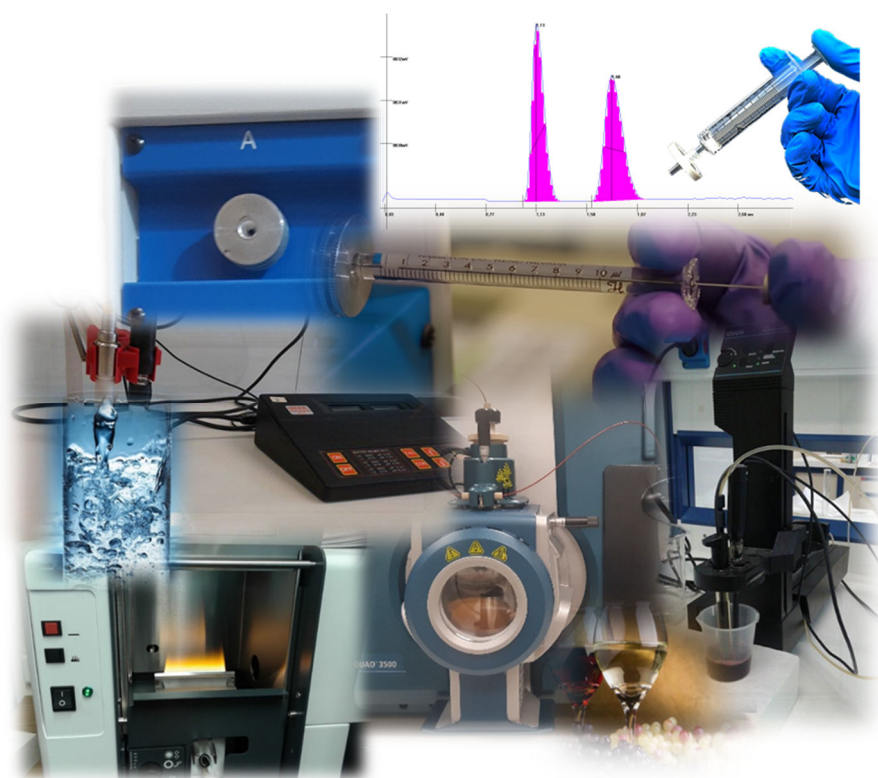


Εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας II

Εργαστηριακές Σημειώσεις & Πειραματικές ασκήσεις



Τμήμα Χημείας
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Γιώργος Κουβαράκης

Γιάννης Σαριδάκης

Νίκος Χανιωτάκης

Σπύρος Περγαντής

Ηράκλειο - 2025

Περιεχόμενα

Γενικές Πληροφορίες	3
Εισηγήσεις.....	9
Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography - GC)	9
1.Κινητή φάση (φέρον αέριο):	9
2.Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector):	10
3.Εσωτερικό πρότυπο (Internal Standard, IS):	12
4.Διαλύτης:	12
5.Αναλυτική στήλη:.....	13
6.Ανιχνευτής	15
7.Καταγραφικό	18
Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC)	19
1.Κινητή φάση:	21
2.Αντλία:	22
3.Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector):	24
4.Στήλη:.....	26
5.Σύστημα καταστολής σήματος:.....	28
6.Ανιχνευτής:	30
7.Καταγραφικό	32
Άσκηση – Αέρια Χρωματογραφία με ανιχνευτή Ιονισμού Φλόγας (GC-FID)	33
Άσκηση – Αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή Θερμικής Αγωγιμότητας (GC-TCD) ..	47
Άσκηση – Υγρή Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (RPLC)	60
Άσκηση – Ιοντική Χρωματογραφία (IC).....	74
Άσκηση – Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης	85
Άσκηση – Προσδιορισμός συγκέντρωσης Φωσφόρου σε ποτά Κόλας	105
Άσκηση – Προσδιορισμός Σχετικής Μοριακής Μάζας (Mr) Πρωτεΐνης με την χρήση Φασματομετρίας Μάζας Ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS)	115
Βιβλιογραφία	130

Γενικές Πληροφορίες

Οι ασκήσεις που πραγματοποιούνται στο πλαίσιο των εργαστηρίων Αναλυτικής Χημείας στοχεύουν στην εξοικείωση των φοιτητών με τη χρήση του εργαστηριακού εξοπλισμού, την οργανολογία και τις μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή χημικών αναλύσεων σε διάφορους τύπους δειγμάτων. Σκοπός είναι η εφαρμογή της διδαχθείσας θεωρίας και η απόκτηση ουσιαστικής εργαστηριακής εμπειρίας. Επιπροσθέτως, καλλιεργείται η ικανότητα επίλυσης συνηθισμένων προβλημάτων που εμφανίζονται στις χημικές αναλύσεις, ενώ παράλληλα επιτυγχάνεται η εξοικείωση των φοιτητών με μεθοδολογίες στατιστικής ανάλυσης, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως για την αξιολόγηση των δειγμάτων.

Οι εργαστηριακές ασκήσεις πραγματοποιούνται σε ομάδες **κυκλικά**, σε συγκεκριμένες ημερομηνίες που καθορίζονται στην αρχή κάθε ακαδημαϊκού εξαμήνου.

Κάθε φοιτητής είναι υποχρεωμένος να διαθέτει το προσωπικό του εργαστηριακό τετράδιο (Lab book) σε κάθε εργαστηριακή άσκηση. Σε αυτό καταγράφονται όλες οι απαραίτητες λεπτομέρειες, που αφορούν την πειραματική μεθοδολογία και τον εξοπλισμό, καθώς και τα αποτελέσματα των αναλύσεων που πραγματοποιούνται.

Μετά το πέρας κάθε εργαστηριακής άσκησης, κάθε ομάδα παραδίδει στον υπεύθυνο του εργαστηρίου πρωτόκολλο, συμπληρωμένο με τα αποτελέσματα που παρήχθησαν στο πλαίσιο της άσκησης.

Παράδειγμα:

Πρωτόκολλο καταγραφής μετρήσεων που χρησιμοποιείται στην εργαστηριακή άσκηση της αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (GC-FID).

GC (FID)

Ημερομηνία:	/ /20
Ομάδα:	

πρότυπο 1		
	time	area
Me-OH		
Et-OH		
ACN		
Pro-OH		
But-OH		

πρότυπο 2		
	time	area
Me-OH		
Et-OH		
ACN		
Pro-OH		
But-OH		

πρότυπο 3		
	time	area
Me-OH		
Et-OH		
ACN		
Pro-OH		
But-OH		

Άγνωστο:

	time	area
1)		
2)		
3)		
4)		
5)		

Ραχή:

	time	area
1)		
2)		
3)		

Ο χρόνος έκλουσης με 2 δεκαδικά
η επιφάνεια ολοκλήρωσης με όλα τα ψηφία

Όνομα	Επίθετο	ΑΜ	Βαθμός

Αέριο	bar
He	
Air	
H ₂	

Άγνωστο	μl
MeOH	
EtOH	
ACN	
ProOH	
ButOH	

Κανόνες συμπεριφοράς και ασφάλειας στο εργαστήριο

Τα εργαστήρια Χημείας, γενικά αποτελούν έναν χώρο με αυξημένο κίνδυνο, στον οποίο είναι δυνατόν να υπάρξει έκθεση σε πληθώρα επικίνδυνων καταστάσεων. Για τον λόγο αυτό, η υιοθέτηση ορθών κανόνων συμπεριφοράς και εργασίας είναι αναγκαία για την ασφαλή παραμονή στον χώρο.

Βασικές αρχές ασφάλειας:

- 1) Αναγνωρίζω του κινδύνους.
- 2) Αξιολογώ και εκτιμώ το μέγεθος των κινδύνων.
- 3) Ελαχιστοποιώ την έκθεση στους κινδύνους.
- 4) Προετοιμάζομαι για την αντιμετώπιση καταστάσεων έκτακτης ανάγκης.

Κατά τη παρουσία των φοιτητών στα Εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας:

- Είναι υποχρεωτική η χρήση της εργαστηριακής ποδιάς, των προστατευτικών γυαλιών και γαντιών.
- Απαγορεύεται το κάπνισμα καθώς και η κατανάλωση τροφίμων και ποτών.
- Απαγορεύεται η χρήση φακών επαφής.
- Οι φοιτητές πρέπει να γνωρίζουν τη θέση του κουτιού πρώτων βοηθειών, των πυροσβεστήρων και των ντους έκτακτης ανάγκης.
- Όλα τα προσωπικά αντικείμενα που δεν είναι απαραίτητα για την άσκηση, φυλάσσονται σε κατάλληλα ράφια εντός του εργαστηρίου.

Κατά τη διεξαγωγή των εργαστηριακών ασκήσεων:

- Η χρήση των οργάνων του εργαστηρίου απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή. Αν υπάρχει οποιαδήποτε αμφιβολία στη λειτουργία τους, απευθυνθείτε στον υπεύθυνο του εργαστηρίου.
- Για τον καθαρισμό των γυάλινων σκευών χρησιμοποιείται νερό βρύσης με κατάλληλο απορρυπαντικό. Το τελικό ξέπλυμα γίνεται **μόνο με απιονισμένο νερό, ποτέ με χαρτί.**
- Όταν είναι απαραίτητο, για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων του απιονισμένου νερού, γίνεται έκπλυση με μικρή ποσότητα του αντιδραστηρίου που θα χρησιμοποιηθεί.
- Όταν απαιτείται ξήρανση των σκευών, γίνεται χρήση του φούρνου. Απαγορεύεται να τοποθετούνται σε αυτόν κλειστά σκεύη ή πλαστικά αντικείμενα. Τα γυαλικά που είναι για ξήρανση να έχουν ξεπλυθεί **μόνο με απιονισμένο νερό και όχι με ακετόνη.**
- Ποτέ δεν επιστρέφεται περίσσεια αντιδραστηρίου στην αρχική φιάλη. Τυχόν περίσσεια απορρίπτεται στο κατάλληλο δοχείο αποβλήτων. Γι' αυτό, πρέπει να λαμβάνονται μόνο οι απαραίτητες ποσότητες.

- Η εργασία με επικίνδυνες, τοξικές, πτητικές και εύφλεκτες ουσίες πρέπει να γίνεται υποχρεωτικά εντός του απαγωγού.
- Το απιονισμένο νερό πρέπει να τοποθετείται στους υδροβολείς. Απαγορεύεται το πλύσιμο σκευών απευθείας από το κεντρικό δοχείο αποθήκευσης.
- Απαγορεύεται η χρήση σιφωνίων με το στόμα. Πρέπει να χρησιμοποιείτε τα κατάλληλα πουάρ.
- Όταν εξαντλείται κάποιο αντιδραστήριο, πρέπει να ενημερώνεται άμεσα ο υπεύθυνος του εργαστηρίου.
- Σε περίπτωση διαρροής αντιδραστηρίου, η περιοχή πρέπει να καθαρίζεται άμεσα και με ασφάλεια.

Μετά το πέρας κάθε εργαστηριακής άσκησης, οι φοιτητές οφείλουν να καθαρίσουν, σύμφωνα με τις υποδείξεις του υπεύθυνου του εργαστηρίου:

- Το χώρο εργασίας τους.
- Τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν.
- Τον εργαστηριακό εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε.

Το τετράδιο εργαστηρίου (Lab Book)

Το τετράδιο του εργαστηρίου αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία για όλους τους πειραματικούς χημικούς, καθώς σε αυτό περιλαμβάνονται όλες οι πληροφορίες σχετικά με το πείραμα που διεξήχθη, με σκοπό τη δυνατότητα αναπαραγωγής στο μέλλον, είτε από τον ίδιο είτε από διαφορετικό πειραματιστή. Είναι ατομικό, συμπληρώνεται πριν τη διεξαγωγή κάθε εργαστηριακής άσκησης, ενώ προστίθεται σε αυτό υλικό καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Το εργαστηριακό τετράδιο πρέπει να έχει **σκληρό εξώφυλλο** ώστε να προστατεύεται στις συνθήκες εργαστηρίου και κατά προτίμηση, να είναι σε **μικρό ή μεσαίο μέγεθος** ώστε να είναι πρακτικό στην χρήση του. Επίσης, δεν πρέπει να **είναι σπирάλ** ώστε να μη αφαιρούνται εύκολα τα φύλλα του.

**Το τετράδιο του εργαστηρίου πρέπει να προορίζεται αποκλειστικά
για τα εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας I και II.**

Το εργαστηριακό τετράδιο πρέπει να περιλαμβάνει τα εξής:

- **Τον τίτλο** της εργαστηριακής άσκησης.
- **Το σκοπό** της εργαστηριακής άσκησης, σε μια σύντομη παράγραφο αναφέρεται συνοπτικά το αντικείμενο και ο στόχος της άσκησης.
- **Θεωρία - οργανολογία:** Συνοπτική παρουσίαση της βασικής θεωρίας και της λειτουργίας κάθε οργάνου/συστήματος με επιγραμματική αναφορά στα επιμέρους τμήματα από τα οποία αποτελείται.
- **Πειραματική διαδικασία:** Αναλυτική περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας, στην οποία περιλαμβάνονται οι παράμετροι των χειρισμού των οργάνων, οι παρασκευές των διαλυμάτων, οι αραιώσεις των προτύπων, καθώς και κάθε άλλο βήμα που πραγματοποιήθηκε και έχει επίδραση στο πείραμα.
- **Αποτελέσματα:** Καταγράφονται όλες οι μετρήσεις και τα αποτελέσματα που παρήχθησαν κατά τη διεξαγωγή της εργαστηριακής άσκησης.

**Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, το Lab Book συμπληρώνεται
με παρατηρήσεις, σχόλια και τυχόν αλλαγές που έγιναν κατά την εκτέλεση της άσκησης.**

Εργαστηριακή αναφορά

Μετά το πέρας κάθε εργαστηριακής άσκησης παραδίδεται λεπτομερής αναφορά των αποτελεσμάτων, η οποία πρέπει να ακολουθεί την παρακάτω δομή:

1. Περίληψη

2. Αντιδραστήρια – Παράμετροι:

- a. Αντιδραστήρια, γυαλικά, σκεύη, κλπ.
- b. Παράμετροι οργάνου (όπου απαιτείται)

3. Πειραματική διαδικασία:

(Περιγραφή πειράματος, δημιουργία διαλυμάτων και αραιώσεων)

4. Αποτελέσματα - Ανάλυση:

- i. Πειραματικές μετρήσεις
- ii. Υπολογισμοί - Στατιστικά - Διαγράμματα

5. Σχόλια - Σφάλματα

6. Συμπεράσματα

7. Βιβλιογραφία

Παράδοση Αναφοράς:

- Η αναφορά υποβάλλεται ανά ομάδα.
- Πρέπει να παραδίδεται **σε ηλεκτρονική μορφή**, σε αρχείο pdf ή word ή με αντίστοιχο πρόγραμμα.
- Η αποστολή γίνεται στο e-mail: gkouvarakis@uoc.gr
με **υποχρεωτική κοινοποίηση** σε όλα τα μέλη της ομάδας.
- Στον τίτλο του mail να πρέπει να αναφέρεται:
 - το **όνομα** της ομάδας
 - και τον **τίτλο** της πειραματικής άσκησης

Αν **οποιοδήποτε από τα παρακάτω** λείπει από το e-mail:

1. Όνομα ομάδας.
2. Τίτλος πειραματικής άσκησης.
3. Κοινοποίηση στα υπόλοιπα μέλη της ομάδας.

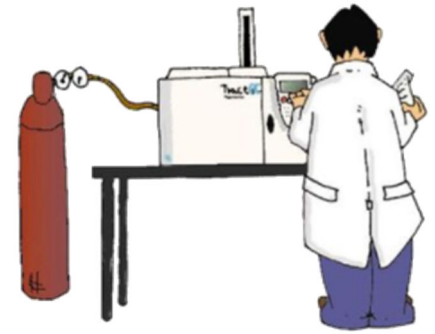
θα έχει επίπτωση στην βαθμολογία της αναφοράς.

- Η καταληκτική ημερομηνία παράδοσης είναι **έως μία (1) εβδομάδα** μετά τη διεξαγωγή κάθε πειραματικής άσκησης.
- **Καθυστερημένη υποβολή** θα επιφέρει **μείωση** της βαθμολογίας:
 - **-1 βαθμός** για κάθε ημέρα καθυστέρησης, έως και 4 ημέρες.
 - **Μετά την 4^η ημέρα**, η αναφορά δεν θα γίνεται αποδεκτή.

Εισηγήσεις

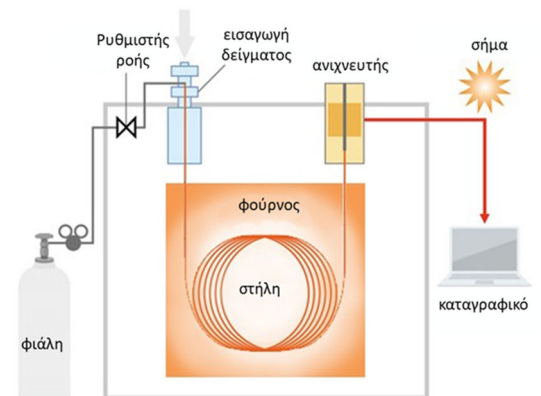
Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography - GC)

Στην αέρια χρωματογραφία τα συστατικά ενός μίγματος διαχωρίζονται λόγω της κατανομής τους μεταξύ μιας κινητής αέριας φάσης και μιας στατικής φάσης και ανιχνεύονται από ένα κατάλληλο ανιχνευτή. Το δείγμα εξατμίζεται αρχικά μέσω ενός εισαγωγέα και εισάγεται στη χρωματογραφική στήλη ως αέριο, με την βοήθεια της ροής ενός αδρανούς αερίου (φέρων αέριο), το οποίο αποτελεί την κινητή φάση. Συνήθως χρησιμοποιούνται τα αέρια άζωτο (N_2), υδρογόνο (H_2), ήλιο (He) ή αργό (Ar).



Τα μέρη ενός αερίου χρωματογράφου είναι παραπλήσια με εκείνα της υγρής χρωματογραφίας με την βασική διαφορά ότι η κινητή φάση είναι ένα αέριο και όχι υγρός διαλύτης. Τα βασικά μέρη ενός αερίου χρωματογράφου είναι:

- 1) Η κινητή φάση
- 2) Το σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector)
- 3) Η αναλυτική στήλη
- 4) Ο ανιχνευτής
- 5) Το καταγραφικό.



1. Κινητή φάση (φέρων αέριο):

Η κινητή φάση είναι ένα αδρανές αέριο υψηλής καθαρότητας, συνήθως άζωτο (N_2), υδρογόνο (H_2), ήλιο (He) ή αργό (Ar), το οποίο βρίσκεται σε φιάλη υψηλής πίεσης.



Οι φιάλες που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως τύπου B50, δηλαδή φιάλες χωρητικότητας 50 λίτρων, στις οποίες το αέριο βρίσκεται σε υψηλή υπό πίεση ~ 200 bar (δηλ. 197.385 atm ή 2900 psi, καθώς 1 atm = 1.013 bar και 1 bar = 14.5 psi). Δεδομένου ότι η πίεση είναι ιδιαίτερα υψηλή, απαιτείται ελεγχόμενη εκτόνωση, η οποία επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός μειωτήρα πίεσης, που συνδέεται στην έξοδο της φιάλης και έχει δύο

μανόμετρα. Η εσωτερική ένδειξη (προς τη φιάλη) καταγράφει την πίεση του αερίου εντός της φιάλης, που αρχικά είναι 200 bar. Καθώς μειώνεται η ποσότητα του αερίου, η ένδειξη πέφτει μέχρι να μηδενιστεί, γεγονός που υποδηλώνει την ανάγκη αντικατάστασης της φιάλης. Η εξωτερική ένδειξη δείχνει τη πίεση εξόδου του αερίου προς

τον χρωματογράφο. Η πίεση εξόδου μπορεί να φτάσει έως και 10 bar και ρυθμίζεται μέσω της κεντρικής βαλβίδας (B) του μειωτήρα. Όταν η ροή του φέροντος αερίου ρυθμίζεται αυτόματα από το λογισμικό του χρωματογράφου, επιλέγεται πίεση εξόδου περίπου $3 - 5$ bar και η ρύθμιση της ροής γίνεται μέσω του συστήματος του οργάνου. Αν ο χρωματογράφος



Φιάλες παροχής αερίων (He , Air, H_2)

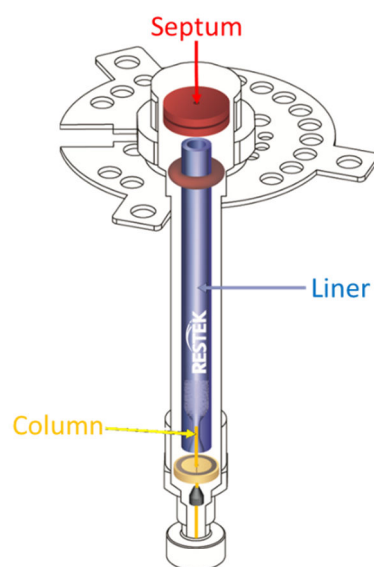
δεν διαθέτει αυτή τη δυνατότητα, τότε η πίεση ρυθμίζεται χειροκίνητα από τη κεντρική βαλβίδα (B) του μειωτήρα και η ροή μετριέται με ροόμετρο στην έξοδο από τον χρωματογράφο, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή τιμή. Πάνω στη φιάλη είναι η κεντρική βαλβίδα (A) που είναι on-off, η οποία δεν ρυθμίζει ροή, απλώς επιτρέπει ή διακόπτει τη ροή του αερίου. Σε ορισμένα μανόμετρα υπάρχει και εξωτερική βαλβίδα (Γ), η οποία επίσης είναι on-off και δεν επηρεάζει τη ρύθμιση της ροής. Κατά το άνοιγμα και το κλείσιμο της λειτουργίας του χρωματογράφου, ανοίγετε και κλείνετε τις βαλβίδες A και Γ χωρίς να μεταβάλλετε τη ρύθμιση της βαλβίδας B, ώστε να διατηρείται σταθερή η ροή του φέροντος αερίου.

Τα αέρια που χρησιμοποιούνται είναι υψηλής καθαρότητας, τόσο για τη προστασία του χρωματογράφου, όσο και για τη διασφάλιση καθαρών σημάτων στον ανιχνευτή. Συνήθως επιλέγονται αέρια με καθαρότητα 5.0 (δηλ. είναι καθαρά κατά 99.999%).

2. Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector):

Υγρό δείγμα, το οποίο αποτελεί μίγμα των ουσιών, εισάγεται αρχικά σε ένα εισαγωγέα (injector) σε υψηλή θερμοκρασία, όπου εξατμίζεται άμεσα και με την βοήθεια του φέροντος αερίου εισάγεται στη στήλη διαχωρισμού.

Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με σύριγγα, η βελόνα της οποίας διαπερνά ένα ελαστικό διάφραγμα (septum) που βρίσκεται στον εισαγωγέα. Το septum έχει την ιδιότητα να μπορεί να τρυπηθεί και να σφραγίζει αεροστεγώς επανειλημμένα, αποτρέποντας διαρροές αερίου. Υπάρχουν τρεις βασικοί τρόποι εισαγωγής, ο καθένας με διαφορετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η επιλογή του κατάλληλου εξαρτάται από τις ενώνεις προς διαχωρισμό, τη στήλη και τον ανιχνευτή που χρησιμοποιούνται.



I. On Column

Το υγρό μίγμα εισάγεται απευθείας μέσα στη στήλη. Αυτό προϋποθέτει ότι η στήλη είναι σχετικά μεγάλης διαμέτρου ώστε να μπορέσει εισχωρήσει η βελόνα της σύριγγας. Εναλλακτικά χρησιμοποιούνται ειδικές σύριγγες με πολύ λεπτή βελόνα. Η αρχή της στήλης τοποθετείται εντός του εισαγωγέα, ώστε να επιτρέπεται η άμεση εισαγωγή του δείγματος.

1. Πλεονεκτήματα

- Υψηλή ευαισθησία, καθώς μεγάλη ποσότητα δείγματος καταλήγει στον ανιχνευτή.
- Ενδείκνυται και για θερμό-ασταθείς ενώσεις, επειδή ο χρόνος παραμονής στις υψηλές θερμοκρασίες του εισαγωγέα είναι περιορισμένος.
- Δημιουργία στενών κορυφών λόγω άμεσης εισαγωγής χωρίς διασπορά.

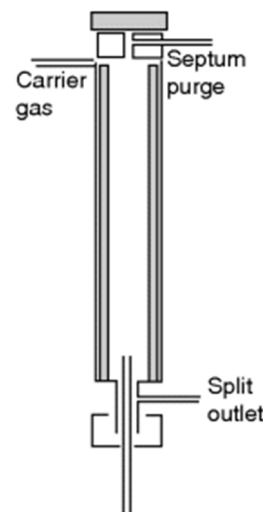
2. Μειονεκτήματα

- Χρησιμοποιείται μόνο για στήλες πλήρωσης και τριχοειδείς με μεγάλη διάμετρο.
- Μικρή διαχωριστική ικανότητα, καθώς η μεγάλη ποσότητα δείγματος μειώνει την απόδοση της στήλης.

II. Split

Το δείγμα εισέρχεται πρώτα σε έναν θάλαμο (liner), όπου εξατμίζεται. Ένα μέρος οδηγείται προς τη στήλη, ενώ το υπόλοιπο αποβάλλεται μέσω της εξόδου split. Το ποσοστό του δείγματος που εισέρχεται στη στήλη καθορίζεται από τη ροή του φέροντος αερίου και τη ροή προς τη βαλβίδα split. Η ροή στο θάλαμο περιλαμβάνει τη ροή που πηγαίνει στη στήλη και τη ροή που πηγαίνει στην βαλβίδα split. Για παράδειγμα,

αν η συνολική ροή είναι 200 mL/min και η ροή προς τη στήλη είναι 1 mL/min, τότε στη στήλη εισέρχεται το 1/200 του δείγματος. Αν εισαχθεί 1 μ l δείγματος, μόνο 0.005 μ l καταλήγει στη στήλη. Αυτή είναι μια πολύ μικρή ποσότητα δείγματος, η οποία είναι σχεδόν αδύνατο να μετρηθεί με σύριγγα υγρών. Ο μόνος εναλλακτικός τρόπος εισαγωγής θα ήταν να γίνει αραιώση του δείγματος πριν την εισαγωγή του, κάτι που είναι οικονομικά δαπανηρό (λόγω των διαλυτών), χρονοβόρο και ενέχει τον κίνδυνο σφαλμάτων κατά τη διαδικασία της αραιώσης.



1. Πλεονεκτήματα

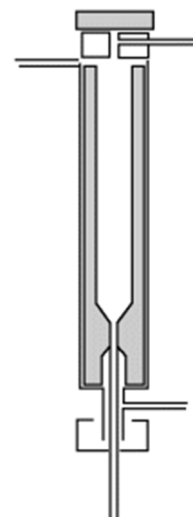
- Υψηλή διαχωριστική ικανότητα, λόγω της μικρής ποσότητας του δείγματος.
- Προστασία της στήλης από υπερφόρτωση.
- Δυνατότητα εισαγωγής δειγμάτων χωρίς προηγούμενη αραιώση.

2. Μειονεκτήματα

- Δεν ενδείκνυται για θερμό-ασταθείς ενώσεις, λόγω παραμονής στον θερμαινόμενο θάλαμο.
- Δημιουργία πεπλατυσμένων κορυφών λόγω αργής μεταφοράς του δείγματος προς τη στήλη.
- Περισσότερο χρόνο στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα, καθώς η στήλη πρέπει να παραμείνει μεγαλύτερο χρόνο στην αρχική θερμοκρασία της.

III. Splitless

Παρόμοια με τη λειτουργία split, Υπάρχει και εδώ ένας θάλαμος (liner) όπου εισάγεται το δείγμα, όμως τώρα η βαλβίδα split είναι κλειστή επομένως όλο το δείγμα εισέρχεται στη στήλη. Η ροή στο θαλάμο είναι χαμηλή και παραπλήσια με αυτή της κινητής φάσης. Η μόνη διαφοροποίηση με την split λειτουργία (εκτός ότι η βαλβίδα split είναι κλειστή και ότι η ροή του θαλάμου είναι μειωμένη) είναι ότι και ο ίδιος ο θάλαμος (liner) είναι διαφορετικός. Η διαφορά είναι ότι ο θάλαμος στο split είναι ανοιχτός στο κάτω μέρος (εικόνα split) ώστε να μπορεί να φεύγει η επιπλέον ροή, ενώ στο splitless είναι στενός στο τελείωμα ώστε να αποφεύγεται διαρροή του δείγματος (εικόνα splitless).



1. Πλεονεκτήματα

- Υψηλή ευαισθησία καθώς σχεδόν όλο το δείγμα καταλήγει στη στήλη.

2. Μειονεκτήματα

- Δεν ενδείκνυται για θερμό-ασταθείς ενώσεις, λόγω παραμονής στον θερμαινόμενο θάλαμο.
- Δημιουργία πεπλατυσμένων κορυφών λόγω αργής μεταφοράς του δείγματος προς τη στήλη.
- Περισσότερο χρόνο στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα, καθώς η στήλη πρέπει να παραμείνει μεγαλύτερο χρόνο στην αρχική θερμοκρασία της.

Ο βασικός λόγος επιλογής της λειτουργίας splitless έναντι της split είναι η ανάλυση αραιών δειγμάτων. Στην περίπτωση του split, πραγματοποιείται επιπλέον αραιώση, με αποτέλεσμα χαμηλό σήμα στον ανιχνευτή. Η λειτουργία του splitless προσομοιάζει με την on column, αφού και στις δύο περιπτώσεις το μεγαλύτερο ποσοστό του δείγματος εισέρχεται στη στήλη. Όμως η αλλαγή από splitless σε on column, απαιτεί την μετακίνηση της στήλης σε υψηλότερη θέση, ώστε να φτάσει η βελόνα της κάτι που είναι χρονοβόρο και μπορεί να προκαλέσει φθορές. Επιπλέον, απαιτείται συμβατότητα της στήλης με την on column λειτουργία (π.χ. επαρκής διάμετρος). Αντίθετα, η μετάβαση από την split σε splitless, είναι απλή και γρήγορη. Απαιτείται μόνο αλλαγή του εσωτερικού θαλάμου (liner) και ρυθμίσεις στο λογισμικό του οργάνου, χωρίς φυσική μετακίνηση της στήλης.

3. Εσωτερικό πρότυπο (Internal Standard, IS):

Ένα σημαντικό πρόβλημα κατά την εισαγωγή δείγματος είναι ότι συνήθως υπάρχουν απώλειες και δεν εισάγεται με ακρίβεια η επιθυμητή ποσότητα στον χρωματογράφο. Αυτό οφείλεται κυρίως στους παρακάτω λόγους.

- Η ποσότητα του δείγματος που λαμβάνεται με τη σύριγγα ενδέχεται να παρουσιάζει σφάλμα, τόσο από την ίδια τη σύριγγα όσο και λόγω του χειριστή.
- Κατά την εισαγωγή του δείγματος στον εισαγωγέα, δημιουργούνται απώλειες.
- Ο ίδιος ο εισαγωγέας κατά τη λειτουργία του μπορεί να προκαλέσει επιπλέον απώλειες.

Ως αποτέλεσμα παρατηρούνται σημαντικές και μη σταθερές απώλειες του δείγματος. Παρ' όλα αυτά, η αέρια χρωματογραφία είναι τεχνική που, εκτός από τον ποιοτικό διαχωρισμό επιτρέπει και ποσοτικό με υψηλή ακρίβεια. Το παραπάνω πρόβλημα αντιμετωπίζεται με τη χρήση εσωτερικού προτύπου (Internal Standard). Ως εσωτερικό πρότυπο επιλέγεται μια ένωση, διαφορετική από τις ουσίες που περιέχει το δείγμα, η οποία προστίθεται σε γνωστή ποσότητα στο δείγμα. Η βασική ιδέα είναι ότι οι απώλειες που θα υποστεί το δείγμα κατά τη διαδικασία εισαγωγής, θα είναι ίδιες και για το εσωτερικό πρότυπο. Έτσι μετρώντας την τελική ποσότητα του εσωτερικού προτύπου, μπορούν να υπολογιστούν οι συνολικές απώλειες του δείγματος.

Παράδειγμα: Η επιφάνεια ολοκλήρωσης της κορυφής του εσωτερικού προτύπου αναμένεται να είναι 100. Αν όμως αντί για 100 μετρηθεί 60, αυτό σημαίνει υπήρξε 40% απώλεια στην ποσότητα του εσωτερικού προτύπου που έφτασε στη στήλη και τελικά στον ανιχνευτή. Συνεπώς, η ίδια απώλεια θεωρείται ότι υπήρξε και στο δείγμα, οπότε με τον τρόπο αυτό το συγκεκριμένο σφάλμα διορθώνεται.

Τα κύρια κριτήρια επιλογής ενός εσωτερικού προτύπου:

- Να μην υπάρχει ήδη στο δείγμα.
- Μια έχει φυσικοχημικές ιδιότητες παραπλήσιες με εκείνες των ουσιών του δείγματος, ώστε με το υπάρχον θερμοκρασιακό πρόγραμμα να εκλούεται μέσα στους επιθυμητούς χρόνους, όχι όμως ταυτόχρονα με τις ουσίες του δείγματος.
- Να δίνει επιφάνεια ολοκλήρωσης παραπλήσια με εκείνη των ενώσεων του δείγματος.
- Να διαλύεται στον διαλύτη που χρησιμοποιείται για το δείγμα.
- Κατά προτίμηση να μην είναι τοξική.
- Κατά προτίμηση να είναι οικονομική.

Όταν σε μια χρωματογραφία χρησιμοποιείται εισαγωγέας με βρόχο (loop) η χρήση εσωτερικού προτύπου για ποσοτική δεν είναι απαραίτητη. Ο λόγος είναι ότι ο βρόχος επιτρέπει την είσοδο σταθερού όγκου δείγματος στον χρωματογράφο, όσο είναι και ο όγκος του βρόχου. Μόνο σε περίπτωση λάθους χειρισμού μπορεί να εισαχθεί διαφορετική ποσότητα. Αν παρ' όλα αυτά χρησιμοποιηθεί εσωτερικό πρότυπο, η επιφάνεια ολοκλήρωσης της κορυφής του θα παραμένει σταθερή (π.χ. 100) αφού θα εισάγεται η ίδια ποσότητα κάθε φορά.

4. Διαλύτης:

Ο διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί για τη διάλυση του δείγματος πρέπει να πληροί τα εξής κριτήρια:

- Να διαλύει πλήρως όλες τις ενώσεις του δείγματος καθώς και το εσωτερικό πρότυπο.
- Να μην αντιδρά χημικά με τις ενώσεις του δείγματος ή το εσωτερικό πρότυπο.
- Να έχει χαμηλό σημείο ζέσεως. Αυτό είναι πολύ σημαντικό ώστε να εκλούεται πρώτος ο διαλύτης (πριν τις ενώσεις του δείγματος) αποφεύγοντας αφενός η επικάλυψη των σημάτων των ενώσεων από το σήμα του διαλύτη και αφετέρου τη φόρτιση της στήλης με μεγάλη ποσότητα, μειώνοντας

έτσι τη διαχωριστική της ικανότητα. Ο διαλύτης χρησιμοποιείται σε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα από τις αναλυόμενες ενώσεις και ως εκ τούτου, δίνει πολύ ισχυρότερο σήμα.

- Κατά προτίμηση, να μην είναι τοξικός.
- Κατά προτίμηση, να είναι οικονομικός.

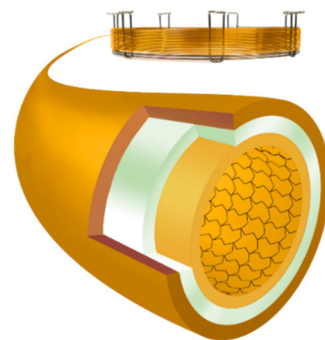
5. Αναλυτική στήλη:

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν στήλες πλήρωσης ή τριχοειδείς στήλες, ανάλογα με το είδος των ενώσεων που αναλύονται και το είδος του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται.

Η στατική φάση της στήλης μπορεί να είναι είτε σε στερεή μορφή, στην περίπτωση της Στερεάς Αέριας Χρωματογραφίας (GSC) είτε σε υγρή μορφή, στην περίπτωση της Υγρής Αέριας Χρωματογραφίας (GLC ή απλά GC). Στη στερεά στατική φάση, ο διαχωρισμός γίνεται μέσω προσρόφησης των ουσιών του μίγματος στην ενεργή επιφάνεια της, ενώ στην υγρή στατική φάση, ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορά των συντελεστών κατανομής κάθε ουσίας του μείγματος μεταξύ της υγρής (στατικής) και αέριας (κινητής) φάσης.

Η υγρή στατική φάση είναι πιο συνηθισμένη στην αέρια χρωματογραφία, λόγω των πλεονεκτημάτων που δίνει η κατανομή των ουσιών μεταξύ υγρής και αέριας φάσης. Όσο μεγαλύτερη η χημική συγγένεια κάθε ουσίας με την υγρή στατική φάση τόσο μεγαλύτερος ο χρόνος κατακράτησής της στη στήλη.

Η στήλη διαχωρισμού βρίσκεται μέσα σε ένα θερμαινόμενο φούρνο, όπου μέσω θερμοκρασιακού προγράμματος, μεταβάλλεται η θερμοκρασία του. Αυτό επηρεάζει τον συντελεστή κατανομής της κάθε ένωσης και κατά συνέπεια, τον χρόνο κατακράτησής της.



Ο διαχωρισμός των ενώσεων βασίζεται κυρίως στα εξής κριτήρια:

- Φορτίο
- Μέγεθος
- Πολικότητα
- Σημείο ζέσεως

Η πολικότητα αποτελεί βασικό κριτήριο επιλογή στήλης, καθώς επηρεάζει άμεσα τον διαχωρισμό. Γενικά ισχύει ότι πολικές στήλες, διαχωρίζουν πολικές ενώσεις και οι μη πολικές στήλες διαχωρίζουν μη πολικές ενώσεις.

Το σημείο ζέσεως των ενώσεων είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για τον σχεδιασμό του κατάλληλου θερμοκρασιακού προγράμματος λειτουργίας του φούρνου του χρωματογράφου, ώστε να επιτευχθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός. Ο φούρνος του χρωματογράφου πρέπει:

- Να έχει την ίδια θερμοκρασία σε όλα τα μέρη του, ώστε η στήλη να θερμαίνεται ομοιόμορφα.
- Να μπορεί να θερμαίνεται με το ρυθμό που ορίζεται από το θερμοκρασιακό πρόγραμμα.
- Να μπορεί να ψύχεται γρήγορα ώστε να είναι έτοιμος για το επόμενο δείγμα.

Η δημιουργία του θερμοκρασιακού προγράμματος βασίζεται στα σημεία ζέσεως των ενώσεων. Καθώς οι ενώσεις καθώς εξέρχονται από τον εισαγωγέα (injector) και εισάγονται στη στήλη, βρίσκονται σε αέρια μορφή. Η θερμοκρασία της στήλης (δηλαδή του φούρνου) πρέπει αρχικά να είναι χαμηλότερη από το χαμηλότερο σημείο ζέσεως των ενώσεων, ώστε να συγκρατηθούν από την υγρή στατική φάση. Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, όταν φτάσει στο σημείο ζέσεως της εκάστοτε ένωσης, η ένωση εξατμίζεται, περνά στην κινητή φάση και εξέρχεται από τη στήλη. Με αυτόν τον τρόπο, μέσω προοδευτικής αύξησης της θερμοκρασίας, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός. Επεμβαίνοντας στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα, μπορούν να

τροποποιηθούν οι χρόνοι κατακράτησης κάθε ένωσης. Τέτοιο πρόγραμμα χρησιμοποιείται στην άσκηση με ανιχνευτή FID, ενώ στην άσκηση με ανιχνευτή TCD, όπου δεν υπάρχει δυνατότητα θερμοκρασιακού προγράμματος, χρησιμοποιείται σταθερή θερμοκρασία υψηλότερη από το μεγαλύτερο σημείο ζέσεως των ενώσεων. Στην περίπτωση αυτή, οι χρόνοι έκλουσης μειώνονται σημαντικά, ωστόσο η πολικότητα και το μέγεθος των ενώσεων εξακολουθούν να επηρεάζουν τη σειρά έκλουσής τους.

Η τελική θερμοκρασία του φούρνου πρέπει να είναι υψηλότερη από όλα τα σημεία ζέσεως, ώστε να απομακρυνθούν από τη στήλη όλες οι ενώσεις και ο διαλύτης τους.

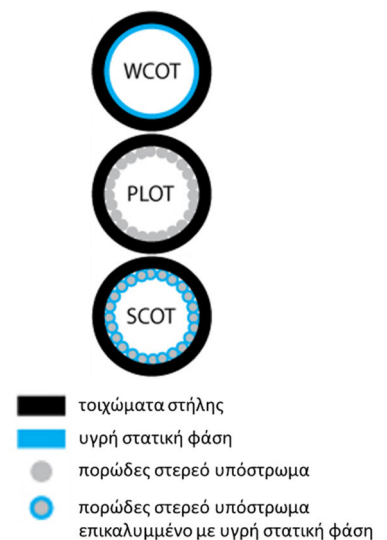
I. Τριχοειδείς Στήλες

Οι στήλες πλήρωσης είναι γενικά στήλες με σχετικά μεγάλη διάμετρο, μικρό μήκος και περιέχουν πληρωτικό υλικό. Αντίθετα, οι τριχοειδείς στήλες έχουν πολύ μικρή εσωτερική διάμετρο (μικρότερη από 1 mm, λεπτές σαν τρίχα), μεγάλο μήκος (μερικές δεκάδες μέτρα) και συνεπώς, πολύ μεγάλο αριθμό θεωρητικών πλακών, γεγονός που προσδίδει μεγάλη διαχωριστική ικανότητα.



Οι τριχοειδείς διακρίνονται σε τρεις διαφορετικούς τύπους:

- I. **Wall – Coated Open Tubular column (WCOT)** Τα εσωτερικά τοιχώματα της στήλης είναι επικαλυμμένα με μια λεπτή στρώση υγρής στατικής φάσης.
- II. **Porous – Layer Open Tubular column (PLOT)** Τα εσωτερικά τοιχώματα της στήλης είναι επικαλυμμένα με πορώδες στερεό υπόστρωμα (π.χ. αλουμίνα, silica gel).
- III. **Support – Coated Open Tubular column (SCOT)**, Παρόμοια με τον τύπο PLOT, μόνο που τα στερεά υποστρώματα είναι επικαλυμμένα με μια λεπτή στρώση υγρής στατικής φάσης.



Ο πιο συνηθισμένος τύπος είναι το SCOT στήλης, όπως χρησιμοποιείται και στην άσκηση GC-FID

1. Πλεονεκτήματα:

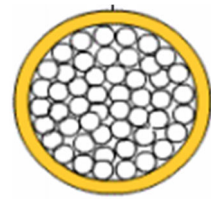
- Υψηλός αριθμός θεωρητικών πλακών (έως 500.000 σε σύγκριση με τις στήλες πλήρωσης ~20.000), οπότε έχουν καλύτερη διαχωριστική ικανότητα.
- Απαιτείται μικρότερη ποσότητα δείγματος (ng).
- Χαμηλότερες θερμοκρασίες διαχωρισμού, λόγω της υψηλής διαχωριστική ικανότητα.
- Μικρότεροι χρόνοι έκλουσης, άρα συντομότερος χρόνος ανάλυσης.
- Κατάλληλες για χρήση με ανιχνευτές που απαιτούν μικρή ποσότητα δείγματος (π.χ. φασματογράφος μάζας).

2. Μειονεκτήματα:

- Δεν ενδείκνυται για πυκνά δείγματα.
- Δεν είναι κατάλληλες για on column εισαγωγή.
- Δεν χρησιμοποιούνται για κλασματικό διαχωρισμό, καθώς αυτό απαιτεί μεγαλύτερες ποσότητες δείγματος.

II. Πληρωμένες Στήλες

Οι πληρωμένες στήλες περιέχουν λεπτά σωματίδια στερεού υλικού στήριξης, επικαλυμμένα με μη πτητική υγρή στατική φάση. Συγκρινόμενες σε σχέση με τις τριχοειδείς στήλες, έχουν μεγαλύτερη χωρητικότητα δείγματος αλλά δίνουν πλατύτερες κορυφές, μεγαλύτερους χρόνους κατακράτησης και χαμηλότερη διαχωριστική ικανότητα. Παρόλα αυτά, χρησιμοποιούνται για παρασκευαστικούς διαχωρισμούς, όπου απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος ή για το διαχωρισμό ενώσεων που δεν κατακρατούνται ισχυρά. Συνήθως κατασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα ή γυαλί με διάμετρο 3-6 mm και μήκος 1-5 m. Το στερεό υλικό στήριξης είναι συνήθως οξείδια του πυριτίου. Σε μία πληρωμένη στήλη, το ομοιόμορφο μέγεθος σωματιδίων μειώνει τον όρο των πολλαπλών διαδρομών στην εξίσωση Van Deemter, μειώνοντας έτσι το



ύψος πλάκας (H) και αυξάνοντας τον αριθμό θεωρητικών πλακών (N), με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαχωριστική της ικανότητα της στήλης. Επίσης το μικρότερο μέγεθος σωματιδίων μειώνει επίσης τον χρόνο εξισορρόπησης των ουσιών, αυξάνοντας τη συνολική αποδοτικότητα της στήλης. Το μέγεθος των σωματιδίων εκφράζεται σε μικρόμετρα ή σε μονάδες mesh, οι οποίες υποδεικνύουν το μέγεθος του πλέγματος το οποίο τα σωματίδια περνούν ή κατακρατούνται.

1. Πλεονεκτήματα:

- Μπορεί να δεχτεί μεγάλη ποσότητα δείγματος και έτσι είναι κατάλληλες για λιγότερο ευαίσθητους ανιχνευτές.
- Κατάλληλες για κλασματικό διαχωρισμό των ενώσεων για παρασκευαστικούς λόγους.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε on column όσο και σε split εισαγωγή.

2. Μειονεκτήματα:

- Έχει χαμηλό αριθμό θεωρητικών πλακών με αποτέλεσμα να έχει μικρή διαχωριστική ικανότητα.
- Δεν είναι κατάλληλες για ανιχνευτές με πολύ χαμηλό όριο ανίχνευσης.

