Έγινε προσδιορισμός της στοιχειομετρικής αναλογίας του προϊόντος της αντίδρασης, με τη μέθοδο του γραμμομοριακού λόγου στο φωτόμετρο. Βρέθηκε ότι η αναλογία (M) μετάλλου -(L) υποκαταστάτη είναι 3 : 2 στη μισή ώρα και 2 : 1 στη μιάμιση ώρα. Αυτό εξηγείται διότι όσο περνάει ο χρόνος σχηματίζονται και άλλα προϊόντα με μικρότερες τιμές απορρόφησης. Αλλαγές στις τιμές της αναλογίας όσο περνάει ο χρόνος έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες στη βιβλιογραφία.

E) Προσδιορισμός ίνδολο-3-οξικού οξέος σε εκχύλισμα μπρόκολου, τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην ύπαρξη πολλών ουσιών εντός του φυτικού ιστού, εμποδίζοντας έτσι την αντίδραση ανίχνευσης. Ακόμη πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικές ουσιών, όπως η αυξίνη βρίσκονται σε ίχνη της τάξης των ng ( $10^{-9}$  gr ), εντός του φυτικού ιστού. Έτσι είναι δύσκολη έως αδύνατη η ανίχνευση τους με συμβατικά αντιδραστήρια. Ακόμη οι αυξίνες απαντώνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα αρχικά στάδια ανάπτυξης του φυτού.

**Τελικό συμπέρασμα :** Στη παρούσα διπλωματική έγινε μελέτη του ίνδολο-3-οξικού οξέος με απλές μεθόδους αναλυτικής χημείας. Ακόμη έγινε δοκιμή ανίχνευσης σε φυτικό ιστό μπρόκολου, με αρνητικά αποτελέσματα. Ιδανικά θα μπορούσε να γίνει μια μελέτη σε όλα τα βιολογικά στάδια μονοετών φυτών, ώστε να δούμε μέχρι ποια στάδια του βιολογικού κύκλου υπάρχουν αυξίνες και σε τι ποσότητες στους φυτικούς ιστούς, με απλά αντιδραστήρια, αλλά και με πιο ευαίσθητες μεθόδους. Αυτή η μελέτη αποτελεί αντικείμενο πολυετούς έρευνας, και θα μπορούσε να αποτελέσει θέμα διδακτορικής διατριβής.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Χατζηϊωάννου Π.Θ. Κουπάρης Α.Μ. Ενόργανη ανάλυση
- 2) Θ.Π. Χατζηϊωάννου Α.Κ. Καλοκαιρινού, Μ.Τιμόθεου Ποταμιά Ποσοτική Ανάλυση
- 3) Κατσανός Α. Νίκος, Φυσικοχημεία
- 4) Solon A.Gordon and Robert P.Weber , Colorimetric estimation of indole acetic acid, Plant Physiol. 1951 Jan; 26 (1) : 192-195
- 5) Dejanna Caric, Vladislav Tomisic, Marina Kveder, Nives Galic, Greta Pifat, Volker Magnus, Milan Sosic, Absorption and Fluorescence spectra of ring substituted indole-3-acetic acids Biophysical chemistry II (2004) 247-257,
- 6) B.Andonovski, I. Spirevska and A. Nikolovski, UV study of the protonation of Indole and 3-substituted Indoles in Perchloric acid Media Croatica chemica acta 69 (3) 1201-1213 (1996)
- 7) Mustafa Kellen, Nurullah Sanli, Determination of pka values of some auxins in methanol-water mixtures by reversed phase liquid chromatography and potentiometric methods, J.Braz. Chem. Soc. Vol.20 No1 133-140, 2009
- 8) Xavier Subirats, Marti Roses and Elisabeth Bosch, On the effect of Organic Solvent Composition on the pH of Buffered HPLC Mobile phases and the pka of analytes a review, Separation & Purification Reviews, 36 : 231-255,2007
- 9) A.Kamnev, A.G.Shchelochkov, Petros A.Tarantilis, Moschos G. Polissiou and Yurii D. Perfiliev, Complexation of Indole-3-acetic acid with iron (III) : Influence of Coordination on the  $\pi$ -electronic system of the ligand, Monatshefte fuer Chemie 132,675-681 (2001)
- 10) Krisztina Kovács , Alexander A. Kamnev , Alexei G. Shchelochkov , Ernő Kuzmann , János Mink , Tünde Megyes , Attila Vértes Structure and redox transformations of iron (III) complexes with some Biologically important indole 3-alkanoic acids in aqueous solutions, Chemistry Journal of Moldova, General Industrial and ecological chemistry, 2007,2 (1), 88-9
- 11) Μεθενίτης, Πνευματικάκη, Μητσοπούλου, Ανόργανη Χημεία, εκδόσεις Σταμούλη
- 12) Leroy J.Wade,Οργανική Χημεία εκδόσεις Τζιόλα
- 13) K.Paech, M.V. Tracey Modern Methods of plant analysis, Vol 4, Springer Verlag, 1955
- 14) Merck Index “ An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals”
- 15) Hinsvark, WM. H. Houff, S. H. Wittwer and H. M. Sell  
The extraction and colorimetric estimation of indole-3-acetic acid and its esters in developing corn kernels. February 1954, Plant Physiology.
- 16) Ζιώγας& Μαρκόγλου, Γεωργική Φαρμακολογία
- 17)Edited by William J.Houlihan ,  
Chemistry of heterocyclic compounds, Indoles Wiley, Part one p.20,25
- 18) Augusta University, Medical Illustration techniques  
Methods for determining the composition of complexes in solution, Version 2.6