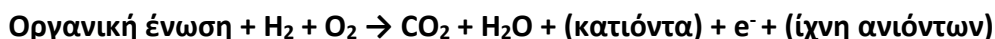
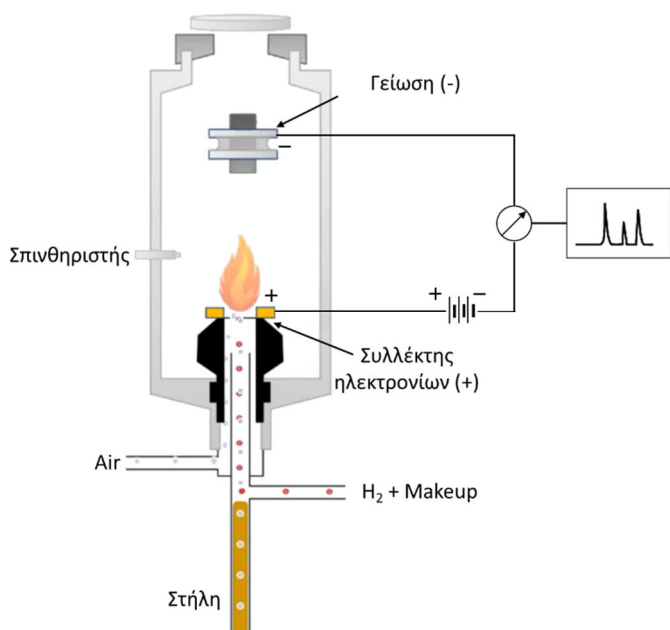
6. Ανιχνευτής

Οι ανιχνευτές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην αέρια χρωματογραφία είναι αρκετοί, ωστόσο θα παρουσιαστούν μόνο οι δύο που χρησιμοποιούνται στις εργαστηριακές ασκήσεις των προπτυχιακών εργαστηρίων της Αναλυτικής Χημείας: ο ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας (FID) και ο ανιχνευτής Θερμικής Αγωγιμότητας (TCD).

I. Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας (Flame Ionization Detector - FID):

Η αρχή λειτουργίας του βασίζεται στη μεταβολή της αγωγιμότητας, η οποία προκαλείται από τον ιοντισμό μιας οργανικής ένωσης κατά την καύση της σε φλόγα υδρογόνου – αέρα. Κατά τη καύση της οργανικής ένωσης, πραγματοποιείται θερμική διάσπαση των οργανικών θραυσμάτων σε ιονισμένα είδη, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό θετικών ιόντων, όπως C^+ , CH^+ , CHO^+ και ελευθέρων ηλεκτρονίων (e^-). Αρνητικά ιόντα εμφανίζονται στιγμιαία, όμως είναι ελάχιστα, δίνοντας μικρή συνεισφορά στο συνολικό σήμα. Ένα ηλεκτρικό πεδίο, που δημιουργείται μεταξύ του συλλέκτη (θετικό δυναμικό, συνήθως +200–300 V) και του καυστήρα (γείωση), έχει ως αποτέλεσμα τα ελεύθερα ηλεκτρόνια κινούνται προς τον θετικό συλλέκτη (παραγόμενο ρεύμα), ενώ τα θετικά ιόντα κατευθύνονται προς την γείωση και συμβάλλουν έμμεσα στη ροή του ρεύματος. Αυτή η κίνηση των φορτίων δημιουργεί ένα ηλεκτρικό ρεύμα πολύ μικρού μεγέθους (10^{-12} – 10^{-9} A), το οποίο με την βοήθεια ενός ενισχυτή μετατρέπεται σε αναλογικό σήμα και στη συνέχεια καταγράφεται.

Η καύση της οργανικής μάζας δίνει τελικά προϊόντα CO₂ και H₂O. Ωστόσο, η ενδιάμεση φάση της καύσης περιλαμβάνει θετικά ιόντα, ελεύθερα ηλεκτρόνια και προσωρινά αρνητικά ιόντα. Η συμβολή των ανιόντων είναι πολύ μικρή και συνήθως αγνοείται. Αυτό το “μίγμα φορτίων” είναι που ανιχνεύεται.



Η ένταση του σήματος εξαρτάται από την ποσότητα των ηλεκτρονίων που παράγονται, η οποία με τη σειρά της επηρεάζεται από την οξειδωτική κατάσταση του άνθρακα. Έτσι ενώσεις με τον ίδιο αριθμό ατόμων άνθρακα μπορούν να δώσουν διαφορετικά σήματα.

Παράδειγμα: το ακετονιτρίλιο και η αιθανόλη έχουν δύο άτομα άνθρακα, αλλά δίνουν διαφορετικά σήματα λόγω της διαφορετικής οξειδωτικής τους κατάστασης

Makeup gas:

Για τη λειτουργία του ανιχνευτή, εκτός της ροής του υδρογόνου και του αέρα (που απαιτούνται για τη δημιουργία της φλόγα) χρησιμοποιείται συνήθως και ένα επιπλέον αδρανές αέριο που ονομάζεται makeup gas. Συνήθως χρησιμοποιείται το ίδιο με το αέριο της κινητής φάσης. Το makeup βοηθά στη μεταφορά των εκλούμενων ενώσεων από τη στήλη προς τον ανιχνευτή. Είναι απαραίτητο όταν η ροή της κινητής φάσης είναι μικρή (π.χ. 1 ml/min), ενώ όταν η ροή είναι μεγάλη (π.χ. 30 ml/min) το makeup μπορεί να παραλειφθεί, καθώς η ίδια η κινητή φάση είναι αρκετή για τη καλή λειτουργία του ανιχνευτή.

1. Πλεονεκτήματα

- Ανταποκρίνεται κυρίως σε άνθρακα, έτσι μπορεί να ανιχνεύσει σχεδόν όλες τις οργανικές ενώσεις, γεγονός που τον καθιστά γενικό ανιχνευτή.
- Έχει πολύ μεγάλο εύρος γραμμικότητας (περίπου 7-8 τάξεις μεγέθους). Είναι τόσο γραμμικός που για τη καμπύλη βαθμονόμησης αρκεί μόνο ένα σημείο (μαζί με το μηδέν δίνουν την ευθεία βαθμονόμησης).
- Έχει πολύ μεγάλη ευαισθησία (10⁻¹² g/s), που επιτρέπει την ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων.

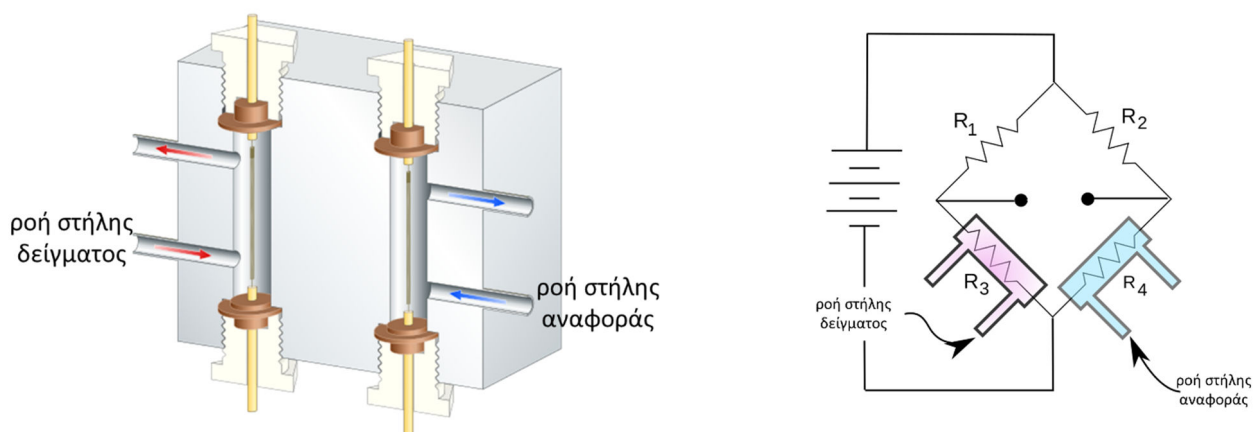
2. Μειονεκτήματα

- Είναι καταστρεπτικός ανιχνευτής (το δείγμα καίγεται).
- Δεν ανιχνεύει ενώσεις χωρίς άνθρακα (π.χ. SO₂, NO_x, ευγενή αέρια, CO₂).
- Δεν παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία σε συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες (π.χ. καρβονυλο-αλογονο-ομάδες) καθώς ανταποκρίνεται κυρίως στον άνθρακα.

II. Ανιχνευτής Θερμικής Αγωγιμότητας (Thermal Conductivity Detector -TCD)

Ο TCD ένας από τους πρώτους ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν στην αέρια χρωματογραφία, συχνά αναφέρεται και ως καθαρόμετρο.

Η αρχή της λειτουργίας του στηρίζεται σε μια γέφυρα **Wheatstone** με θερμαινόμενα στοιχεία (αντιστάσεις) από λεπτό σύρμα λευκόχρυσου, χρυσού ή βολφραμίου. Η ηλεκτρική αντίσταση αυτών των στοιχείων εξαρτάται από τη θερμική αγωγιμότητα του αερίου που τα περιβάλλει. Αρχικά και στις δύο διαδρομές του κυκλώματος (δείγματος και αναφοράς), περνάει μόνο κινητή φάση διατηρώντας το σύστημα σε μια θερμική ισορροπία. Κατά τη λειτουργία, στη μία διαδρομή συνεχίζει να περνά μόνο η κινητή φάση (αναφορά), ενώ στην άλλη περνάει κινητή φάση μαζί με τις ενώσεις του δείγματος. Η παρουσία αυτών των ενώσεων αλλάζει τη θερμική αγωγιμότητα του αερίου μίγματος, καθώς η κινητή φάση (συνήθως Ar, He ή H₂) έχει πολύ υψηλότερη θερμική αγωγιμότητα από τις οργανικές ενώσεις (6–10 φορές μεγαλύτερη).



Η μείωση της θερμικής αγωγιμότητας έχει ως αποτέλεσμα η αντίσταση να ψύχεται λιγότερο, να θερμαίνεται περισσότερο και επομένως να **αυξάνεται η τιμή της αντίστασής της**. Καθώς η ένταση του ρεύματος διατηρείται σταθερή, μεταβάλλεται η διαφορά δυναμικού ($V = I \times R$). Η διαφορά δυναμικού ανάμεσα στην αντίσταση της διαδρομής του δείγματος και της διαδρομής αναφοράς καταγράφεται και αποδίδεται ως κορυφή στο χρωματογράφημα.

Ο ανιχνευτής είναι θερμαινόμενος για να εξουδετερώνονται οι μεταβολές της θερμοκρασίας περιβάλλοντος, αυξάνοντας έτσι τη σταθερότητα και ευαισθησία του.

1. Πλεονεκτήματα

- Μη καταστρεπτικός (επιτρέπει τη συλλογή των εκλουόμενων ουσιών μετά την ανίχνευση).
- Μεγάλο εύρος γραμμικότητας (περίπου 4-5 τάξεις μεγέθους).
- Καθολικός ανιχνευτής: μπορεί να ανιχνεύει οργανικές και ανόργανες ενώσεις.

2. Μειονεκτήματα

- Έχει χαμηλή ευαισθησία ($\sim 10^{-8}$ g ουσίας/ ml φέροντος αερίου).
- Η χαμηλή ευαισθησία του συχνά καθιστά αδύνατη τη χρήση του με τριχοειδείς στήλες οι οποίες εισάγουν πολύ μικρές ποσότητες δείγματος.

Συγκριτικός Πίνακας FID – TCD

Χαρακτηριστικό	FID	TCD
Αρχή λειτουργίας	Ιονισμός οργανικών ενώσεων σε φλόγα H_2 /αέρα → παραγωγή ιόντων & e^- → μέτρηση ρεύματος.	Μέτρηση αλλαγής θερμικής αγωγιμότητας του αερίου ροής σε σχέση με το φέρον αέριο.
Τι ανιχνεύει	Κυρίως οργανικές ενώσεις με C–H	Οργανικές και ανόργανες ενώσεις που έχουν διαφορετική θερμική αγωγιμότητα από το φέρον αέριο.
Ευαισθησία	Πολύ υψηλή (LOD ~ 10^{-12} g/s C).	Μέτρια (LOD ~ 10^{-8} g/s).
Εύρος γραμμικότητας	7–8 τάξεις μεγέθους.	4–5 τάξεις μεγέθους.
Καταστροφή δείγματος	Ναι – καύση στη φλόγα.	Όχι το δείγμα μπορεί να ανακτηθεί.
Απάντηση σε H_2O , CO_2 , N_2 , O_2	Σχεδόν μηδενική (δεν δίνουν σήμα).	Ανιχνεύονται (λόγω αλλαγής της θερμικής αγωγιμότητας).
Χρήση	Χρειάζεται συνεχή παροχή H_2 και αέρα προσεκτικό χειρισμό της φλόγας.	Απλός, δεν απαιτεί φλόγα, αλλά πιο ευαίσθητος σε θόρυβο θερμοκρασία / πίεση.
Τυπικές εφαρμογές	GC ανάλυση πτητικών οργανικών, καύσιμα, τρόφιμα, ρύποι.	Ανίχνευση ενώσεων με ή χωρίς άνθρακα (π.χ. H_2 , O_2 , CO_2).
Επιλεκτικότητα	Πολύ εκλεκτικός για C–H ενώσεις.	Μη εκλεκτικός ανιχνεύει οτιδήποτε αλλάζει την αγωγιμότητα.

7. Καταγραφικό

Το αναλογικό σήμα που δίνει ο ανιχνευτής μετατρέπεται σε ψηφιακό, με τη χρήση κατάλληλης κάρτας μετατροπής (A/D converter). Η επεξεργασία και καταγραφή του σήματος γίνεται μέσω ειδικού λογισμικού σε μονάδα ηλεκτρονικού υπολογιστή, όπου εμφανίζονται και αποθηκεύονται τα χρωματογραφήματα.

Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC)

Στην υγρή χρωματογραφία ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας υγρής κινητής φάσης. Το δείγμα εισέρχεται στη κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκλύονται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης.

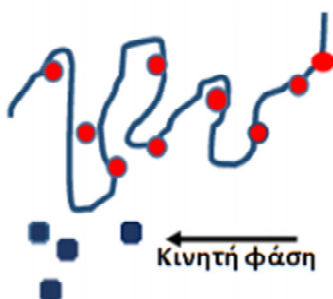
Η υγρή χρωματογραφία είναι σημαντική διότι οι περισσότερες ενώσεις δεν είναι αρκετά πτητικές ώστε να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί η αέρια χρωματογραφία. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) χρησιμοποιεί την υψηλή πίεση για να αναγκάσει τον διαλύτη να μετακινηθεί μέσω κλειστών στηλών που περιέχουν πολύ μικρά σωματίδια επιτυγχάνοντας διαχωρισμούς υψηλής διαχωριστικής ικανότητας.

Είδη υγρής χρωματογραφία: Διακρίνονται ως προς τον τρόπο διαχωρισμού των ενώσεων.

- I. Χρωματογραφία προσρόφησης
- II. Χρωματογραφία κατανομής
- III. Χρωματογραφία ιονανταλλαγής
- IV. Χρωματογραφία συγγένειας
- V. Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους

I. Στη χρωματογραφία **προσρόφησης (Adsorption Chromatography)** ο διαχωρισμός των διαφόρων ουσιών βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης τους πάνω στη στατική φάση. Οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν ανάμεσα στον αναλύτη και τη στατική φάση οφείλονται κυρίως σε διπολικές αλληλεπιδράσεις, Van der Waals και σε δεσμούς υδρογόνου.

Στερεή στατική φάση



Ο κόκκινος αναλύτης προσροφάται ισχυρότερα στην στατική φάση σε σχέση με το μπλε, οπότε καθυστερεί να εξέλθει.

II. Η χρωματογραφία **κατανομής (Partition Chromatography)** εφαρμόζεται στο διαχωρισμό μη ιοντικών πολικών ενώσεων. Στην επιφάνεια του αδρανούς στερεού υποστρώματος υπάρχει ακινητοποιημένη λεπτή στοιβάδα υγρού (υψηλού σημείου ζέσεως). Ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ της υγρής κινητής και της υγρής στατικής φάσης.



Υγρή στατική φάση

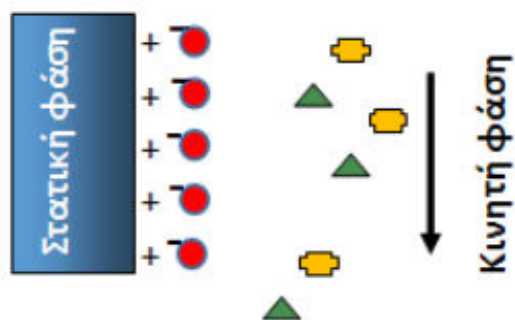
Ο κόκκινος αναλύτης κατανέμεται ισχυρότερα στην στατική φάση σε σχέση με το μπλε, οπότε καθυστερεί να εξέλθει.

III. Η χρωματογραφία **μοριακού αποκλεισμού (Size Exclusion Chromatography)** εφαρμόζεται στον διαχωρισμό ενώσεων με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 10.000 Da. Χρησιμοποιείται στην ανάλυση και το χαρακτηρισμό των πολυμερών ενώσεων (συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών). Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μέγεθος (και το σχήμα) των μορίων των αναλυόμενων ενώσεων. Τα μικρά μόρια καθυστερούν, εισερχόμενα στους πόρους των σωματιδίων της στατικής φάσης, ενώ τα μεγάλα μόρια δεν εισέρχονται και εξέρχονται πρώτα από τη στήλη.



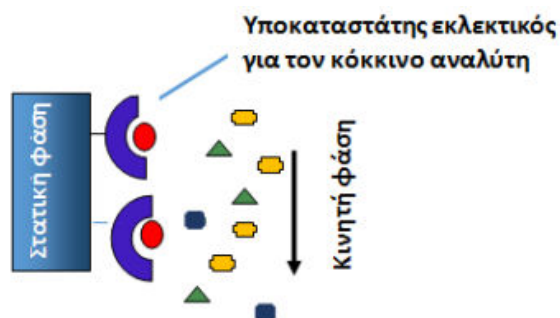
ο κόκκινος αναλύτης εισχωρώντας στους πόρους της στατικής φάσης καθυστερεί να εξέλθει σε σχέση με τους υπόλοιπους.

IV. Η χρωματογραφία **ιονανταλλαγής (Ion Exchange Chromatography)** εφαρμόζεται στο διαχωρισμό ιοντικών ενώσεων. Ο διαχωρισμός οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης.



Ο αρνητικά φορτισμένος κόκκινος αναλύτης αλληλοεπιδρά ηλεκτροστατικά με τις θετικά φορτισμένες ομάδες της στατικής φάσης, οπότε καθυστερεί να εξέλθει.

V. Η χρωματογραφία **χημικής συγγένειας (Affinity Chromatography)** εφαρμόζεται στο διαχωρισμό εναντιομερών ενώσεων. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις δεσμεύονται εκλεκτικά σε υποκαταστάτες που είναι ακινητοποιημένοι στη στατική φάση.

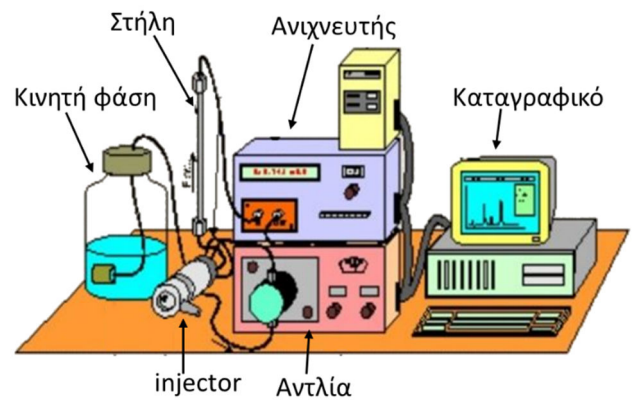


Ο κόκκινος αναλύτης δεσμεύεται από τη στατική φάση, στην οποία υπάρχει ακινητοποιημένος υποκαταστάτης με εκλεκτική συγγένεια προς αυτόν. Κατά συνέπεια, καθυστερεί να εξέλθει σε σχέση με τους υπόλοιπους.

Θα εξεταστούν πιο αναλυτικά η χρωματογραφία **κατανομής** που εφαρμόζεται στην άσκηση της **RPLC** καθώς και η χρωματογραφία **ιονανταλλαγής** που εφαρμόζεται στην άσκηση της **ιοντικής χρωματογραφίας**.

Ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας αποτελείται:

1. Την κινητή φάση.
2. Την αντλία.
3. Το σύστημα εισαγωγής δείγματος.
4. Την αναλυτική στήλη.
5. Το σύστημα καταστολής σήματος (προαιρετικό στην ιοντική χρωματογραφία).
6. Τον ανιχνευτή.
7. Το καταγραφικό.



1. Κινητή φάση:

Η κινητή φάση είναι ένα διάλυμα που η σύσταση του εξαρτάται από το είδος της χρωματογραφίας. Για τη χρωματογραφία ιονανταλλαγής είναι ένα διάλυμα μιας βάσης για το διαχωρισμό ανιόντων και αντίστοιχα ένα διάλυμα ενός οξέος για το διαχωρισμό κατιόντων ενώ για τη χρωματογραφία κατανομής η κινητή φάση αποτελείται από ένα μίγμα οργανικών διαλυτών.

Η κινητή φάση μπορεί να έχει σταθερή σύσταση σε όλη τη διάρκεια της χρωματογραφίας (ισοκρατική έκλουση) ή να έχει μεταβαλλόμενη σύσταση (βαθμιδωτή έκλουση), όπου ξεκινά από χαμηλή εκλουστική ισχύ και σταδιακά αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, σύμφωνα με προκαθορισμένο πρόγραμμα. Η βαθμιδωτή έκλουση επιλέγεται συνήθως για μίγματα ενώσεων που παρουσιάζουν πολύ διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης. Στην αρχή χρησιμοποιείται κινητή φάση χαμηλής ισχύος, ώστε οι ουσίες που κατακρατούνται ασθενώς να διαχωριστούν επαρκώς. Στη συνέχεια, η ισχύς της κινητής φάσης αυξάνεται για να εκλουστούν και οι πιο ισχυρά κατακρατούμενες ενώσεις. Αν αυτό δεν γίνει, οι ενώσεις αυτές είτε θα αργήσουν πολύ να εξέλθουν, αυξάνοντας σημαντικά τη διάρκεια της ανάλυσης, είτε μπορεί να παραμείνουν μόνιμα στη στήλη.

Τα κριτήρια επιλογής της κινητής φάσης εξαρτώνται από το είδος της χρωματογραφίας:

1. Για τη χρωματογραφία ιονανταλλαγής:

- a. Το φορτίο, η σταθερά ιονισμού και το μέγεθος των ιόντων.
- b. Το είδος της στατικής φάσης.
- c. Το είδος του ανιχνευτή.
- d. Την εφαρμογή ή όχι συστήματος καταστολής σήματος.

2. Για τη χρωματογραφία κατανομής:

1. Η πολικότητα και το μέγεθος των ενώσεων.
2. Το είδος της στατικής φάσης.
3. Το είδος του ανιχνευτή.
4. Η τοξικότητα του διαλύτη.
5. Το κόστος (αν είναι οικονομικός).

Φυσαλίδες:

Ένα από τα βασικότερα προβλήματα κατά την έκλουση της κινητής φάσης είναι η δημιουργία φυσαλίδων αέρα. Κατά την παρασκευή της κινητής φάσης, ο διαλύτης περιέχει διαλυμένο αέρα, ο οποίος κατά την κίνηση του στο σύστημα, μπορεί να σχηματίσει φυσαλίδες. Οι φυσαλίδες αυτές μπορούν να προκαλέσουν διάφορα προβλήματα, όπως:

1. Στην αντλία του συστήματος, όπου υπάρχουν βαλβίδες ροής, ενδέχεται να εγκλωβιστούν, προκαλώντας αύξηση της πίεσης.

2. **Στη χρωματογραφική στήλη**, όπου μπορούν επίσης να αυξήσουν την πίεση και να επηρεάσουν τον διαχωρισμό των ενώσεων.
3. **Στον ανιχνευτή**, αν η φυσαλίδα φτάσει στην κυψελίδα, μπορεί να εγκλωβιστεί και να μεταβάλλει το σήμα με τυχαίο τρόπο. Αυτός ο τυχαίος "θόρυβος" μπορεί να κρύψει μικρές κορυφές, αλλοιώνοντας τα αποτελέσματα

Απαέρωση:

Για την αποφυγή της δημιουργίας φυσαλίδων, μετά τη παρασκευή της κινητής φάσης πραγματοποιείται απαέρωση. Η απαέρωση επιτυγχάνεται κυρίως με διοχέτευση ενός αδρανούς αερίου (π.χ. He ή N₂) ή με τη χρήση υπερήχων. Οι φυσαλίδες του αερίου που διοχετεύεται παρασύρουν το διαλυμένο αέρα και τον απομακρύνουν, η διαδικασία αυτή κρατάει 10 με 15 λεπτά. Για την απομάκρυνση με τους υπερήχους, ο διαλύτης τοποθετείται σε αυτούς για 15 με 20 λεπτά. Η δόνηση των μορίων του διαλύματος απομακρύνει το διαλυμένο αέρα δημιουργώντας φυσαλίδες που φεύγουν στην ατμόσφαιρα.

Εάν, παρ' όλα αυτά, δημιουργηθούν φυσαλίδες κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, αυτές πρέπει να απομακρυνθούν πριν εισέλθουν στην αντλία. Αυτό γίνεται με τη διαδικασία που αναλύεται στο μέρος της αντλίας. Τα σύγχρονα χρωματογραφικά συστήματα περιλαμβάνουν **αυτόματο μηχανισμό απομάκρυνσης φυσαλίδων**, εξαλείφοντας την ανάγκη για προκαταρκτική απαέρωση της κινητής φάσης.

2. Αντλία:

Η αντλία καθορίζει τη ροή της κινητής φάσης μέσω της παλινδρομικής κίνησης ενός ή δύο εμβόλων (πιστονιών). Η ροή δεν είναι συνεχής, αλλά περιλαμβάνει παλμούς κάθε φορά που πάλλεται το έμβολο, δημιουργείται διακύμανση στη ροή. Αυτό θα προκαλούσε σημαντικά προβλήματα τόσο στο διαχωρισμό όσο και στο σήμα του ανιχνευτή. Για το λόγο αυτό μετά το έμβολο τοποθετείται ένας καταστολέας παλμών, ο οποίος ομαλοποιεί τη ροή



ώστε να γίνεται συνεχής και σταθερή. Ένας απλός τύπος καταστολέα είναι ένας σπειροειδής σωλήνας μεγάλου μήκους, στον οποίο αποσβένονται οι διαταραχές ροής κατά τη διέλευση της κινητής φάσης. Αυτός ο τύπος χρησιμοποιείται στην άσκηση της RPLC. Άλλος τύπος καταστολέα παλμών είναι η μεμβράνη απόσβεσης. Καθώς η κινητή φάση προσκρούει πάνω της, η μεμβράνη πάλλεται και αποσβένει τη διαταραχή. Η αντλία που χρησιμοποιείται στην άσκηση της ιοντικής χρωματογραφίας διαθέτει τέτοια μεμβράνη ως καταστολέα παλμών.

Χειρισμός Αντλίας – Λειτουργίες και Ρυθμίσεις

Το ενεργό λαμπάκι στην οθόνη της αντλίας δείχνει ποια λειτουργία είναι σε ενεργή. Με το κουμπί "MODE" εναλλάσσονται οι επιλογές και με τα βελάκια (↑ ή ↓) αυξομειώνονται οι αντίστοιχες τιμές, όταν αυτό επιτρέπεται.

Η πρώτη επιλογή είναι η ροή (**flow rate**) με μονάδες ml/min. Η τιμή αυξομειώνεται με τα βελάκια, π.χ. 1.0 ml/min. Η αλλαγή της τιμής πρέπει να γίνεται με κλειστή ροή, για να αποφευχθούν απότομες αλλαγές που μπορεί να προκαλέσουν φθορά στο σύστημα, κυρίως στη στήλη. Η δεύτερη επιλογή αφορά την πίεση του συστήματος (π.χ. 1169 psi). Η τιμή αυτή δεν αλλάζει χειροκίνητα· αποτελεί ένδειξη της πίεσης που αναπτύσσεται στο σύστημα λόγω της ροής. Οι χρωματογραφικές στήλες είναι πυκνά συσκευασμένες, και απαιτείται υψηλή πίεση για να διέλθει η κινητή φάση μέσα από αυτές.

Η τελική τιμή της πίεσης εξαρτάται από:

1. Το είδος της χρωματογραφικής στήλης.
2. Το είδος της κινητής φάσης.
3. Τη τιμή της ροής της κινητής φάσης.
4. Το είδος του ανιχνευτή.
5. Την ύπαρξη καταστολέα σήματος (π.χ. στην ιοντική χρωματογραφία).

Η πίεση παρέχει γρήγορη ένδειξη της κατάστασης του συστήματος. Αν είναι υψηλότερη από το αναμενόμενο τότε:

- Πιθανόν η στήλη να έχει φραχθεί από ακαθαρσίες και να απαιτεί καθαρισμό.
- Μπορεί να έχει εισέλθει φυσαλίδα αέρα.
- Ίσως έχει γίνει λάθος ρύθμιση της ροής (όσο αυξάνεται η ροή, αυξάνεται και η πίεση).

Πίεση σημαντικά μεγαλύτερη από την προβλεπόμενη ενδέχεται να προκαλέσει βλάβη στο σύστημα ή προβλήματα στον διαχωρισμό.

Για την αποφυγή ζημιών, ορίζονται άνω και κάτω όρια πίεσης. Αν ξεπεραστεί το ανώτερο όριο (π.χ. 1600 psi), η αντλία σταματά αυτόματα. Αντίστοιχα, το κατώτερο όριο (π.χ. 50 psi) εξασφαλίζει ότι δεν υπάρχει διαρροή. Αν για κάποιο λόγο η πίεση πέσει απότομα (π.χ. αποσύνδεση σωλήνα από υπερπίεση), η αντλία θα σταματήσει αυτόματα. Αυτό είναι σημαντικό σε αυτόματα συστήματα (autosampler), όπου ο χειριστής δεν παρίσταται συνεχώς.

Αφού οριστούν οι παράμετροι η λειτουργία της αντλίας ξεκινά με το κουμπί **'RUN/STOP'**.

Με την εκκίνηση της ροής, ελέγχεται οπτικά (μέσω του διαφανούς σωλήνα) αν υπάρχουν φυσαλίδες. Συνήθως εμφανίζονται στην αρχή της λειτουργίας, οπότε για την αποφυγή πιθανής εμφάνισης τους, γίνεται αρχικά η διαδικασία της απομάκρυνσής τους.

Διαδικασία αφαίρεσης φυσαλίδων:

1. **Κλείνετε** τη ροή της αντλίας.
2. Τοποθετείτε μία **σύριγγα** στη βαλβίδα **'Prime/Purge'**.
3. Ανοίγετε τη βαλβίδα (**αριστερόστροφα**).
4. Πατάτε το κουμπί **'Prime'**.
 - ο Έτσι διοχετεύεται υψηλή ροή (~50 mL/min), που απομακρύνει τις φυσαλίδες.
5. Όταν βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχουν φυσαλίδες:
 - ο Πατάτε ξανά **'Prime'** για να σταματήσει η ροή.
 - ο Κλείνετε τη βαλβίδα (**δεξιόστροφα**) και αφαιρείτε τη σύριγγα.

Κατά την ενεργοποίηση του κουμπιού **'Prime'**, η ροή παρακάμπτει το υπόλοιπο σύστημα και κατευθύνεται στη σύριγγα μέσω της βαλβίδας.

Προσοχή:

- Ποτέ μην ανοίγετε/κλείνετε τη βαλβίδα **'Prime/Purge'** με ανοιχτή ροή, υπάρχει ο κίνδυνος απότομης αλλαγής πίεσης και ζημιάς στο σύστημα.
- Πατήστε το κουμπί **'Prime'** μόνο όταν η βαλβίδα είναι ανοιχτή, διαφορετικά η υψηλή ροή θα εισέλθει στο χρωματογραφικό σύστημα, προκαλώντας απότομη αύξηση πίεσης.

Σημείωση: Το πιστόνι της αντλίας συνδέεται με ένα αυτόνομο διάλυμα MeOH/H₂O 10% v/v, το οποίο χρησιμοποιείται για λίπανση. Οι φυσαλίδες που ενδέχεται να υπάρχουν εκεί δεν επηρεάζουν το σύστημα, καθώς δεν έρχονται σε επαφή με την κινητή φάση.

3. Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector):

Το σύστημα εισαγωγής διαθέτει μία βαλβίδα δύο θέσεων: φόρτισης (Load) και εισαγωγής (inject). Σε συστήματα όπου η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με χρήση σύριγγας υγρών, υπάρχουν επτά οπές, από τις οποίες μόνο οι έξι είναι ενεργές κάθε φορά. Δύο από αυτές είναι συνδεδεμένες με βρόχο καθορισμένου όγκου (loop). Η εισαγωγή του δείγματος να γίνεται χειροκίνητα με τη χρήση σύριγγας υγρών από μια κεντρική οπή, ενώ οι υπόλοιπες έξι οπές βρίσκονται στο πίσω μέρος του και συνδέονται διαφορετικά ανάλογα τη θέση της βαλβίδας (Load / Inject).

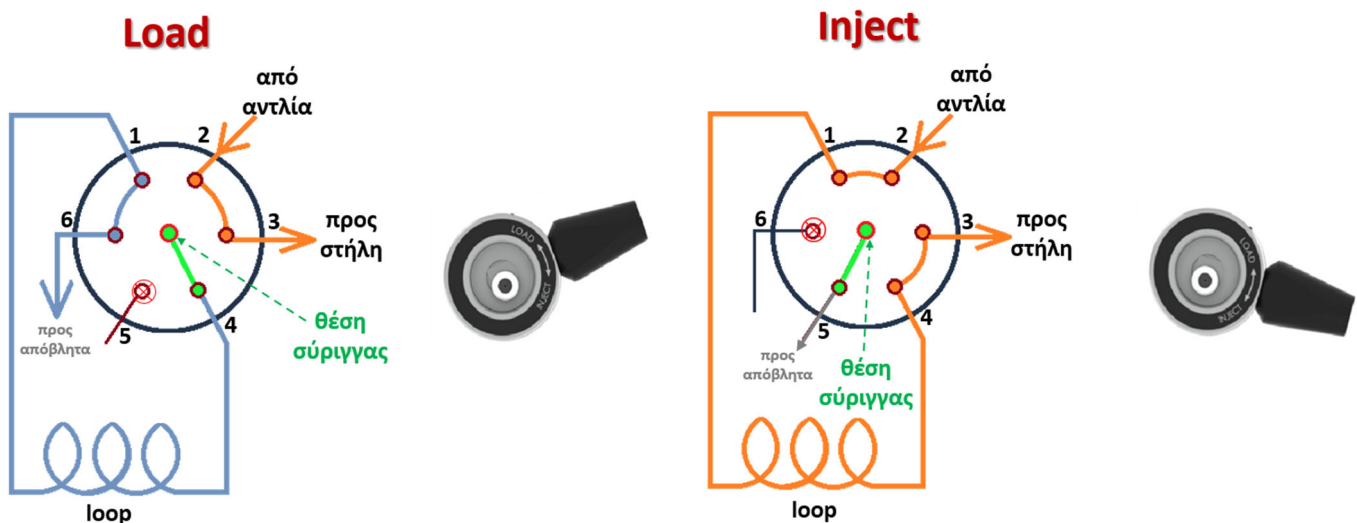
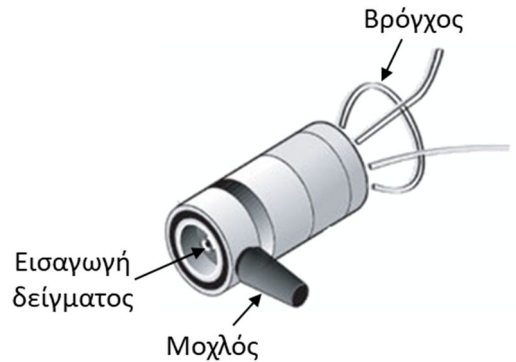
Στις οπές συνδέονται:

- Η σύριγγα εισαγωγής δείγματος στην κεντρική οπή.
- Η έξοδος της αντλίας στην οπή 2.
- Η είσοδο προς τη στήλη στην οπή 3.
- Ο βρόχος καθορισμένου όγκου στις οπές 1 και 4.
- Τα απόβλητα με τις οπές 5 και 6.

Ο μοχλός του συστήματος έχει δύο θέσεις:

- **φόρτισης (Load)** που ο μοχλός είναι προς τα πάνω
- **εισαγωγής (Inject)** που ο μοχλός είναι προς τα κάτω.

Στο εσωτερικό υπάρχει σύστημα με αυλάκια που συνδέει τις οπές ανά δύο. Καθώς μετακινείται ο μοχλός από τη μία θέση στην άλλη, περιστρέφεται το σύστημα με τα αυλάκια, με αποτέλεσμα οι οπές να συνδέονται διαφορετικά στη θέση Load και διαφορετικά στη θέση Inject.



Στη θέση Load:

Η κεντρική οπή (εισαγωγής του δείγματος) συνδέεται με την οπή 4, οι οπή 2 με την 3, και η οπή 1 με την 6, ενώ η οπή 5 είναι εκτός λειτουργίας. Έτσι καθώς ο διαλύτης έρχεται από την αντλία εισέρχεται από την οπή 2 και εξέρχεται από την οπή 3 προς τη στήλη. Το δείγμα εισάγεται από την κεντρική οπή, οδηγείται στην οπή 4 και μέσω του βρόχου περνά στην οπή 1, καταλήγοντας στην οπή 6 και από εκεί στα απόβλητα. Το πλεόνασμα του δείγματος απορρίπτεται στα απόβλητα. Στη θέση αυτή η οπή 5 είναι εκτός λειτουργίας.

Στη θέση Inject:

Το εσωτερικό σύστημα με τα αυλάκια περιστρέφεται και τώρα οι συνδέσεις αλλάζουν. Η κεντρική οπή συνδέεται με την οπή 5, η οπή 2 με την 1, η οπή 4 με την οπή 3 και η οπή 6 είναι τώρα εκτός λειτουργίας.

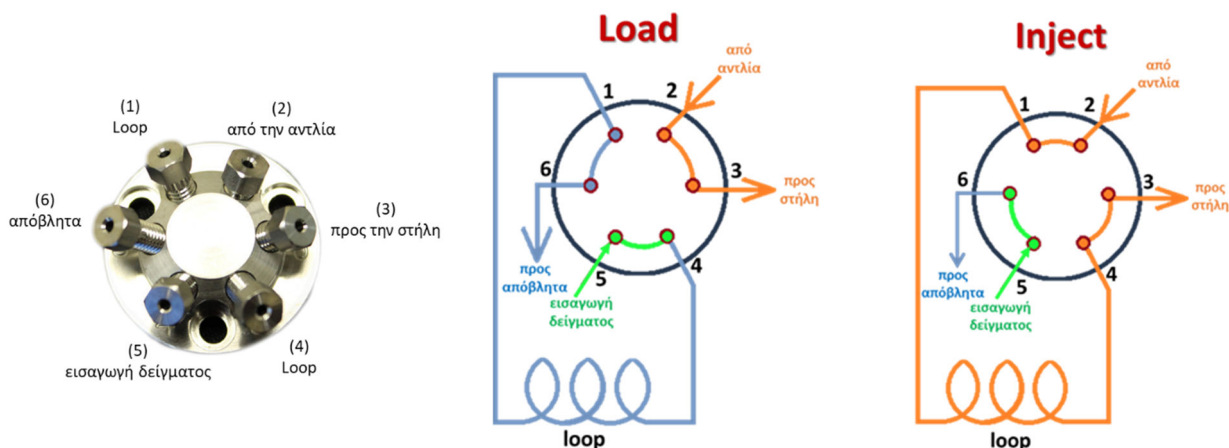
Έτσι, ο διαλύτης που έρχεται από την αντλία (οπή 2) περνά την οπή 1, διαμέσου του βρόχου (παρασύροντας το δείγμα), και εξέρχεται από την οπή 4, η οποία συνδέεται με την οπή 3 καταλήγοντας στη στήλη. Η κεντρική οπή είναι συνδεδεμένη με την οπή 5 (στα απόβλητα), επομένως αν σε αυτή τη θέση

επιχειρηθεί εισαγωγή δείγματος, το δείγμα θα πάει κατευθείαν στα απόβλητα. Στην θέση αυτή η οπή 6 είναι εκτός λειτουργίας.

Σε συστήματα με έξι οπές, η εισαγωγή του δείγματος γίνεται από την οπή 5, είτε χειροκίνητα με χρήση σύριγγας υγρών είτε με χρήση αυτόματου δειγματολήπτη (autosampler).

Στις οπές συνδέονται:

- Η εισαγωγή δείγματος στην οπή 5.
- Η έξοδος της αντλίας στην οπή 2.
- Η είσοδος προς τη στήλη στην οπή 3.
- Ο βρόχος καθορισμένου όγκου στις οπές 1 και 4.
- Τα απόβλητα με την οπή 6.



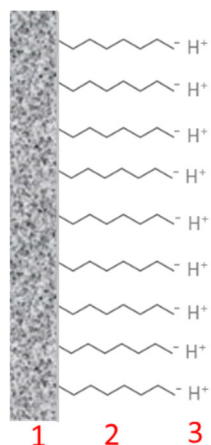
Προσοχή:

- Το σύστημα πρέπει πρώτα να είναι στη θέση Load (ώστε για να γεμίσει ο βρόγχος με το δείγμα και στη συνέχεια γυρνάει στη θέση Inject για να οδηγηθεί το δείγμα στη στήλη. Αν γίνει η εισαγωγή του δείγματος όταν το σύστημα είναι στη θέση Inject, τότε όλο το δείγμα θα πάει στα απόβλητα.
- Ο βρόγχος είναι σταθερού όγκου, οπότε το πλεόνασμα του δείγματος καταλήγει στα απόβλητα μέσω της οπής 6. Πάντα εισάγεται ποσότητα δείγματος μεγαλύτερη από τον όγκο του βρόχου, ώστε να ξεπλυθεί και να εξασφαλιστεί πλήρης πλήρωση. Ο κανόνας είναι ότι προστίθεται τουλάχιστον τριπλάσιος όγκος από τον όγκο του βρόχου (π.χ. για βρόχο 20 μl, εισάγονται τουλάχιστον 60 μl δείγματος. Στον βρόχο θα μείνουν τα τελευταία 20 μl ενώ τα υπόλοιπα πηγαίνουν στα απόβλητα.
- Η ποσότητα του δείγματος που φτάνει στη στήλη είναι πάντα ίση με τον όγκο του βρόχου, επομένως δεν απαιτείται διόρθωση όγκου εισαγωγής με εσωτερικό πρότυπο (όπως γίνεται στην άσκηση GC-FID). Η μόνη περίπτωση να αλλάξει η ποσότητα είναι να μην γεμίσει σωστά ο βρόχος.
- Αφού γεμίσει ο βρόχος με το δείγμα η σύριγγα **δεν αφαιρείται** από την κεντρική οπή πριν μετακινηθεί ο μοχλός στη θέση Inject. Περιστρέφεται το μοχλό τη θέση Inject (**με τη σύριγγα μέσα στην κεντρική οπή**) και όταν ολοκληρωθεί το χρωματογράφημα τότε μόνο αφαιρείται η σύριγγα. Η αφαίρεση της σύριγγας πρόωρα μπορεί να δημιουργήσει υποπίεση και να τραβηχτεί αέρας από την οπή των αποβλήτων (οπή 6), με αποτέλεσμα να μειωθεί ο όγκος του δείγματος στον βρόχο.

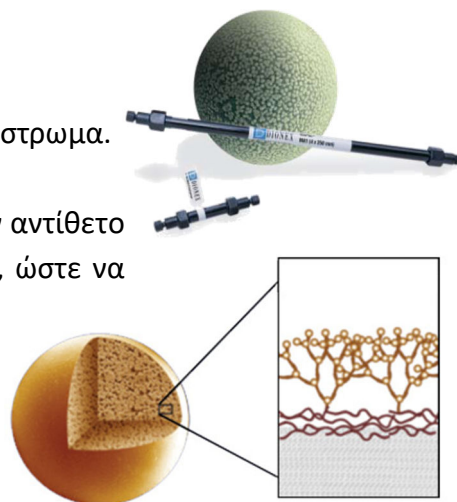
4. Στήλη:

I. Για τη χρωματογραφία ιονανταλλαγής:

Στη άσκηση της Ιοντικής χρωματογραφίας χρησιμοποιείται στήλη πλήρωσης, της οποίας το πληρωτικό υλικό αποτελείται από ρητίνες ιονανταλλαγής. Μια ιονανταλλακτική ρητίνη αποτελείται από τρία κυρίως τμήματα:



1. Ένα μη διαλυτό οργανικό ή ανόργανο υπόστρωμα.
2. Τις δραστικές ιονανταλλακτικές ομάδες.
3. Τα αντισταθμιστικά ιόντα, τα οποία έχουν αντίθετο φορτίο από τις ιονανταλλακτικές ομάδες, ώστε να διατηρείται η ηλεκτρική ουδετερότητα.



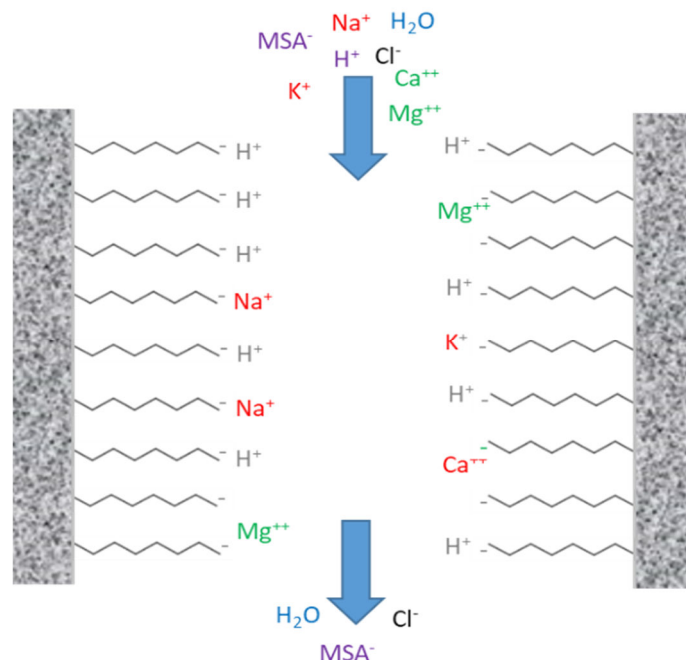
Στις στήλες ιοντικής χρωματογραφίας χρησιμοποιούνται κυρίως οργανικά πολυμερή του στυρενίου, αλλά και πηκτή διοξειδίου του πυριτίου. Η χημική σταθερότητα αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα των οργανικών πολυμερών σε σχέση με τη πηκτή διοξειδίου του πυριτίου, η οποία παρουσιάζει ευαισθησία σε αλκαλικό περιβάλλον.

Οι ρητίνες ιονανταλλαγής πρέπει να διαθέτουν τα εξής χαρακτηριστικά για να είναι κατάλληλες ως υλικό πλήρωσης:

1. Υψηλή ταχύτητα ανταλλαγής ιόντων.
2. Χημική σταθερότητα σε ευρύ φάσμα pH.
3. Καλή μηχανική αντοχή και ανθεκτικότητα σε μεγάλες μεταβολές πίεσης.
4. Αντοχή στην αποσύνθεση κατά την πλήρωση και τη ροή της κινητής φάσης.

Η στήλη αποτελείται από δύο μέρη: την προστήλη και την κύρια στήλη. Η προστήλη έχει το ίδιο υλικό πλήρωσης με την κύρια στήλη, αλλά μήκος ίσο με το ένα τρίτο αυτής, και τοποθετείται πριν από την κύρια στήλη. Στην προστήλη συγκρατούνται ενώσεις που δεσμεύονται μόνιμα από το υλικό, καθώς και ακαθαρσίες του δείγματος, αποτρέποντας τη φθορά της κύριας στήλης. Η προστήλη έχει χαμηλότερο γεγονός που επιτρέπει την τακτική αντικατάστασή της, σε αντίθεση με την κύρια στήλη που είναι ακριβότερη. Η κύρια στήλη μαζί με τη προστήλη επιτυγχάνουν τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος.

Στην άσκηση IC θα πραγματοποιηθεί ανάλυση κατιόντων. Τα αντισταθμιστικά ιόντα θα είναι ιόντα πρωτονίου (H^+) τα οποία παρέχονται στη στήλη από το διαλύτη που είναι ένα οξύ (MSA, Methanesulfonic Acid, CH_3SO_2OH). Τα αντισταθμιστικά ιόντα της ρητίνης αντικαθίστανται συνεχώς από τα ιόντα του διαλύτη. Κάθε δραστική ομάδα της ρητίνης φέρει ένα κατιόν, ώστε να διατηρείται η ηλεκτρική ουδετερότητα. Κατά την εισαγωγή του δείγματος, εισέρχεται μίγμα κατιόντων και ανιόντων. Τα κατιόντα του δείγματος, όπως Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} προσκολλώνται προσωρινά στις δραστικές ομάδες της ρητίνης, αντικαθιστώντας τα αντισταθμιστικά ιόντα του H^+ . Στη συνέχεια τα H^+ από τον διαλύτη αντικαθιστούν ξανά τα κατιόντα του δείγματος, τα οποία αποδεσμεύονται και εξέρχονται από τη στήλη. Κάθε είδος κατιόντος προσκολλώνται σε διαφορετικό χρόνο πάνω στις δραστικές ομάδες με αποτέλεσμα να εκλούονται σε διαφορετικούς χρόνους, επιτυγχάνοντας τον διαχωρισμό.



Τα κριτήρια του διαχωρισμού είναι:

- Πρώτα είναι το φορτίο ιόντος: Τα μονοσθενή ιόντα (π.χ. Na^+ , K^+) προσκολλώνται σε μία δραστική ομάδα, ενώ τα δισθενή (π.χ. Mg^{2+} , Ca^{2+}), σε δύο με αποτέλεσμα να δεσμεύονται πιο ισχυρά.
- Στη συνέχεια είναι το μέγεθος του ιόντος: Όσο πιο μεγάλο είναι το ιόν, τόσο πιο κοντά μπορεί να προσεγγίσει στις δραστικές ομάδες και τόσο πιο εύκολα θα προσκολληθεί.

Άρα η σειρά έκλουσης των ιόντων θα είναι: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , καθώς πρώτα θα βγουν τα μονοσθενή (δηλ. Na^+ και K^+) και μετά τα δισθενή (Mg^{2+} και Ca^{2+}) και από τα μονοσθενή πιο μικρό είναι το Na^+ οπότε θα βγει αυτό πρώτο και μετά το K^+ και από τα δισθενή πιο μικρό είναι το Mg^{2+} και έτσι θα βγει αυτό πρώτο και μετά το Ca^{2+} .

Όμως στο δείγμα εκτός από τα κατιόντα υπάρχουν και ανιόντα του. Για παράδειγμα, το Na^+ δεν μπορεί να βρίσκεται μόνο του, θα συνοδεύεται από άποιο ανιόν για την ηλεκτρική ουδετερότητα όπως π.χ. το Cl^- . Τα ανιόντα δεν προσκολλώνται στις θετικά φορτισμένες δραστικές ομάδες της στήλης και έτσι εξέρχονται αμέσως. Ο χρόνος εξόδου τους αντιστοιχεί στον νεκρό χρόνο (t_0), δηλαδή τον χρόνο που απαιτείται για να περάσει το δείγμα από το σύστημα εισαγωγής στον ανιχνευτή χωρίς κατακράτηση. Το δείγμα εκτός από τα ιόντα περιέχει επίσης και νερό, το οποίο αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του, καθώς οι συγκεντρώσεις ιόντων είναι της τάξης ppm ή ppb (μέρη στο εκατομμύριο ή δισεκατομμύριο). Το νερό όμως δεν έχει φορτίο, έτσι εκλύεται στον νεκρό χρόνο, μαζί με τα ανιόντα. Οπότε στο χρωματογράφημα εμφανίζεται πρώτα μια μεγάλη κορυφή στο χρόνο t_0 (ανιόντα και νερό του δείγματος) και στη συνέχεια θα βγουν σταδιακά οι κορυφές των κατιόντων με τη σειρά έκλουσης που περιγράφηκε παραπάνω.

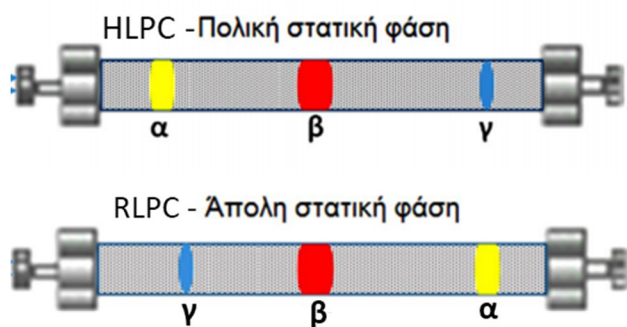
II. Για τη χρωματογραφία κατανομής:

Η χρωματογραφία κανονικής φάσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) χρησιμοποιεί πολική στατική φάση και λιγότερο πολικό διαλύτη, ενώ η χρωματογραφία αντίστροφη φάσης (Reversed Phase Liquid Chromatography, RPLC) χρησιμοποιεί μη πολική στατική φάση και πολικότερο διαλύτη.

Στην HPLC κανονικής φάσης, ως πληρωτικό υλικό χρησιμοποιείται κάποιο πολικό υλικό (όπως οξείδιο του πυριτίου, SiO_2 ή οξείδιο του αργιλίου, Al_2O_3). Η πολικότητα των υλικών αυτών οφείλεται στις υδροξυλομάδες που περιέχουν. Αντίθετα η κινητή φάση είναι μειωμένης πολικότητας, χρησιμοποιούνται μη πολικοί διαλύτες, όπως εξάνιο ή χλωροφόρμιο, ενώ δεν περιέχεται στην κινητή φάση νερό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι πολικές ενώσεις του διαχωριζόμενου μίγματος να αλληλοεπιδρούν ισχυρότερα με την

πολική στατική φάση, σε σύγκριση με τις άπολες ενώσεις. Έτσι οι λιγότερο πολικές ενώσεις διασχίζουν τη στήλη ταχύτερα και εκκλύονται νωρίτερα.

Το αντίστροφο της HPLC κανονικής φάσης είναι η υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reversed Phase Liquid Chromatography, RPLC). Η στατική φάση αποτελείται από οξειδίο πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες με μακριές αλυσίδες υδρογονάνθρακα (π.χ. C₈, C₁₈) οι οποίες προσδίδουν στη στατική φάση έντονα άπολο χαρακτήρα. Η κινητή φάση είναι πολική και αποτελείται από μίγματα οργανικών διαλυτών όπως μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, αιθανόλη κ.ά., με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή με νερό. Με την αντιστροφή της πολικότητας της κινητής και της στατικής φάσης, αντιστρέφεται και η σειρά έκλουσης των συστατικών του μίγματος. Μη πολικά μόρια του δείγματος προσροφούνται ισχυρά στις αλυσίδες υδρογονάνθρακα, ενώ τα πολικά μόρια κινούνται ταχύτερα διαμέσου της στήλης και εκκλύονται νωρίτερα.



Χρωματογραφικός διαχωρισμός μίγματος αποτελούμενου από μόρια τριών τύπων, τα οποία εμφανίζονται ως:

κίτρινες (α), κόκκινες (β) και μπλε (γ) ζώνες.

Τα μόρια ακολουθούν τη εξής σειρά αυξανόμενης πολικότητας:

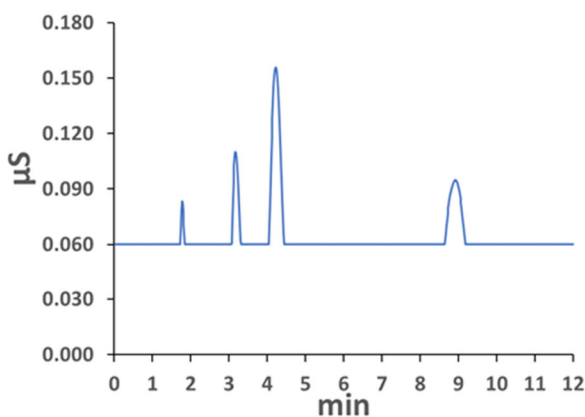
κίτρινο (α) > κόκκινο (β) > μπλε (γ)

Σε οποιοδήποτε διαχωρισμό προπορεύονται τα μόρια με πολικότητα αντίστοιχης της κινητής φάσης, ενώ καθυστερούν εκείνα με πολικότητα αντίστοιχης της στατικής φάσης. Στη χρωματογραφία ισχύει η αρχή «τα όμοια διαχωρίζουν τα όμοια», η οποία εδώ εφαρμόζεται με την έννοια ότι πολικές στήλες απαιτούνται για το διαχωρισμό πολικών ενώσεων και το αντίστροφο.

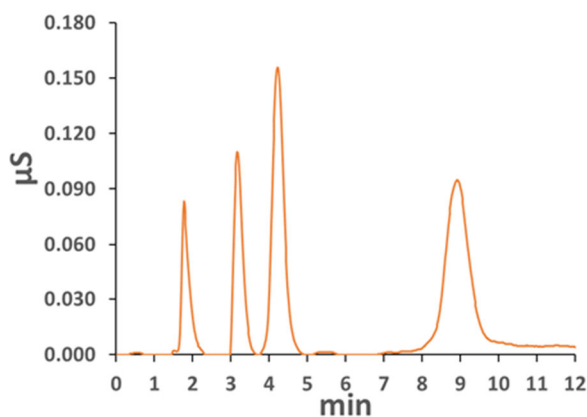
Η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μορφή της υγρής χρωματογραφίας, οι περισσότερες εφαρμογές στο διαχωρισμό μικρών μορίων με RPLC γίνονται σε στήλες C₈ ή C₁₈.

5. Σύστημα καταστολής σήματος:

Το σύστημα καταστολής σήματος του διαλύτη χρησιμοποιείται μόνο στην Ιοντική χρωματογραφία για να βελτιώσει το σήμα των ιόντων, κάτι που είναι απαραίτητο κυρίως σε πολύ αραιά δείγματα. Σε διαφορετική περίπτωση, οι κορυφές τους θα είναι τόσο μικρές που θα χάνονται στο θόρυβο του οργάνου. Στα πυκνά δείγματα η λειτουργία του δεν είναι τόσο απαραίτητη, καθώς η ανίχνευσή των ιόντων γίνεται ικανοποιητικά.



σήμα πριν τη καταστολή



σήμα μετά τη καταστολή

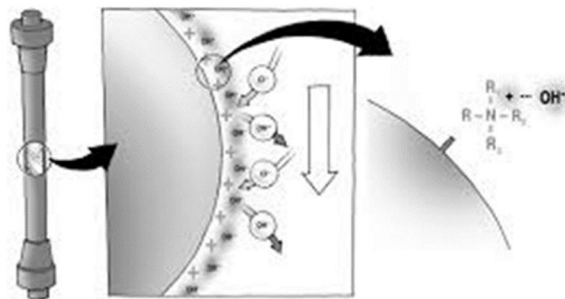
Στο σύστημα της χρωματογραφίας ο διαλύτης είναι συνήθως ένα οξύ ή μια βάση και από μόνος του εμφανίζει υψηλή αγωγιμότητα, η οποία καταγράφεται στον ανιχνευτή. Για να διακριθούν οι κορυφές των

ιόντων, πρέπει αυτά να έχουν μεγαλύτερη αγωγιμότητα από το διαλύτη. Διαφορετικά, στα αραιά δείγματα, όπου η αγωγιμότητα των ιόντων είναι μικρότερη από αυτή του διαλύτη, δεν θα εμφανίζονται καθόλου. Σε αυτή την περίπτωση, είναι απαραίτητη η χρήση συστήματος καταστολής του σήματος του διαλύτη, το οποίο καταστέλλει (εξουδετερώνει) το σήμα του, σχεδόν μηδενίζοντας το.

Υπάρχουν συστήματα καταστολής με τη μορφή της στήλης και με τη μορφή των μεμβρανών:

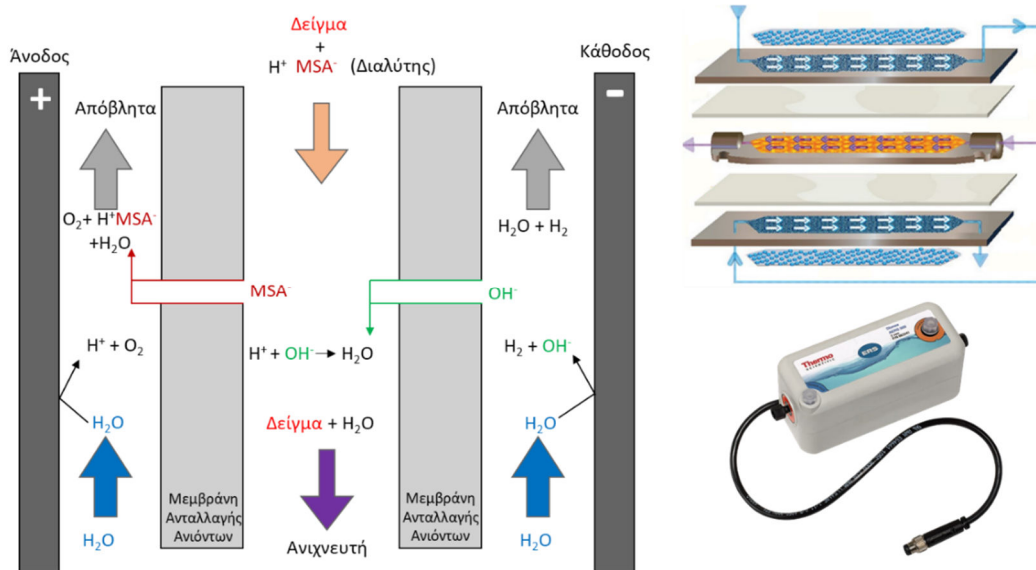
I. Με τη μορφή της στήλης:

Αποτελείται από μια ρητίνη που αντικαθιστά τα ιόντα του διαλύτη. Για παράδειγμα στην άσκηση της IC που ο διαλύτης είναι MSA (μεθανεσουλφονικό οξύ), περιέχονται ιόντα H^+ και MSA^- . Στη ρητίνη, τα ιόντα MSA^- αντικαθίστανται με OH^- . Έτσι ενώ στο σύστημα καταστολής εισέρχεται ο διαλύτης (H^+ και MSA^-) εξέρχονται H^+ και OH^- , δηλαδή νερό, το οποίο έχει πολύ μικρή αγωγιμότητα.



II. Με τη μορφή της μεμβράνης:

Η λογική είναι η ίδια με την προηγούμενη, δηλαδή η αντικατάσταση των ιόντων MSA^- με OH^- , αλλά εδώ ο τρόπος παροχής τους είναι διαφορετικός. Το σύστημα αποτελείται από τρία διαμερίσματα, ένα κεντρικό και δύο πλευρικά (δεξιά και αριστερά). Τα διαμερίσματα χωρίζονται με δύο ημιπερατές μεμβράνες, η μία επιτρέπει τη διέλευση των ιόντων MSA^- και η άλλη των OH^- . Στις άκρες του συστήματος υπάρχουν δύο ηλεκτρόδια, στα οποία δίνεται δυναμικό.



Στο δεξιό διαμέρισμα το ηλεκτρόδιο έχει αρνητικό δυναμικό, οπότε λαμβάνει χώρα κάθοδος. Με τη διέλευση νερού παράγεται αέριο H_2 και ιόντα HO^- . Αντίθετα στο αριστερό διαμέρισμα το ηλεκτρόδιο έχει θετικό δυναμικό, οπότε λαμβάνει χώρα άνοδος. Με τη διέλευση νερού να παράγεται αέριο O_2 και ιόντα H^+ . Στο κεντρικό διαμέρισμα διέρχεται ο διαλύτης με τη μορφή ιόντων MSA^- και H^+ . Τα ηλεκτρόδια μέσω ηλεκτροστατικών ελκτικών ή απωστικών δυνάμεων, μετακινούν τα ιόντα μέσω των ημιπερατών μεμβρανών.

- Τα ιόντα MSA^- έλκονται προς την άνοδο (θετικό δυναμικό) και καταλήγουν στο αριστερό διαμέρισμα, από όπου οδηγούνται στα απόβλητα.
- Τα ιόντα HO^- , που παράγονται στο δεξιό διαμέρισμα, απωθούνται από την κάθοδο (αρνητικό δυναμικό) και περνούν μέσω της αντίστοιχης μεμβράνης στο κεντρικό διαμέρισμα.

Εκεί τα OH^- αντιδρούν με τα H^+ του διαλύτη σχηματίζουν νερό. Έτσι ενώ αρχικά στο κεντρικό διαμέρισμα εισέρχονται ιόντα MSA^- και H^+ , τελικά εξέρχεται νερό. Το αποτέλεσμα είναι ότι στον ανιχνευτή δεν φθάνει πλέον το οξύ (MSA) που έχει υψηλή αγωγιμότητα, αλλά νερό με χαμηλή αγωγιμότητα, μειώνοντας το σήμα υποβάθρου.

Το μειονέκτημα του συστήματος με τη στήλη είναι ότι οι θέσεις ανταλλαγής ιόντων είναι πεπερασμένες οπότε με τον καιρό μειώνεται η αποτελεσματικότητά του και τελικά απαιτείται αντικατάσταση. Αντίθετα στο σύστημα με τις μεμβράνες, η παραγωγή των ιόντων γίνεται συνεχώς μέσω της ηλεκτρόλυσης, διατηρώντας σταθερό επίπεδο καταστολής.

6. Ανιχνευτής:

Στην υγρή χρωματογραφία μπορεί να χρησιμοποιηθεί πλήθος ανιχνευτών, μεταξύ των οποίων:

- Ανιχνευτής απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)
- Αγωγιμομετρικοί
- Φθορισμού
- Δείκτης Διάθλασης
- Ηλεκτροχημικοί
- Φασματομετρίας μαζών (MS)

Στο πλαίσιο των εργαστηριακών ασκήσεων, χρησιμοποιείται κυρίως ο αγωγιμομετρικός ανιχνευτής στην ιοντική χρωματογραφία και ο ανιχνευτής απορρόφησης UV-Vis στην RPLC.

I. Αγωγιμομετρικός (Conductivity Detector):

Είναι ο ανιχνευτής που χρησιμοποιείται σε ένα σύστημα ιοντικής χρωματογραφίας, καθώς όλα τα ιόντα παρουσιάζουν αγωγιμότητα. Στο εσωτερικό του ανιχνευτή υπάρχει ένα κελί (cell) που περιέχει δύο ηλεκτρόδια, μεταξύ τους μετρείται η αγωγιμότητα. Καθώς τα ιόντα διέρχονται από το κελί, η αγωγιμότητα που καταγράφεται αυξάνεται, φθάνει σε μέγιστο (κορύφωση) και στη συνέχεια μειώνεται, επανερχόμενη στην τιμή υποβάθρου.



Η αρχή λειτουργίας του καθορίζεται από δύο βασικούς νόμους:

1. Νόμος του Ohm:

Η αγωγιμότητα είναι ανάλογη της έντασης του ρεύματος και αντίστροφος ανάλογη της τάσης

$$G = \frac{I}{E}$$

2. Νόμος του Kohlraush:

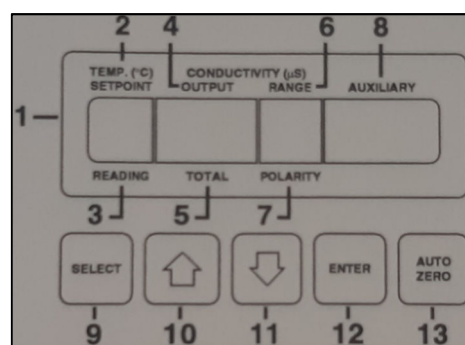
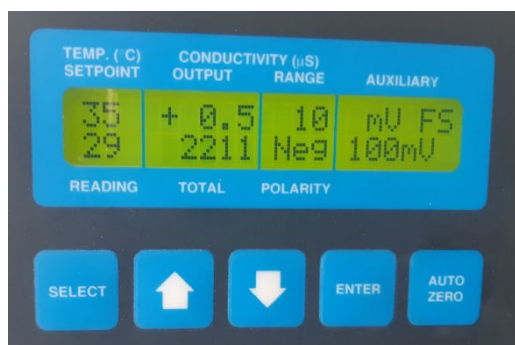
Αναφέρεται την αρχή ανεξαρτησίας των ιόντων. Κάθε ιόν συμβάλλει στην αγωγιμότητα ανεξάρτητα της παρουσίας άλλων ιόντων. Έτσι, η συνολική αγωγιμότητα είναι το άθροισμα των επιμέρους αγωγιμοτήτων κάθε ιόντος.

Η αγωγιμότητα που μετρά ο ανιχνευτής είναι το άθροισμα της αγωγιμότητας του διαλύτη (που ρέει συνεχώς) και της αγωγιμότητας των ιόντων του δείγματος. Συνήθως η αγωγιμότητα των ιόντων είναι πολύ μικρότερη από αυτή του διαλύτη, λόγω της χαμηλής συγκέντρωσής τους (π.χ. σε επίπεδα ppb ή ppt), ενώ ο διαλύτης ρέει συνεχώς με την κινητή φάση (π.χ. 1 ml/min).

Παράδειγμα: Αν η αγωγιμότητα του διαλύτη είναι 2000 μS και του ιόντος 50 μS , η συνολική αγωγιμότητα θα είναι 2050 μS . Η διαφορά (50 μS) είναι πολύ μικρή σε σχέση με τη βασική τιμή, οπότε η κορυφή στο χρωματογράφημα θα είναι μικρή. Για το λόγο αυτό, καταγράφεται η σχετική αγωγιμότητα δηλαδή η διαφορά της συνολικής αγωγιμότητας από αυτή του διαλύτη.

Πατώντας το κουμπί «**auto zero**», η τιμή της αγωγιμότητας εκείνη τη στιγμή θεωρείται μηδέν και κάθε μεταβολή καταγράφεται ως σχετική αγωγιμότητα. Στο παράδειγμα, η σχετική αγωγιμότητα θα είναι 50 μS , δημιουργώντας μια έντονη κορυφή.

Η αγωγιμότητα εξαρτάται από τη θερμοκρασία, γι' αυτό το κελί του ανιχνευτή θερμαίνεται σε θερμοκρασία ελαφρώς μεγαλύτερη της θερμοκρασίας του δωματίου (π.χ. 35 °C), ώστε να ελαχιστοποιούνται οι διακυμάνσεις.



Στον αγωγιμομετρικό ανιχνευτή που χρησιμοποιείται στην άσκηση της ιοντικής χρωματογραφίας:

- Με το κουμπί “**select**” (9) επιλέγεται η κάθε λειτουργία.
- Με τα βελάκια (10, 11) ρυθμίζονται οι τιμές (όταν αυτό επιτρέπεται).
- Με το πλήκτρο “**enter**” (12) επιβεβαιώνεται η ρύθμιση.

Στη θέση 2 ορίζεται η επιθυμητή θερμοκρασία του κελιού, στη θέση 3 δίνεται η μετρούμενη θερμοκρασία του, στη θέση 4 η σχετική αγωγιμότητα και στη 5 η συνολική αγωγιμότητα. Στη θέση 6 δίνεται η ευαισθησία, όσο μεγαλύτερη η αριθμητική τιμή, τόσο μικρότερη η ευαισθησία (είναι αντιστρόφως ανάλογη) π.χ. σε αύξηση από 10 σε 100 μειώνεται το ύψος της κορυφής κατά 10 φορές.

Η έξοδος του ανιχνευτή παρέχει τάση σε volt, η οποία καταγράφεται από το αντίστοιχο καταγραφικό. πολικότητα (θετική ή αρνητική) φαίνεται στη θέση 7 και μπορεί να αντιστραφεί μέσω του μενού. Στη θέση 8 φαίνονται οι μονάδες μέτρησης της τάσης (mV).

II. Ανιχνευτής απορρόφησης UV-VIS:

Ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος στην HPLC, καθώς πολλές οργανικές ενώσεις απορροφούν στην περιοχή αυτή. Απλά συστήματα χρησιμοποιούν εκπομπή λαμπτήρα υδραργύρου στα 254 nm, στο οποίο απορροφούν πολλές αρωματικές ενώσεις.

Πιο εξελιγμένα συστήματα διαθέτουν λαμπτήρες δευτερίου ή ξένου (για UV) ή βολφραμίου (για VIS), κυψελίδες ροής και συνήθως μονοχρωμάτορα, ώστε να επιλέγεται το βέλτιστο μήκος κύματος για κάθε αναλύτη.

Η μέτρηση βασίζεται στο νόμο Beer-Lambert:

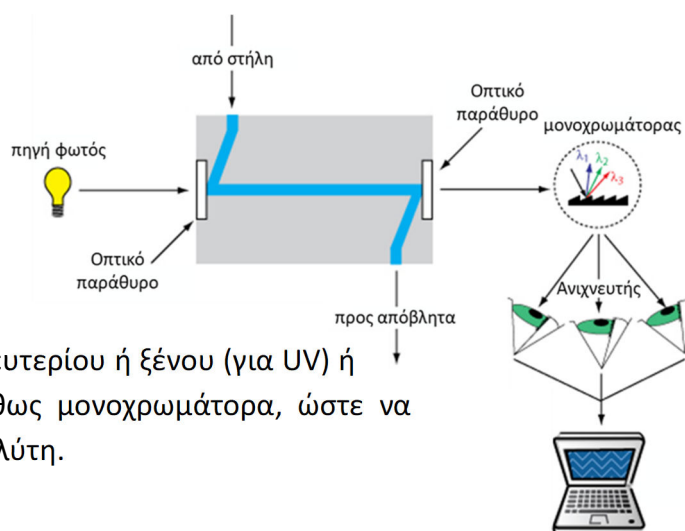
$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Όπου:

- ϵ είναι ο γραμμομοριακός συντελεστής απορρόφησης
- b η οπτική διαδρομή (cm)
- c η συγκέντρωση του αναλύτη

Γενικά χαρακτηριστικά ιδανικού ανιχνευτή:

- Υψηλή ευαισθησία σε χαμηλές συγκεντρώσεις.
- Γραμμική απόκριση.
- Ελάχιστη διαπλάτυνση κορυφών.



- Σταθερότητα έναντι μεταβολών θερμοκρασίας ή σύστασης του διαλύτη.

Συγκριτικός Πίνακας UV–Vis και Αγωγιμομετρικού Ανιχνευτή.

Χαρακτηριστικό	UV–Vis Ανιχνευτής	Αγωγιμομετρικός Ανιχνευτής
Αρχή λειτουργίας	Μέτρηση απορρόφησης UV/Vis φωτός από μόρια σε ροή (Beer–Lambert law).	Μέτρηση ηλεκτρικής αγωγιμότητας του εκλούσματος (διαλύματος) μεταξύ δύο ηλεκτροδίων.
Τι ανιχνεύει	Ουσίες που απορροφούν UV/Vis φως (π.χ. αρωματικές, ακόρεστες ενώσεις, χρωμοφόρα).	Ιοντικές ενώσεις (ανόργανα άλατα, οργανικά οξέα / βάσεις).
Ευαισθησία	Υψηλή για μόρια που απορροφούν στο UV (LOD ~ ng).	Υψηλή για ιοντικές ενώσεις (LOD ~ μg έως ng, εξαρτάται από την αγωγιμότητα υποβάθρου).
Εύρος γραμμικότητας	4–5 τάξεις μεγέθους.	3–4 τάξεις μεγέθους.
Πληροφορία που δίνει	Ποσοτική, μερικές φορές και ποιοτική αν υπάρχει χαρακτηριστικό φάσμα.	Μόνο ποσοτική.
Καταστροφή δείγματος	Όχι.	Όχι.
Περιορισμοί	Δεν ανιχνεύει μόρια χωρίς χρωμοφόρες ομάδες ή με πολύ χαμηλή απορρόφηση.	Απαιτεί φορέα-υγρό με χαμηλή αγωγιμότητα, δεν λειτουργεί καλά σε αλμυρούς διαλύτες.
Τυπικές εφαρμογές	Ανάλυση φαρμάκων, αρωματικών, φυσικών προϊόντων, πρωτεϊνών.	Ανάλυση ανόργανων αλάτων, ιόντων σε νερά, ανιόντων / κατιόντων σε ιοντοχρωματογραφία.

7. Καταγραφικό

Το καταγραφικό μετατρέπει το αναλογικό σήμα του ανιχνευτή σε ψηφιακό μέσω κατάλληλης κάρτας, και το αποθηκεύει σε υπολογιστή με τη βοήθεια εξειδικευμένου λογισμικού.

Άσκηση – Αέρια Χρωματογραφία με ανιχνευτή Ιονισμού Φλόγας (GC-FID)

Σκοπός της άσκησης είναι:

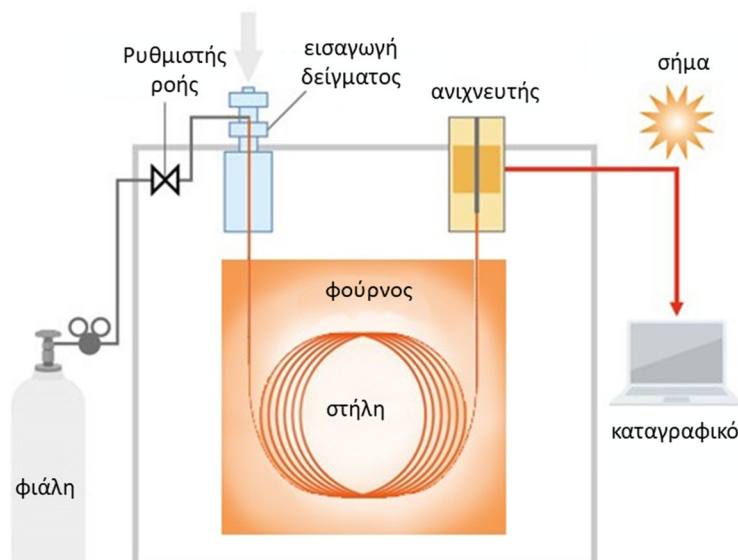
Ο ποιοτικός και ο ποσοτικός προσδιορισμός αλκοολών σε άγνωστο δείγμα και σε αλκοολούχο ποτό με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID).



Ένα σύστημα ενός αέριου Χρωματογράφου αποτελείται από 5 κυρίως τμήματα :

- 1) Την κινητή φάση
- 2) Το σύστημα εισαγωγής δείγματος
- 3) Την αναλυτική στήλη
- 4) Τον ανιχνευτή
- 5) Το καταγραφικό

Αναλυτικά, η λειτουργία του κάθε μέρους αναφέρεται στη γενική εισήγηση της αέριας χρωματογραφίας



Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια – Όργανα:

- **Διαλύτης:** tert-Butyl methyl ether (MTBE)
- **Αλκοόλες:** MeOH, EtOH, 1-PrOH, 1-ButOH
- **Εσωτερικό πρότυπο:** acetonitrile (ACN)
- **Vials:** γυάλινα βιδωτά
- **Vortex:** συσκευή ανάδευσης
- **Μικροσύριγγα:** σύριγγα υγρών Hamilton
- **Πιπέτες:** μεταβλητού όγκου για πτητικές ενώσεις των 100 μl, 1000 μl Gilson
- **Αέριος Χρωματογράφος:** GC-FID - Thermo -Focus

Παράμετροι Χρωματογράφου:

- **Κινητή φάση:**
 - **αέριο:** He
 - **ροή:** 1.5 ml/min
- **Εισαγωγέας:**
 - **τύπος:** με διαμοιρασμό (Split)
 - **ροή διαμοιρασμού:** 300 ml/min
 - **λόγος διαμοιρασμού:** 200
 - **θερμοκρασία:** 250 °C
- **Στήλη:**
 - **Τύπος:** Alltech Capillary Column
 - **Υλικό:** AT™ – WAX
 - **Χαρακτηριστικά:** ID: 0.32 mm, Length: 30 m, Film: 0.25 μm
 - **Είδος:** Πολική (polyethylene glycol)
 - **Θερμοκρασιακό πρόγραμμα:** αρχικά 50 °C για 2 λεπτά, στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξάνεται κατά 10 °C/λεπτό έως τους 120 °C, όπου παραμένει για 1 λεπτό. Ο συνολικός χρόνος του προγράμματος είναι 10 λεπτά.
- **Ανιχνευτής:**
 - **Τύπος:** Ιονισμού φλόγας (FID)
 - **αέριο makeup:** He
 - **αέρια φλόγας:** H₂ + Air
 - **ευαισθησία:** 100
 - **θερμοκρασία:** 250 °C
- **Διαλύτης:** tert-Butyl methyl ether (MTBE)
- **Εσωτερικό πρότυπο:** acetonitrile (ACN)

Το πειραματικό μέρος χωρίζεται σε τρία μέρη:

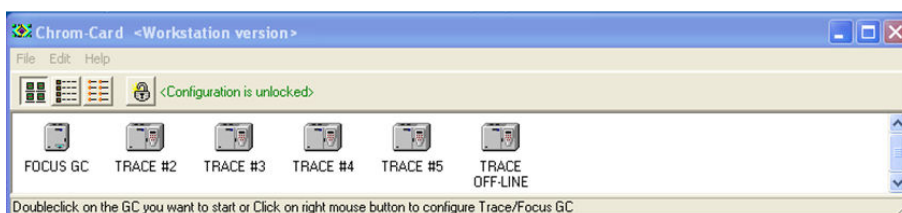
- A. Δημιουργία ενός διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης αλκοολών.
- B. Ανάλυση άγνωστου διαλύματος.
- Γ. Ανάλυση αλκοολούχου ποτού που προέρχεται από απόσταξη (π.χ. ρακή).

Άνοιγμα οργάνου:

1. Ανοίξτε το χρωματογράφο.
2. Ανοίξτε τον ηλεκτρονικό υπολογιστή.
3. Ανοίξτε τις φιάλες των αερίων (He, Air, H₂). Αν στα μανόμετρα των αερίων, η πίεση εξόδου είναι μικρότερη από 3 bar, την αυξάνεται στα 3 bar.
4. Από το λογισμό του οργάνου, επιλέξτε το επιθυμητό πρόγραμμα '**Alcohols**', φορτώστε το στον χρωματογράφο και περιμένετε να επιτευχθούν οι επιθυμητές θερμοκρασίες και να σταθεροποιηθεί το σήμα.

Συγκεκριμένα:

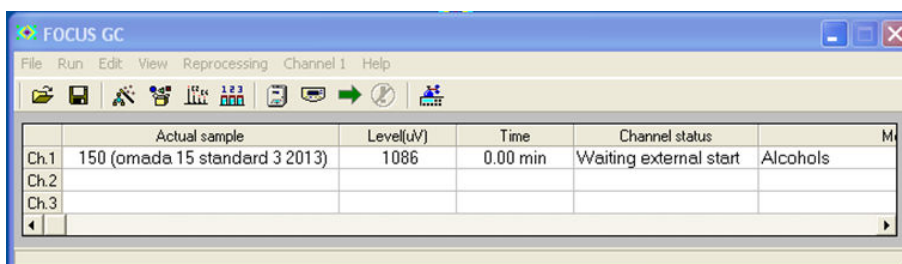
Από την επιφάνεια εργασίας του υπολογιστή, ανοίγετε το πρόγραμμα **Chrom-Card** και στη συνέχεια το **FOCUS GC** με διπλό κλικ πάνω στο αντίστοιχο εικονίδιο.



Στο παράθυρο που εμφανίζεται επιλέξτε:

edit → edit GC parameter → edit method → file open

από το φάκελο **Anal-chem II-methods** επιλέξτε τη μέθοδο **alcohols.gcm**



Αφού έχει επιλεγεί η μέθοδος λειτουργίας πρέπει να φορτωθεί στο χρωματογράφο, αυτό γίνεται από το παράθυρο της μεθόδου:

από το μενού επιλέξτε:

command → send method to GC → ok

Θα ακουστεί ένας χαρακτηριστικός ήχος από τον χρωματογράφο, ο οποίος επιβεβαιώνει ότι η μέθοδος έχει φορτωθεί. Ο χρωματογράφος θα αρχίζει να ανεβάζει θερμοκρασία και να ρυθμίζει τις ροές σύμφωνα με τη μέθοδο. Μόλις ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία, θα βρίσκεται σε κατάσταση **Stand by**, και είναι έτοιμος για την εισαγωγή και ανάλυση δείγματος.

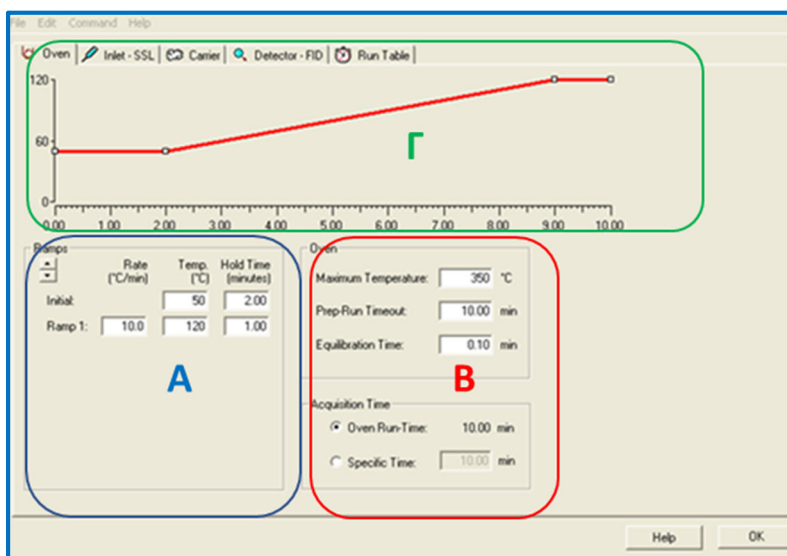
Η μέθοδος ελέγχει τις παραμέτρους όλων των μερών του χρωματογράφου:

- a) Το φούρνο (Oven)
- b) Τον εισαγωγέα, injector (Inlet-SSL)
- c) Το φέρον αέριο (Carrier)
- d) Τον ανιχνευτή (Detector – FID)



a) Φούρνος (Oven):

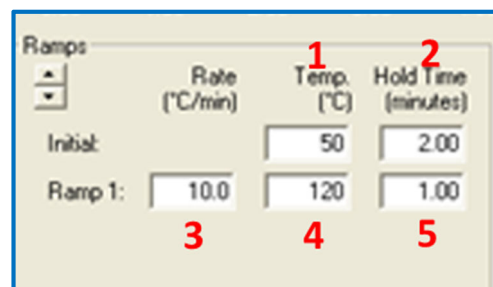
Η καρτέλα χωρίζεται σε τρία μέρη: κάτω αριστερά A, κάτω δεξιά B και το πάνω μέρος Γ.



Στο **μέρος A**, ορίζεται η αρχική θερμοκρασία του φούρνου και επόμενος και της στήλης. Η επιλογή γίνεται με βάση τις ενώσεις που αναλύονται και το διαλύτη που χρησιμοποιείται. Η αρχική θερμοκρασία πρέπει να είναι χαμηλότερη από το χαμηλότερο σημείο ζέσεως, ώστε οι ενώσεις, μόλις εισέλθουν στη στήλη, να συγκρατηθούν από αυτήν.

Στην άσκηση, η αρχική θερμοκρασία της στήλης πρέπει να είναι κάτω από τους 55.2 °C, ορίζεται 50.0 °C (θέση 1) και ορίζεται να παραμείνει για 2 λεπτά (θέση 2), ώστε όλες οι ενώσεις να εισέλθουν και να κατακρατηθούν από την υγρή στατική φάση της στήλης. Στη θέση 3 ορίζεται ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας, εδώ 10.0 °C/min, δηλαδή κάθε ένα λεπτό η θερμοκρασία αυξάνεται κατά 10 βαθμούς Κελσίου. Στη θέση 4 ορίζεται η μέγιστη θερμοκρασία της στήλης, η οποία πρέπει να είναι μεγαλύτερη από το υψηλότερο σημείο ζέσεων των ενώσεων, ώστε να απομακρυνθούν όλες. Στην άσκηση, το υψηλότερο σημείο ζέσεως είναι της βουτανόλης (117.7 °C), επομένως ορίζεται στους 120 °C και να διατηρείται για 1 λεπτό (θέση 5), για την πλήρη απομάκρυνση.

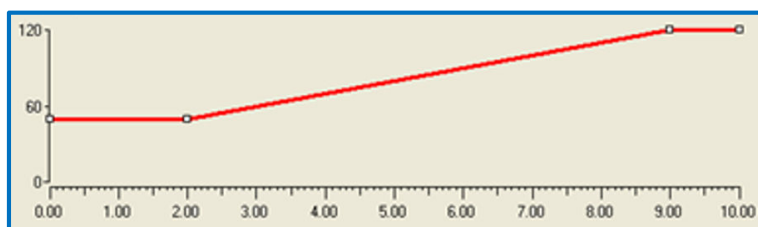
Μόλις ολοκληρωθεί το θερμοκρασιακό πρόγραμμα, ο φούρνος θα αρχίσει να ψύχεται μέχρι να φτάσει στην αρχική θερμοκρασία, ώστε η στήλη να είναι έτοιμη για το επόμενο δείγμα. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, θα ανάψει το λαμπάκι **no ready** στη κονσόλα του οργάνου, όταν επιτευχθεί η επιθυμητή θερμοκρασία ο χρωματογράφος θα επανέλθει σε κατάσταση **Stand by**.



Στο **μέρος Β** της καρτέλας ορίζονται τα όρια ασφαλείας για τη προστασία του οργάνου.

- **Θέση 1 (Maximum Temperature):** Η μέγιστη επιτρεπόμενη θερμοκρασία του φούρνου για τη προστασία της στήλης από λανθασμένες ρυθμίσεις. Εξαρτάται από τις προδιαγραφές της στήλης· στην άσκηση είναι 350 °C.
- **Θέση 2 (PrepRun Timeout):** Ο μέγιστος χρόνος (σε λεπτά) μέσα στον οποίο πρέπει να γίνει η ένεση, όταν το όργανο είναι σε κατάσταση **Ready**. Στην άσκηση είναι 10 λεπτά.
- **Θέση 3 (Equilibration Time):** Ο χρόνος εξισορρόπησης της θερμοκρασίας του φούρνου μετά την εκκίνηση (**Run**). Στην άσκηση είναι 0.1 λεπτό.
- **Θέση 4 (Oven Run-Time):** Ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης σύμφωνα με το θερμοκρασιακό πρόγραμμα. Στην άσκηση είναι 10 λεπτά καθώς:
 - 2 λεπτά στην αρχική θερμοκρασία,
 - 7 λεπτά για αύξηση από 50 έως 120 °C (70 °C / με ρυθμό 10 °C/min),
 - 1 λεπτό στη μέγιστη θερμοκρασία.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα απεικονίζεται γραφικά στο επάνω μέρος της καρτέλας (Γ)



β) Εισαγωγέας – injector Split/SplitLess (Inlet-SSL):

Στη καρτέλα αυτή ορίζονται οι παράμετροι για τη λειτουργία του εισαγωγέα.

- **Θερμοκρασία εισαγωγέα:** Ορίζεται σε τιμή αρκετά μεγαλύτερη από τα σημεία ζέσεως των ενώσεων, ώστε το δείγμα να εξατμίζεται άμεσα. Στην άσκηση είναι 250 °C (θέση 1).
- **Τρόπος λειτουργίας:** Ορίζεται αν θα είναι σε λειτουργία Split / Splitless / On-Column. Στην άσκηση επιλέγεται Split (θέση 2).
- **Ροή αραιώσης (split flow):** Σε λειτουργία Split, καθορίζεται η ροή **αραιώσης** (split flow). Στην άσκηση είναι 300 ml/min (θέση 3).
- **Λόγος διαμοιρασμού (split ratio):** Υπολογίζεται ως ο λόγος της ροής **αραιώσης** (split flow) προς τη ροή της κινητής φάσης (θέση 4).

Παράδειγμα: Στην άσκηση η κινητή φάση έχει ροή 1.5 ml/min.

$$\text{Split ratio} = \frac{\text{split flow}}{\text{carrier flow}} = \frac{300}{1.5} = 200$$

Άρα, μόνο 1/200 του δείγματος κατευθύνεται προς τη στήλη, ενώ τα υπόλοιπα (199 μέρη) απομακρύνονται από την έξοδο split του οργάνου. Για να αλλάξει ο λόγος διαμοιρασμού π.χ. από 200 να γίνει 100, μεταβάλλεται η **ροή αραιώσης**, η ροή της κινητής φάσης παραμένει σταθερή (καθώς επηρεάζει τον διαχωρισμό).

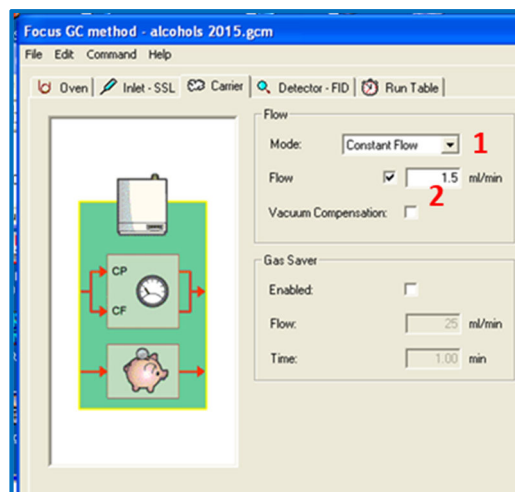
Παράδειγμα: Με μείωση της ροής αραίωσης από 300 mL/min σε 150 mL/min, ο λόγος διαμοιρασμού γίνεται 100.

$$\frac{150}{1.5} = 100$$

Φέρον αέριο (Carrier):

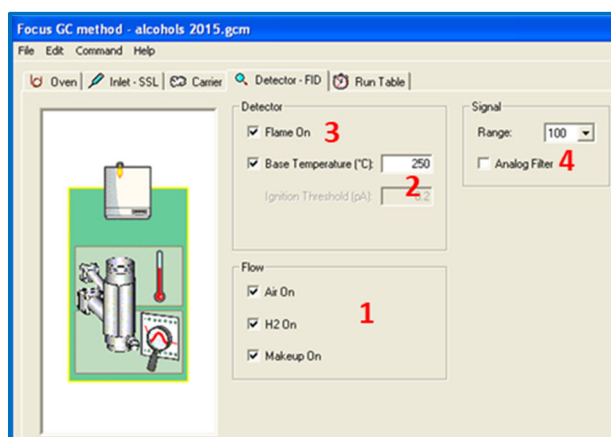
Στη καρτέλα αυτή ορίζεται ο τρόπος λειτουργίας του φέροντος αερίου:

- Αν θα είναι με **σταθερή ροή** (constant flow) ή με **σταθερή πίεση** (constant pressure). Στην άσκηση επιλέγεται σταθερή ροή (θέση 1). Στην επιλογή σταθερή ροή, η ροή του αερίου μέσα στη στήλη παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης, ακόμα και αν η πίεση μεταβάλλεται λόγω αλλαγών θερμοκρασίας.
- **Ροή κινητής φάσης:** Στην άσκηση, ορίζεται στα 1.5 mL/min (θέση 2).



γ) Ανιχνευτής (Detector – FID)

Στη καρτέλα αυτή ορίζονται οι παράμετροι λειτουργίας του ανιχνευτή:



- **Ενεργοποίηση αερίων:** Επιλέγεται η παροχή αέρα (Ar) και υδρογόνου (H₂), απαραίτητων για τη δημιουργία της φλόγας, καθώς και του make-up gas, που απαιτείται για τη σωστή λειτουργία του ανιχνευτή (θέση 1).
- **Θερμοκρασία ανιχνευτή:** Στην άσκηση ορίζεται στους 250 °C (θέση 2).
- **Άναμμα φλόγας:** Ορίζεται να ανάβει αυτόματα μόλις ο ανιχνευτής φτάσει στη σωστή θερμοκρασία και επιτευχθούν οι κατάλληλες ροές αερίων (θέση 3).

Σε παλαιότερους χρωματογράφους όταν δεν λειτουργούσε το αυτόματο άνοιγμα της φλόγας η φλόγα άναβε χειροκίνητα με αναπτήρα (παρόμοια με το άναμμα γκαζιού στο σπίτι). Είναι κρίσιμο να βεβαιώνετε ότι η φλόγα είναι αναμμένη, γιατί σε διαφορετική περίπτωση το υδρογόνο διαφεύγει άκαυτο στον χώρο, γεγονός ιδιαίτερα επικίνδυνο. Η φλόγα βρίσκεται στο εσωτερικό του ανιχνευτή και δεν είναι ορατή. Ο έλεγχος γίνεται από το **σήμα** που δίνει: όταν η φλόγα είναι αναμμένη, το σήμα είναι πολύ μεγαλύτερο σε σύγκριση με όταν είναι σβηστή. Επίσης μπορεί να ελεγχθεί στην έξοδο του ανιχνευτή αν εμφανίζεται ή όχι υγρασία, καθώς η καύση δημιουργεί νερό εμφανίζεται στην έξοδο του ανιχνευτή η ύπαρξη υγρασίας, αφού η καύση του υδρογόνου παράγει νερό. Η υγρασία εντοπίζεται εύκολα τοποθετώντας ένα μικρό καθρεφτάκι

στην έξοδο και παρατηρώντας αν θαμπώσει. Στον συγκεκριμένο χρωματογράφο, αυτός ο χειροκίνητος έλεγχος δεν είναι απαραίτητος, καθώς η διαδικασία γίνεται αυτόματα. Αν η φλόγα δεν είναι αναμμένη, το όργανο κλείνει την παροχή υδρογόνου και εμφανίζει ειδοποίηση (alarm).

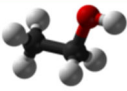
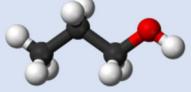
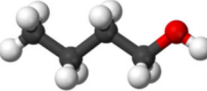
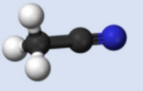
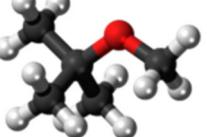
- **Ευαισθησία (Range):** Στην άσκηση έχει οριστεί τιμή 100 (θέση **4**). Η τιμή της ευαισθησίας είναι αντιστρόφως ανάλογη με την ένταση του σήματος· όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή, τόσο μικρότερη είναι η ευαισθησία του ανιχνευτή.

A. Δημιουργία προτύπου διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης:

Θα δημιουργήσετε ένα διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης με τις παρακάτω αλκοόλες:

- Μεθανόλη (MeOH)
- Αιθανόλη (EtOH)
- 1-Προπανόλη (1-ProOH)
- 1-Βουτανόλη (1-ButOH)

Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιείτε το ακετονιτρίλιο (Acetonitrile, ACN). Το ακετονιτρίλιο πληροί τα κριτήρια επιλογής για το εσωτερικό πρότυπο, καθώς εκλούεται μέσα στους επιθυμητούς χρόνους, χωρίς να επικαλύπτει κάποια κορυφή των αλκοολών και το σήμα του είναι συγκρίσιμο με αυτό των ενώσεων (οι αλκοόλες έχουν από ένα έως τέσσερα άτομα άνθρακα, ενώ το ακετονιτρίλιο έχει δύο). Ως διαλύτης χρησιμοποιείται ο τετρα-βουτυλομεθυλαιθέρας (Tert-Butyl Methyl Ether, MTBE) με σημείο ζέσεως 55.2 °C, μικρότερο και από αυτό της μεθανόλης. Το χαμηλότερο σημείο ζέσεως είναι 55.2 °C που είναι του διαλύτη (MTBE) και το υψηλότερο είναι 117.7 °C της Βουτανόλης.

Ένωση	Χημικός τύπος	3-D	Σημείο Ζέσεως (°C)	Πυκνότητα (Kg/l)
Μεθανόλη	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$		64.7	0.79
Αιθανόλη	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$		78.2	0.79
1-Προπανόλη	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$		97.0 – 98.0	0.80
1-Βουτανόλη	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$		117.7	0.81
Ακετονιτρίλιο	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}\equiv\text{N} \\ \\ \text{H} \end{array}$		81.3 – 82.1	0.79
τετρα-βουτυλομεθυλαιθέρας	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$		55.2	0.74

Δημιουργία πρότυπου δειγμάτων:

Λόγω του ότι οι ενώσεις είναι πτητικές, για τη δημιουργία των διαλυμάτων χρησιμοποιούνται ειδικές πιπέτες μεταβαλλόμενου όγκου για πτητικές ενώσεις. Τα ακτοφύσια τους (tip) περιέχουν εσωτερικά ένα έμβολο που εμποδίζει την εξάτμιση.

Παρασκευάζεται τρία (3) πρότυπα ίδια συγκέντρωσης. Για το κάθε ένα μεταφέρετε με προσοχή (λόγω πτητικότητας) 50 μl από κάθε αλκοόλη (MeOH, EtOH, ProOH, ButOH) και από το εσωτερικό πρότυπο (ACN) σε ειδικό βιδωτό vial και συμπληρώνεται σε τελικό όγκο με τον διαλύτη (MTBE). Ο συνολικός όγκος που αντιστοιχεί για τις αλκοόλες και το εσωτερικό πρότυπο είναι 250 μl οπότε χρειάζονται ακόμα 1750 μl διαλύτη ώστε ο τελικός όγκος στο κάθε πρότυπο να είναι στα 2 ml.



Ερώτηση:

Ποια είναι η συγκέντρωση του διαλύματος που παρασκευάζεται ως προς κάθε αλκοόλη σε $\frac{\mu g}{\mu l}$;

Απάντηση: π.χ. για την MeOH, τοποθετήθηκαν 50 μl MeOH σε τελικό όγκο 2 ml (δηλ. 2000 μl), οπότε η συγκέντρωση της MeOH θα είναι 50μl/2000 μl.

Η πυκνότητα της MeOH είναι: $0.79 \frac{Kgr}{lt} = 0.79 * 10^3 \frac{g}{lt} = 0.79 * 10^3 \frac{\mu g}{\mu l}$

Επομένως:

$$C_{MeOH} = \frac{50 \mu l}{2000 \mu l} = \frac{50 * 0.79 * 10^3 \mu g}{2000 \mu l} = 19.75 \frac{\mu g}{\mu l}$$

Υπολογίστε με τον ίδιο τρόπο τις συγκεντρώσεις των υπόλοιπων αλκοολών καθώς και του εσωτερικού προτύπου.

Injections δείγματος

Αφού έχει σταθεροποιηθεί το σήμα, ετοιμάζεται ο χρωματογράφος για το πρώτο injection.

- Από το λογισμικό:
από το κεντρικό παράθυρο επιλέγετε **edit sample** και γράφεται στο **Act**.

Αανοίγει ένας πίνακας όπου:

- Στη πρώτη στήλη (**sample name**) γράφετε το έτος, το όνομα της ομάδας και ποιο injection κάνετε π.χ. **2025 omada A1 standard 1**
- Στη δεύτερη στήλη (**file name**) γράφετε ακριβώς το ίδιο και αφού βγείτε από το κελί πατάτε **OK**

Η πρώτη στήλη αντιστοιχεί το όνομα που θα εμφανίζεται στην οθόνη και η δεύτερη το όνομα με το οποίο θα σωθεί το χρωματογράφημα.

- Μόλις η νέα καταχώρηση γίνει ενεργή, επιλέγετε από το μενού:

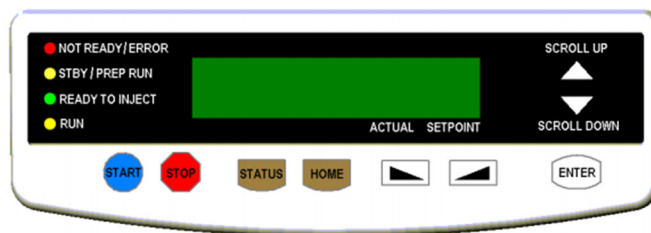
view → view sample being acquired

Ανοίγει ένα παράθυρο που θα φαίνεται το χρωματογράφημα κατά την εκτέλεση. Στη συνέχεια με μια σύριγγα υγρών (Hamilton):

- Ξεπλένετε 3 φορές με το διαλύτη (MTBE).
- Ξεπλένετε 3 φορές με το δείγμα.
- Παίρνετε ακριβώς 1 μl δείγματος **χωρίς φυσαλίδες**.



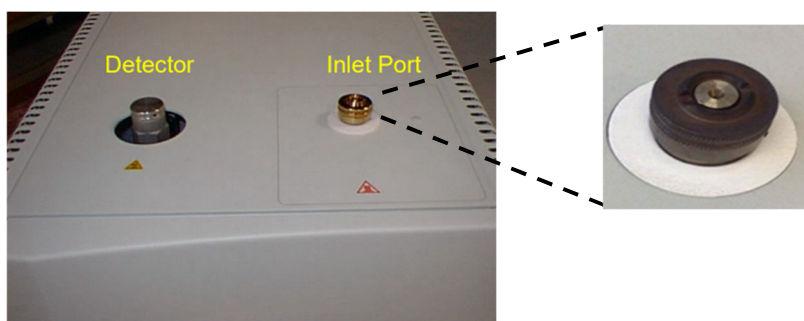
Ο χρωματογράφος είναι σε κατάσταση **Stand by**. Πρέπει να μεταβεί σε κατάσταση **Ready**. Πατώντας μια φορά το κουμπί **Start** από τη κονσόλα, το όργανο περνάει από **Stand by** σε **Ready**. Σε αυτή την κατάσταση ενεργοποιείται η ροή διαμοιρασμού (300 ml/min) καθώς το όργανο είναι σε λειτουργία split mode. Η ροή διαμοιρασμού κατά την διάρκεια αναμονής (stand by) είναι κλειστή και ενεργοποιείται λίγο πριν την εισαγωγή του δείγματος.



Τώρα το όργανο είναι έτοιμο για να γίνει το injection.

Injection στο inlet port:

1. Τοποθετείται η βελόνα της σύριγγας ακριβώς στο κέντρο του inlet. Μέσα υπάρχει το septum και χρειάζεται μικρή πίεση για να τρυπηθεί.
2. Εισάγετε όλη τη βελόνα.
3. Αδειάζετε με γρήγορη κίνηση, χωρίς υπερβολική δύναμη.
4. Αφαιρείτε γρήγορα τη βελόνα.
5. Τη στιγμή που ο χειριστής αδειάζει τη σύριγγα, άλλο μέλος της ομάδας πατά το κουμπί **Start** από την κονσόλα για να ξεκινήσει η ανάλυση. Ανάβει το λαμπάκι **Run**.
6. Μετά το injection, ξεπλένετε τη σύριγγα 3 φορές με τον διαλύτη.



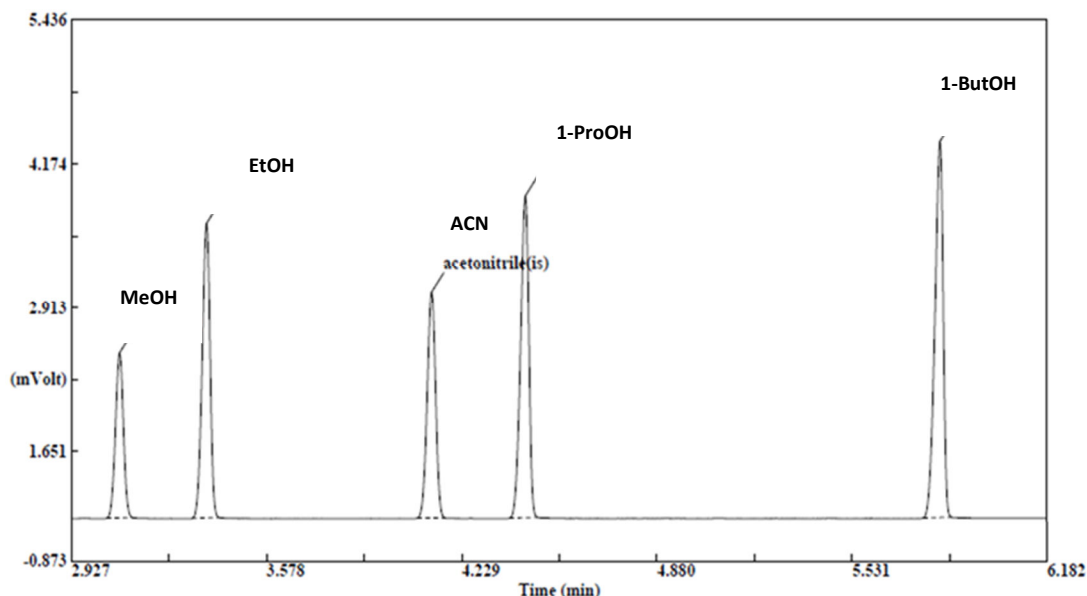
**Η διαδικασία του injection πρέπει να είναι γρήγορη και απότομη
όχι όμως με δύναμη για να μην προκληθεί κάποια ζημιά.**

Πιθανά λάθη χειρισμού:

- Αργή εισαγωγή του δείγματος θα έχει σαν αποτέλεσμα αργή είσοδος στη στήλη και αυτό να δημιουργήσει διαπλάτυνση κορυφών.
- Σταδιακή εισαγωγή του δείγματος θα έχει ως αποτέλεσμα το σπάσιμο των κορυφών, καθώς αυτό θα εισέρχεται σε δόσεις μέσα στην στήλη.
- Μη πλήρης εισαγωγή βελόνας, αν η βελόνα δεν τερματίσει τότε το δείγμα δεν θα μπει στο σωστό σημείο του εισαγωγέα και θα υπάρχουν απώλειες του δείγματος. Το μήκος της βελόνας είναι συγκεκριμένο ώστε το δείγμα να εισέρχεται στο σωστό σημείο.
- Έλλειψη συγχρονισμού injection-start, αν δεν υπάρχει συγχρονισμός στο **injection** και στο πάτημα του κουμπιού **start**, θα εμφανίζονται διαφορετικοί χρόνοι έκλουσης των ενώσεων σε κάθε **injection**.

Μόλις ολοκληρωθούν τα 10 λεπτά που χρειάζονται για να γίνει η ανάλυση λόγω του θερμοκρασιακού προγράμματος, το χρωματογράφημα αποθηκεύεται αυτόματα και το παράθυρο κλείνει. Στη κονσόλα του οργάνου θα έχει ανάψει το λαμπάκι **not ready** ενώ το όργανο επανέρχεται στις αρχικές θερμοκρασίες. Ταυτόχρονα θα ακούγεται ο ανεμιστήρας του φούρνου που θα ψύχει. Όταν φτάσει στους 50 °C, ανάβει το λαμπάκι **Stand by** και ο χρωματογράφος θα είναι έτοιμος για το επόμενο injection.

Τα χρωματογραφήματα θα έχουν τη παρακάτω μορφή, εμφανίζεται πρώτα την ουσία με το μικρότερο σημείο ζέσεως και τελευταία αυτή με το μεγαλύτερο:



Αρχικά εμφανίζεται η κορφή του διαλύτη (MTBE) που έχει το μικρότερο σημείο ζέσεως (στο παραπάνω διάγραμμα δεν φαίνεται λόγω της μεγέθυνσης που έχει γίνει). Από τις αλκοόλες πρώτη θα βγει η μεθανόλη με το μικρότερο σημείο ζέσεως 64.7 °C, έπειτα η αιθανόλη με σ.ζ. 78 °C, το ακετονιτρίλιο με σ.ζ. 81 °C, η 1-προπανόλη με σ.ζ. 97 °C και τέλος η 1-βουτανόλη με σ.ζ. 117 °C. Η επιφάνεια των κορυφών σχετίζεται με την ποσότητα άνθρακα της κάθε ουσίας.

Παράδειγμα: MeOH, EtOH και ACN έχουν την ίδια συγκέντρωση (19.75 µg/µl). Η αιθανόλη έχει δύο άνθρακες, η μεθανόλη ένα, οπότε η επιφάνεια ολοκλήρωσης της αιθανόλης αναμένεται διπλάσια από της μεθανόλης. Το ACN έχει επίσης δύο άνθρακες και ίδια συγκέντρωση με αιθανόλη αλλά λόγω διαφορετικής οξειδωτικής κατάστασης, το σήμα του είναι μικρότερο. Η προπανόλη έχει τρία άτομα άνθρακα και η συγκέντρωσή της είναι ελαφρώς μεγαλύτερη (20.00 µg/µl) από αυτή της αιθανόλης. Επομένως, η επιφάνεια ολοκλήρωσής της αναμένεται να είναι μεγαλύτερη, όπως και της βουτανόλης, η οποία έχει τέσσερα άτομα άνθρακα και ακόμη μεγαλύτερη συγκέντρωση (20.25 µg/µl).

Με τον ίδιο τρόπο γίνεται το 2^ο και το 3^ο injection από το πρότυπο.

B. Άγνωστο Δείγμα

Σας δίνεται άγνωστο δείγμα αλκοολών, στο οποίο θα κάνετε μόνο ένα injection με την ίδια ακριβώς διαδικασία όπως στο πρότυπο δείγμα. Το όνομα που θα δώσετε στο αρχείο θα είναι π.χ. **2025 omada A1 agnwsto**. Η μόνη πληροφορία που έχετε για τη σύσταση του αγνώστου είναι ότι πρόκειται για μείγμα κάποιων από τις τέσσερις αλκοόλες που είναι διαλυμένες στον ίδιο διαλύτη με το πρότυπο δείγμα και ότι το εσωτερικό πρότυπο είναι ίδιο και στην ίδια συγκέντρωση με εκείνο του πρότυπου διαλύματος.

Γ. Αλκοολούχο ποτό προερχόμενο από απόσταξη (ρακή)

Ως αλκοολούχο ποτό θα χρησιμοποιήσετε δείγμα ρακής. Αρχικά θα ετοιμάσετε το δείγμα της ρακής, το μόνο που χρειάζεται είναι να προστεθεί το εσωτερικό πρότυπο στην ίδια ακριβώς συγκέντρωση με το πρότυπο δείγμα.

Σε ένα καθαρό vials μεταφέρετε 50 μl ACN και 1950 μl ρακής.

Θα κάνετε ένα injection από τη ρακή με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως και τα προηγούμενα, δίνοντας το όνομα π.χ. **2025 omada A1 raki aleksakis**.

Για το injection αυτό τη σύριγγα τη πλένετε λίγο διαφορετικά:

- Ξεπλένετε 3 φορές με το διαλύτη (MTBE).
- Ξεπλένετε 3 φορές με καθαρό νερό (είναι ο διαλύτης της ρακής), ώστε να απομακρυνθεί ο οργανικός διαλύτης (MTBE) από τη σύριγγα, διαφορετικά θα εμφανιστεί η κορυφή του στο χρωματογράφημα.
- Ξεπλένετε 3 φορές με το δείγμα (δηλαδή τη ρακή με το εσωτερικό πρότυπο).
- Παίρνετε ακριβώς 1 μl χωρίς φυσαλίδες.
- Κάνετε το injection αφού πρώτα ρυθμίσετε το GC.
- Ξεπλένετε 3 φορές με καθαρό νερό.
- Ξεπλένετε 3 φορές με διαλύτη (MTBE) ώστε να μην μείνει νερό στη σύριγγα.

Διαδικασία κλεισίματος

Αφού ολοκληρωθούν τα χρωματαγραφήματα όλων των δειγμάτων, κάνετε την διαδικασία κλεισίματος, κατά την οποία σβήνει η φλόγα και μειώνονται οι θερμοκρασίες, στον εισαγωγέα, στο φούρνο και στον ανιχνευτή.

Από το κεντρικό μενού επιλέγετε:

edit → edit GC parameter → edit method → file open

και από το φάκελο Anal-chemII-methods επιλέγετε τη μέθοδο shut down.gcm

Στέλνετε τη μέθοδο στο χρωματογράφο:

command → send method to GC → ok

(θα ακούσετε πάλι τον αντίστοιχο ήχο, πιο αδύναμο από πριν)

Μόλις πέσουν οι θερμοκρασίες, κλείνετε τις παροχές των αερίων (Air, H₂, He) από τις βαλβίδες τους στη φιάλη και στο μανόμετρο.

Ολοκληρώσεις

Για την ολοκλήρωση του χρωματογραφήματος, πρώτα ανοίγεται το αντίστοιχο χρωματογράφημα:

view chromatogram → file → load chrom

Ανοίγετε το επιθυμητό αρχείο, βάσει των ονομάτων που έχετε δώσει, στο οποίο έχει ρυθμιστεί η αυτόματη ολοκλήρωση. Κάνετε μεγέθυνση (zoom) για να φανούν καλύτερα οι κορυφές.

Από το μενού show είναι δυνατή η επιλογή (baseline, Retention time, peak name).

peak data → view peak data

Καταγράφεται για κάθε κορυφή το χρόνο έκλουσης και την επιφάνεια ολοκλήρωσης.

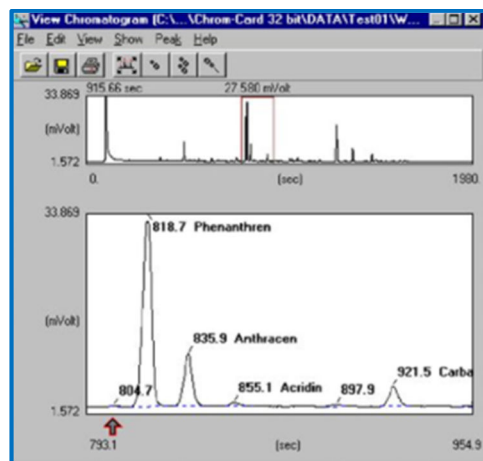
Αποθηκεύετε την εικόνα ως αρχείο pdf για την αναφορά σας.

file → print → save to pdf

Στο Lab book σας ετοιμάζεται πίνακες στους οποίου, για κάθε injection και κάθε ένωση θα σημειώνεται το χρόνο έκλουσης (με ακρίβεια 2 δεκαδικών ψηφίων) και η επιφάνεια ολοκλήρωσης.

Οι πίνακες θα έχουν τη μορφή:

Standard inj. No1	Time/min	Area
MeOH	3.13	18983
EtOH	3.42	30664
ACN	4.18	29437
ProOH	4.49	44696
ButOH	5.88	48996



Αποτελέσματα και ανάλυση:

Αρχικά πρέπει να υπολογίσετε τους μέσους χρόνους έκλουσης κάθε αλκοόλης καθώς και του εσωτερικού πρότυπου. Έχετε τρεις χρόνους, έναν από τα injection κάθε πρότυπου. Από αυτούς θα υπολογίσετε τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση, με τα σωστά σημαντικά ψηφία.

Παράδειγμα: Για την MeOH, από το injection του 1^{ου} πρότυπου έχετε χρόνο έκλουσης 3.13 min, από το 2^ο έχετε 3.15 min και από το 3^ο έχετε 3.15 min. Αυτά δίνουν μια μέση τιμή στα 3.14 min με μια τυπική απόκλιση 0.01 (3.14 ± 0.01). Αυτή θα είναι η τιμή χρόνου έκλουσης για τη MeOH. Αντίστοιχα θα κάνετε για τις υπόλοιπες αλκοόλες και το εσωτερικό πρότυπο.

Στη συνέχεια θα υπολογίσετε τους Σχετικούς Συντελεστές Απόκρισης (Relative Response Factor, RRF) για κάθε αλκοόλη, για κάθε injection. Πρώτα πρέπει να υπολογίσετε τις συγκεντρώσεις κάθε αλκοόλης καθώς και του εσωτερικού προτύπου (is) στο πρότυπο διάλυμα. Π.χ. στη MeOH είναι 19.75 $\frac{\mu g}{\mu l}$, **πρέπει να υπολογίσετε αντίστοιχα για την EtOH, ProOH, ButOH και ACN (is)**

Ο υπολογισμός RRF για κάθε αλκοόλη γίνεται από τη σχέση:

$$RRF_A = \frac{RF_A}{RF_{is}} = \frac{area_A * c_{is}}{area_{is} * C_A}$$

Όπου:

- A η ουσία,
- is το εσωτερικό πρότυπο,
- c η συγκέντρωση της ουσίας A και του is σε $\mu g/\mu l$
- area το εμβαδόν κορυφής της ουσίας A και του is

Υπολογίζετε τρία RRF, ένα για τη κάθε αλκοόλη από το injection του κάθε προτύπου. Από τις τρεις τιμές θα βρείτε τη **μέση τιμή** και τη **τυπική απόκλιση** για κάθε αλκοόλη.

1. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του αγνώστου δείγματος:

- Για τη ποιοτική ανάλυση, γίνεται ταυτοποίηση κάθε κορυφής με τη σύγκριση των χρόνων έκλουσης του αγνώστου δείγματος με τη μέση τιμή των χρόνων έκλουσης κάθε ένωσης από τα πρότυπα, λαμβάνοντας υπόψη το εύρος που δίνει η τυπική απόκλιση.
- Για το ποσοτικό προσδιορισμό, η συγκέντρωση κάθε ουσίας στο άγνωστο διάλυμα υπολογίζεται από τον τύπο:

$$C_A = \frac{area_A * c_{is}}{area_{is} * RRF_A}$$

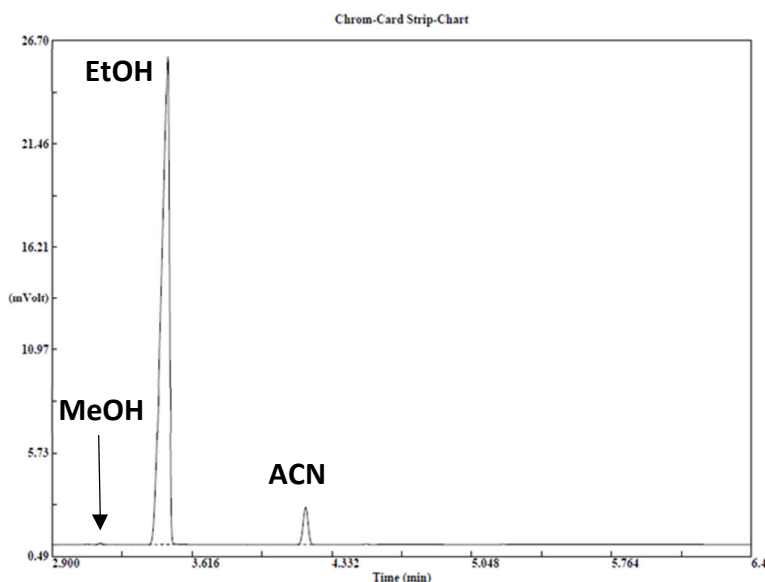
Όπου:

- **A:** η ουσία,
- **is:** το εσωτερικό πρότυπο,
- **c:** η συγκέντρωση του εσωτερικού πρότυπου σε $\mu\text{g}/\text{ml}$
- **area:** το εμβαδόν κορυφής (για την ουσία A και το is)
- **RRF:** ο σχετικός συντελεστής απόκρισης για την ουσία A

Μεγάλο πλεονέκτημα με τη χρήση των RRF είναι ότι διορθώνονται οι απώλειες του δείγματος κατά την εισαγωγή του στο χρωματογράφο.

2. Ανάλυση του δείγματος Ρακής:

Στο δείγμα από απόσταξη 'ρακή' θα πραγματοποιηθεί ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των αλκοολών. Για το ποιοτικό προσδιορισμό, γίνεται ταυτοποίηση της κάθε κορυφής με σύγκριση των χρόνων έκλουσης των κορυφών του δείγματος με τη μέση τιμή των χρόνων έκλουσης από τα πρότυπα. Παρατηρείται ότι εκτός από τη κορυφή του εσωτερικού προτύπου (ACN) που έχει προστεθεί, εμφανίζεται μια μεγάλη κορυφή στο χρόνο έκλουσης της αιθανόλης και σε ορισμένες περιπτώσεις, μια πολύ μικρή στο χρόνο έκλουσης της μεθανόλης. Στους χρόνους έκλουσης της προπανόλης και της βουτανόλης δεν εμφανίζονται κορυφές, όπως αναμενόταν.



Στη συνέχεια υπολογίζεται η συγκέντρωση της αιθανόλης και της μεθανόλης (αν ανιχνεύεται) σε $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$.

Καθώς το δείγμα της ρακής που αναλύθηκε είναι αραιωμένο (λόγω προσθήκης εσωτερικού προτύπου: 50 μl is σε 1950 μl ρακής), πρέπει να γίνει αναγωγή των υπολογισμένων συγκεντρώσεων MeOH και EtOH στο αρχικό δείγμα.

Η συγκέντρωση της μεθανόλης πρέπει να είναι μικρότερη από $10 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$ για να θεωρείται ασφαλής προς κατανάλωση.

Τέλος από τη τελική συγκέντρωση της αιθανόλης υπολογίζονται οι αλκοολικοί βαθμοί σε % v/v.

Παράδειγμα: Έστω ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης σε ένα δείγμα ρακής ήταν $395.1 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$, πόσοι είναι οι αλκοολικοί βαθμοί;

Απάντηση: Η πυκνότητα της αιθανόλης είναι $0.79 \frac{\text{Kg}}{\text{lt}}$ οπότε θα είναι $0.79 * 10^3 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$

οπότε η συγκέντρωση γίνεται: $395.1 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \rightarrow$

$$395.1 / (0.79 * 10^3) \frac{\mu\text{l}}{\mu\text{l}} \rightarrow$$

$$0.50001 \frac{\text{v}}{\text{v}} \rightarrow$$

$$50.01 \% \frac{\text{v}}{\text{v}}$$

Η συγκεκριμένη ρακή έχει αλκοολικούς βαθμούς 50.0°.

Βίντεο: Αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας παρουσιάζεται στο βίντεο της άσκησης στη ιστοσελίδα του μαθήματος στο e-class, καθώς και στο κανάλι του εργαστηρίου στο YouTube:



Εργ. Αναλυτικής II:



<https://www.chemistry.uoc.gr/eclass/modules/document/?course=CHEM-UNDER115>

Youtube:



<https://www.youtube.com/channel/UCrrDdUXUiTxyhezA140Rlew>

Ερωτήσεις Κατανόησης:

1. Η συγκέντρωση της MeOH, της EtOH και του εσωτερικού προτύπου είναι $19.75 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ και οι επιφάνειες ολοκλήρωσης είναι: για την MeOH 18983, για την EtOH 30664 και για το εσωτερικό πρότυπο 29437. Υπολογίσετε τον RRF της MeOH και της EtOH.
2. Στο άγνωστο δείγμα, η επιφάνεια ολοκλήρωσης της EtOH είναι 50450 και του εσωτερικού προτύπου 25400. Με βάση τον RRF της EtOH που βρήκατε προηγούμενος, υπολογίσετε τη συγκέντρωση της EtOH σε $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Σε πόσους αλκοολικούς βαθμούς αντιστοιχεί;
3. Δημιουργείτε ένα διάλυμα στο οποίο προσθέτετε 100 μl EtOH και 200 μl ButOH σε τελικό όγκο 2 ml. Πόση είναι η συγκέντρωση της EtOH και της ButOH σε $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ στο διάλυμα; Δίνεται οι πυκνότητες: της EtOH $0.79 \text{ Kg}/\text{lt}$ και της ButOH $0.81 \text{ Kg}/\text{lt}$.

Άσκηση – Αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή Θερμικής Αγωγιμότητας (GC-TCD)

Σκοπός της άσκησης είναι:

Η εφαρμογή της εξίσωσης Van Deemter για τον προσδιορισμό
της βέλτιστης ταχύτητας ροής της κινητής φάσης.

Η άσκηση χωρίζεται σε δύο μέρη:

- A. Στο πρώτο μέρος θα προσδιοριστεί η βέλτιστη ταχύτητα ροής της κινητής φάσης μέσω της εξίσωσης Van Deemter.
- B. Στο δεύτερο μέρος θα γίνει ποιοτικός προσδιορισμός άγνωστου δείγματος με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων.

Βέλτιστη ταχύτητα ροής:

Σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας της στήλης, μεταβάλλεται η ροή της κινητής φάσης προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη ταχύτητα ροής, στην οποία παρατηρείται ο μέγιστος αριθμός θεωρητικών πλακών σύμφωνα με την εξίσωση Van Deemter. Το Ύψος Ισοδύναμο Θεωρητικής Πλάκας (ΥΙΘΠ) μπορεί να θεωρηθεί ως το ελάχιστο τμήμα της στήλης στο οποίο μπορεί να επιτευχθεί διαχωρισμός:

$$H = \frac{L}{N}$$

Όπου:

- **L**: μήκος της στήλης
- **N**: αριθμός των θεωρητικών πλακών

Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών δίνεται από τον τύπο:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{t_w} \right)^2$$

Όπου:

- **t_r**: χρόνος έκλουσης της ουσίας
- **t_w**: πλάτος κορυφής της ουσίας.

Η εξίσωση **Van Deemter** δείχνει πως η στήλη και η ταχύτητα ροής επηρεάζουν το ύψος πλάκας.

Η σχέση είναι:

$$H = A + \frac{B}{U} + C * U$$

Όπου:

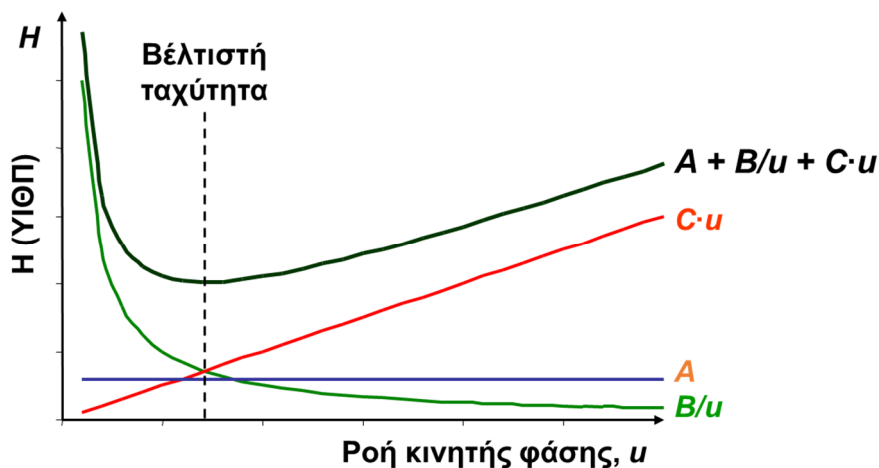
- **U**: ταχύτητα ροής,
- **A**: συντελεστής στροβιλώδους διάχυσης
- **B**: συντελεστής επιμήκης διάχυσης
- **C**: συντελεστής αντίσταση στη μεταφοράς μάζας



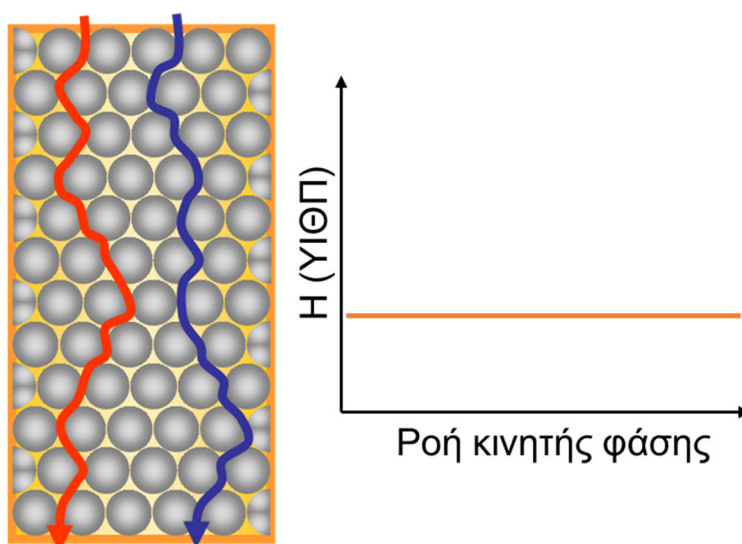
Η εξίσωση δείχνει ότι υπάρχουν τρεις διαφορετικοί μηχανισμοί, οι οποίοι επηρεάζονται διαφορετικά από την ταχύτητα ροής:

- Ο πρώτος είναι ανάλογος της ταχύτητας.
- Ο δεύτερος είναι αντιστρόφως ανάλογος.
- Ο τρίτος είναι ανεξάρτητος αυτής.

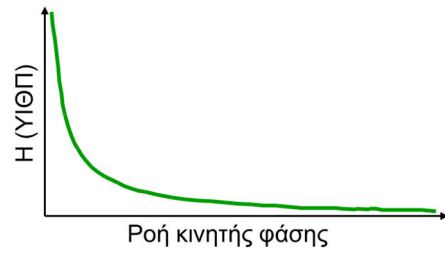
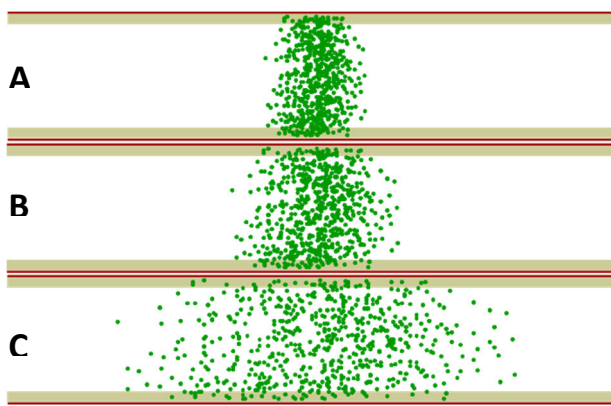
Η συνολική συμπεριφορά του ΥΙΘΠ ως συνάρτηση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης παρουσιάζει αρχικά μείωση, φτάνει σε ένα ελάχιστο σημείο και στη συνέχεια αυξάνεται. Η ταχύτητα της κινητής φάσης που αντιστοιχεί στο ελάχιστο ΥΙΘΠ αποτελεί το ζητούμενο της σημερινής άσκησης.



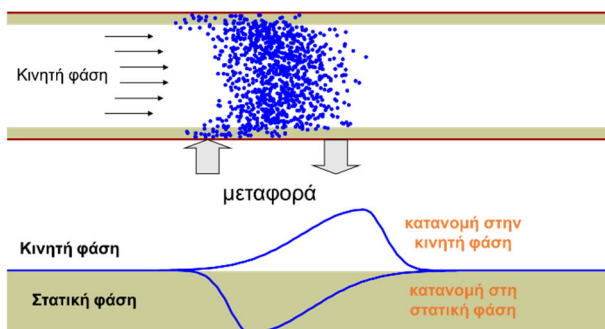
1. **Συντελεστής στροβιλώδους διάχυσης (A):** Εξαρτάται από τις πολλαπλές διαδρομές που προκύπτουν λόγω της ανομοιομορφίας στο μέγεθος και το σχήμα των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού. Οι διαφορετικές διαδρομές οδηγούν σε διαφορετικές αποστάσεις που διανύουν τα μόρια, με αποτέλεσμα τη διεύρυνση των κορυφών. Όλες οι ενώσεις επηρεάζονται εξίσου, ανεξάρτητα από τη χημική τους φύση και ο συντελεστής στροβιλώδους διάχυσης **δεν εξαρτάται από την ταχύτητα της κινητής φάσης**.



2. **Συντελεστής επιμήκους διάχυσης (B):** Εξαρτάται από τη διαμήκη διάχυση της ουσίας στην κινητή φάση. Η διάχυση απαιτεί χρόνο, επομένως, όσο πιο γρήγορα πραγματοποιείται η ανάλυση, τόσο μικρότερη είναι η διεύρυνση της κορυφής λόγω διάχυσης. Ο όρος B είναι αντιστρόφως ανάλογος της ταχύτητας ροής.



3. **Συντελεστής αντίστασης στη μεταφορά μάζας (C):** Σχετίζεται με την αντίσταση που συναντούν τα μόρια κατά τη μεταφορά τους μεταξύ των φάσεων. Όσο αυξάνεται η ταχύτητα ροής, αυξάνεται και η αντίσταση στη μεταφορά μάζας. Όταν τα μόρια εισέλθουν σε μία φάση, δυσκολεύονται να εξέλθουν ξανά. Ο όρος C είναι ανάλογος της ταχύτητας ροής.



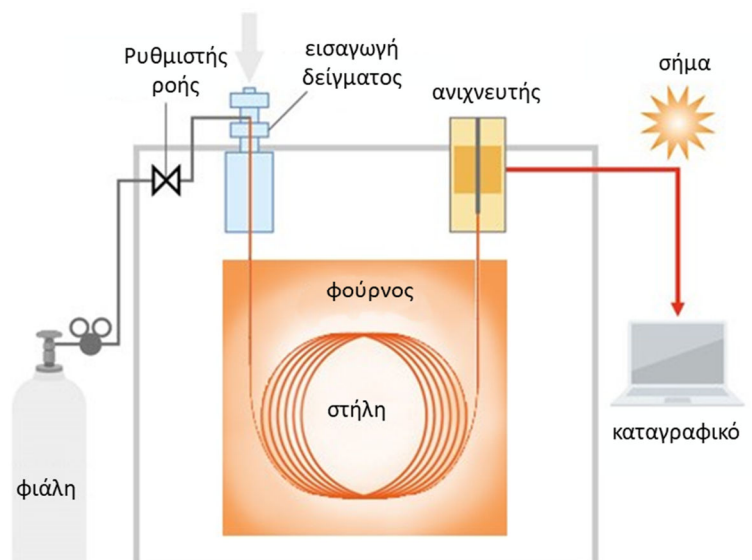
Σε πληρωμένες στήλες και οι τρεις όροι συνεισφέρουν στη διεύρυνση των κορυφών. Μικρότερα σωματίδια εξασφαλίζουν πιο ομοιόμορφες διαδρομές, περιορίζοντας τη διεύρυνση λόγω του φαινομένου των πολλαπλών διαδρομών. Επίσης, διευκολύνουν την ανταλλαγή μεταξύ των φάσεων, μειώνοντας την αντίσταση στη μεταφορά μάζας. Στην υγρή χρωματογραφία επειδή οι συντελεστές διάχυσης στα υγρά είναι πολύ μικρότεροι σε σύγκριση με εκείνους στα αέρια, ο όρος B συνήθως δεν έχει ιδιαίτερη σημασία, εκτός εάν χρησιμοποιούνται πολύ χαμηλές ταχύτητες ροής.

Στις ανοιχτές σωληνοειδείς (τριχοειδείς) στήλες, ο όρος των πολλαπλών διαδρομών (A) είναι μηδενικός, γεγονός που μειώνει το πλάτος της ζώνης και αυξάνει τη διαχωριστική ικανότητα.

Ένα σύστημα ενός αέριου Χρωματογράφου αποτελείται από 5 κυρίως τμήματα :

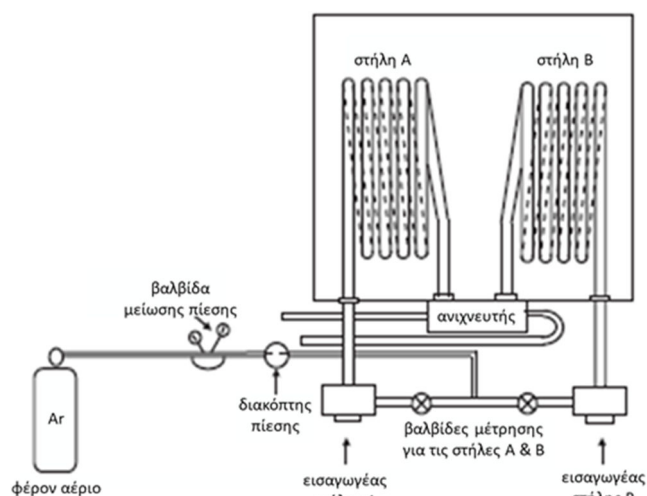
- 1) Την κινητή φάση
- 2) Το σύστημα εισαγωγής δείγματος
- 3) Την αναλυτική στήλη
- 4) Τον ανιχνευτή
- 5) Το καταγραφικό

Αναλυτικά, η λειτουργία του κάθε μέρους αναφέρεται στη γενική εισήγηση της αέριας χρωματογραφίας



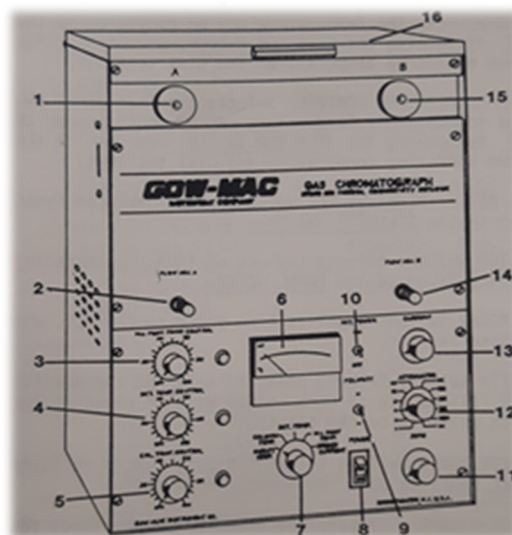
Οργανολογία

Το όργανο αποτελείται από δύο στήλες πλήρωσης την A και την B. Η στήλη A χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των ουσιών, ενώ η στήλη B λειτουργεί ως στήλη αναφοράς. Για τη λειτουργία του ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας απαιτείται φέρουσα ροή αναφοράς. Και οι δύο στήλες βρίσκονται στον ίδιο φούρνο, ώστε να θερμαίνονται με τον ίδιο τρόπο.



Διακόπτες Χρωματογράφου:

1. Το inlet (injector) για τη στήλη A.
2. Flow ADJ. Ρυθμίζει τη ταχύτητα ροής της στήλη A.
3. Injection.port.temp. Ρυθμίζει τη θερμοκρασία του injector επί τοις %.
4. Det.Temp.Control. Ρυθμίζει τη θερμοκρασία του ανιχνευτή επί τοις %.
5. Col.temp.control Ρυθμίζει τη θερμοκρασία της στήλης επί τοις %.
6. Οθόνη που δείχνει τη τιμή των θερμοκρασιών και της έντασης του ρεύματος του ανιχνευτή
7. Διακόπτης για την επιλογή της παραμέτρου που θα δείχνει η οθόνη (6)
8. Κεντρικός διακόπτης του οργάνου
9. Διακόπτης πολικότητας σήματος. Αλλάζει την πολικότητα στο αναλογικό σήμα εξόδου του χρωματογράφου
10. Διακόπτης Det power. Ενεργοποιείται ο ανιχνευτής όταν είναι στο on, ενώ όταν είναι στο off είναι εκτός λειτουργίας
11. Διακόπτης zero. Μεταβάλλει το σήμα υποβάθρου. Ήταν χρήσιμο σε παλιά καταγραφικά που δεν είχαν αυτόματο auto-zero (μηδενισμό σήματος υποβάθρου) και με αυτό μειωνόταν το σήμα υποβάθρου.
12. Διακόπτης Attenuator. Ρυθμίζει την ευαισθησία του οργάνου, η τιμή της ευαισθησίας είναι αντιστρόφως ανάλογη του σήματος. Η ευαισθησία που επιλέγεται για τη συγκεκριμένη άσκηση είναι 2.
13. Διακόπτης Current. Ρυθμίζει το ρεύμα της γέφυρας, είναι το ρεύμα που λειτουργεί ο ανιχνευτής. Στη συγκεκριμένη άσκηση βάζετε 120 mA (αργή ρύθμιση γιατί μπορεί να καεί το νήμα του ανιχνευτή)
14. Flow ADJ. Ρυθμίζει την ταχύτητα ροής της στήλης B.
15. Το inlet (injector) για την στήλη B.
16. Πόρτα του φούρνου. Μέσα σε αυτόν βρίσκονται οι δύο στήλες.



Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια – Όργανα:

- Τολουόλιο
- Αλκοόλες: MeOH, EtOH, 1-PrOH, 1-ButOH
- Μικροσύριγγα: σύριγγα υγρών Hamilton
- Προχοΐδα ροής
- Χρονόμετρο
- Αέριος Χρωματογράφος Gow Mac series 350



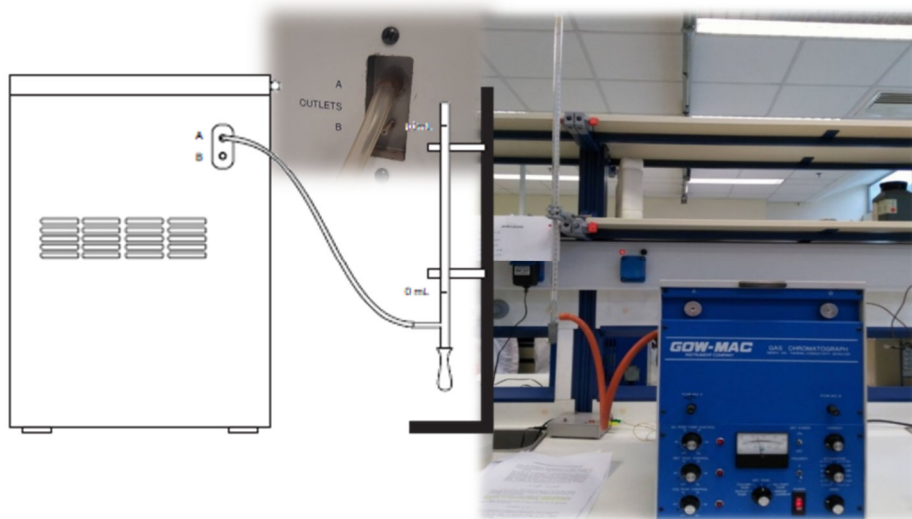
Παράμετροι Χρωματογράφου:

- **Κινητή φάση:**
 - **Αέριο:** Ar
 - **Ροή:** 30, 60, 90 ml/min
- **Εισαγωγέας:**
 - **Τύπος:** on column
 - **Θερμοκρασία Εισαγωγέα:** ~150 °C
- **Στήλη:**
 - **Υλικό:** 20 % Carb 20 m on chrom. –P 80/100 mesh
 - **Χαρακτηριστικά:** μήκος 1.22 m, 4'x1/4' DNP
 - **Είδος:** πολική
 - **Θερμοκρασιακό πρόγραμμα:** σταθερή θερμοκρασία ~150 °C
- **Ανιχνευτής:**
 - **Τύπος:** Θερμικής Αγωγιμότητας (TCD)
 - **Θερμοκρασία:** ~150 °C
 - **Ευαισθησία:** 2
 - **Ένταση ρεύματος ανιχνευτή:** 120 mA
- **Χρωματογράφος:**
 - Gow Mac series 350

Άνοιγμα οργάνου:

1. Ανοίγετε τον ηλεκτρονικό υπολογιστή
2. Ανοίγετε το αέριο Ar ανοίγοντας την βαλβίδα από τη φιάλη. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται το Ar, λόγω του ότι έχει μεγάλη θερμική αγωγιμότητα, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία του ανιχνευτή.
3. Ανοίγετε το χρωματογράφο (διακόπτης 8)
4. Ανοίγετε τον ανιχνευτή (διακόπτης 10)
5. Ρυθμίζετε τους θερμοστάτες
 - a. του injector (διακόπτης 3)
 - b. του ανιχνευτή (διακόπτης 4)
 - c. των στηλών (διακόπτης 5)
6. Ρυθμίζετε την ένταση του ρεύματος του ανιχνευτή στα 120 mA (διακόπτης 13)
7. Ρυθμίζετε την ευαισθησία του ανιχνευτή στο 2 (διακόπτης 12).

Μόλις οι θερμοκρασίες σταθεροποιηθούν, ελέγχετε ξανά την ένταση του ρεύματος γέφυρας του ανιχνευτή να είναι στα 120 mA, και ρυθμίζετε τους διακόπτες (3,4,5) των θερμοστατών στο 20% ώστε να συντηρούν τις θερμοκρασίες σε σταθερά επίπεδα.



Ρύθμιση ταχύτητας ροής της κινητής φάσης:

Η ροή της κινητής φάσης της στήλης A ρυθμίζεται με το διακόπτη ροής (διακόπτης 2). Ο έλεγχος της ροής πραγματοποιείται με τη χρήση ροόμετρου προχοΐδας, το οποίο στην είσοδο του συνδέεται με την έξοδο του χρωματογράφου. Πιέζοντας το πουάρ στο κάτω μέρος της προχοΐδας δημιουργείται μια φυσαλίδα, η οποία μετακινείται με την ταχύτητα της κινητής φάσης.

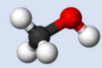
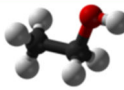
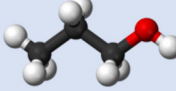
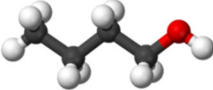
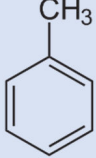
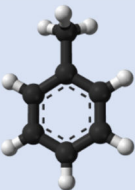
Με τη βοήθεια χρονομέτρου μετράτε τον χρόνο που χρειάζεται για να μετακινηθεί η φυσαλίδα μέσα στην προχοΐδα κατά 10 ml και υπολογίζετε την ταχύτητά της σε ml/min. Αυτή η τιμή αντιστοιχεί στην ταχύτητα της κινητής φάσης. Αν η ταχύτητα ροής δεν είναι η επιθυμητή, την τροποποιείτε μέσω του διακόπτη 3 και αφού σταθεροποιηθεί τη μετράτε ξανά.

A. Μέρος 1^ο - Βέλτιστη ταχύτητα ροής της κινητής φάσης

Όλες οι παράμετροι του χρωματογράφου παραμένουν σταθερές και το μόνο που θα μεταβάλλεται είναι η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης. Η θερμοκρασία της στήλης παραμένει σταθερή, επομένως δεν είναι απαραίτητη η χρήση κάποιου κύκλου θερμοκρασιακού προγράμματος. Οι θερμοκρασίες που επιλέγονται πρέπει είναι να είναι μεγαλύτερες από το σημείο ζέσεως των ενώσεων που θα χρησιμοποιηθούν.

Στο πρώτο μέρος της άσκησης θα χρησιμοποιηθεί τολουόλιο και στο δεύτερο οι αλκοόλες:

MeOH, EtOH, ProOH και ButOH.

Ένωση	Χημικός τύπος	3-D	Σημείο Ζέσεως (°C)
Μεθανόλη	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$		64.7
Αιθανόλη	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$		78.2
Προπανόλη	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$		97.0 – 98.0
Βουτανόλη	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$		117.7
τολουόλιο			110.6

Η στήλη που χρησιμοποιείται είναι πλήρωσης, πολική.

Θα κάνετε τρία injection από 1 μl τολουολίου σε κάθε ταχύτητα ροής:

30 ml/min, 60 ml/min και 90 ml/min

Injection

Αφού ρυθμίσετε την πρώτη ταχύτητα ροής κοντά στα 30 ml/min, ετοιμάζεται το λειτουργικό του υπολογιστή ώστε να είναι έτοιμο να καταγράψει το πρώτο injection.

Προετοιμασία λογισμικού επικοινωνίας:

Από την οθόνη του ηλεκτρονικού υπολογιστή:

- Ανοίγετε το πρόγραμμα «**integral**» και ρυθμίζετε τις παραμέτρους του:
- Από το παράθυρο “**DataRead**”
 - Ρυθμίζετε το **port com** στο **com1** (θύρα σύνδεσης στον υπολογιστή)
 - Ρυθμίζετε το **Baud Rates** στα **9600** (ροή δεδομένων ανά sec)
- Πατάτε **GO** και ανοίγουν δύο επιπλέον παράθυρα, όπου γράφετε:
 - Την ταυτότητα του δείγματος
δηλ. έτος, ομάδα, δείγμα (π.χ. 2025 A5 tol inj. 1)
 - Τον επιθυμητό χρόνο ανάλυσης: π.χ. 8 min.
- Πατάτε **ok** για να κατοχυρωθούν οι αλλαγές

Το λογισμικό είναι έτοιμο να ξεκινήσει μόλις πατήσετε το κουμπί «**start**».

Εισαγωγή του δείγματος (Injection):

1. Χρησιμοποιείτε σύριγγα υγρών (Hamilton).
2. Ξεπλένετε τη σύριγγα 3 φορές με τολουόλιο.
3. Παίρνετε **ακριβώς 1 μl** δείγματος χωρίς φυσαλίδες.
4. Τοποθετείται τη βελόνα της σύριγγας σε οριζόντια θέση, ακριβώς στο κέντρο του inlet. Στο εσωτερικό του inlet υπάρχει το septum, το οποίο τρυπιέται με ήπια πίεση.
5. Εισάγετε όλη την βελόνα.
6. Αδειάζετε το περιεχόμενο με γρήγορη κίνηση.
7. Αφαιρείτε τη βελόνα γρήγορα.
8. Την ίδια στιγμή που ο χειριστής πατάει το έμβολο της σύριγγας για την έγχυση, ένα άλλο μέλος της ομάδας πατάει το κουμπί **start** στο λογισμικό, ώστε να ξεκινήσει η καταγραφή της ανάλυσης.



Η διαδικασία του injection πρέπει να είναι γρήγορη και απότομη, όχι όμως με υπερβολική δύναμη, ώστε να αποφευχθεί πιθανή ζημιά στον εξοπλισμό.

Λάθη που μπορεί να γίνουν στο χειρισμό:

- **Αργή εισαγωγή του δείγματος:** Έχει ως αποτέλεσμα το δείγμα να εισέλθει αργά στη στήλη, προκαλώντας διαπλάτυνση των κορυφών.
- **Λανθασμένη εκτίμηση όγκου:** Ο όγκος των 1 μl δεν περιλαμβάνει την ποσότητα που παραμένει στη βελόνα της σύριγγας (~0,3 μl). Με αργή εισαγωγή μέρος αυτής της ποσότητας μπορεί να εξατμιστεί, οδηγώντας σε μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος προς ανάλυση από την προβλεπόμενη.
- **Σταδιακή εισαγωγή:** Μπορεί να προκαλέσει σπάσιμο (distortion) των κορυφών.
- **Μη πλήρης εισαγωγή της βελόνας:** Αν η βελόνα δεν τερματίσει, το δείγμα δεν θα εισαχθεί στο σωστό σημείο του εισαγωγέα και θα χαθεί. Το μήκος της βελόνας είναι προκαθορισμένο για σωστή τοποθέτηση.
- **Λανθασμένος όγκος δείγματος:** Εάν η σύριγγα δεν έχει ακριβώς 1 μl, η ποσότητα δείγματος θα διαφέρει, με αποτέλεσμα να αλλάξει το ύψος της κορυφής (μεγαλύτερη ποσότητα → μεγαλύτερη κορυφή). Στην παρούσα άσκηση δεν χρησιμοποιείται εσωτερικό πρότυπο (όπως στο GC-FID) για διόρθωση.
- **Κακός συγχρονισμός:** Μη ταυτόχρονο injection και το πάτημα του κουμπιού start οδηγεί σε σφάλματα στον χρόνο έκλουσης (t_r).
- **Διαφορετική ποσότητα δείγματος:** Επηρεάζει το πλάτος της κορυφής (t_w) και κατ' επέκταση τον υπολογισμό του αριθμού των θεωρητικών πλακών (N).

**Με τον ίδιο τρόπο κάνετε το 2^ο και το 3^ο injection
με 1 μl τολουόλιο για την ίδια ταχύτητα κινητής φάσης (30 ml/min).**

Στη συνέχεια ρυθμίζετε τη ροή της κινητής φάσης στα 60 ml/min και με την ίδια διαδικασία με πριν κάνετε 3 injection από 1 μl τολουόλιο.

Τέλος ρυθμίζετε τη ροή της κινητής φάσης στα 90 ml/min και με την ίδια διαδικασία με πριν κάνετε 3 injection από 1 μl τολουόλιο.

Υπολογίζετε την βέλτιστη ταχύτητα ροής, (περιγράφεται παρακάτω στους υπολογισμούς). Στη συνέχεια ρυθμίζετε τον χρωματογράφο σε αυτή την ταχύτητα για το δεύτερο μέρος της άσκησης.

**Για εξοικονόμηση χρόνου,
η στατιστικά επικρατούσα βέλτιστη ταχύτητα ροής δίνεται από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.**

B. Μέρος 2^ο - Ποιοτικός προσδιορισμός άγνωστου δείγματος αλκοολών

Αφού σταθεροποιηθεί ο χρωματογράφος στην βέλτιστη ταχύτητας ροής, με την ίδια διαδικασία όπως στο πρώτο μέρος, γίνεται έγχυση (injection) 1 μl από:

1. Μεθανόλη (MeOH),
2. Αιθανόλη (EtOH),
3. 1-Προπανόλη (1-ProOH),
4. 1-Βουτανόλη (1-ButOH),
5. Άγνωστο δείγμα

Πριν και μετά από κάθε έγχυση, η σύριγγα καθαρίζεται ξεπλένοντας τη με απιονισμένο νερό αρκετές φορές, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν ποσότητες των αλκοολών και στη συνέχεια ξαναξεπλένεται με την ουσία που πρόκειται να αναλυθεί.

Το άγνωστο δείγμα δίνεται από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.

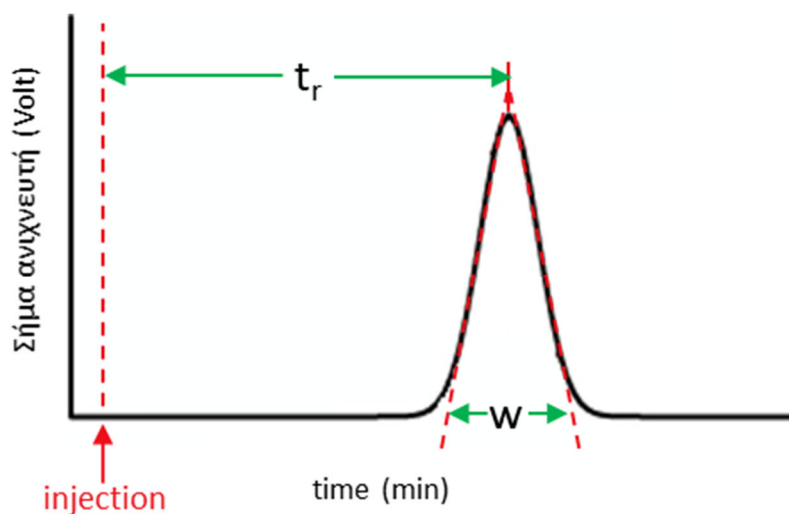
Ολοκλήρωση χρωματογραφημάτων:

- Από το μενού του προγράμματος «**chromato**» επιλέγετε **load**, εντοπίζετε το επιθυμητό χρωματογράφημα (με το όνομα που του έχετε δώσει) και το φορτώνετε.
- Με το κουμπί «**zoom**» μεγαλώνετε τις κορυφές όσο χρειάζεται, ώστε να είναι ευδιάκριτες.
- Πατώντας το **αριστερό κλικ** του ποντικιού ξεκινάει η ολοκλήρωση της κορυφής και πατώντας το ξανά, ολοκληρώνεται η διαδικασία.
- Καταγράφεται το χρόνο έκλουσης (t_r) της κάθε κορυφής με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων. Η επιφάνεια ολοκλήρωσης δεν χρειάζεται για τη συγκεκριμένη άσκηση.
- Υπολογίζεται το t_w της κάθε κορυφής με ακρίβεια δύο δεκαδικών. Ο υπολογισμός του t_w χρειάζεται μόνο για το σχεδιασμό της καμπύλης Van Deemter.
- **Μεταφορά γραφημάτων:** Τα χρωματογραφήματα μπορούν να μεταφερθούν ως εικόνες σε αρχείο Word και στη συνέχεια, στην αναφοράς σας. Αφού επιλέξετε το επιθυμητό χρωματογράφημα και ρυθμίσετε το μέγεθος των κορυφών, από το μενού «**chromato**» επιλέγετε **copy image** και στη συνέχεια, επικολλάτε την εικόνα στο αρχείο Word.

Αποτελέσματα και ανάλυση

1. Για βέλτιστη ταχύτητα ροής:

Σε κάθε ταχύτητα, για κάθε έγχυση (injection), υπολογίζονται το t_r και το t_w . Το t_r παρέχεται από το λογισμικό κατά την ολοκλήρωση της κορυφής. Για τον υπολογισμό του t_w χαράσσετε εφαπτόμενες από τη κορυφή προς τις πλευρές της, οι οποίες τέμνουν την baseline σε δύο σημεία, t_1 και t_2 . Η απόσταση αυτών των σημείων αποτελεί το t_w (το w στη παρακάτω εικόνα).



Καταγράψετε τους χρόνους έκλουσης καθώς και τα t_w με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων.

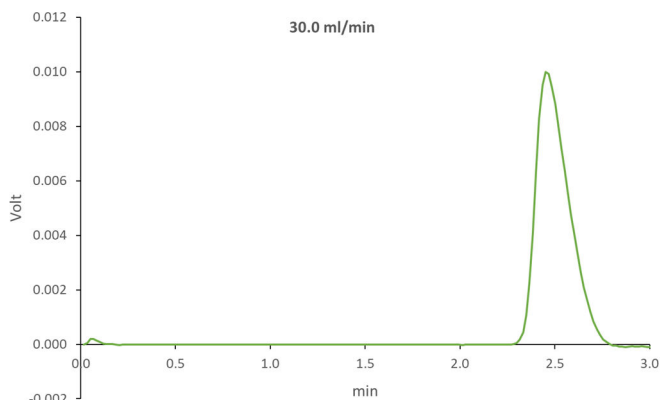
30 ml/min (toluene)	t_r (min)	t_w (min)
1° injection	2.26	0.24
2° injection	2.29	0.24
3° injection	2.32	0.28

Από τις τιμές των t_r και t_w υπολογίζετε τον αριθμό των θεωρητικών πλακών (N) και στη συνέχεια το ύψος ισοδύναμο με θεωρητική πλάκα H (το μήκος της στήλης είναι $L=1.22\text{m}$):

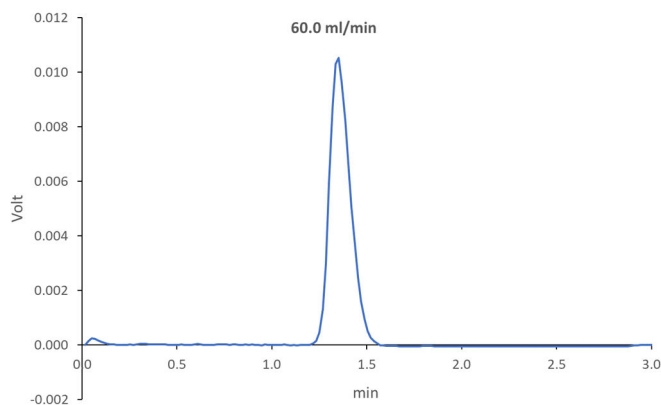
$$H = \frac{L}{N}$$

Για κάθε έγχυση θα προκύψει ένα H . Έτσι, για κάθε ταχύτητα θα έχετε τρεις τιμές H , από τις οποίες θα υπολογίσετε τη μέση τιμή και τη τυπική απόκλιση της.

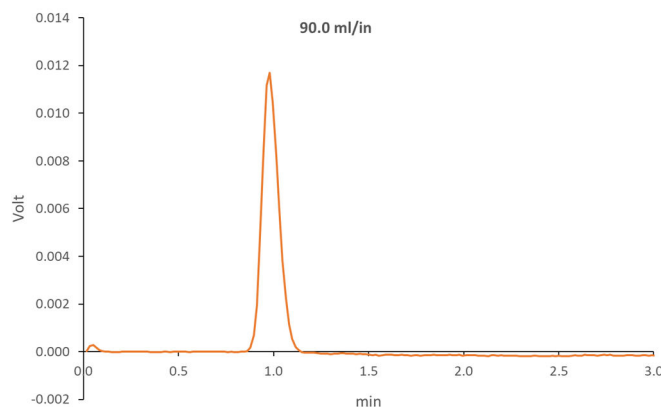
Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τις ταχύτητες ροής 60 και 90 ml/min



Χρωματογράφημα toluene σε ταχύτητα ροής της κινητής φάσης 30.0 ml/min.



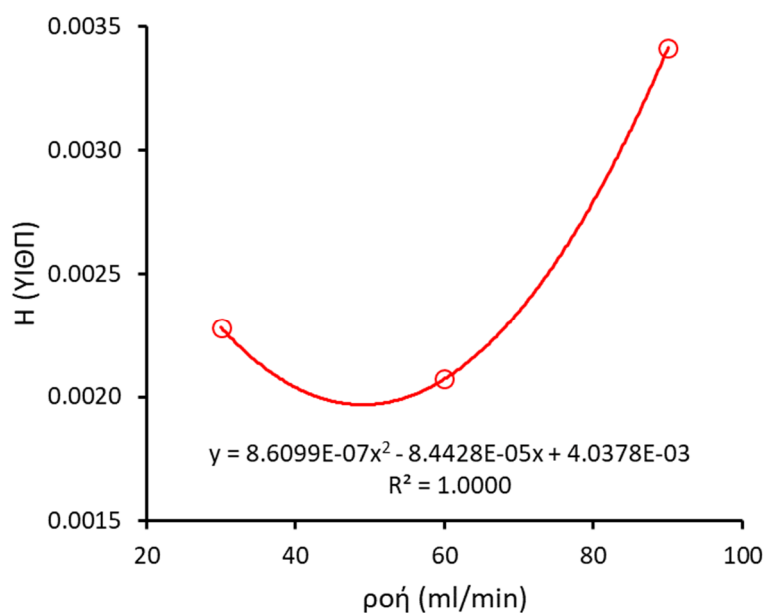
Χρωματογράφημα toluene σε ταχύτητα ροής της κινητής φάσης 60.0 ml/min.



Χρωματογράφημα toluene σε ταχύτητα ροής της κινητής φάσης 90.0 ml/min.

Flow (ml/min)	H (m) (average)	H (m) (stdev)
30	0.00246	0.00005
60	0.00200	0.00023
90	0.00339	0.00047

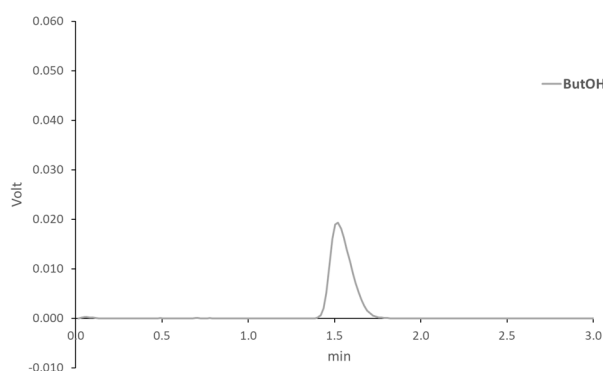
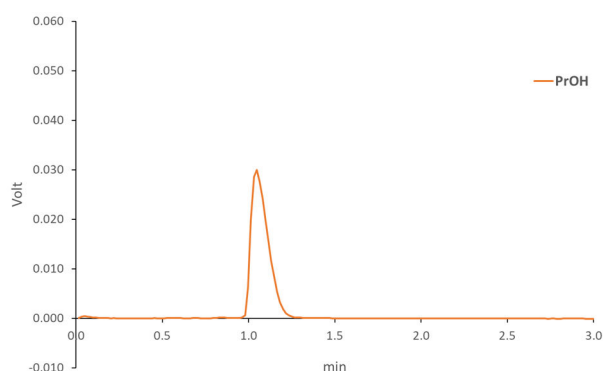
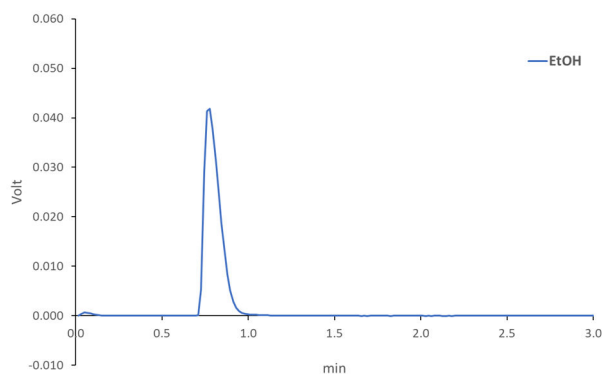
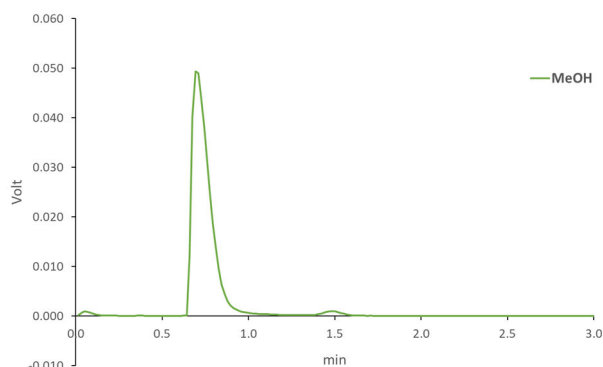
Στη συνέχεια σχεδιάζετε το διάγραμμα ΥΙΘΠ ως προς τη ταχύτητα, το οποίο δίνει μια εξίσωση δευτέρου βαθμού. Η πρώτη παράγωγος της εξίσωσης αυτής δίνει την τιμή της βέλτιστης ταχύτητας ροής (ml/min), δηλαδή η ροή στην οποία αντιστοιχεί το ελάχιστο ΥΙΘΠ και συνεπώς, ο μέγιστος αριθμός των θεωρητικών πλακών.



2. Ανάλυση αγνώστου

Υπολογίζονται οι χρόνοι έκλουσης (t_r) των αλκοολών καθώς και των κορυφών που εμφανίζονται στο άγνωστο δείγμα. Από τη σύγκριση των χρόνων έκλουσης γίνεται ο ποιοτικός προσδιορισμός των αλκοολών που περιέχοντα στο άγνωστο δείγμα.

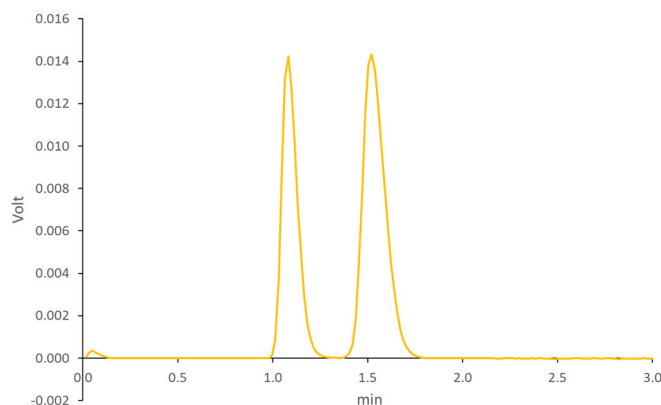
Παράδειγμα:



Οι χρόνοι έκλουσης των αλκοολών στην βέλτιστη ταχύτητα είναι:

Ένωση	t_r (min)
Μεθανόλη	0.70
Αιθανόλη	0.78
1-Προπανόλη	1.11
1-Βουτανόλη	1.67

Το άγνωστο δείγμα δίνει δύο κορυφές στους χρόνους 1.13 και 1.68. Η πρώτη κορυφή είναι στο χρόνο έκλουσης της 1-Προπανόλης και η δεύτερη στο χρόνο έκλουσης της 1-Βουτανόλης. Οπότε το άγνωστο δείγμα αποτελείται από τις παραπάνω αλκοόλες.



Βίντεο:

Αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας παρουσιάζεται στο βίντεο της άσκησης στη ιστοσελίδα του μαθήματος στο e-class καθώς και στο κανάλι του εργαστηρίου στο youtube:



Εργ. Αναλυτικής II:



<https://www.chemistry.uoc.gr/eclass/modules/document/?course=CHEM-UNDER115>

Youtube:



<https://www.youtube.com/channel/UCrrDdUXUiTxyhezA14ORlew>

Ερωτήσεις Κατανόησης:

1. Ο χρόνος έκλουσης 1 μl τολουόλιο είναι 2.30 min. Αν η ευαισθησία του ανιχνευτή αυξηθεί από 2 σε 4, ο χρόνος έκλουσης θα αλλάξει; Αν ναι, θα είναι μεγαλύτερος ή μικρότερος;
2. Ποια είναι η εξίσωση Van Deemter και από ποιους μηχανισμούς εξαρτάται;
3. Έχοντας ένα μίγμα που περιέχει τις αλκοόλες MeOH, EtOH, PrOH και ButOH, με ποια σειρά εκλουσθούν και για ποιο λόγο;
4. Αν το t_r είναι 2.30 min και το t_w είναι 0.25 min, πόσο είναι το H (ΥΙΘΠ);
5. Αν αντί για 1 μl τολουόλιο, γινόταν εισαγωγή διαφορετικής ποσότητας, τι θα επηρέαζε αυτό;
6. Γιατί το injection πρέπει να γίνεται
 - a. γρήγορα;
 - b. με σωστό συγχρονισμό με την έναρξη καταγραφής του χρωματογραφήματος;
7. Ποια είναι τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα μιας στήλης πλήρωσης;
8. Ποια είναι τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα ενός ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας (TCD);
9. Πώς επηρεάζει η αύξηση της ταχύτητας ροής τον όρο B της εξίσωσης Van Deemter;
10. Γιατί οι τριχοειδείς στήλες εμφανίζουν μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα;
11. Ποιοι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν το πλάτος μιας κορυφής;

Άσκηση – Υγρή Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (RPLC)

Σκοπός της άσκησης είναι:

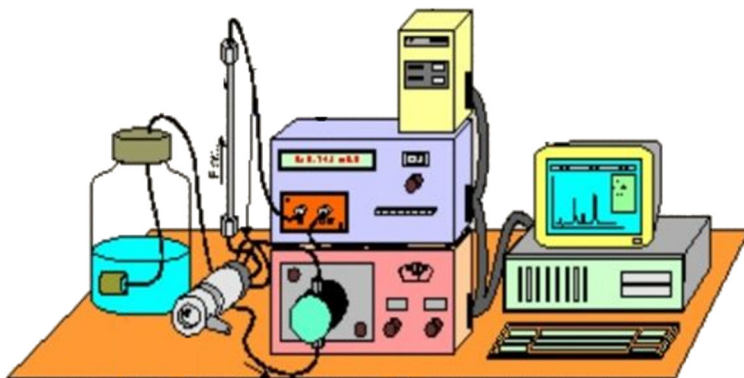
Η εύρεση του συντελεστή κατανομής οκτανόλης – νερό $\log(K_{ow})$
με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RPLC).

Η υγρή χρωματογραφία αποτελείται από τα μέρη:

1. Την κινητή φάση
2. Την αντλία
3. Το σύστημα εισαγωγής δείγματος
4. Την αναλυτική στήλη
5. Τον ανιχνευτή (UV)
6. Το καταγραφικό



Αναλυτικά, η λειτουργία του κάθε μέρους
αναφέρεται στη γενική εισήγηση
της υγρής χρωματογραφίας



Συντελεστής κατανομής οκτανόλης – νερού ($\log K_{ow}$):

Ως συντελεστής κατανομής (K) ορίζεται ο λόγος των συγκεντρώσεων ισορροπίας μιας διαλυμένης ουσίας σε ένα διφασικό σύστημα, το οποίο αποτελείται από δύο, σε μεγάλο βαθμό, μη αναμίξιμους διαλύτες. Για το σύστημα οκτανόλης – νερού (octanol – water), ο συντελεστής συμβολίζεται με K_{ow} . Καθώς η οκτανόλη προσομοιάζει το οργανικό υλικό (π.χ. των σωματιδίων, στο λίπος των οργανισμών), ο συντελεστής K_{ow} αποτελεί δείκτη λιποφιλίας, δηλαδή εκφράζει την τάση των ενώσεων να μεταφέρονται και να κατανέμονται μεταξύ ενός οργανικού διαλύτη και του νερού.

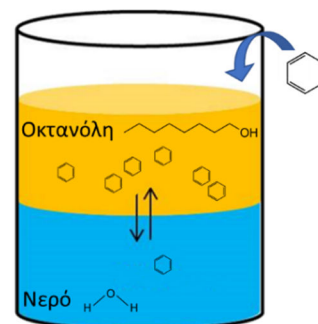
Ο λιποφιλικός δείκτης μίας ένωσης παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την περιβαλλοντική της συμπεριφορά όπως: η πιθανότητα ενσωμάτωσης ή πρόσληψης της από οργανισμούς, την προσρόφησης σε στερεά που περιέχουν οργανική ύλη κ.ά.

Ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης – νερού K_{ow} ορίζεται ως εξής:

$$K_{ow} = \frac{[C_{οκτ.}]}{[C_{νερό}]}$$

όπου: $[C_{οκτ.}]$ είναι η συγκέντρωση της ουσίας στην οκτανόλη

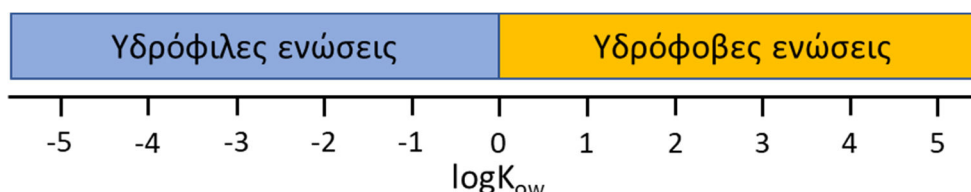
$[C_{νερό}]$ είναι η συγκέντρωση της ουσίας στο νερό



Ο συντελεστής K_{ow} δεν ισούται με τον λόγο της διαλυτότητας της ουσίας στην οκτανόλη προς την διαλυτότητα της στο νερό, διότι η διαλυτότητα της οκτανόλης στο νερό είναι μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση του νερού στην οκτανόλη. Συγκεκριμένα, σε ισορροπία στο σύστημα οκτανόλης – νερού η οκτανόλη περιέχει περίπου 2.3 mol/L νερό, ενώ το νερό περιέχει περίπου $4.5 \cdot 10^{-3}$ mol/L οκτανόλης.

Ο συντελεστής κατανομής είναι αδιάστατο μέγεθος, καθώς πρόκειται από το πηλίκο δύο συγκεντρώσεων. Συνήθως εκφράζεται με τη δεκαδική λογαριθμική του μορφή $\log K_{ow}$. Οι τιμές του K_{ow} για οργανικές ενώσεις κυμαίνονται από 10^{-3} έως 10^7 με αντίστοιχες τιμές $\log K_{ow}$ από -3 έως 7.

Τιμή $\log(K_{ow})$	Συγκέντρωση Ένωσης	Χαρακτηρισμός	Περιγραφή
< -1	$[C_{νερό}] \gg [C_{οκτ}]$	πολύ υδρόφιλη	Υδατοδιαλυτή, μικρή ή καμία λιποφιλικότητα, δύσκολα περνά μεμβράνες
-1 έως 0	$[C_{νερό}] > [C_{οκτ}]$	υδρόφιλη	Προτιμά κυρίως το νερό
0 έως 1	$[C_{νερό}] \leq [C_{οκτ}]$	ελαφρώς υδρόφιλη	Ισορροπία ή ελαφρά προτίμηση προς οκτανόλη, μέτρια βιοδιαλυτότητα
1 έως 3	$[C_{νερό}] < [C_{οκτ}]$	μέτρια υδρόφοβη	Πιθανή βιοσυσσωρεύσιμη, περνά μεμβράνες
3 έως 5	$[C_{νερό}] \ll [C_{οκτ}]$	υδρόφοβη	Πιθανή τοξικότητα, υψηλή βιοσυσσώρευση
> 5	$\sim [C_{οκτ}]$	πολύ υδρόφοβη	Πολύ χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, πολύ λιποφιλική, υψηλή τοξικότητα

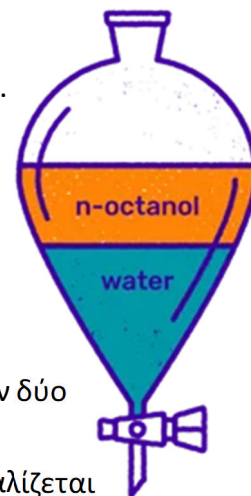


Όσο υψηλότερη είναι η τιμή $\log K_{ow}$, τόσο πιο υδρόφοβη (λιπόφιλη) είναι η ένωση. Τιμές $\log K_{ow} > 3$ υποδεικνύουν σημαντική λιποφιλία (π.χ. **π-Ξυλόλιο**), ενώ τιμές κοντά στο 1 ή χαμηλότερες υποδεικνύουν σχετική υψηλή υδατοδιαλυτότητα (π.χ. **βενζυλική αλκοόλη**). Ενώσεις όπως το **βενζόλιο** και το **τολουόλιο** θεωρούνται μέτριας λιποφιλίας, καθώς η παρουσία μεθυλίου αυξάνει την τιμή του $\log K_{ow}$.

Μέθοδοι υπολογισμού του συντελεστή K_{ow} :

A. Άμεση εργαστηριακή μέθοδος (μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης):

Αποτελεί την πιο συνηθισμένη μέθοδο προσδιορισμού του συντελεστή κατανομής. Δεδομένου ότι η οκτανόλη έχει μέτρια ικανότητα κορεσμού στο νερό, οι πειραματικοί προσδιορισμοί είναι ευκολότεροι σε σύγκριση με άλλα συστήματα διαλυτών, όπως το κυκλοεξάνιο – νερό (με σχεδόν μηδενική ικανότητα κορεσμού) ή το βουτάνιο – νερό (με υψηλή ικανότητα κορεσμού).



Στη μέθοδο αυτή:

- Επιλέγεται κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να επιτυγχάνεται ο κορεσμός των δύο φάσεων.
- Ρυθμίζεται η αναλογία όγκων οκτανόλης και υδατικής φάσης ώστε να διασφαλίζεται ικανοποιητική κατανομή της υπό μελέτη ουσίας και στις δύο φάσεις.

Μια ένωση A προστίθεται στο διφασικό μείγμα οκτανόλης - νερού σε συγκέντρωση ($[A] < 0.01 \text{ mol/L}$) και το σύστημα ανακινείται για περίπου 15 λεπτά έως 1 ώρα. Στη συνέχεια αφήνεται για επαρκές χρονικό διάστημα ώστε να αποκατασταθεί η ισορροπία. Ακολουθεί διαχωρισμός των δύο φάσεων (π.χ. με εκχύλιση), ώστε να διαχωριστεί η οργανική από την υδατική φάση. Τέλος, προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ένωσης A σε κάθε φάση και υπολογίζεται ο συντελεστής K_{ow} ως ο λόγος των συγκεντρώσεων.

B. Έμμεση εργαστηριακή μέθοδος (χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης):

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές για τον προσδιορισμό του συντελεστή κατανομής K_{ow} αλλά η πιο συχνή είναι η χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως (RPLC). Στη τεχνική αυτή χρησιμοποιείται μη πολική στατική φάση (π.χ. C8, C18 κ.ά.) και πολική κινητή φάση (π.χ. MeOH-H₂O, EtOH-H₂O, ACN-H₂O κ.ά.), με ισοκρατική έκλουση (σταθερή ροή της κινητής φάσης).

Η μέθοδος βασίζεται στη συσχέτιση του χρόνου κατακράτησης μιας ένωσης με τον $\log K_{ow}$. Καθώς κάθε ένωση που εισάγεται στη στήλη κατανέμεται μεταξύ της πολικής κινητής φάσης και της μη πολικής υδρογονανθρακικής στατικής φάσης, διαχωρίζεται κατά τη μετακίνησή της μέσα στη στήλη με τη βοήθεια της κινητής φάσης. Οι ενώσεις συγκρατούνται ανάλογα με τον συντελεστή κατανομής τους στο σύστημα υδρογονάνθρακας – νερό, όσο πιο υδρόφοβη (λιπόφιλη) είναι μια ένωση, τόσο εντονότερα αλληλοεπιδρά με τη μη πολική στατική φάση (π.χ. C18) με αποτέλεσμα να καθυστερεί η εκρόφησή της. Αντίθετα, οι πιο υδρόφιλες ενώσεις εκλούνται πρώτες. Στην τεχνική αυτή αναλύονται πρότυπες ενώσεις με γνωστούς συντελεστές κατανομής $\log K_{ow}$ και υπολογίζεται ο παράγοντας χωρητικότητας τους (K') για κάθε μία.

Ο παράγοντας χωρητικότητας K' δίνεται από τον τύπο:

$$K' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

όπου:

- t_R είναι ο χρόνος κατακράτησης της ένωσης
- t_0 είναι ο νεκρός χρόνος.

Ο λογάριθμος των παραγόντων χωρητικότητας ($\log K'$) συσχετίζεται με τον λογάριθμο των συντελεστών κατανομής ($\log K_{ow}$) των πρότυπων ενώσεων, δημιουργώντας μια πρότυπη καμπύλη γραμμική παλινδρόμησης της μορφής:

$$\log K_{ow} = m \cdot \log K' + b$$

Στη συνέχεια αναλύεται η επιθυμητή ένωση A, υπολογίζεται ο παράγοντας χωρητικότητας της (K'_A) και ο λογάριθμος του ($\log K'_A$) και μέσω της πρότυπης καμπύλης προσδιορίζεται το αντίστοιχο $\log K_{ow}$.

Οι πρότυπες ενώσεις πρέπει να είναι δομικά συγγενείς με την υπό ανάλυση ένωση και να διαθέτουν τιμές συντελεστή κατανομής που περικλείουν την τιμή του $\log K_{ow}$ της υπό μελέτη ένωσης. Δηλαδή, τουλάχιστον μία πρότυπη ένωση πρέπει να έχει $\log K_{ow}$ υψηλότερο από αυτό της υπό ανάλυση ένωσης και μία άλλη πρότυπη ένωση πρέπει να έχει χαμηλότερο.

Στην τεχνική αυτή δεν απαιτείται ποσοτικός προσδιορισμός αλλά μόνο ποιοτικός καθώς είναι αναγκαίος μόνο ο προσδιορισμός των χρόνων κατακράτησης.

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι:

- Γρήγορη μέθοδος χωρίς ανάγκη διαχωρισμού φάσεων (σε αντίθεση με την κλασική shake-flask).
- Κατάλληλη για σειρές παρόμοιων ενώσεων.
- Παρουσιάζει καλή αναπαραγωγιμότητα.

C. Υπολογιστικές μέθοδοι εκτίμησης του K_{ow} :

Υπάρχουν επίσης υπολογιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της τιμής K_{ow} μιας οργανικής ένωσης, οι οποίες απαιτούν:

- γνώση της χημικής δομής
- και προαιρετικά, γνώση του K_{ow} για συγγενείς ενώσεις.

Βασίζονται στη θεωρητική κατάτμηση του μορίου σε δομικές ομάδες από τις οποίες αποτελείται μια οργανική ένωση και στην πρόσθεση των συνεισφορών τους, μαζί με διορθωτικούς όρους για ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις.

Ωστόσο, με αυτή την προσέγγιση δεν λαμβάνονται υπόψη τα στερεοχημικά φαινόμενα που ενδέχεται να αναπτύσσονται μεταξύ των δομικών ομάδων, καθώς και άλλες ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Για τον λόγο αυτό, καθίσταται απαραίτητη η χρήση μεγάλου αριθμού διορθωτικών παραγόντων, οι οποίοι επιτρέπουν την διόρθωση των υπολογιζόμενων τιμών K_{ow} . Ως αποτέλεσμα, η αξιοπιστία των υπολογιστικών μεθόδων μειώνεται όσο αυξάνει η πολυπλοκότητα της υπό μελέτη ένωσης.

Στην περίπτωση απλών μορίων με μικρό μοριακό βάρος και με μία ή δύο λειτουργικές ομάδες, η αναμενόμενη απόκλιση μεταξύ των υπολογιζόμενων και των πειραματικών τιμών **log K_{ow}** κυμαίνεται από 0.1 έως 0.3 μονάδες.

Το περιθώριο σφάλματος εξαρτάται από την:

- Αξιοπιστία των σταθερών των τμημάτων που χρησιμοποιούνται.
- Ικανότητα αναγνώρισης των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων (π.χ. των δεσμών υδρογόνου).
- Ορθή χρήση των διορθωτικών όρων.

Δύο είναι οι κύριες μέθοδοι:

1. Η μέθοδος των Fujita και Hansch:

Στη μέθοδο των **Fujita και Hansch** ο $\log K_{ow}$ υπολογίζεται προσθετικά, με βάση την επίδραση των υποκαταστατών (τιμές π) στη βασική δομή του βενζολίου. Οι τιμές αυτές προκύπτουν κυρίως από μονοϋποκατεστημένα βενζοειδή συστήματα. Η μέθοδος είναι απλή και ιδιαίτερα κατάλληλη για αρωματικές ενώσεις. Ο υπολογισμός για πιο πολύπλοκες ενώσεις μπορεί να βελτιωθεί εάν το μόριο διασπαστεί σε μικρότερα δομικά τμήματα για τα οποία υπάρχουν αξιόπιστες τιμές $\log K_{ow}$, είτε από πίνακες είτε από υφιστάμενα πειραματικά δεδομένα.

$$\text{Εξίσωση υπολογισμού: } \log K_{ow(\text{ένωσης})} = \log K_{ow(\text{βενζολίου})} + \sum \pi_i$$

όπου:

- $\log K_{ow(\text{βενζολίου})} = 2.13$
- $\pi_1, \pi_2, \dots = \pi - \text{τιμές των υποκαταστατών}$

Παράδειγμα: Chlorobenzene (C_6H_5Cl)

$$\log K_{ow(C_6H_5Cl)} = \log K_{ow(C_6H_6)} + \pi_{Cl} = 2.13 + 0.71 = 2.84$$

2. Η μέθοδος των Meylan και Howard:

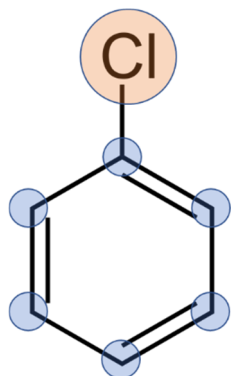
Η μέθοδος των **Meylan & Howard** βασίζεται σε εμπειρικά προσδιοριζόμενους συντελεστές συνεισφοράς για άτομα ή μοριακά θραύσματα, καθώς και σε διορθωτικούς παράγοντες για την παρουσία ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ λειτουργικών ομάδων. Η μέθοδος αυτή είναι ευρέως εφαρμόσιμη και σχεδόν καθολικής ισχύος, καθιστώντας την ιδιαίτερα κατάλληλη για γενικές οργανικές ενώσεις με σύνθετη δομή (αλειφατικές, πολυϋποκατεστημένες, ετεροκυκλικές κ.ά.).

$$\text{Εξίσωση υπολογισμού: } \log K_{ow} = \sum n_i * f_i + \sum n_j * c_j$$

όπου:

- f_i : συνεισφορές από βασικά θραύσματα
- c_j : διορθώσεις για ειδικές αλληλεπιδράσεις
- n_i και n_j είναι η συχνότητα εμφάνισης για καθένα θραύσμα και για καθένα διορθωτικό παράγοντα, αντίστοιχα

Παράδειγμα: Chlorobenzene (C_6H_5Cl)



Θραύσμα	f_i	n_i	C_j	n_j
C_{ar}	0.2940	6		
Cl	0.6445	1		
σταθερά εξίσωσης			0.23	1

$$\log K_{ow(C_6H_5Cl)} = \sum n_i * f_i + \sum n_j * c_j = 6 * 0.2940 + 1 * 0.6445 + 1 * 0.23 = 2.6385 \sim 2.64$$

Η τιμή $\log K_{ow}$ που έχει προσδιοριστεί πειραματικά για το χλωροβενζόλιο είναι 2.84.

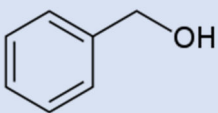
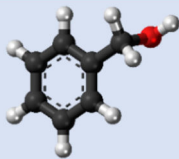
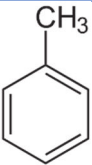
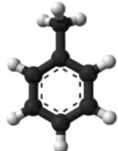
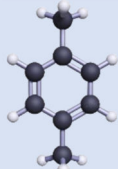
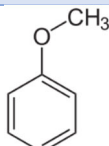
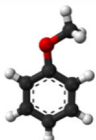
Οργανολογία:

Το σύστημα είναι αντίστροφης φάσης (RPLC) καθώς έχει μη πολική στατική φάση (C18) και πολική κινητή φάση, η οποία αποτελείται από μίγμα αιθανόλης – νερό σε αναλογία 70:30.

Οι πρότυπες ενώσεις που θα μελετηθούν είναι:

- Η βενζυλική αλκοόλη.
- Το τολουόλιο.
- Το παρα-ξυλόλιο.

Η υπο μελέτη ένωση είναι η ανισόλη.

Ένωση	Χημικός τύπος	3-D	NFPA 704
Βενζυλική αλκοόλη			
Τολουόλιο			
π-Ξυλόλιο			
Ανισόλη			

Λόγω της επικινδυνότητας των ουσιών (αρωματικοί υδρογονάνθρακες) αυτές παραμένουν στον απαγωγό και όλες οι αραιώσεις πραγματοποιούνται επίσης στον απαγωγό.

Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιεί ο χρωματογράφος είναι UV/VIS, ρυθμισμένος στα 254 nm, περιοχή στην οποία απορροφούν οι περισσότερες αρωματικές ενώσεις.

Ο διαχωρισμός γίνεται αρχικά βάσει πολικότητας: οι περισσότερο πολικές ενώσεις εκλούνται πιο γρηγορά καθώς η στήλη είναι άπολη. Στη συνέχεια, ο διαχωρισμός επηρεάζεται και από το μοριακό μέγεθος: τα μικρότερα μόρια είναι πιο ευκίνητα και εκλούνται νωρίτερα.

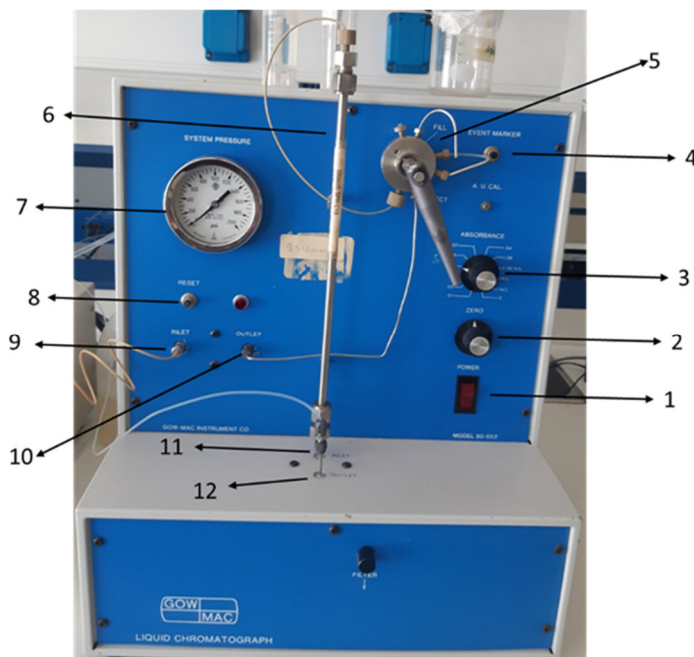
Οι πρότυπες ενώσεις που αναλύονται (βενζυλική αλκοόλη, τολουόλιο και π-ξυλόλιο) έχουν παρόμοια χημική δομή. Η πιο πολική ένωση είναι η βενζυλική αλκοόλη, η οποία περιέχει υδροξύλιο και εκλούεται πρώτη. Οι άλλες δύο έχουν παρόμοια πολικότητα, οπότε ο διαχωρισμός τους βασίζεται κυρίως στο μέγεθος του μορίου. Έτσι, εκλούεται πρώτα το τολουόλιο και έπειτα το π-ξυλόλιο, το οποίο έχει ένα επιπλέον μεθύλιο.

Η σειρά έκλουσης είναι η εξής:

Βενζυλική αλκοόλη → Τολουόλιο → π-Ξυλόλιο

Χρωματογράφος Gow Mac series 350:

1. Ο κεντρικός διακόπτης on – off του οργάνου.
2. Διακόπτης zero. Μεταβάλλει το σήμα υποβάθρου. Ήταν χρήσιμο σε παλιά καταγραφικά που δεν είχαν αυτόματο auto-zero (μηδενισμό σήματος υποβάθρου). Δεν χρησιμοποιείται πλέον με το λογισμικό του υπολογιστή.
3. Διακόπτης Absorbance. Ρυθμίζει την ευαισθησία του οργάνου, η ευαισθησία είναι αντίστροφη με τη τιμή του absorbance. Η ευαισθησία που επιλέγεται για τη συγκεκριμένη άσκηση είναι **0.02**.
4. Διακόπτης event marker. Μαρκάρει το ξεκίνημα του χρωματογραφήματος, αυτό ήταν χρήσιμο σε παλιά καταγραφικά με χαρτί που καταγράφεται συνεχώς. Δεν χρησιμοποιείται με το λογισμικό του υπολογιστή.
5. Το σύστημα εισαγωγής, περιέχει βρόχο (loop) των 20 μl.
6. Η στήλη διαχωρισμού. Στη συγκεκριμένη άσκηση δεν υπάρχει προ-στήλη. Είναι μια άπολη στήλη με υλικό πλήρωσης C₁₈.
7. Μανόμετρο που δείχνει τη πίεση του συστήματος.
8. Κουμπί Reset. Στο χρωματογράφο είναι συνδεδεμένη η παροχή της αντλίας, έτσι για να μπορέσει να ξεκινήσει πρέπει αρχικά να πατηθεί το κουμπί reset. Αυτό γίνεται για λόγους ασφαλείας, ώστε αν για κάποιο λόγο σταματήσει ο χρωματογράφος να σταματήσει και η αντλία.
9. Είσοδος του διαλύτη που έρχεται από την αντλία στο καταστολέα παλμών που βρίσκεται στο εσωτερικό του χρωματογράφου. Η αντλία λόγω της παλινδρομικής κίνησης του πιστονιού δημιουργεί μια αυξομείωση στη πίεση του διαλύτη με αποτέλεσμα η ροή του να μην είναι σταθερή. Αυτή η ανωμαλία εξαφανίζεται από το καταστολέα παλμών, που στο συγκεκριμένο χρωματογράφο έχει τη μορφή ενός σπирάλ σωλήνα. Αν δεν υπήρχε ο καταστολέας παλμών τότε η ανωμαλία της ροής του διαλύτη θα εμφανιζόταν στο σήμα υποβάθρου, δημιουργώντας ένα έντονο θόρυβο.
10. Έξοδος του διαλύτη από το καταστολέα παλμών.
11. Είσοδος στον ανιχνευτή.
12. Έξοδος από τον ανιχνευτή και πηγαίνει στα απόβλητα.



Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια – Όργανα:

- Αιθανόλη (EtOH) κατάλληλη για HPLC
- Ανισόλη (Anisole)
- Βενζυλική αλκοόλη (Benzyl alcohol)
- Τολουόλιο (Toluene)
- παρα-Ξυλόλιο (p-Xylene)
- Νιτρικό νάτριο (NaNO₃)
- Υπερκάθαρο νερό (nanopure)
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Ποτήρια ζέσεως
- Σύριγγα υγρών 100 μl Hamilton
- Πιπέτες ακριβείας μεταβλητού όγκου
- Φίλτρα σωματιδίων
- Συσκευή υπερήχων
- Υγρή Χρωματογραφία

Παράμετροι Χρωματογράφου:

- Στήλη: C₁₈
- Όγκος βρόχου (Loop): 20 μl
- Ανιχνευτής: λάμπα Hg στα 254 nm
- Ευαισθησία ανιχνευτή: 0.02
- Διαλύτης: EtOH:H₂O σε αναλογία 70:30
- Ταχύτητα κινητής φάσης: 1.0 ml/min
- Πίεση συστήματος: 1200 – 1400 psi

1. Παρασκευή κινητής φάσης:

Παρασκευάζονται 200 ml από διάλυμα EtOH/H₂O σε αναλογία 70:30 χρησιμοποιώντας ογκομετρικούς κυλίνδρους (δεν απαιτείται μεγαλύτερη ακρίβεια). Η αιθανόλη που χρησιμοποιείται είναι κατάλληλη για HPLC και το νερό είναι υπερκάθαρο (nanopure).

Το διάλυμα απαερώνεται σε υπερήχους για **15 λεπτά**.

2. Προετοιμασία διαλυμάτων:

Στον **απαγωγό**, παρασκευάζεται διάλυμα μίγματος των τριών πρότυπων ενώσεων σε αιθανόλη κατάλληλης για HPLC, με τη χρήση πιπετών ακριβείας μεταβλητού όγκου.

Διαδικασία:

- Στον απαγωγό, με πιπέτα ακριβείας των 1000 μl, μεταφέρετε **875 μl** αιθανόλης σε vial αραιώσης.
- Στη συνέχεια με πιπέτα ακριβείας των 100 μl, προσθέτετε:
 - **25 μl** βενζυλικής αλκοόλης
 - **50 μl** τολουολίου
 - **50 μl** π-ξυλολίου(Ο τελικός όγκος είναι **1000 μl**)
- Ομογενοποιείτε το διάλυμα.
- Κάνετε δεύτερη αραιώση **1/10** σε αιθανόλη σε τελικό όγκο 1000 μl:
 - Σε νέο vial, τοποθετείτε **900 μl** αιθανόλης και προσθέτετε **100 μl** από το αρχικό διάλυμα.
 - Ομογενοποιείτε το διάλυμα ξανά.

Τελικές αραιώσεις είναι:

- για την Βενζυλική αλκοόλη: **1/400**
- για το Τολουόλιο: **1/200**
- για το π-Ξυλόλιο: **1/200**

Όλες οι αραιώσεις γίνονται στον απαγωγό.

Φιλτράρετε το τελικό διάλυμα τοποθετώντας ένα φίλτρο whatman (0.45 μm) σε σύριγγα ώστε να απομακρυνθούν όλα τα τυχόν σωματίδια και ακαθαρσίες

3. Άνοιγμα χρωματογράφου:

- Πατήστε **power** (1) για ενεργοποίηση του χρωματογράφου και **reset** (8) για εκκίνηση της αντλίας.
- Από την αντλία ρυθμίστε την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης στα 1.0 ml/min.
- Περιμένετε να σταθεροποιηθεί η πίεση στα 1200 – 1400 psi (δεν πρέπει να ανέβει πάνω από 1600 psi για να μην προκληθεί ζημιά στο όργανο).
- Ελέγξτε για φυσαλίδες και αφαιρέστε τις εφόσον χρειάζεται.
- Περιμένετε να σταθεροποιηθεί το σήμα
- Μετρήστε την πραγματική ροή με ογκομετρικό κύλινδρο. Η ένδειξη που φαίνεται στη οθόνη της αντλίας δεν είναι η πραγματική ροή, λόγω συστηματικού σφάλματος του οργάνου και λόγω διαφόρων παρεμποδίσεων. Για το λόγο αυτό, η πραγματική ταχύτητα υπολογίζεται μετρώντας πόση κινητή φάση εξέρχεται στα απόβλητα σε με τη βοήθεια ενός ογκομετρικού κυλίνδρου.



Παράδειγμα: 3 ml συλλέγονται σε 2.5 min, οπότε η πραγματική ταχύτητα ροής θα είναι 1.2 ml/min. Επαναλαμβάνεται τουλάχιστον τρεις φορές και υπολογίζετε τη μέση τιμή.

- Ρυθμίστε την ευαισθησία του ανιχνευτή στην τιμή **0.02**

4. Προετοιμασία λογισμικού επικοινωνίας:

Από τον υπολογιστή, ανοίγετε το πρόγραμμα «**integral**» και ρυθμίζετε τις παραμέτρους του:

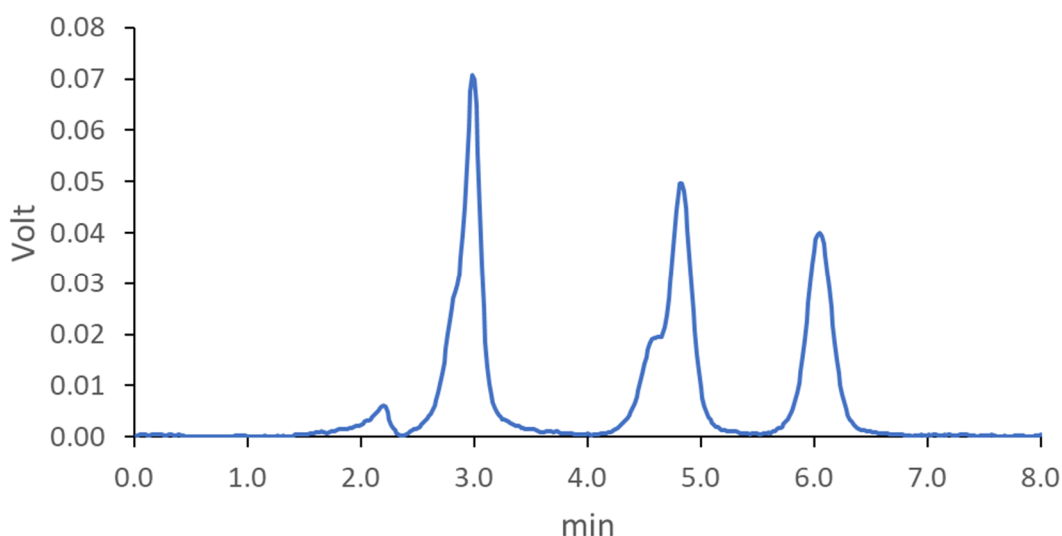
- Στο μενού “**DataRead**”
 - Ρυθμίζεται το **portcome** στο **com1** (θύρα σύνδεσης στον υπολογιστή)
 - Ρυθμίζεται το **Baud Rates** στα **9600** (ροή δεδομένων ανά sec)
 - Πατάτε **GO** και ανοίγουν δύο επιπλέον παράθυρα
- Στα νέα παράθυρα γράφετε:
 - Συμπληρώστε την ταυτότητα δείγματος, έτος, ομάδα, δείγμα (π.χ. 2025 A5 inj.1)
 - Ορίστε χρόνο ανάλυσης (π.χ. 8 min).
 - Πατάτε **OK**.
- Ενεργοποιήστε το **auto ON**

Το λογισμικό είναι έτοιμο να ξεκινήσει μόλις κάνετε το injection.

5. Εισαγωγή του δείγματος (Injection):

- Βάζετε τον εισαγωγέα (injector) στη θέση load (Fill)
- Ξεπλύνετε τη σύριγγα 3 φορές με αιθανόλη.
- Παίρνετε ~80 ml δείγματος χωρίς φυσαλίδες και την τοποθετήστε το στο βρόχο (loop). Η ποσότητα των 80 ml είναι πολλαπλάσια του όγκου του βρόχου (20 ml) ώστε να ξεπλυθεί καλά ο βρόχος και να μείνει στο τέλος η απαραίτητη ποσότητα των 20 ml.
- **Με τη σύριγγα να βρίσκεται μέσα στο σύστημα εισαγωγής**, μετακινήστε γρήγορα (όχι δυνατά) το μοχλό του injector από τη θέση **fill** σε **inject**.
- Μετά τη λήξη του χρόνου, το χρωματογράφημα αποθηκεύεται αυτόματα.
- Από το μενού από το **dataRead** πατάτε το **stop** και κλείστε τα παράθυρα.
- Αφαιρέστε και ξεπλύνετε τη σύριγγα 3 φορές με αιθανόλη.

Επαναλάβετε τη διαδικασία για τα επόμενα 2 injections.

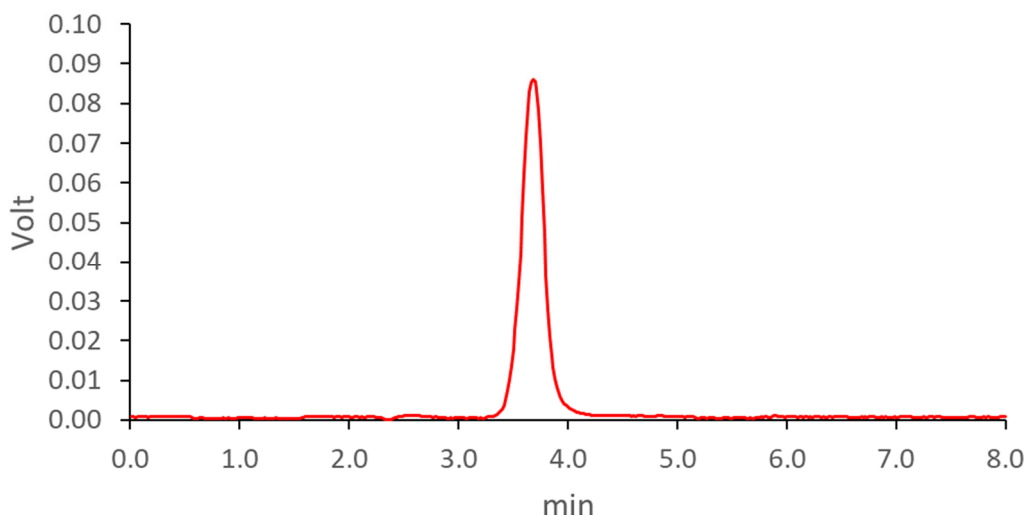


6. Παρασκευή διαλύματος ανισόλης:

Παρασκευάζεται το διάλυμα της ανισόλης τοποθετώντας 25 μl ανισόλης σε 975 μl αιθανόλη (τελικό όγκο 1000 μl). Αφού ομογενοποιείστε το διάλυμα, πραγματοποιείτε δεύτερη αραιώση 1/10 σε αιθανόλη σε τελικό όγκο 1000 μl. Οπότε τοποθετείται 900 μl αιθανόλης και 100 μl από το αρχικό διάλυμα και στη συνέχεια το ομογενοποιείτε ξανά. Η τελική αραιώση που έχει πραγματοποιηθεί είναι 1/400. Φιλτράρετε το τελικό διάλυμα τοποθετώντας ένα φίλτρο whatman (0.45 μm) σε σύριγγα ώστε να απομακρυνθούν όλα τα τυχόν σωματίδια και ακαθαρσίες

Όλες οι αραιώσεις γίνονται στον απαγωγό.

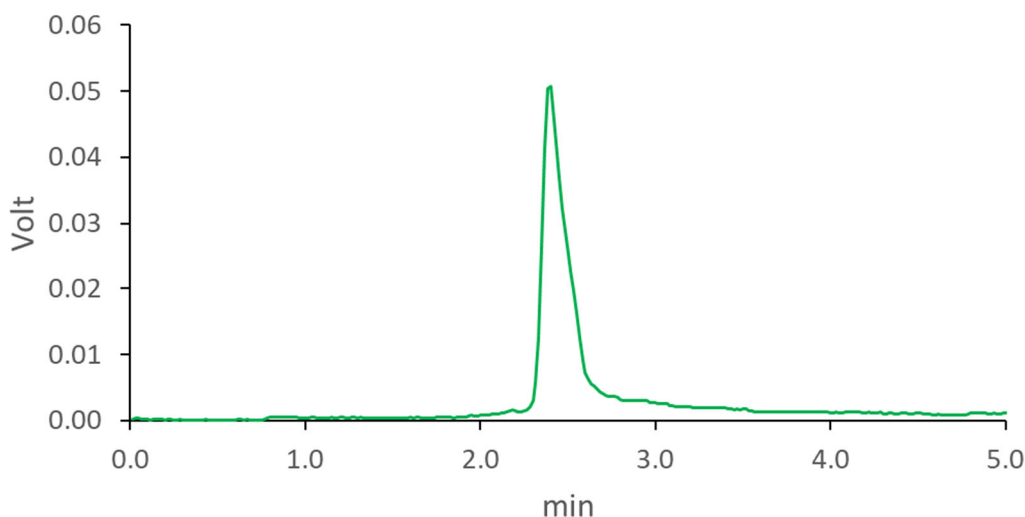
Κάνετε **τρία (3) injection** από το διάλυμα της ανισόλης, ακολουθώντας ακριβώς την ίδια διαδικασία που εφαρμόστηκε για το πρότυπο δείγμα.



7. Διάλυμα NaNO₃ 10 % w/v:

- Παρασκευάζεται διάλυμα NaNO₃ 10% w/v σε τελικό όγκο 10 ml, χρησιμοποιώντας ογκομετρικό κύλινδρο.
- Φιλτράρετε το διάλυμα με φίλτρο whatman (0.45 μm) για την απομάκρυνση τυχόν σωματιδίων και ακαθαρσιών.
- Ρυθμίζετε την ευαισθησία του ανιχνευτή στο 0.02.
- Κάνετε μόνο ένα injection με το διάλυμα NaNO₃
- Η διάρκεια του χρωματογραφήματος είναι 5 λεπτά.

Το NaNO₃ είναι πολύ πολική ένωση, δεν κατακρατείται στη στατική φάση, οπότε ο χρόνος έκλουσης του αντιστοιχεί στον νεκρό χρόνο (t_0).



8. Ολοκλήρωση χρωματογραφημάτων:

- Από το μενού «**chromato**» επιλέγετε το **load**, εντοπίζετε και φορτώνετε το επιθυμητό χρωματογράφημα (με το όνομα που του έχετε δώσει).
- Με το κουμπί «**zoom**» μεγεθύνετε τις κορυφές ώστε να είναι ευδιάκριτες.
- Πατώντας **αριστερό κλικ** στο ποντίκι ξεκινάει η ολοκλήρωση της κορυφής και πατώντας ξανά το **αριστερό κλικ** ολοκληρώνεται η διαδικασία.
- Καταγράφετε τον χρόνο έκλουσης (t_r) της κάθε κορυφής **με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων**. Η επιφάνεια της κορυφής δεν χρειάζεται για τη συγκεκριμένη άσκηση.
- **Μεταφορά γραφημάτων:** Αφού επιλέξετε το χρωματογράφημα και προσαρμόσετε το μέγεθος των κορυφών, από το μενού «**chromato**» επιλέγετε **copy image** και στη συνέχεια επικολλάτε την εικόνα σε ένα αρχείο Word για την αναφορά σας.

9. Κλείσιμο χρωματογράφου:

- Διακόπτετε τη ροή της κινητής φάσης πατώντας το **stop** από την αντλία.
- Μόλις η πίεση του συστήματος πέσει, απενεργοποιείτε τον χρωματογράφο από το διακόπτη power (1).

Αποτελέσματα και ανάλυση

1. Μέτρηση τιμών $\log K'$:

Από τα χρωματογραφήματα των πρότυπων ενώσεων υπολογίζονται οι χρόνοι κατακράτησης (t_r) για κάθε ένωση σε κάθε injection με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων:

Παράδειγμα:

Ένωση	t_r (min) 1° injection	t_r (min) 2° injection	t_r (min) 3° injection
Βενζυλική αλκοόλη	2.95	2.97	2.98
Τολουόλιο	4.77	4.78	4.83
π-Ξυλόλιο	5.95	5.97	6.05

Υπολογίζεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση του χρόνου έκλουσης για κάθε ένωση.

Ένωση	t_r (min) average	t_r (min) Stdev
Βενζυλική αλκοόλη	2.97	0.02
Τολουόλιο	4.79	0.03
π-Ξυλόλιο	5.99	0.05

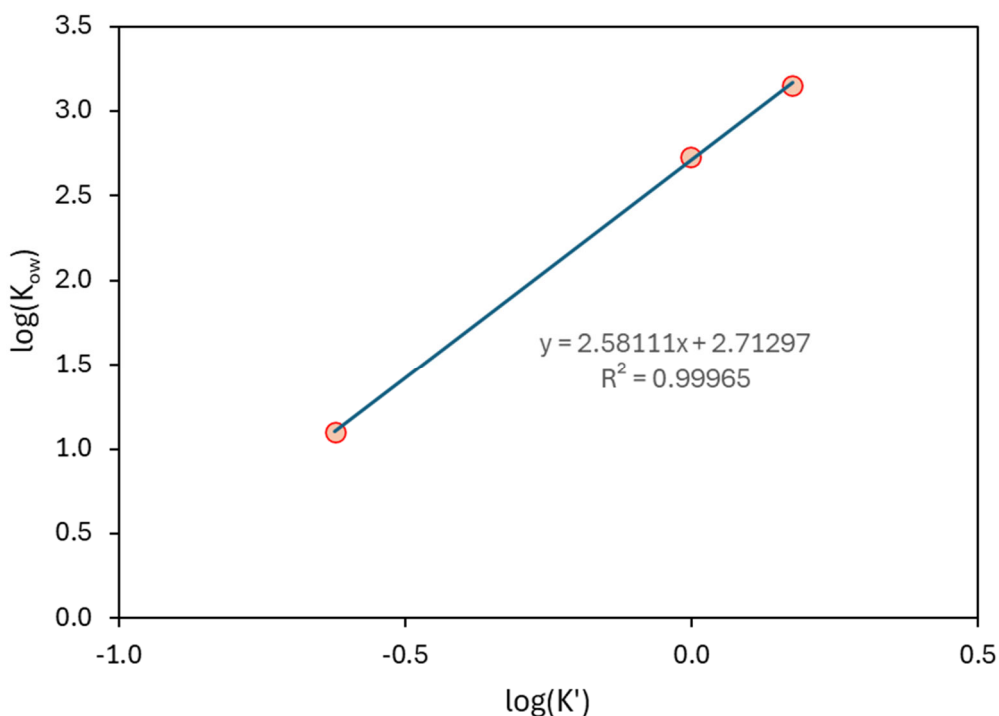
Με τη χρήση του νεκρού χρόνου (t_0) που είναι ο χρόνος έκλουσης του NaNO_3 , ($t_0=2.40$) υπολογίζονται οι συντελεστές χωρητικότητας K' στο σύστημα RPLC και στη συνέχεια ο δεκαδικός λογάριθμος τους $\log(K')$.

Ένωση	K'	$\log(K')$
Βενζυλική αλκοόλη	0.238	-0.623
Τολουόλιο	0.996	-0.002
π-Ξυλόλιο	1.50	0.176

Οι συντελεστές κατανομής (K_{ow}) για το πρότυπο σύστημα οκτανόλης - νερού καθώς και οι λογάριθμοι τους είναι:

Ένωση	$\log(K_{ow})$	Χαρακτηρισμός
Βενζυλική αλκοόλη	1.10	ήπια υδρόφιλη λόγω $-OH$
Τολουόλιο	2.73	λιπόφιλη (1 μεθύλιο ενισχύει λιποφιλία)
π-Ξυλόλιο	3.15	πολύ λιπόφιλη (2 μεθύλια)

Δημιουργείται διάγραμμα συσχέτισης των $\log(K')$ που υπολογίσθηκαν με την μέθοδο της RPLC (άξονας Χ) και των $\log(K_{ow})$ του συστήματος οκτανόλης-νερού (άξονας Υ).



Με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων υπολογίζεται η εξίσωση προσαρμογής $Y = m \cdot X + b$ που στο συγκεκριμένο παράδειγμα είναι $Y = 2.58111 \cdot X + 2.71297$.

2. Ανάλυση Ανισόλης:

Από τα χρωματογραφήματα της ανισόλης, υπολογίζεται ο χρόνος έκλουσης (t_r) για κάθε injection και στη συνέχεια η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση.

Οπότε στο παράδειγμα:

Ένωση	t_r (min) 1° injection	t_r (min) 2° injection	t_r (min) 3° injection
Ανισόλη	3.70	3.68	3.67

Ένωση	t_r (min) average	t_r (min) Stdev
Ανισόλη	3.68	0.02

Από την μέση τιμή των χρόνων έκλουσης και γνωρίζοντας τον νεκρό χρόνο (t_0) υπολογίζεται ο συντελεστής K' και στη συνέχεια ο δεκαδικός του λογάριθμος, οπότε:

για $t_r=3.68$ και $t_0=2.40$ δίνει $K'=0.533$ και $\log(K') = -0.273$

Με χρήση της εξίσωσης προσαρμογής υπολογίζεται ο συντελεστής χωρητικότητας της ανισόλης για το σύστημα οκτανόλης - νερού:

$$\log(K_{ow}) = 2.58111 \cdot \log(K') + 2.71297 = 2.007626241 \sim \mathbf{2.01}$$

Η θεωρητική τιμή του $\log(K_{ow})$ της ανισόλης είναι 2.11
οπότε το επί % απόλυτο σφάλμα είναι: **4.74 %**.

Η τιμή $\log(K') = 2.00$ αντιστοιχεί σε ένωση με **μέτρια πολικότητα**, γεγονός που δικαιολογείται καθώς η ανισόλη είναι αιθέρας.

Βίντεο:

Αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας παρουσιάζεται στο βίντεο της άσκησης στη ιστοσελίδα του μαθήματος στο e-class καθώς και στο κανάλι του εργαστηρίου στο youtube:



Εργ. Αναλυτικής II:



<https://www.chemistry.uoc.gr/eclass/modules/document/?course=CHEM-UNDER115>

Youtube:



<https://www.youtube.com/channel/UCrrDdUXUiTxyhezA140RIew>

Ερωτήσεις Κατανόησης:

1. Κατά τη διαδικασία του injection, για ποιο λόγο δεν αφαιρείτε τη σύριγγα από το σύστημα εισαγωγής κατά τη διάρκεια του χρωματογραφήματος;
2. Για ποιο λόγο, στην RPLC, εκλούεται πρώτα η βενζυλική αλκοόλη; Ποια είναι η σειρά των επόμενων ενώσεων; Αν εκτός από τις ενώσεις σας, υπήρχε και η ένωση Na_2SO_4 , σε ποιο σημείο θα εκλουόταν και για ποιο λόγο;
3. Ποιες είναι οι κύριες διαφορές μεταξύ RPLC και HPLC;

Άσκηση – Ιοντική Χρωματογραφία (IC)

Σκοπός της άσκησης είναι:

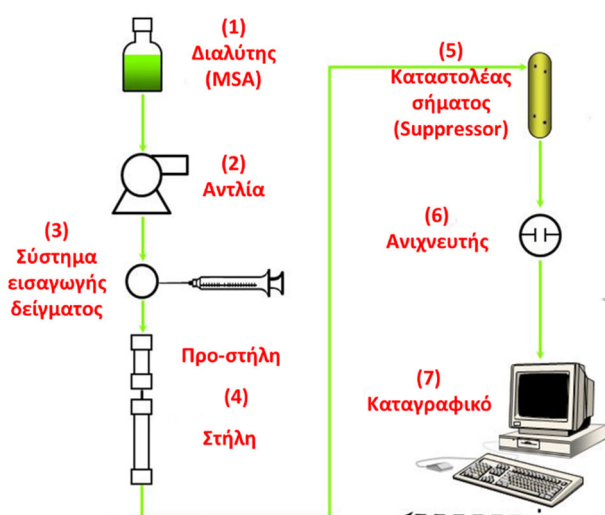
Η κατανόηση των παραμέτρων της ιοντικής χρωματογραφίας
και ο προσδιορισμός κατιόντων σε δείγματα νερού.



Η άσκηση της ιοντικής χρωματογραφίας, χωρίζεται σε δύο μέρη:

- 1. Πρώτο μέρος:** Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων ιόντων διαφορετικών συγκεντρώσεων, με σκοπό τη δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης για κάθε κατιόν ξεχωριστά.
- 2. Δεύτερο μέρος:** Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός αγνώστου δείγματος και δείγματος νερού από το δίκτυο του Πανεπιστημίου.

Ένα σύστημα ιοντικής χρωματογραφίας αποτελείται από 7 κυρίως τμήματα :



1. Την κινητή φάση
2. Την αντλία
3. Το σύστημα εισαγωγής δείγματος
4. Την αναλυτική στήλη
5. Το σύστημα καταστολής σήματος υποβάθρου (προαιρετικά)
6. Τον ανιχνευτή
7. Το καταγραφικό

**Αναλυτικά, η λειτουργία του κάθε μέρους αναφέρεται
στη γενική εισήγηση της υγρής χρωματογραφίας.**

Ένα από τα βασικά κριτήρια για να θεωρείται το νερό κατάλληλο για πόσιμο είναι η σκληρότητά του. Ένα από τα βασικά κριτήρια για να θεωρείται το νερό κατάλληλο για πόσιμο. Η σκληρότητα οφείλεται κυρίως στα διαλυμένα άλατα ασβεστίου (Ca^{2+}) και μαγνησίου (Mg^{2+}). Άλλα ιόντα, όπως του αργιλίου (Al^{3+}) και του σιδήρου (Fe^{3+}), μπορούν επίσης να αυξήσουν τη σκληρότητα, όμως η παρουσία τους είναι λιγότερο σημαντική. Η σκληρότητα εκφράζεται σε ισοδύναμη ποσότητα ανθρακικού ασβεστίου (CaCO_3) ή σε οξείδιο του ασβεστίου (CaO).

Υπάρχουν δύο είδη σκληρότητας:

- **Παροδική (ή ανθρακική) σκληρότητα**, προκαλείται από τα όξινα ανθρακικά άλατα ασβεστίου και μαγνησίου. Εξαφανίζεται με το βρασμό, γιατί τα άλατα αυτά μετατρέπονται σε δυσδιάλυτα ανθρακικά σχηματίζοντας ιζήματα.
- **Μόνιμη σκληρότητα**, οφείλεται στα χλωριούχα και θειικά άλατα ασβεστίου και μαγνησίου και δεν φεύγει με το βρασμό.

Η ολική σκληρότητα είναι το άθροισμα της παροδικής και της μόνιμης σκληρότητα και υπολογίζεται από την σχέση:

$$\text{Ολική σκληρότητα} = 4.118 \times (\text{Mg}) + 2.497 \times (\text{Ca})$$

Οι μονάδες μέτρησης που χρησιμοποιούνται είναι:

- **Γερμανικοί Βαθμοί ($^{\circ}\text{d}$)**, $1^{\circ}\text{d} = 1 \text{ mg CaO} / 100\text{ml νερού}$.
- **Γαλλικοί Βαθμοί ($^{\circ}\text{f}$)**, $1^{\circ}\text{f} = 1 \text{ mg CaCO}_3 / 100\text{ml νερού}$.
- **Αμερικάνικοι Βαθμοί**, $1 = 1 \text{ mg CaCO}_3 / \text{l νερού}$ (δηλαδή 1 ppm CaCO_3)

Ανάλογα με τις τιμές της σκληρότητας, το νερό χαρακτηρίζεται ως εξής:

Χαρακτηρισμός	Γερμανικοί Βαθμοί ($^{\circ}\text{d}$)	Γαλλικοί Βαθμοί ($^{\circ}\text{f}$)	Αμερικάνικοι Βαθμοί
Πολύ μαλακό	0 – 4	0 – 7	0 – 70
Μαλακό	4 – 8	7 – 15	70 – 150
Ημίσκληρο	8 – 12	15 – 25	150 – 250
Σχετικά σκληρό	12 – 18	25 – 32	250 – 320
Σκληρό	18 – 30	32 – 42	320 – 420
Πολύ σκληρό	>30	>42	>420

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές για τη μέτρηση της σκληρότητας του νερού. Μια από αυτές είναι η χρήση της ιοντικής χρωματογραφίας, κατά την οποία καταγράφονται οι συγκεντρώσεις των ιόντων του μαγνησίου και του ασβεστίου.

Άλλες τεχνικές είναι με τη χρήση ατομικής απορρόφησης (όπως θα κάνετε και στην αντίστοιχη άσκηση), με φασματοφωτομετρική μέτρηση των συμπλόκων Mg και Ca, με τιτλοδότηση με EDTA, με έτοιμα εμπορικά kit ή έμμεσα με τη μέτρηση της αγωγιμότητας.

Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια – Όργανα:

- Διαλύτης: Methansulfonic Acid (MSA)
- Πρότυπα διαλύματα ιόντων: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}
- Υπερκάθαρο νερό (nanopure)
- Σύριγγα υγρών 50 μl Hamilton
- Πιπέτες ακριβείας μεταβλητού όγκου
- Φίλτρα σωματιδίων: pore size 0.45 μm , filter diameter 15 mm
- Συσκευή υπερήχων
- Ιοντική Χρωματογραφία

Παράμετροι Χρωματογράφου:

- Προστήλη: Universal GC-2 cation 7.5 x 4.6 mm
- Στήλη: Universal Cation, 7 μm , 100 x 4.6 mm
- Θερμοκρασία φούρνου στήλης: 35⁰ C
- Όγκος βρόχου (Loop): 20 μl
- Θερμοκρασία κελιού ανιχνευτή: 35⁰ C
- Ευαισθησία ανιχνευτή : 10
- Διαλύτης : MSA 5 mM
- Ταχύτητα κινητής φάσης : 1.0 ml/min
- Πίεση συστήματος: 800 – 1200 psi
- Ελάχιστη πίεση: 50 psi
- Μέγιστη πίεση: 1800 psi

1. Παρασκευή κινητής φάσης:

Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα της κινητής φάσης MSA 5 Mm, με υπερκάθαρο νερό, ώστε να μειωθεί το σήμα υποβάθρου. Πριν από τη χρήση, το διάλυμα απαρώνεται στους υπερήχους για 45 λεπτά.

2. Φυσαλίδες

Καθώς υπάρχει η πιθανότητα δημιουργίας φυσαλίδων στην κινητή φάση στο ξεκίνημα της ροής (παρότι έχει ήδη απαερωθεί) ξεκινάτε με τη διαδικασία αφαίρεσης φυσαλίδων, όπως αυτή περιγράφεται στην εισήγηση της υγρής χρωματογραφίας. Ωστόσο, φυσαλίδες μπορεί να εμφανιστούν και κατά τη διάρκεια της λειτουργίας, οπότε πρέπει να γίνεται τακτικός έλεγχος. Για τον σκοπό αυτό, ο σωλήνας μεταφοράς της κινητής φάσης είναι διαφανής.

3. Σταθεροποίηση σήματος

Καθώς ο ανιχνευτής είναι αγωγιμομετρικός απαιτείται αρκετός χρόνος περίπου 30–45 λεπτά) για να σταθεροποιηθεί το σήμα του, για το λόγο αυτό ξεκινάτε άμεσα τη λειτουργία του. Αρχικά ενεργοποιείτε το

χρωματογράφο, πατώντας τους διακόπτες της αντλίας, του ανιχνευτή και του φούρνου της στήλης. Στη συνέχεια, συνδέεται το σύστημα μετατροπής του σήματος στη τροφοδοσία και ανοίγετε τον υπολογιστή. Έπειτα, πραγματοποιείτε τη συνήθη διαδικασία αφαίρεσης φυσαλίδων και ξεκινάτε το σύστημα σε λειτουργία με την επιθυμητή ροή της κινητής φάσης.

Προσοχή:

- Ελέγχετε η πίεση του συστήματος να σταθεροποιηθεί σε φυσιολογικά επίπεδα (1000 – 1500 psi). Πολύ μεγαλύτερη ή μικρότερη τιμή αποτελεί ένδειξη λανθασμένης λειτουργίας ή πιθανής βλάβης.
- Παρακολουθείτε συνεχώς για εμφάνιση φυσαλίδων, ειδικά στο ξεκίνημα του χρωματογράφου.

4. Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων:

Παρασκευάζονται πέντε πρότυπα διαλύματα (C_1 , C_2 , C_3 , C_4 και C_5) από αρχικό πυκνό πρότυπο διάλυμα (C_0), το οποίο σας δίνεται από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου. Το αρχικό διάλυμα περιέχει και τα τέσσερα ιόντα που θα αναλυθούν, με συγκέντρωση 10.0 ppm για καθένα: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} και Ca^{2+} .

Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάζονται με πιπέτες ακριβείας μεταβλητού όγκου, σε τελικό όγκο 1 ml (1000 μ l) με υπερκάθαρο νερό, στις παρακάτω συγκεντρώσεις:

Πρότυπο	Συγκέντρωση (ppm)
C_1	0.50
C_2	1.00
C_3	2.00
C_4	3.00
C_5	4.00

Υπολογίστε πόσο όγκο(σε μ l) πρέπει να πάρετε από το αρχικό πρότυπο C_0 ώστε να παρασκευάσετε τις αραιώσεις για κάθε πρότυπο διάλυμα.

Παρατήρηση: Τα πρότυπα διαλύματα θα έχουν ακρίβεια τριών σημαντικών ψηφίων (δύο δεκαδικά). Η ακρίβεια αυτή καθορίζεται από:

- την ακρίβεια του αρχικού προτύπου (10.0 ppm, τρία σημαντικά ψηφία)
- την ακρίβεια του όγκου που λαμβάνεται με τις πιπέτες μεταβλητού όγκου (200 μ l και 1000 μ l), οι οποίες έχουν ακρίβεια μεγαλύτερη από τρία σημαντικά ψηφία.

Συνεπώς, ο περιοριστικός παράγοντας είναι η συγκέντρωση του αρχικού προτύπου, δηλαδή τα τρία σημαντικά ψηφία.

Σημείωση: Στην υγρή χρωματογραφία είναι σημαντικό όλα τα δείγματα να είναι φιλτραρισμένα, διαφορετικά πιθανές ακαθαρσίες μπορεί να περάσουν στη στήλη και να της προκαλέσουν φθορά. Το φιλτράρισμα γίνεται με φίλτρο σωματιδίων 0.45 μ m, το οποίο κατακρατά όλα τα σωματίδια με διάμετρο μεγαλύτερη από 0.45 μ m. Για ευκολία, δεν φιλτράρονται τα τελικά πρότυπα (ώστε να αποφευχθεί η επιμόλυνση από το ένα διάλυμα στο άλλο) αλλά φιλτράρονται, το αρχικό πρότυπο (C_0) και το υπερκάθαρο νερό με το οποίο θα γίνουν οι αραιώσεις.

Από τα φιλτραρισμένα αυτά διαλύματα παρασκευάζονται τα τελικά πρότυπα, τα οποία έτσι είναι ήδη φιλτραρισμένα. Το φιλτράρισμα πρέπει να γίνει και στα άγνωστα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν.

5. Προετοιμασία λογισμικού επικοινωνίας:

Πριν από την εισαγωγή του δείγματος πρέπει να ρυθμιστεί το λογισμικό λογισμικού του χρωματογράφου.

- Από την οθόνη του ηλεκτρονικού υπολογιστή, ανοίγετε το πρόγραμμα «**integral**».
- Από το παράθυρο **Data Read**:
 - Ρυθμίζεται το **port come** στο **com1** (θύρα σύνδεσης στον υπολογιστή)
 - Ρυθμίζεται το **Baud Rates** στα **19200** (ρυθμός μετάδοσης δεδομένων ανά δευτερόλεπτο)
- Πατάτε **GO** και ανοίγουν δύο επιπλέον παράθυρα
- Στα νέα παράθυρα γράφετε:
 - Συμπληρώνετε την ταυτότητα του δείγματος: έτος, όνομα ομάδας, δείγμα (π.χ. 2025 A1 2 ppm)
 - Ρυθμίζεται τον επιθυμητό χρόνο: π.χ. 8 min.
 - Πατάτε **ok** για να αποθηκευτούν οι αλλαγές
- Πατάτε το κουμπί **auto ON**

Το λογισμικό είναι πλέον έτοιμο να ξεκινήσει μόλις γίνει η έγχυση του δείγματος.

6. Εισαγωγή του δείγματος (Injection):

- Βάζετε τον εισαγωγέα στη θέση **load**.
- Ξεπλένεται 3 φορές τη σύριγγα με υπερκάθαρο νερό.
- Ξεπλένεται 3 φορές το βρόχο με υπερκάθαρο νερό χρησιμοποιώντας τη σύριγγα.
- Γεμίζετε τη σύριγγα με ποσότητα δείγματος (χωρίς φυσαλίδες) τουλάχιστον τρεις φορές μεγαλύτερη από τον όγκο του βρόχου, ώστε να ξεπλυθεί πλήρως και να μείνει η απαραίτητη ποσότητα δείγματος σε αυτόν.
- Με τη σύριγγα στο σύστημα εισαγωγής, γυρίστε γρήγορα και απότομα (αλλά όχι με υπερβολική δύναμη) το μοχλό του injector από τη θέση **load** στη θέση **inject**, ώστε να εισαχθεί το δείγμα στον χρωματογράφο.
- Μόλις ολοκληρωθεί ο χρόνος καταγραφής, το χρωματογράφημα αποθηκεύεται αυτόματα.
- Από το μενού **dataRead** πατάτε **stop** για να σταματήσει το πρόγραμμα.
- Κλείνετε τα παράθυρα του προγράμματος.
- Αφαιρείτε τη σύριγγα από το σύστημα εισαγωγής και ξεπλένετε 3 φορές με υπερκάθαρο νερό.

Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλα τα πρότυπα διαλύματα.

7. Ανάλυση αγνώστων δειγμάτων:

- a) Φιλτράρετε το άγνωστο δείγμα με φίλτρο σωματιδίων 0.45 μm και κάνετε έγχυση (injection) με την ίδια διαδικασία που εφαρμόζεται και για τα πρότυπα διαλύματα.

Το άγνωστο δείγμα θα δοθεί από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.

- b) Λαμβάνετε νερό από το δίκτυο του Πανεπιστημίου και πραγματοποιείται αραιώση 1/10 σε τελικό όγκο 25 ml, χρησιμοποιώντας πιπέτα ακριβείας μεταβλητού όγκου και ογκομετρικής φιάλης των 25 ml. Στη συνέχεια, φιλτράρετε το αραιωμένο δείγμα με φίλτρο σωματιδίων 0.45 μm και κάνετε έγχυση με την ίδια ακριβώς διαδικασία που εφαρμόζεται και για τα πρότυπα διαλύματα.

8. Συλλογή δεδομένων – Ολοκλήρωση χρωματογραφήματων:

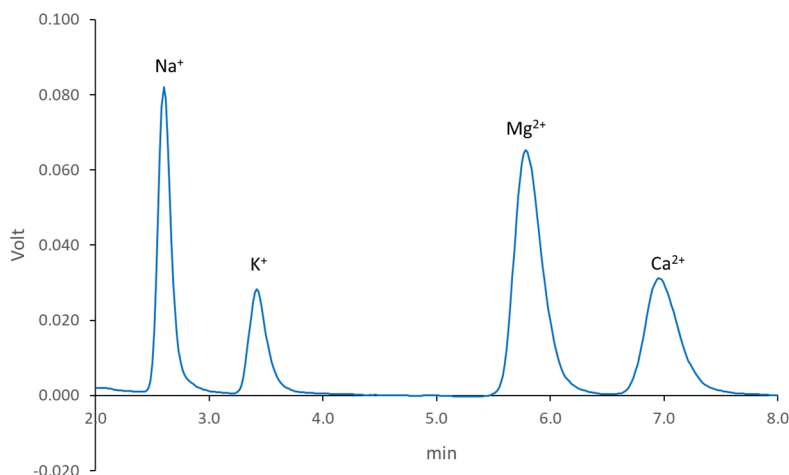
- Από το μενού **chromate**, επιλέγετε **load**, εντοπίζετε το επιθυμητό χρωματογράφημα (με το όνομα που του έχετε δώσει) και το φορτώνετε.
- Με το κουμπί **zoom** μεγεθύνετε τις κορυφές όσο χρειάζεται για να είναι ευδιάκριτες.

- Με **δεξί κλικ** επιλέγετε και ορίζετε την επιθυμητή **baseline**.
- Πατώντας το αριστερό πλήκτρο του ποντικιού ξεκινάει η ολοκλήρωση της κορυφής και πατώντας ξανά το ξανά ολοκληρώνεται η διαδικασία.
- Τη πρώτη φορά για κάθε κορυφή πατάτε το κουμπί **newpic** και ονομάζεται τη κάθε κορυφή (π.χ. Na).
- Από το μενού **Result**, ενεργοποιείτε την επιλογή **logfile**, ώστε όλα τα δεδομένα ολοκλήρωσης να αποθηκεύονται σε αρχείο κειμένου (.txt) που δημιουργείται στο φάκελο του προγράμματος.
- Στη συνέχεια ανοίγετε ένα-ένα τα χρωματογραφήματα από το μενού **chromate**, επιλέγετε **load** και ολοκληρώνεται κάθε κορυφή ξεχωριστά. Στο τέλος κάθε ολοκλήρωσης, πατάτε **OK** για να μεταφερθούν τα δεδομένα στο αρχείο **Logfile**.

9. Μεταφορά γραφημάτων:

Τα χρωματογραφήματα μπορούν να μεταφερθούν ως εικόνες σε ένα αρχείο **word** και στη συνέχεια στην αναφοράς σας. Αφού επιλέξετε το επιθυμητό χρωματογράφημα και στο επιθυμητό μέγεθος των κορυφών, από το μενού **chromate**, επιλέγετε **copy image** και το επικολλάτε στο αρχείο word.

Τα χρωματογραφήματα θα έχουν τη παρακάτω μορφή:



Αρχεία:

Σε ένα usb stik αντιγράφεται το αρχείο κειμένου (.txt, logfile) καθώς και το αρχείο word με τα γραφήματα. Το .txt αρχείο βρίσκεται στο φάκελο: **Desktop\Integral32** και θα έχει τη μορφή πίνακα:

Time	Area	Heigh	Name
2.651068	0.1961603	2.009629E-02	Na
3.551068	5.154434E-02	4.51988E-03	K
6.167735	0.2210234	1.205155E-02	Mg
7.434402	0.2481565	1.191876E-02	Ca

- 1η στήλη: χρόνος έκλουσης κάθε κορυφής (t_r)
- 2η στήλη: επιφάνεια ολοκλήρωσης
- 3η στήλη: ύψος κορυφής
- 4η στήλη: όνομα ιόντος που αντιστοιχεί στην κορυφή

Παράδειγμα: η κορυφή του Na εμφανίζεται στα 2.651068 min (2.65 min, κάντε στρογγυλοποίηση σε δύο δεκαδικά) έχει επιφάνεια ολοκλήρωσης 0.1961603 και ύψος κορυφής 2.009629E-02 (ή αλλιώς 0.02009629).

Αποτελέσματα και ανάλυση

1. Υπολογισμός χρόνων έκλουσης των ιόντων:

Ο χρόνος έκλουσης δίνεται με στρογγυλοποίηση σε δύο (2) δεκαδικά ψηφία. Για κάθε ιόν υπολογίζονται πέντε χρόνοι έκλουσης, ένας από κάθε injection του κάθε προτύπου: έναν για το πρότυπο των 0.50 ppm, έναν για το 1.00 ppm, έναν για το 2.00 ppm, έναν για το 3.00 ppm και έναν για το πρότυπο των 4.00 ppm.

Έτσι για παράδειγμα για το ιόν του Νατρίου θα είναι:

Συγκέντρωση πρότυπου	0.50	1.00	2.00	3.00	4.00
Χρόνος έκλουσης (min)	2.60	2.58	2.60	2.62	2.62

Από αυτούς θα υπολογιστεί η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση για κάθε ιόν. Ο χρόνος αυτός θα αποτελεί τον τελικό χρόνο έκλουσης τους. Έτσι:

Ιόν	t_r (min) average	t_r (min) Stdev
Na ⁺	2.60	0.02
K ⁺	3.42	0.01
Mg ²⁺	5.82	0.02
Ca ²⁺	7.00	0.02

(η τυπική απόκλιση δίνεται με τα ίδια δεκαδικά ψηφία της μέσης τιμής)

2. Δημιουργία καμπυλών αναφοράς για κάθε ιόν:

Στη συνέχεια δημιουργούνται οι καμπύλες αναφοράς από τις επιφάνειες ολοκλήρωσης των πρότυπων δειγμάτων. Για κάθε ιόν θα υπάρχουν πέντε επιφάνειες ολοκλήρωσης, που προκύπτουν από την ολοκλήρωση των πέντε πρότυπων διαλυμάτων.

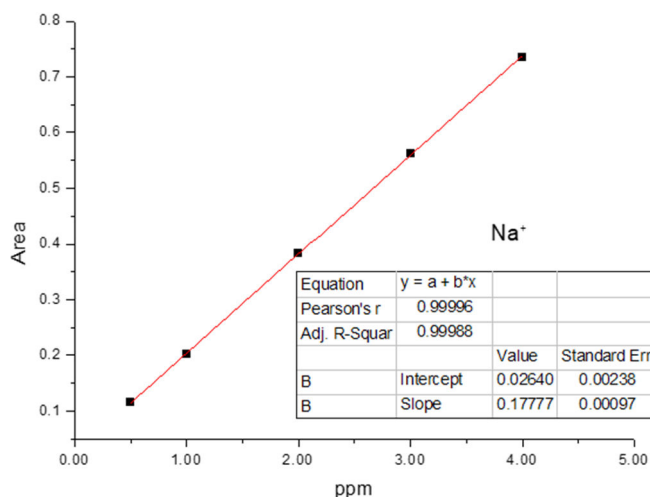
Με τη χρήση ενός υπολογιστικού προγράμματος (όπως το excel ή το Origin) κατασκευάζεται διάγραμμα τύπου XY scattering και εφαρμόζεται η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων, δημιουργώντας για κάθε ιόν χωριστά (Na⁺, K⁺, Mg²⁺ και Ca²⁺) την αντίστοιχη καμπύλη αναφορά του.

Στον άξονα του X τοποθετούνται οι συγκεντρώσεις του πρότυπου δείγματος (σε ppm) και στον άξονα των Y οι επιφάνειες ολοκλήρωσης του.

Παράδειγμα: για το ιόν του Na⁺ οι επιφάνειες ολοκλήρωσης του είναι:

Πρότυπο (ppm)	0.50	1.00	2.00	3.00	4.00
Επιφάνεια ολοκλήρωσης	0.11489	0.20240	0.38375	0.56272	0.73478

Η καμπύλη αναφοράς δίνει μια εξίσωση προσαρμογής της μορφής: $Y = m \cdot X + b$ όπου m η κλίση της ευθείας και b η τεταγμένη. Ο συντελεστής προσαρμογής R δείχνει πόσο καλή είναι η προσαρμογή, όσο πιο κοντά στη μονάδα, τόσο καλύτερη. Συνήθως επιδιώκεται τουλάχιστον $R^2 \geq 0.999$. Μικρότερη τιμή οφείλονται συνήθως σε ατέλειες της πειραματικής διαδικασίας, κυρίως σφάλματα που γίνονται κατά τις αραιώσεις. Στο προηγούμενο παράδειγμα η εξίσωση είναι $Y = 0.17777 \cdot X + 0.02640$ με $R^2 = 0.99988$.



3. Προσδιορισμός ορίων ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ):

Από τις καμπύλες αναφοράς κάθε ιόντος υπολογίζονται τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ξεχωριστά.

Παράδειγμα: για το ιόν του Na⁺, από την καμπύλη βαθμονόμησης προκύπτει:

Η κλίση της ευθείας είναι $m = 0.17777$ και η τυπική απόκλιση της κλίσης $S = 0.00097$

- το όριο ανίχνευσης είναι $LOD = \frac{3 \cdot S}{m} = \frac{3 \cdot 0.00097}{0.17777} = 0.016369 \sim 0.016 \text{ ppm}$
- το όριο ποσοτικοποίησης είναι $LOQ = \frac{10 \cdot S}{m} = \frac{10 \cdot 0.00097}{0.17777} = 0.054565 \sim 0.055 \text{ ppm}$

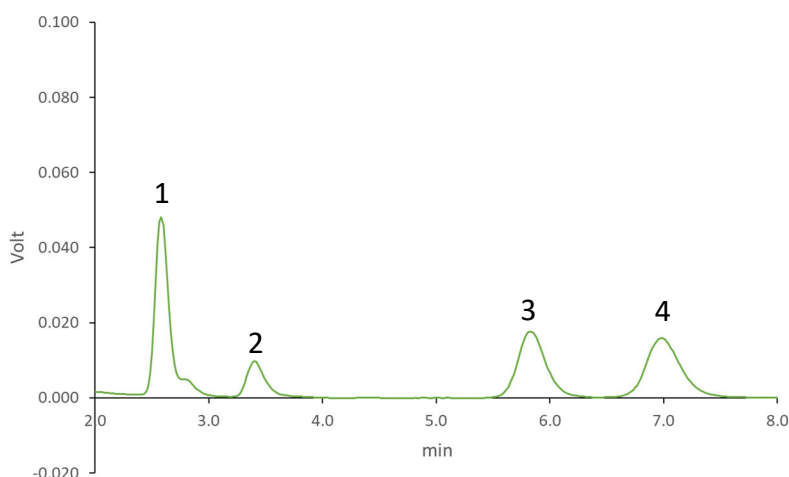
Αντίστοιχα υπολογίζονται και για υπόλοιπα ιόντα:

Ιόν	LOD	LOQ
Na ⁺	0.016	0.055
K ⁺	0.125	0.415
Mg ²⁺	0.088	0.294
Ca ²⁺	0.048	0.159

4. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός άγνωστου δείγματος:

Υπολογίζονται οι χρόνοι έκλουσης και οι επιφάνειες ολοκλήρωσης για κάθε κορυφή του άγνωστου δείγματος.

Παράδειγμα:



Κορυφή	t _r (min)	Επιφάνεια ολοκλήρωσης
1	2.62	0.72658
2	3.42	0.12014
3	5.82	0.47813
4	6.99	0.23544

Οι χρόνοι έκλουσης συγκρίνονται με τους αντίστοιχους των προτύπων. Με βάση τις μέσες τιμές τους και το εύρος που ορίζει η τυπική απόκλιση, γίνεται αντιστοίχιση και ποιοτική ταυτοποίηση των ιόντων. Μικρές αποκλίσεις οφείλονται συνήθως σε σφάλματα συγχρονισμού κατά την έναρξη του χρωματογραφήματος.

Στο παράδειγμα η 1^η κορυφή θα αντιστοιχεί στο ιόν του Na⁺, η 2^η στο ιόν του K⁺, η 3^η στο ιόν του Mg²⁺ και η 4^η στο ιόν του Ca²⁺.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό, από την επιφάνεια ολοκλήρωσης κάθε ιόντος και με χρήση της καμπύλης αναφοράς του, υπολογίζεται η συγκέντρωση σε ppm. Το τελικό αποτέλεσμα δίνεται με ακρίβεια των αρχικών πρότυπων διαλυμάτων, δηλ. με 3 σημαντικά ψηφία.

Στο παράδειγμα: το ιόν του Na⁺ έχει επιφάνεια ολοκλήρωσης 0.72658 και η καμπύλη βαθμονόμηση ⁺ είναι $Y = 0.17777 \cdot X + 0.02640$. Οπότε το άγνωστο δείγμα θα έχει συγκέντρωση σε ιόντα Na⁺ 3.94 ppm.

Αντίστοιχα γίνεται και για τα υπόλοιπα ιόντα:

Ιόν	ppm
Na ⁺	3.94
K ⁺	1.61
Mg ²⁺	1.41
Ca ²⁺	1.38

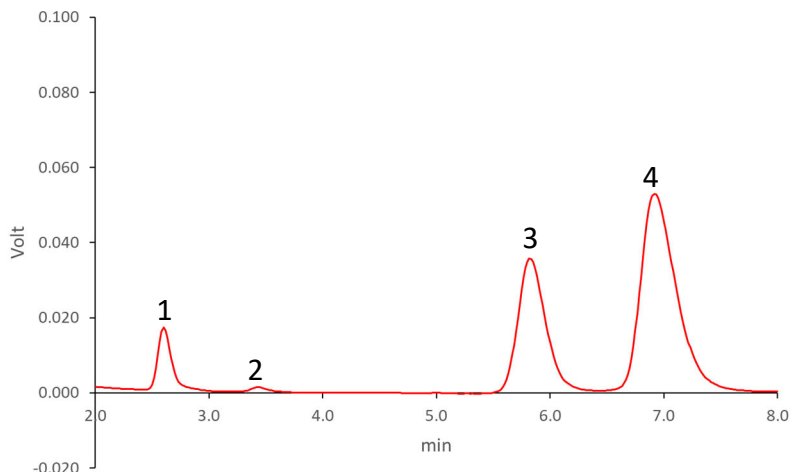
Οι τιμές ελέγχονται ως προς τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου για κάθε ιόν:

- **Αν είναι < LOD:** τότε ως αποτέλεσμα δίνεται το όριο ανίχνευσης (LOD).
- **Αν είναι μεταξύ LOD και LOQ:** τότε το αποτέλεσμα δίνεται με επιφύλαξη ως προς την ακρίβεια του.
- **Αν είναι μεταξύ LOQ και μέγιστου προτύπου:** τότε το αποτέλεσμα δίνεται κανονικά.
- **Αν είναι μεγαλύτερο από το μεγαλύτερο πρότυπο:** τότε το αποτέλεσμα δίνεται με επιφύλαξη ως προς την ακρίβεια του.

5. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός στο δείγμα νερού από το δίκτυο του Πανεπιστημίου:

Υπολογίζονται οι χρόνοι έκλουσης και οι επιφάνειες ολοκλήρωσης για κάθε κορυφή του άγνωστου δείγματος.

Παράδειγμα:



Κορυφή	t _r (min)	Επιφάνεια ολοκλήρωσης
1	2.62	0.16282
2	3.43	0.02296
3	5.85	0.60531
4	6.92	1.22101

Όπως και στο προηγούμενο άγνωστο δείγμα, οι χρόνοι έκλουσης των κορυφών συγκρίνονται με τους χρόνους έκλουσης των ιόντων στα πρότυπα δείγματα, γίνεται αντιστοίχιση και ταυτοποίηση των ιόντων.

Στο παράδειγμα: η 1^η κορυφή θα αντιστοιχεί στο ιόν του Na⁺, η 2^η στο ιόν του K⁺, η 3^η στο ιόν του Mg²⁺ και η 4^η στο ιόν του Ca²⁺.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται ο ποσοτικός προσδιορισμός. Από την επιφάνεια ολοκλήρωσης κάθε ιόντος και με τη χρήση της καμπύλης αναφοράς του αντίστοιχου ιόντος, υπολογίζεται η ποσότητα του σε ppm. Η συγκέντρωση που προκύπτει πρέπει να διορθωθεί με τον παράγοντα αραιώσης που εφαρμόστηκε στο δείγμα (1/10) και να δοθεί ως τελικό αποτέλεσμα, λαμβάνοντας υπόψη τη σωστή ακρίβεια.

Στο παράδειγμα: το ιόν του Na⁺ έχει επιφάνεια ολοκλήρωσης 0.16282, η καμπύλη βαθμονόμηση του Na⁺ είναι $Y = 0.17777 \cdot X + 0.02640$, οπότε η συγκέντρωση σε ιόντα Na⁺ 0.767 ppm, αντίστοιχα γίνεται και για τα υπόλοιπα ιόντα:

Ιόν	ppm
Na ⁺	0.767
K ⁺	0.062
Mg ²⁺	1.801
Ca ²⁺	8.387

Οι τιμές ελέγχονται ως προς τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου για κάθε ιόν:

- **Αν είναι < LOD:** τότε ως αποτέλεσμα δίνεται το όριο ανίχνευσης (LOD).
- **Αν είναι μεταξύ LOD και LOQ:** τότε το αποτέλεσμα δίνεται με επιφύλαξη ως προς την ακρίβεια του.
- **Αν είναι μεταξύ LOQ και μέγιστου προτύπου:** τότε το αποτέλεσμα δίνεται κανονικά.
- **Αν είναι μεγαλύτερο από το μεγαλύτερο πρότυπο:** τότε το αποτέλεσμα δίνεται με επιφύλαξη ως προς την ακρίβεια του.

Στο συγκεκριμένο παράδειγμα, η τιμή του ιόντων K⁺ είναι μικρότερη από το όριο ανίχνευσης, οπότε ως αποτέλεσμα δίνεται η τιμή του ορίου ανίχνευσης δηλαδή < 0.125 ppm. Επίσης η τιμή του Ca είναι εκτός των ορίων της καμπύλης βαθμονόμησης, είναι μεγαλύτερη από τη τιμή του μεγαλύτερου πρότυπου (4.00 ppm), οπότε το αποτέλεσμα αυτό δεν θεωρείται αξιόπιστο. Ωστόσο, αναφέρεται με την αντίστοιχη επισήμανση, καθώς είναι μεγαλύτερο από το όριο ανίχνευσης.

Τέλος, οι συγκεντρώσεις που υπολογίζονται για το αραιωμένο δείγμα μετατρέπονται σε συγκεντρώσεις του αρχικού δείγματος με τον συντελεστή αραιώσης και τα τελικά αποτελέσματα δίνονται με τρία σημαντικά ψηφία.

Ιόν	ppm
Na ⁺	7.67
K ⁺	< 1.25
Mg ²⁺	18.0
Ca ²⁺	83.9

Με βάση τις τιμές των συγκεντρώσεων των ιόντων του μαγνησίου και του ασβεστίου υπολογίζεται η σκληρότητα του.

Σε αμερικανικούς βαθμούς, η ολική σκληρότητα θα είναι:

$$\text{Ολική σκληρότητα} = 4.118 \times (\text{Mg}) + 2.497 \times (\text{Ca}) = 4.118 \times 18 + 2.497 \times 83.9 = 283.6$$

Οπότε το νερό κατατάσσεται ως σχετικά σκληρό.

Βίντεο:

Αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας παρουσιάζεται στο βίντεο της άσκησης στη ιστοσελίδα του μαθήματος στο e-class καθώς και στο κανάλι του εργαστηρίου στο youtube:



Εργ. Αναλυτικής II:



<https://www.chemistry.uoc.gr/eclass/modules/document/?course=CHEM-UNDER115>

Youtube:



<https://www.youtube.com/channel/UCrrDdUXUiTxyhezA140Rlew>

Ερωτήσεις Κατανόησης:

1. Με την ευαισθησία του ανιχνευτή ρυθμισμένη στην τιμή 10, η επιφάνεια ολοκλήρωσης είναι 0.900. Επαναλαμβάνοντας την ανάλυση του ίδιου δείγματος, με τις ίδιες συνθήκες αλλά με αυξημένη ευαισθησία του ανιχνευτή στην τιμή 30, ποια θα είναι η επιφάνεια ολοκλήρωσης του ιόντος;
2. Αν η ισχύς του διαλύτη έκλουσης αυξηθεί από 5 mM MSA σε 10 mM MSA, θα αλλάξουν οι χρόνοι έκλουσης των ιόντων; Θα μεταβληθούν οι επιφάνειες ολοκλήρωσης των ιόντων;
3. Αυξάνοντας την ταχύτητα ροής του διαλύτη έκλουσης από 1 ml/min σε 2 ml/min, θα αλλάξουν οι χρόνοι έκλουσης των ιόντων; Θα μεταβληθούν οι επιφάνειες ολοκλήρωσης των ιόντων;
4. Αν αφαιρεθεί η προστήλη και η χρωματογραφία πραγματοποιηθεί μόνο με την κύρια στήλη, θα αλλάξουν οι χρόνοι έκλουσης των ιόντων; Θα μεταβληθούν οι επιφάνειες ολοκλήρωσης των ιόντων;
5. Αν στο δείγμα προς ανάλυση, εκτός από τα κατιόντα (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} και Ca^{2+}) προστεθεί και το ιόν Li^+ , σε ποια σειρά θα εκλουστεί;
6. Πριν από τις κορυφές των ιόντων, εμφανίζεται μια πολύ μεγάλη κορυφή. Σε τι οφείλεται αυτή;

Άσκηση – Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης

Σκοπός της άσκησης είναι:

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων μαγνησίου (Mg) και ασβεστίου (Ca) σε δείγματα πόσιμου νερού με τη χρήση της φασματοσκοπίας Ατομικής Απορρόφησης.



Ένα από τα βασικά κριτήρια για να θεωρείται το νερό κατάλληλο για πόσιμο είναι η σκληρότητά του. Η σκληρότητα οφείλεται κυρίως στα διαλυμένα άλατα ασβεστίου (Ca^{2+}) και μαγνησίου (Mg^{2+}). Άλλα ιόντα, όπως του αργιλίου (Al^{3+}) και του σιδήρου (Fe^{3+}), μπορούν επίσης να αυξήσουν τη σκληρότητα, όμως η παρουσία τους είναι λιγότερο σημαντική. Η σκληρότητα εκφράζεται σε ισοδύναμη ποσότητα ανθρακικού ασβεστίου (CaCO_3) ή σε οξείδιο του ασβεστίου (CaO).

Υπάρχουν δύο είδη σκληρότητας:

- Παροδική (ή ανθρακική) σκληρότητα, προκαλείται από τα όξινα ανθρακικά άλατα ασβεστίου και μαγνησίου. Εξαφανίζεται με το βρασμό, γιατί τα άλατα αυτά μετατρέπονται σε δυσδιάλυτα ανθρακικά σχηματίζοντας ιζήματα.
- Μόνιμη σκληρότητα, οφείλεται στα χλωριούχα και θειικά άλατα ασβεστίου και μαγνησίου και δεν φεύγει με το βρασμό.

Η ολική σκληρότητα είναι το άθροισμα της παροδικής και της μόνιμης σκληρότητα και υπολογίζεται από την σχέση:

$$\text{Ολική σκληρότητα} = 4.118 \times (\text{Mg}) + 2.497 \times (\text{Ca})$$

Οι μονάδες μέτρησης που χρησιμοποιούνται είναι::

- Γερμανικοί Βαθμοί ($^{\circ}\text{d}$), $1^{\circ}\text{d} = 1 \text{ mg CaO} / 100\text{ml νερού}$.
- Γαλλικοί Βαθμοί ($^{\circ}\text{f}$), $1^{\circ}\text{f} = 1 \text{ mg CaCO}_3 / 100\text{ml νερού}$.
- Αμερικάνικοι Βαθμοί, $1 = 1 \text{ mg CaCO}_3 / \text{l νερού}$ (δηλαδή 1 ppm CaCO_3)

Ανάλογα με τις τιμές της σκληρότητας, το νερό χαρακτηρίζεται ως εξής:

Χαρακτηρισμός	Γερμανικοί Βαθμοί (°d)	Γαλλικοί Βαθμοί (°f)	Αμερικάνικοι Βαθμοί
Πολύ μαλακό	0 – 4	0 – 7	0 – 70
Μαλακό	4 – 8	7 – 15	70 – 150
Ημίσκληρο	8 – 12	15 – 25	150 – 250
Σχετικά σκληρό	12 – 18	25 – 32	250 – 320
Σκληρό	18 – 30	32 – 42	320 – 420
Πολύ σκληρό	>30	>42	>420

Ο προσδιορισμός των συγκέντρωσιν των ιόντων μαγνησίου και ασβεστίου θα πραγματοποιηθεί με την χρήση ατομικής απορρόφησης.

Στην ατομική φασματοσκοπία, μια ουσία που εισέρχεται σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας αποσυντίθεται στα συστατικά της άτομα. Κάθε στοιχείο, στην αέρια φάση είναι ικανό να απορροφά ή να εκπέμπει υπεριώδη ή ορατή ακτινοβολία σε χαρακτηριστικό μήκος κύματος.

Η ατομική φασματοσκοπία διακρίνεται σε τρεις κύριες κατηγορίες, ανάλογα με το τρόπο αλληλεπίδρασης με την ακτινοβολία:

1. Φασματοσκοπία Ατομικού Φθορισμού (AFS)
2. Φασματοσκοπία Ατομικής Εκπομπής (AES)
3. Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης (AAS)

1. Φασματοσκοπία Ατομικού Φθορισμού (AFS):

Τα άτομα διεγείρονται με τη βοήθεια ακτινοβολίας λέιζερ, μεταβαίνουν σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες και επανέρχονται στη θεμελιώδη κατάσταση εκπέμποντας φθορισμό.

2. Φασματοσκοπία Ατομικής Εκπομπής (AES):

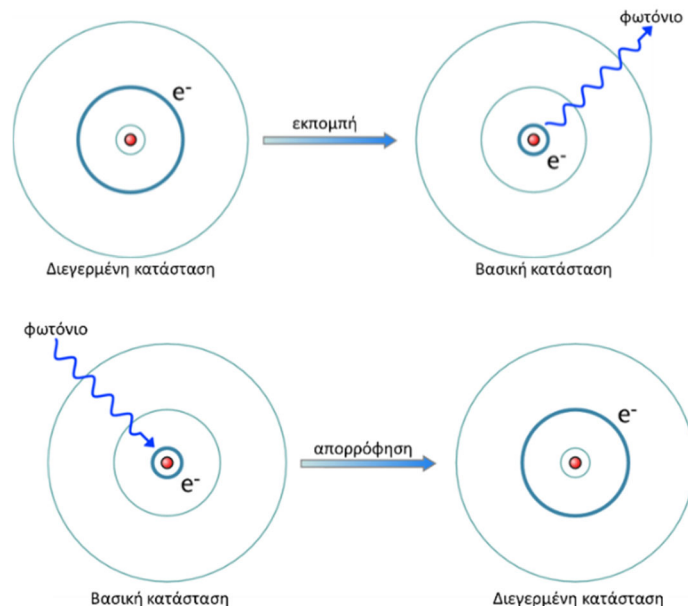
Τα άτομα που βρίσκονται ήδη σε διεγερμένη κατάσταση επανέρχονται στη θεμελιώδη εκλύοντας ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος, η οποία αντιστοιχεί σε καθορισμένες ηλεκτρονικές μεταπτώσεις.

3. Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης (AAS):

Η φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης ακτινοβολίας από άτομα που βρίσκονται στη **θεμελιώδη κατάσταση** τους. Η ακτινοβολία που χρησιμοποιείται έχει μήκος κύματος χαρακτηριστικό για κάθε στοιχείο και παράγεται από λυχνία κοίλης καθόδου που περιέχει το ίδιο στοιχείο με αυτό που πρόκειται να προσδιοριστεί. Η ένταση της απορρόφησης εξαρτάται από τον αριθμό των ατόμων εντός της δέσμης ακτινοβολίας.

Η υψηλή επιλεκτικότητα της AAS την καθιστά κατάλληλη για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, όπως:

- Περιβαλλοντική και γεωργική ανάλυση (π.χ. ανίχνευση βαρέων μετάλλων σε έδαφος και νερό).
- Έλεγχος ποιότητας τροφίμων.
- Ανάλυση φαρμακευτικών σκευασμάτων κ.ά.



Η παρούσα εργαστηριακή άσκηση εστιάζει στη χρήση της φασματοσκοπίας ατομικής απορρόφησης (AAS) για τον προσδιορισμό Mg^{2+} και Ca^{2+} σε δείγματα πόσιμου νερού.

Πλεονεκτήματα της μεθόδου:

- Κατάλληλη για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση περίπου 70 στοιχείων.
- Υψηλή ευαισθησία (ανιχνεύονται συγκεντρώσεις σε επίπεδα ppm ή ακόμα και ppb).
- Γρήγορη και σχετικά απλή στην εφαρμογή.

Μειονεκτήματα της μεθόδου:

- Καταστροφική τεχνική, καθώς το δείγμα καταναλώνεται κατά την ατομοποίηση.

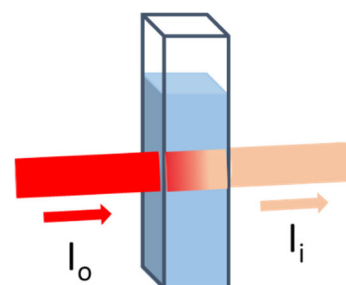
Η φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης είναι παρόμοια σε αρχή, με αυτή ενός φασματοφωτόμετρου υπεριώδους-ορατού, με κάποιες σημαντικές παραλλαγές. Και οι δύο τεχνικές βασίζονται στον νόμο του Beer-Lambert, στη φασματοσκοπία AA όμως τον ρόλο της κυψελίδας αναλαμβάνεται από το σύστημα ατομοποίησης, το οποίο δημιουργεί ελεύθερα άτομα από το δείγμα.

νόμος του Beer-Lambert:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Όπου:

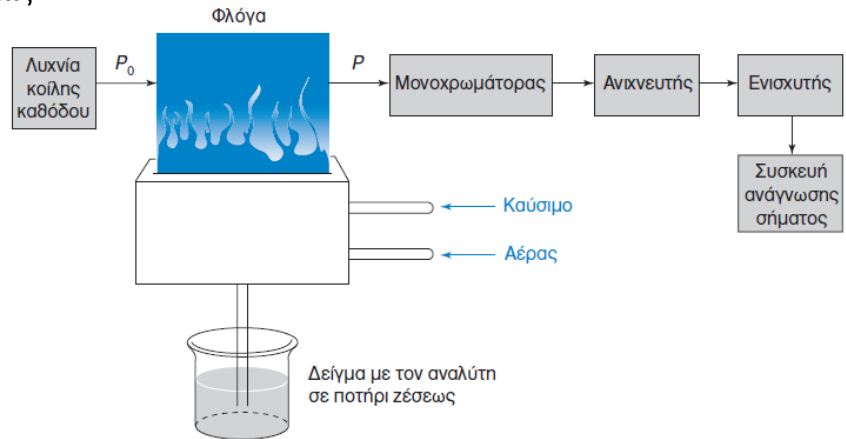
- **A:** απορρόφηση
- **ϵ :** συντελεστής μοριακής απορρόφησης ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
- **b:** πάχος της κυψελίδας (cm)
- **c:** συγκέντρωση του διαλύματος (M)



Οργανολογία

Η ατομική απορρόφηση αποτελείται από πέντε κυρίως μέρη:

1. Το σύστημα εκπομπής ακτινοβολίας
2. Το σύστημα ατομοποίησης
3. Το μονοχρωμάτορα
4. Τον ανιχνευτή
5. Το καταγραφικό



1) Σύστημα εκπομπής ακτινοβολίας

Δυο τύποι πηγής ακτινοβολίας χρησιμοποιούνται στη φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης:

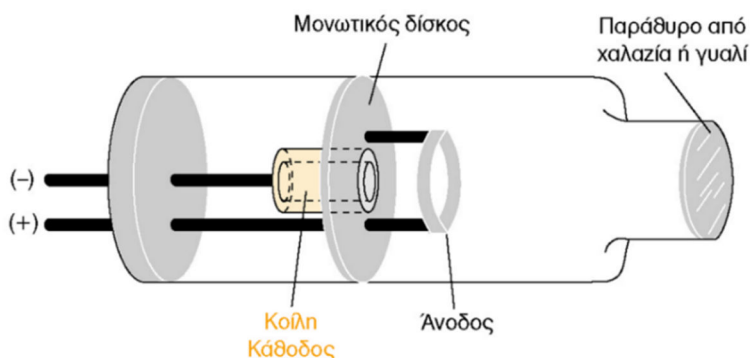
- A. Λυχνία κοίλης καθόδου (Hollow Cathode Lamp – HCL)
- B. Λυχνία εκκενώσεως χωρίς ηλεκτρόδια (Electrodeless Discharge Lamp – EDL)

A. Λυχνία κοίλης καθόδου (Hollow Cathode Lamp – HCL)

Η λυχνία κοίλης καθόδου αποτελεί τη συνηθέστερη πηγή ακτινοβολίας στη φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης. Αποτελείται από μία άνοδο βολφραμίου και μία κυλινδρική κάθοδο, οι οποίες είναι σφραγισμένες μέσα σε υάλινο σωλήνα που περιέχει αδρανές αέριο (συνήθως νέον ή αργό) σε πίεση 1 έως 5 torr.

Η κάθοδος κατασκευάζεται είτε από το μέταλλο που πρόκειται να προσδιοριστεί είτε επιστρώνεται με αυτό. Όταν εφαρμοστεί τάση περίπου 300 V μεταξύ ανόδου και καθόδου, το αέριο ιονίζεται και τα θετικά ιόντα επιταχύνονται προς την κάθοδο. Με επαρκή κινητική ενέργεια, τα ιόντα προσκρούουν στην επιφάνειά της, προκαλώντας εκτίναξη ατόμων του μεταλλικού υλικού στην αέρια φάση. Τα μεταλλικά άτομα διεγείρονται μέσω συγκρούσεων με ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας και καθώς επιστρέφουν στη θεμελιώδη κατάσταση, εκπέμπουν χαρακτηριστική ακτινοβολία του στοιχείου, η οποία χρησιμοποιείται για την ανάλυση. Η λυχνία λειτουργεί με σταθερό ρεύμα 2–30 mA και κατάλληλο δυναμικό, ώστε να εξασφαλίζεται σταθερή και επαναλήψιμη παραγωγή της ακτινοβολίας. Οι λυχνίες κοίλης καθόδου διακρίνονται σε:

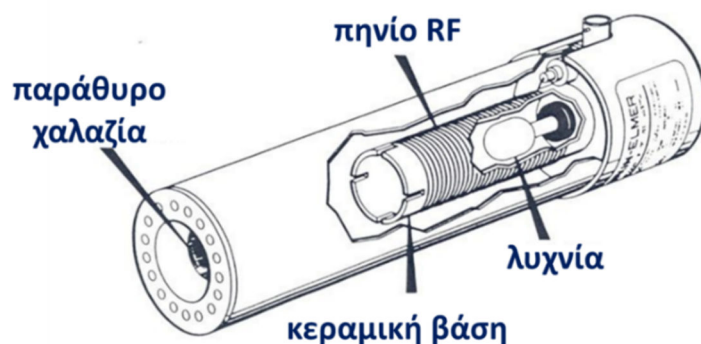
- **Μονοστοιχειακές**, όταν περιέχουν ένα μόνο μέταλλο.
- **Πολυστοιχειακές**, όταν περιέχουν περισσότερα μέταλλα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση διαφορετικών στοιχείων χωρίς αντικατάσταση της λυχνίας.



B. Λυχνία εκκενώσεως χωρίς ηλεκτρόδια (Electrodeless Discharge Lamp – EDL)

Οι λυχνίες EDL αποτελούνται από έναν μικρό, σφραγισμένο σωλήνα χαλαζία, ο οποίος περιέχει το προς ανάλυση μέταλλο ή άλας του, καθώς και αδρανές αέριο (συνήθως Ar) σε χαμηλή πίεση (μερικά mm Hg). Ο σωλήνας περιβάλλεται από πηνίο συνδεδεμένο με γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων (RF), η οποία προκαλεί ιονισμό του αργού. Τα θετικά ιόντα του Ar συγκρούονται με το μέταλλο, προκαλώντας εκτίναξη διεγερμένων ατόμων στην αέρια φάση, τα οποία στη συνέχεια εκπέμπουν ακτινοβολία χαρακτηριστικού μήκους κύματος για το συγκεκριμένο στοιχείο.

Οι EDL χρησιμοποιούνται κυρίως για στοιχεία που εξαχνώνονται εύκολα, όπως: Sb, As, Cd, Se, Te, Sn, Pb, Hg, κ.ά.



2) Σύστημα ατομοποίησης:

Για να είναι δυνατή η ανάλυση, τα στοιχεία πρέπει να βρίσκονται στην ατομική τους κατάσταση (φορτίο = 0). Το πρώτο βήμα, είναι η ατομοποίηση, δηλαδή η διαδικασία κατά την οποία το δείγμα εξαερώνεται και οι διαλυμένες ουσίες μετατρέπονται σε ελεύθερα άτομα.

Κατά την ατομοποίηση, τα άτομα απελευθερώνονται από σύμπλοκα ή μόρια μέσω υψηλής θερμοκρασίας. Το στάδιο αυτό είναι κρίσιμο για την ποιότητα της ανάλυσης, καθώς επηρεάζει άμεσα την ευαισθησία, την ακρίβεια (accuracy) και την επαναληψιμότητα (precision) της μεθόδου.

Κύριες μέθοδοι ατομοποίησης:

- A.** Φλόγα (Flame Atomization).
- B.** Ηλεκτροθερμική ατομοποίηση (Graphite Furnace).
- Γ.** Επαγωγικά Συζευγμένο Πλάσμα (Inductively Coupled Plasma – ICP).

Οι παραπάνω μέθοδοι διαφέρουν κυρίως ως προς τη θερμοκρασία ατομοποίησης και τον τύπο ενέργειας που χρησιμοποιούν.

A. Ατομοποίηση με Φλόγα – Καυστήρας

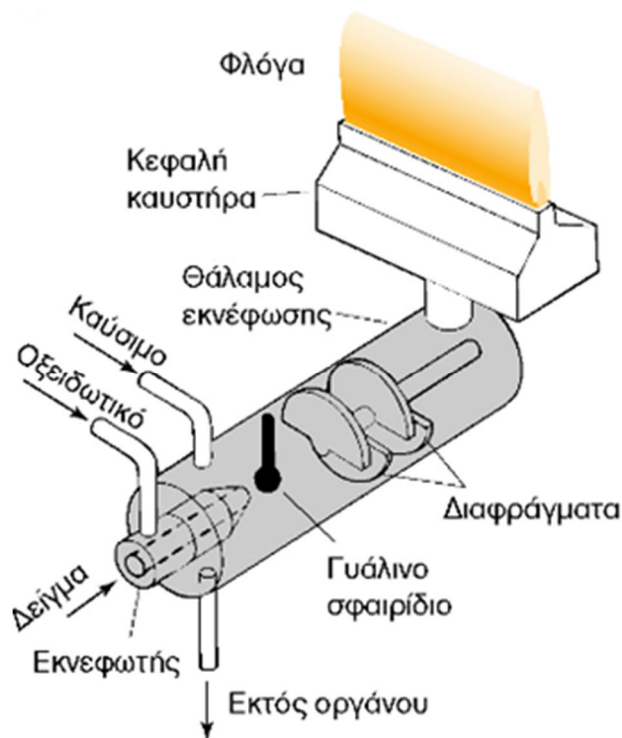
Το διάλυμα του δείγματος εισέρχεται στον καυστήρα μέσω εκνεφωτή και συστήματος προανάμιξης, όπου αναμειγνύεται με το καύσιμο και το οξειδωτικό αέριο. Ο εκνεφωτής λειτουργεί με τη ροή του οξειδωτικού (συνήθως αέρα ή N_2O), το οποίο ρέει παράλληλα με το δείγμα και το απορροφά μέσω τριχοειδούς σωλήνα.

Το υγρό διασπάται σε πολύ μικρά σταγονίδια, τα οποία προσπίπτουν σε ένα γυάλινο σφαιρίδιο, όπου διασπώνται περαιτέρω, η διαδικασία ονομάζεται εκνέφωση. Το προκύπτον αιώρημα σταγονιδίων μέσα σε αέριο ονομάζεται αερόλυμα.

Το αερόλυμα μαζί με τα αέρια καύσης διέρχεται από διαφράγματα, που συγκρατούν τις μεγαλύτερες σταγόνες. Τελικά, μόλις το μείγμα εισέλθει στη φλόγα, περιέχει το 5% περίπου του αρχικού δείγματος.

Μέσα στη φλόγα, το δείγμα υφίσταται διαδοχικά:

- **Εξάτμιση** του διαλύτη.
- **Εξάχνωση** της προσδιοριζόμενης ουσίας.
- **Διάσπαση** μορίων σε άτομα.
- **Διέγερση** ορισμένου ατόμων.



Πλεονεκτήματα:

- Ομοιογενής, ήρεμη φλόγα.
- Πολύ καλή επαναληψιμότητα.
- Μικρά σωματίδια.

Μειονεκτήματα:

- Μικρή ευαισθησία λόγω του ότι:
Α) Μικρή ποσότητα δείγματος φτάνει στη φλόγα.
Β) Μικρός χρόνος παραμονής των ατόμων στην οπτική διαδρομή.

Δύο είναι οι πιο συνηθισμένες τύποι φλόγας στην ΑΑ:

I. Φλόγα : Αέρα – Ακετυλενίου:

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη φλόγα.

Πλεονέκτημα: Απλή στη χρήση και οικονομική.

Μειονέκτημα: Δημιουργούνται **δύστηκτα οξείδια** για ορισμένα στοιχεία (π.χ. Mg, Ca, Sr, Ba, U), τα οποία δυσκολεύουν την ατομοποίηση.

II. Φλόγα : υποοξείδιο του αζώτου – Ακετυλενίου ($N_2O-C_2H_2$):

Πλεονέκτημα: Παρέχει υψηλότερη θερμοκρασία και αναγωγικό περιβάλλον, αποτρέποντας τον σχηματισμό οξειδίων.

Μειονέκτημα: Προκαλεί αυξημένο ιονισμό σε πολλά στοιχεία, γεγονός που μπορεί να μειώσει την ακρίβεια της μέτρησης αν δεν εφαρμοστούν διορθώσεις.

Διάφοροι Τύποι φλόγας σε $^{\circ}C$:

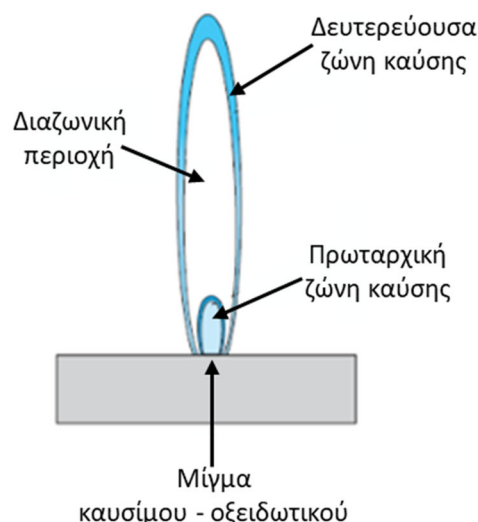
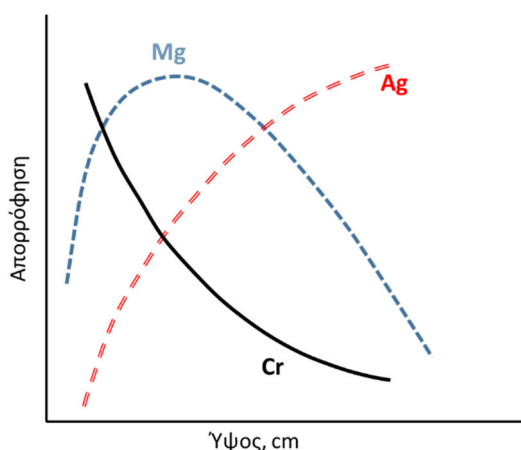
Καύσιμο \ Οξειδωτικό	Αέρας	N_2O	O_2
Προπάνιο	1950	2900	2800
Ακετυλένιο	2300	3000	3050

Δομή της φλόγας

Η φλόγα διακρίνεται σε τρεις χαρακτηριστικές περιοχές:

- Ζώνη πρωταρχικής καύσης.
- Διαζωνική περιοχή.
- Δευτερεύουσα ζώνη καύσης.

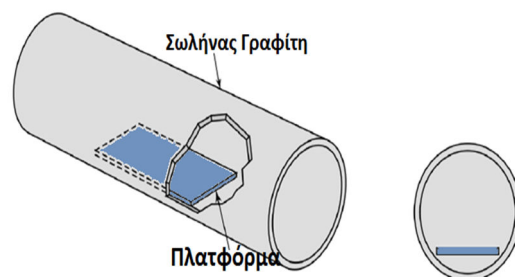
Το ύψος στη φλόγα στο οποίο παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση διαφέρει ανάλογα με το στοιχείο που αναλύεται, καθώς και με τις ροές του δείγματος, του καυσίμου και του οξειδωτικού. Για παράδειγμα το μαγνήσιο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφησης περίπου στο μέσο της φλόγας.



“Για το λόγο αυτό η ρύθμιση της κατακόρυφης θέσης της φλόγας σε σχέση με τη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα είναι κρίσιμη για την ακρίβεια της μέτρησης.”

Β. Ηλεκτροθερμική Ατομοποίηση – Φούρνος Γραφίτη

Ο θερμαινόμενος φούρνος γραφίτη αποτελεί μέθοδο υψηλής ευαισθησίας σε σύγκριση με τη φλόγα και απαιτεί μικρότερη ποσότητα δείγματος. Το δείγμα εισάγεται στον φούρνο μέσω ειδικής οπής, ενώ η ακτινοβολία της λυχνίας διέρχεται κάθετα μέσα από αυτόν. Ο φούρνος θερμαίνεται μέσω ηλεκτρικών αντιστάσεων έως και τους 3000 °C, προκαλώντας εξάτμιση και ατομοποίηση του δείγματος. Ο γραφίτης περιβάλλεται από αδρανές αέριο (συνήθως Ar) για την αποφυγή οξείδωσης και καύσης του υλικού.



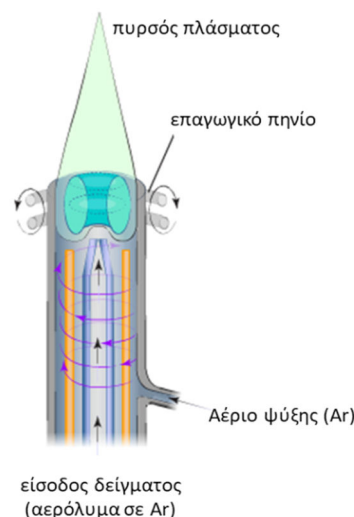
Γ. Επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP)

Το ICP είναι περίπου δύο φορές πιο θερμό από τη φλόγα καύσης. Η υψηλή θερμοκρασία, η σταθερότητα και η σχετικά αδρανής ατμόσφαιρα αργού (Ar) ελαχιστοποιούν τις χημικές και φασματικές παρεμβολές που παρατηρούνται στη φλόγα.

Πλεονεκτήματα της τεχνικής ICP:

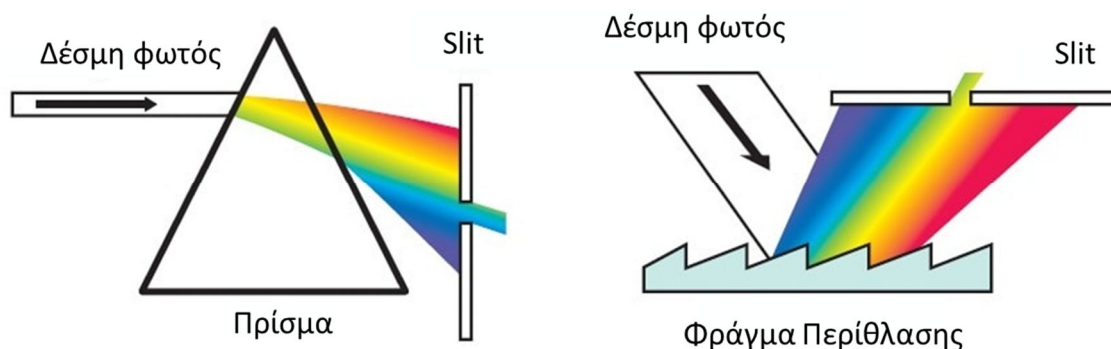
- Ταυτόχρονη ανάλυση πολλών στοιχείων.
- Υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία.
- Μειωμένες παρεμβολές.

Η μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως στην Ατομική Φασματοσκοπία Εκπομπής ICP-AES. Ωστόσο, τα όργανα ICP έχουν πολύ υψηλότερο κόστος (αγοράς και λειτουργίας) σε σχέση με τα συστήματα φλόγας.

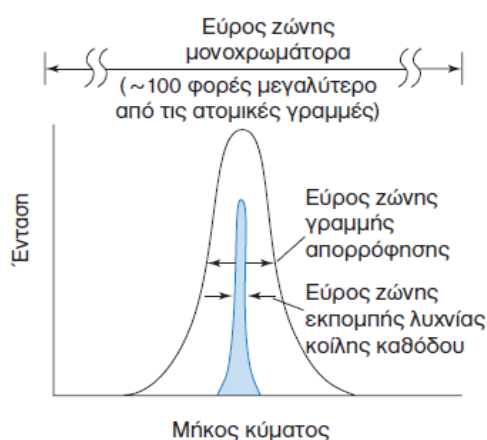


3) Μονοχρωμάτορας

Ο μονοχρωμάτορας τοποθετείται μετά τη φλόγα και πριν τον ανιχνευτή. Ο ρόλος του είναι η απομόνωση της επιθυμητής ακτινοβολίας, καθώς η φλόγα παράγει και ίδια εκπομπή φωτός, η οποία πρέπει να αφαιρεθεί από το τελικό σήμα. Ο μονοχρωμάτορας αποτελείται από πρίσμα ή φράγμα περίθλασης, επιτρέποντας τη διέλευση μόνο της επιλεγμένης ακτινοβολίας μήκους κύματος.

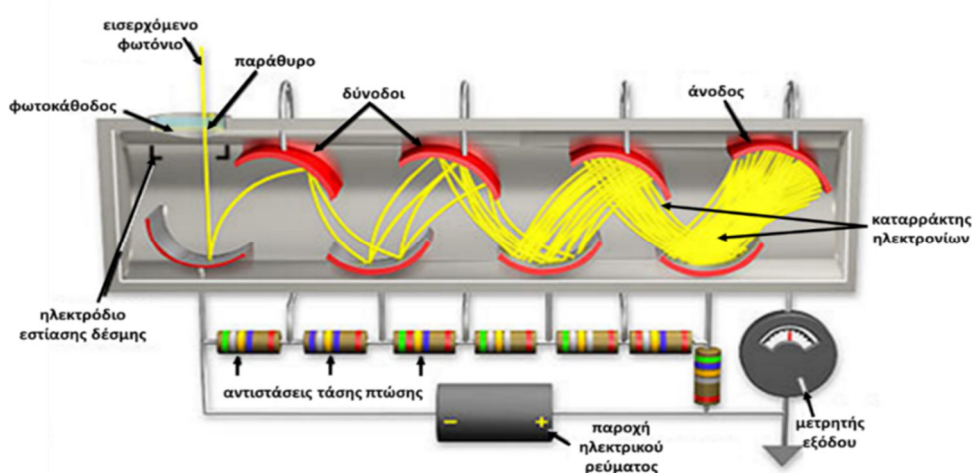


Το φάσμα ατομικής απορρόφησης έχει εξαιρετικά στενό εύρος ($\sim 0.005 \text{ nm}$), το φάσμα εκπομπής είναι ελαφρώς ευρύτερο, ενώ η τυπική ανάλυση του μονοχρωμάτορα είναι περίπου 0.5 nm . Ωστόσο, επειδή η λυχνία κοίλης καθόδου εκπέμπει εξαιρετικά στενού εύρους γραμμές, η χρήση μονοχρωμάτορα είναι δευτερεύουσας σημασίας στην Α.Α. σε σχέση με τα συμβατικά φασματοφωτόμετρα, όπου είναι απολύτως απαραίτητος.



4) Ανιχνευτής:

Στην Ατομική Φασματοσκοπία Απορρόφησης, ο ανιχνευτής είναι συνήθως φωτοπολλαπλασιαστής (photomultiplier tube). Μετατρέπει τη ροή φωτονίων σε ηλεκτρικούς παλμούς, οι οποίοι στη συνέχεια ενισχύονται από ένα ηλεκτρικό πεδίο. Καθώς τα ηλεκτρόνια προσκρούουν σε διαδοχικές επιφάνειες, προκαλούν εκπομπή άλλων ηλεκτρονίων, φτάνοντας σε λόγο ενίσχυσης έως και 10^6 ηλεκτρόνια ανά φωτόνιο. Το σήμα που παράγει ο ανιχνευτής ενισχύεται περαιτέρω από ηλεκτρονικό κύκλωμα ώστε να είναι δυνατή η καταγραφή του.



5) Καταγραφικό:

Συσκευή που καταγράφει το σήμα. Μπορεί να είναι απλή οθόνη πάνω στο όργανο, εκτυπωτής ή ηλεκτρονικός υπολογιστής με το κατάλληλο λογισμικό.

Παρεμποδίσεις στη Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης:

Όπως συμβαίνει με όλες τις αναλυτικές τεχνικές, έτσι και η Ατομική Απορρόφηση (Α.Α.) υπόκειται σε παρεμποδίσεις. Για τον λόγο αυτό η ανάλυση πρέπει να διεξάγεται υπό καλά ορισμένες και ελεγχόμενες συνθήκες.

Παρεμπόδιση ορίζεται ως κάθε επίδραση που μεταβάλλει το μετρούμενο σήμα χωρίς να μεταβάλλεται η συγκέντρωση του αναλύτη.

Οι παρεμποδίσεις μπορούν να διορθωθούν:

- είτε με απομάκρυνση της πηγής της παρεμπόδισης,
- είτε με χρήση προτύπων που υφίστανται την ίδια παρεμπόδιση με το δείγμα.

Οι παρεμποδίσεις διακρίνονται:

I. Φασματικές παρεμποδίσεις.

Οφείλονται στην επικάλυψη του σήματος του αναλύτη από:

- φασματικές γραμμές άλλων στοιχείων ή μοριακών ενώσεων του δείγματος
- εκπομπή από τη φλόγα ή τον φούρνο γραφίτη

II. Φυσικές παρεμποδίσεις.

Προέρχονται από φυσικές ιδιότητες του διαλύματος, όπως:

- ιξώδες
- πυκνότητα
- επιφανειακή τάση
- τάση ατμών

Οι ιδιότητες αυτές μπορούν να επηρεάσουν την ταχύτητα ροής ή την κατανομή του δείγματος στη φλόγα.

III. Ιονικές παρεμποδίσεις.

Οφείλονται στον ιονισμό των ατόμων, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο αριθμός των ατόμων στη βασική κατάσταση, δηλαδή των ατόμων που είναι διαθέσιμα για απορρόφηση ακτινοβολίας.

IV. Χημικές παρεμποδίσεις

Προκαλούνται από συστατικά του δείγματος που:

- σχηματίζουν σταθερές ενώσεις με τον αναλύτη (π.χ. οξείδια ή μη πτητικά σύμπλοκα)
- παρεμποδίζουν την αποτελεσματική ατομοποίησή του

Απορρόφηση υποβάθρου:

Κατά την ατομοποίηση στη φλόγα, εκτός από τον αναλύτη υπάρχουν και άλλα σωματίδια και μόρια, όπως:

- οξείδια μετάλλων
- ριζικά είδη (OH, H₂, κ.ά.)
- μόρια από τον διαλύτη

Τα παραπάνω απορροφούν ή και σκεδάζουν ακτινοβολία, συμβάλλοντας στη γενική απορρόφηση υποβάθρου. Το υπόβαθρο αυτό μπορεί να διορθωθεί με τη χρήση τυφλού διαλύματος, το οποίο περιέχει όλα τα συστατικά του δείγματος εκτός από τον αναλύτη.

Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια – Όργανα:

- Πρότυπα διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης των 100 ppm : Mg, Ca
- Σιφώνια
- Πιπέτες ακριβείας μεταβλητού όγκου
- Ογκομετρικές φιάλες
- Κωνικές φιάλες
- Ποτήρια ζέσεως

Παράμετροι - Οργάνου:

Ρυθμίσεις λειτουργίας	Mg	Ca
Τύπος μέτρησης	Απορρόφηση	Απορρόφηση
Θέση λάμπας	1	2
Ρεύμα ενεργοποίησης	4 mA	10 mA
Ρεύμα αναμονής	0	0
Διόρθωση D ₂	Όχι	Όχι
Αέρα φλόγας	Air - Acetylene	Air - Acetylene
Μήκος κύματος	202.6 nm	422.7 nm
Slit	1.0	0.5

Παράμετροι – Μεθόδου:

Ρυθμίσεις μέτρησης	Επιλογή
Next Sample	1
Batch number	1
Pre-read Delay	0
Read Time	5 sec
Replicate	3
Precision	Όχι

Η λειτουργία της ατομικής απορρόφησης γίνεται μόνο κατά τη διάρκεια των μετρήσεων για λόγους ασφαλείας, λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που αναπτύσσεται από τη φλόγα, καθώς και για να μην καταναλώνονται άσκοπα τα αέρια της καύσης.

**Ετοιμάζονται πρώτα όλα τα διαλύματα (πρότυπα - άγνωστα)
και στη συνέχεια ξεκινάει τη λειτουργία του οργάνου.**

1) Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων:

Παρασκευάζεται 5 πρότυπα διαλύματα που περιέχουν ποσότητες μαγνησίου και ασβεστίου, από αρχικά διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης (100 ppm), τα οποία δίνονται από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου. Οι συγκεντρώσεις σε Mg και Ca των πρότυπων διαλυμάτων που θα παρασκευάσετε δίνονται στο παρακάτω πίνακα:

No	Mg (ppm)	Ca (ppm)
1	0.2	0.4
2	0.5	0.8
3	0.8	1.6
4	1.3	2.4
5	2.0	3.2

Όλα τα διαλύματα παρασκευάζονται σε ογκομετρικές φιάλες των 100 ml. Υπολογίστε αρχικά την ποσότητα Mg που πρέπει να πάρετε από το αρχικό πρότυπο, στη συνέχεια υπολογίστε την αντίστοιχη ποσότητα του Ca και συμπληρώνετε με απιονισμένο νερό μέχρι τα 100 ml.

Παράδειγμα: το πρώτο πρότυπο, θα έχει 0.2 ppm Mg και 0.4 ppm Ca σε τελικό όγκο 100 ml.
Χρησιμοποιώντας το τύπο της αραιώσης:

$$C_1V_1 = C_0V_0$$

όπου:

- C_1 = τελική συγκέντρωση του Mg (0.2 ppm)
- V_1 = τελικός όγκος (100 ml)
- C_0 = η αρχική συγκέντρωση του Mg (100 ppm)
- V_0 = ζητούμενος όγκος,

Οπότε:

$$V_0 = \frac{0.2 * 100}{100} = 0.2 \text{ ml}$$

Με τον ίδιο τρόπο υπολογίζεται η ποσότητα του Ca (0.4 ml).

Έτσι πρέπει να πάρετε 0.2 ml από το αρχικό διάλυμα των 100 ppm του Mg και 0.4 ml από το αρχικό διάλυμα των 100 ppm του Ca, θα τα προσθέσετε στην ογκομετρική φιάλη των 100 ml και θα αραιώσετε στα 100 ml με απιονισμένο νερό.

2) Προετοιμασία άγνωστων δειγμάτων:

- α. Θα αναλύσετε δύο δείγματα πόσιμου νερού, διαφορετικών ετικετών.
- β. Θα αναλύσετε δύο δείγματα νερού δικτύου.
- γ. Θα αναλύσετε ένα δείγμα νερό από το δίκτυο του πανεπιστημίου.
- δ. Θα σας δοθεί άγνωστο δείγμα από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου, το οποίο θα αναλύσετε τρεις φορές (σε τρεις διαφορετικές αραιώσεις), ώστε να πραγματοποιήσετε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Οι συγκεντρώσεις των άγνωστων δειγμάτων πρέπει να είναι μέσα στα όρια των πρότυπων καμπύλων που θα δημιουργήσετε.

Για το μαγνήσιο: 0.2 – 2.0 ppm

Για το Ca μεταξύ 0.4 – 3.2 ppm.

Αν οι αναμενόμενες συγκεντρώσεις είναι διαφορετικές θα πρέπει να γίνουν οι ανάλογες:

- 1) Για τα νερά ετικετών, ελέγξτε τις συγκεντρώσεις που αναγράφονται στην ετικέτα και κάνετε την κατάλληλη αραιώση (συνήθως **1/10** ή **1/20**).
- 2) Για τα νερά δικτύων, αραιώση **1/10** ή **1/20**.
- 3) Για το νερό από το δίκτυο του πανεπιστημίου, αραιώση **1/20**.
- 4) Για το άγνωστο δείγμα, αραιώση **1/20**.

Όλες οι αραιώσεις γίνονται σε ογκομετρικές φιάλες των 100 ml με απιονισμένο νερό.

Σε όλα τα άγνωστα δείγματα θα μετρηθούν οι συγκεντρώσεις του Mg και του Ca.

Προσοχή:

- 1) Όλα τα διαλύματα πρότυπα και άγνωστα παρασκευάζονται με χρήση πιπετών ακριβείας μεταβλητού όγκου.
- 2) Πριν την μέτρηση, μεταφέρετε όλα τα πρότυπα διαλύματα καθώς και όλα τα άγνωστα δείγματα, από τις ογκομετρικές φιάλες σε κωνικές των 100 ml.

3) Προετοιμασία Ατομικής Απορρόφησης:

I. Ενεργοποίηση οργάνου

1. Ανοίξτε τον διακόπτη τροφοδοσίας.
2. Ενεργοποιήστε τον απορροφητήρα.
3. Ανοίξτε τις ροές των αερίων (αέρα και ακετυλένιο).



II. Επιλογή αντίστοιχη μεθόδου για κάθε στοιχείο

Από το μενού '**Load method**' στο πεδίο '**Use**' επιλέξτε τη σωστή μέθοδο.

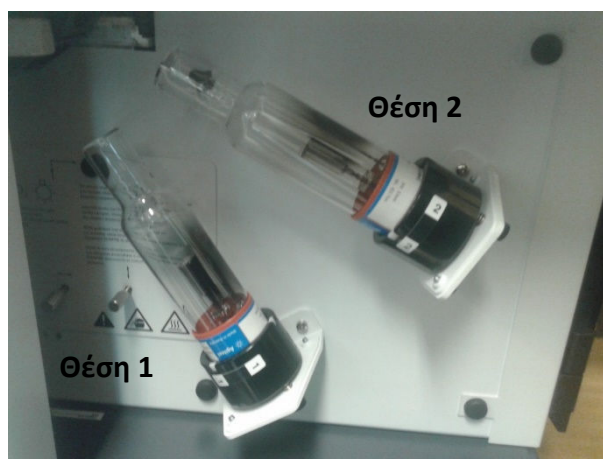
1. Οι ρυθμίσεις λειτουργίας ορίζονται στο μενού '**Instrument Parameters**':

• **Instrument mode:**

Επιλογή απορρόφηση ή εκπομπή (επιλέγεται απορρόφηση).

- **Active lamp:**

Ενεργοποίηση λάμπας (θέση 1 για τη λυχνία του Mg και θέση 2 για τη λυχνία του Ca).



- **Active current:**

Το ρεύμα της λάμπας για την ενεργοποίηση της,. Για το Mg συνιστάται 4 (με μέγιστο το 10) και για το Ca είναι 10 (με μέγιστο το 10).

- **Standby current:**

Το ρεύμα αναμονής για όταν η λυχνία είναι σε αναμονή (επιλογή 0).

- **D2 correction:**

Ενεργοποίηση ή απενεργοποίησης της διόρθωσης D₂ (δεν χρησιμοποιείται).

- **Gas type:**

Είδος αερίου που θα χρησιμοποιηθεί (επιλογή air- acetylene).

- **Wavelength:**

Μήκος κύματος λυχνίας, για το Mg: 202.6 nm, για το Ca: 422.7 nm

- **Slit:**

Φασματικό εύρος ζώνης του μονοχρωμάτορα, για το Mg: 1.0 nm, για το Ca: 0.5 nm.

- **Save method:**

Αποθήκευση μεθόδου.

2. Οι ρυθμίσεις της μέτρησης ορίζονται στο μενού '**Measurement Parameters**':

- **Next Sample:**

Ο αριθμός του δείγματος (επιλέγεται ο αριθμός 1).

- **Batch number:**

Ο αριθμός της πατρίδας (επιλέγεται ο αριθμός 1).

- **Pre-read Delay:**

Ο χρόνος λήψης δείγματος πριν ξεκινήσει η καταγραφή (χρησιμοποιείται κυρίως με autosampler). Επιλέγεται 0.

- **Read Time:**

Ο χρόνος μέτρησης του δείγματος (επιλέγονται 5 sec).

- **Replicate:**

Αριθμός επαναλήψεων ανά δείγμα, με τελικό αποτέλεσμα τον μέσο όρο (επιλέγονται 3 φορές).

- **Precision:**

Αντί για το μέσο όρο, εκτελεί συνεχείς μετρήσεις μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή ακρίβεια (%). Δεν χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη άσκηση.

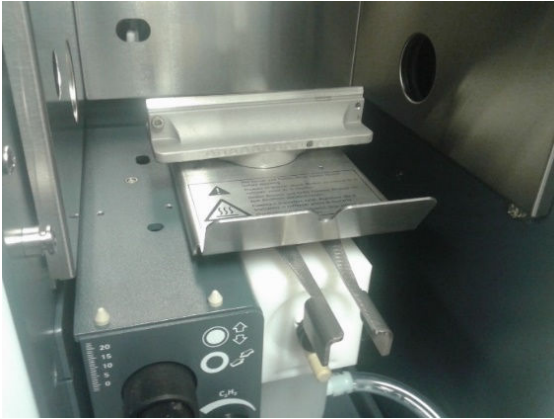
III. Βελτιστοποίηση συστήματος

Μεταβείτε στο μενού 'Optimization Page'.

A) Ευθυγράμμιση του καυστήρα

Χρησιμοποιήστε μία από τις ταινίες καθαρισμού και ευθυγράμμισης καυστήρα που παρέχονται από τον κατασκευαστή του οργάνου, για να εντοπίσετε τη διαδρομή φωτός.

1. Περιστρέψτε τον καυστήρα πιέζοντας τα δοντάκια της λαβής περιστροφής, μέχρι η σχισμή να είναι παράλληλη με τη διαδρομή του φωτός.



2. Ελέγξτε ότι η σχισμή του καυστήρα είναι παράλληλη με τη διαδρομή του φωτός, τοποθετώντας την κάρτα ελέγχου στα άκρα της σχισμής. Ρυθμίστε τη θέση με τα κουμπιά A (ύψος) και B (οριζόντια θέση) του καυστήρα.



Εξωτερικό κουμπί:

ρυθμίζει το ύψος του καυστήρα.

Εσωτερικό κουμπί:

ρυθμίζει την οριζόντια θέση του καυστήρα.

Τώρα μπορείτε να ανάψετε τη φλόγα και να βελτιστοποιήσετε το σήμα.

B) Για να ανάψει η φλόγα:

- Πατήστε το πλήκτρο <Flame on> και κρατήστε το πατημένο έως ότου να ανάψει η φλόγα.
- Αναρροφήστε 50 mL από τον κατάλληλο διαλύτη.
 - **Οξειδωτικό (Αέρας):**
Αριστερό ροόμετρο, η μπίλια στο ύψος της κόκκινης γραμμής.
 - **Καύσιμο (ακετυλένιο):**
Δεξιό ροόμετρο, η μπίλια στο 1.



Γ) Βελτιστοποίηση του σήματος

- Πατήστε το πλήκτρο <Optimize> και επιλέξτε την επιλογή 'Signal'.
- Αναρροφήστε τυφλό δείγμα και πατήστε μαζί τα πλήκτρα <Alt> και <Read> για να μηδενίσει το σήμα.
- Αναρροφήστε ένα πρότυπο διάλυμα που θα δώσει απορρόφηση τουλάχιστον 0.2
- Παρακολουθήστε τη μπάρα σήματος και ρυθμίστε το ύψος του καυστήρα χρησιμοποιώντας το εξωτερικό κουμπί (A) του ρυθμιστή καυστήρα, ώστε να επιτύχετε τη μέγιστη απορρόφηση (διατηρώντας όμως τον καυστήρα κάτω από τη διαδρομή της δέσμης του φωτός).
- Μετακινήστε οριζόντια το καυστήρα με το κουμπί (B) μέχρι να βελτιστοποιηθεί το σήμα.



IV. Βαθμονόμηση για το αντίστοιχο στοιχείο

- Από το μενού <Optimize> επιλέξτε την επιλογή 'Signal'.
- Αναρροφήστε τυφλό δείγμα και πατήστε μαζί τα πλήκτρα <Alt> και <Read> για να μηδενίσει το σήμα.
- Πηγαίνετε στο μενού 'Parameters Calibration':

- **Standard Conc. 0** (μέτρηση τυφλού).

Μέτρηση του τυφλού δείγματος, με προκαθορισμένη τιμή μηδέν (δεν αλλάζει).

- **Standards 1...5** (Πρότυπα 1 ... 5).

- 1) Εισάγετε την τιμή συγκέντρωσης και πατάτε <enter>.
- 2) Επιλέξτε ξανά το πρότυπο και πατάτε <Read> για μέτρηση.
- 3) Αν το αποτέλεσμα δεν είναι το επιθυμητό, πατήστε ξανά <Read> για επιπλέον μέτρηση.

V. Μέτρηση δειγμάτων:

Οι παράμετροι μέτρησης έχουν ρυθμιστεί το μενού 'Measurement Parameters' .

- Πατήστε το πλήκτρο <Read>.
- Τοποθετήσετε το κατάλληλο δείγμα και πατήστε το πλήκτρο <Read> για μέτρηση.
- Αν το αποτέλεσμα δεν είναι το επιθυμητό, πατήστε ξανά <Read> για επιπλέον μέτρηση.
- Επαναλάβετε τη διαδικασία για όλα τα δείγματα. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται σε μορφή πίνακα. Η στήλη 'mean' δείχνει τη μέση τιμή κάθε δείγματος.

1) Φορτώνετε τη μέθοδο για την ανάλυση του Mg.

2) Αναλύεται όλα τα δείγματα για το Mg:

- a. **Τοποθετήστε απιονισμένο νερό για καθαρισμό του καυστήρα.**
- b. Μετρήστε τα πρότυπα από το πιο αραιό στο πιο πυκνό
(χωρίς ενδιάμεσο καθαρισμό με απιονισμένο νερό).
- c. **Τοποθετήστε απιονισμένο νερό για καθαρισμό του καυστήρα.**
- d. Μετρήστε διαδοχικά τα τρία άγνωστα δείγματα
(χωρίς ενδιάμεσο καθαρισμό με απιονισμένο νερό).
- e. **Τοποθετήστε απιονισμένο νερό για καθαρισμό του καυστήρα.**
- f. Μετρήστε τα δείγματα πόσιμου νερού,
(εδώ απαιτείται καθαρισμός με απιονισμένο νερό μεταξύ κάθε δείγματος).
- g. **Τοποθετήστε απιονισμένο νερό για καθαρισμό του καυστήρα.**
- h. Μετρήστε το δείγμα από το νερό του δικτύου του Πανεπιστημίου.
- i. **Τοποθετήστε απιονισμένο νερό για καθαρισμό του καυστήρα.**

3) Φορτώνετε τη μέθοδο για την ανάλυση του Ca.

4) Αναλύεται όλα τα δείγματα για το Ca με την ίδια σειρά και διαδικασία όπως στο Mg.

5) Κλείστε τη φλόγα.

6) Κλείστε τις παροχές αερίων.

7) Απενεργοποιήστε το όργανο.

Αποτελέσματα και ανάλυση

A. Δημιουργία πρότυπων καμπύλων για το Mg και για το Ca:

Από τις μετρήσεις των απορροφήσεων των πρότυπων δειγμάτων για το Mg και το Ca, θα προκύψουν δύο πίνακες με τιμές.

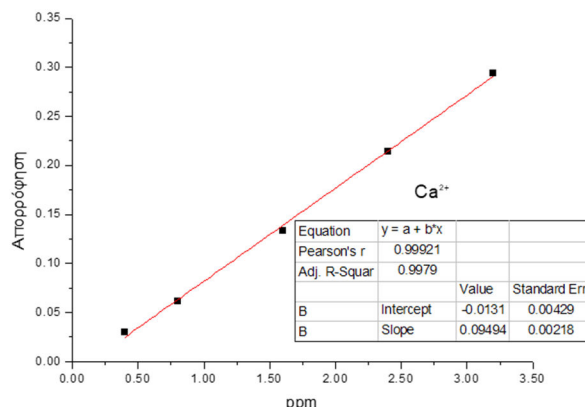
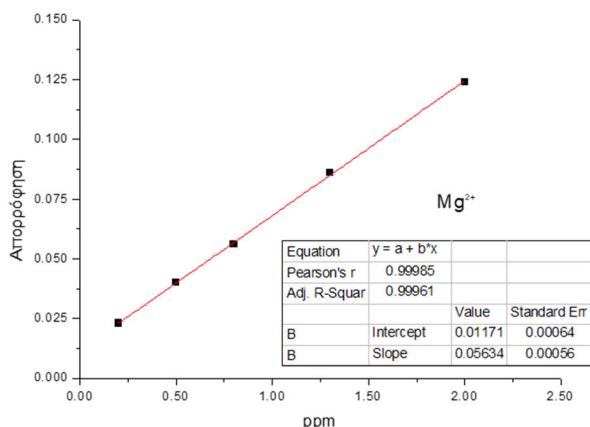
Παράδειγμα:

Πρότυπο Mg	Συγκέντρωση (ppm)	Απορρόφηση
1	0.2	0.023
2	0.5	0.040
3	0.8	0.056
4	1.3	0.086
5	2.0	0.124

Πρότυπο Ca	Συγκέντρωση (ppm)	Απορρόφηση
1	0.4	0.030
2	0.8	0.061
3	1.6	0.133
4	2.4	0.214
5	3.2	0.294

Με τα δεδομένα αυτά και με τη χρήση ενός υπολογιστικού προγράμματος (π.χ. excel ή Origin) κατασκευάζετε διαγράμματα με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων δημιουργώντας έτσι δύο ξεχωριστές καμπύλες αναφοράς, μία για το Mg και μία για το Ca.

Στον άξονα των Y τοποθετούνται οι τιμές της απορρόφησης και στον άξονα του X οι συγκεντρώσεις σε ppm. Έτσι στο παράδειγμα θα έχετε:



Πρότυπες καμπύλες αναφοράς για το μαγνήσιο και το ασβέστιο

B. Υπολογισμός ορίων ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ):

Από την καμπύλη αναφοράς του κάθε ιόν θα υπολογίζονται τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ξεχωριστά.

Παράδειγμα: Για το ιόν του Mg, από την καμπύλη βαθμονόμησης προκύπτει:

Η κλίση της ευθείας είναι $m = 0.05634$ και η τυπική απόκλιση της κλίσης $S = 0.00056$

- το όριο ανίχνευσης είναι $LOD = \frac{3 \cdot S}{m} = \frac{3 \cdot 0.00056}{0.05634} = 0.029819 \sim 0.030 \text{ ppm}$
- το όριο ποσοτικοποίησης είναι $LOQ = \frac{10 \cdot S}{m} = \frac{10 \cdot 0.00056}{0.05634} = 0.099397 \sim 0.099 \text{ ppm}$

Για το ιόν του Ca από την καμπύλη βαθμονόμησης προκύπτει:

Η κλίση της ευθείας είναι $m = 0.09494$ και η τυπική απόκλιση της κλίσης $S = 0.00218$

- το όριο ανίχνευσης είναι $LOD = \frac{3 \cdot S}{m} = \frac{3 \cdot 0.00218}{0.09494} = 0.068886 \sim 0.069 \text{ ppm}$
- το όριο ποσοτικοποίησης είναι $LOQ = \frac{10 \cdot S}{m} = \frac{10 \cdot 0.00218}{0.09494} = 0.229619 \sim 0.230 \text{ ppm}$

Ιόν	LOD	LOQ
Mg^{2+}	0.030	0.099
Ca^{2+}	0.069	0.230

Γ. Υπολογισμός αγνώστων δειγμάτων:

- Με τη χρήση των πρότυπων καμπυλών προσδιορίζετε την ποσότητα Mg και Ca σε όλα τα δείγματα που αναλύσατε (πόσιμα νερά, νερό από το δίκτυο του Πανεπιστημίου και άγνωστα δείγματα), κάνοντας αναγωγή στην αρχική συγκέντρωση.
- Να υπολογίσετε τη σκληρότητα των πόσιμων νερών και τα κατατάσσετε στην αντίστοιχη κατηγορία.
- Στο άγνωστο δείγμα, αφού υπολογίσετε τις τρεις μετρήσεις συγκέντρωσης, να πραγματοποιήσετε στατιστική ανάλυση υπολογίζοντας τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση.
- Να συγκρίνετε και να σχολιάσετε τις τιμές των εμφιαλωμένων νερών με εκείνες που αναγράφονται στις ετικέτες τους.
- Να σχολιάσετε τις συγκεντρώσεις Mg και Ca στο νερό του δικτύου του Πανεπιστημίου, συγκρίνοντας με τις τιμές των πόσιμων νερών.

Παράδειγμα: Έστω ότι τα νερά που αναλύσατε είναι από τις ετικέτες, Ζαρός και Ρούβας και ότι σε όλα τα δείγματα (πόσιμα, νερό Πανεπιστημίου και άγνωστο) έχει γίνει αραίωση 1/20.

Οι μετρήσεις τις απορροφήσεις σε Mg και Ca θα είναι:

Διάλυμα (αραίωση 1/20)	Απορρόφηση Mg	Απορρόφηση Ca
Εμφιαλωμένο 1	0.048	0.095
Εμφιαλωμένο 2	0.047	0.091
Δίκτυο 1	0.051	0.134
Δίκτυο 2	0.049	0.115
Δίκτυο Πανεπιστημίου	0.064	0.163
Άγνωστο 1	0.068	0.097
Άγνωστο 2	0.070	0.094
Άγνωστο 3	0.073	0.096



Με τη χρήση της καμπύλης αναφοράς:

- $Mg: Y = 0.05634 \cdot X + 0.01171$
- $Ca: Y = 0.09494 \cdot X - 0.01310$

Υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις τους στα άγνωστα δείγματα, **ελέγχεται αν είναι εντός των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης** και γίνονται οι απαραίτητες αναγωγές λόγω της αρχικής αραίωσης.

Έτσι τα πόσιμα νερά και το νερό από το δίκτυο του Πανεπιστημίου θα έχουν:

Άγνωστο Διάλυμα	Συγκέντρωση Mg (ppm)	Συγκέντρωση Ca (ppm)
Εμφιαλωμένο 1	12.9	22.8
Εμφιαλωμένο 2	12.5	21.9
Δίκτυο 1	13.9	31.0
Δίκτυο 2	13.2	27.0
Δίκτυο Πανεπιστημίου	18.6	37.1

Από τις τιμές αυτές, υπολογίζεται η σκληρότητα των πόσιμων νερών σε αμερικάνικους βαθμούς και κατατάσσετε στην αντίστοιχη κατηγορία.

Για το νερό από το δίκτυο του Πανεπιστημίου οι συγκεντρώσεις των ιόντων Mg και Ca είναι 18.6 και 37.1 ppm αντίστοιχα , οπότε η σκληρότητα θα είναι 169.1 ppm ισοδύναμο CaCO_3 κατατάσσοντας το στην κατηγορία των ημίσκληρων νερών.

Υπολογίζοντας και για τα υπόλοιπα δείγματα θα είναι:

Άγνωστο Διάλυμα	Σκλήροτητα	Κατηγορία
Εμφιαλωμένο 1	109.9	Μαλακό
Εμφιαλωμένο 2	106.3	Μαλακό
Δίκτυο 1	134.8	Μαλακό
Δίκτυο 2	121.9	Μαλακό
Δίκτυο Πανεπιστημίου	169.1	Ημίσκληρο

Για το εμφιαλωμένο 1 θα έχει σκληρότητα 110.1 ppm και κατατάσσεται στα μαλακά νερά, το εμφιαλωμένο 2 106.2 οπότε και αυτό στα μαλακά νερά και τα νερά δικτύου 1 και 2 με τιμές 134.6 και 133.7 αντίστοιχα θα κατατάσσονται και αυτά στα μαλακά νερά.

Οι συγκεντρώσεις των ιόντων μαγνησίου και ασβεστίου στου άγνωστο δείγμα θα είναι::

Άγνωστο Διάλυμα	Συγκέντρωση Mg (ppm)	Συγκέντρωση Ca (ppm)
1	20.0	23.2
2	20.7	22.6
3	21.8	23.0

Η μέση τιμή και η τυπική του απόκλιση του αγνώστου δείγματος είναι:

Συγκέντρωση (ppm)	Mg	Ca
Μέση τιμή	20.8	22.9
Τυπική απόκλιση	0.9	0.3

Βίντεο:

Αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας παρουσιάζεται στο βίντεο της άσκησης στη ιστοσελίδα του μαθήματος στο e-class καθώς και στο κανάλι του εργαστηρίου στο youtube:



Εργ. Αναλυτικής II:



<https://www.chemistry.uoc.gr/eclass/modules/document/?course=CHEM-UNDER115>

Youtube:



<https://www.youtube.com/channel/UCrrDdUXUiTxyhezA140Rlew>

Ερωτήσεις Κατανόησης:

1. Σε ένα φασματοφωτόμετρο UV-VIS, ο μονοχρωμάτορας βρίσκεται πριν από την κυψελίδα του δείγματος ενώ στην ατομική απορρόφηση ο μονοχρωμάτορας βρίσκεται μετά τη φλόγα, δηλαδή μετά την «κυψελίδα». Για ποιο λόγο γίνεται αυτή η διάταξη;
2. Για ποιο λόγο δεν υπάρχει μονοχρωμάτορας πριν από τη φλόγα;
3. Αν αντικατασταθεί η κεφαλή του καυστήρα της φλόγα με μία άλλη που έχει το 1/5 του μήκους της θα μεταβληθεί η απορρόφηση του δείγματος; Εξηγήστε τον λόγο;
4. Όταν θέλετε να μετρήσετε δείγματα μαγνησίου (Mg), από ποιο στοιχείο αποτελείται η λάμπα κοίλης καθόδου και για ποιο λόγο;
5. Η καμπύλη αναφοράς για το μαγνήσιο (Mg) είναι: $Y = 0.05634 \cdot X + 0.01171$, όπου Y η απορρόφηση και X η συγκέντρωση σε ppm. Σε άγνωστο δείγμα, το οποίο αραιώθηκε αρχικά 1/25, η απορρόφηση που μετρήσατε ήταν 0.085. Πόση είναι η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος σε ppm;

Άσκηση – Προσδιορισμός συγκέντρωσης Φωσφόρου σε ποτά Κόλας

Σκοπός της άσκησης είναι:

Ο προσδιορισμός της ποσότητας φωσφόρου σε ποτά τύπου κόλας με τη μέθοδο «μπλε του μολυβδαινίου» και την εξοικειώσει των φοιτητών με τη χρήση φασματοφωτομέτρων.



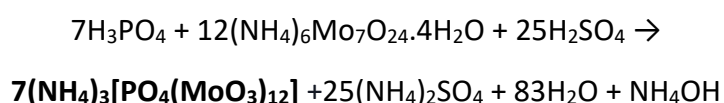
Το φωσφορικό οξύ χρησιμοποιείται στα αναψυκτικά ως πρόσθετο, στο οποίο οφείλεται η όξινη γεύση τους. Παράλληλα, παρουσιάζει και αντιεμετική δράση. Τα αναψυκτικά περιέχουν μεγάλες ποσότητες γλυκαντικών ουσιών, η πρόσληψη των οποίων μπορεί να προκαλέσει τάση για εμετό, το φωσφορικό οξύ αποτρέπει αυτή τη διαδικασία. Ωστόσο, η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων φωσφορικού οξέος μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες καταστάσεις, όπως φθορά των δοντιών, αλλά και διαταραχές στον μεταβολισμό του Ca, καθώς εμποδίζει τη δέσμευση του από τον οργανισμό. Αυτό είναι επικίνδυνο για την υγεία, ειδικά για τα παιδιά και εγκύους, οι οποίοι χρειάζονται υψηλή πρόσληψη ασβεστίου.

Μέθοδος προσδιορισμού

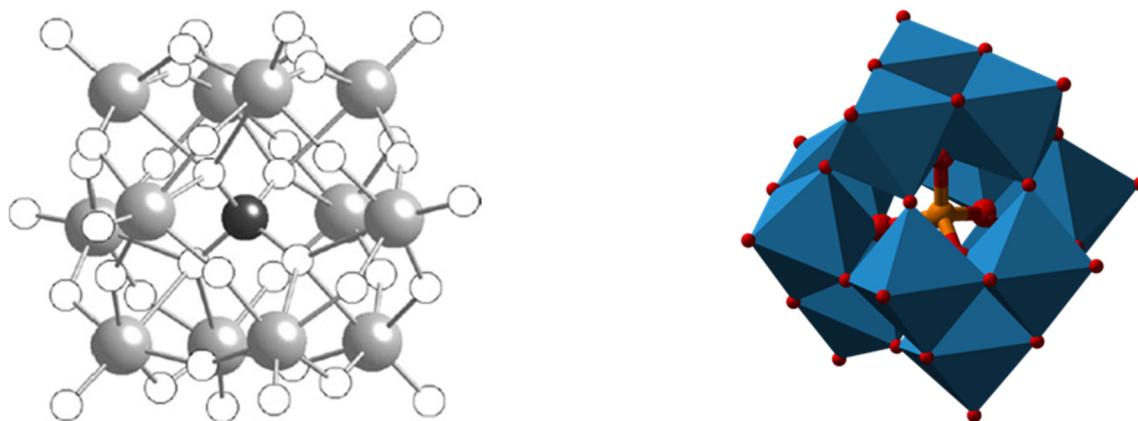
Η μέθοδος στηρίζεται στο σχηματισμό ενός συμπλόκου του φωσφορικού ιόντος με μια ένωση του μολυβδαινίου, το οποίο έχει χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Για το λόγο αυτό ονομάζεται «μπλε του μολυβδαινίου».

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε δύο στάδια:

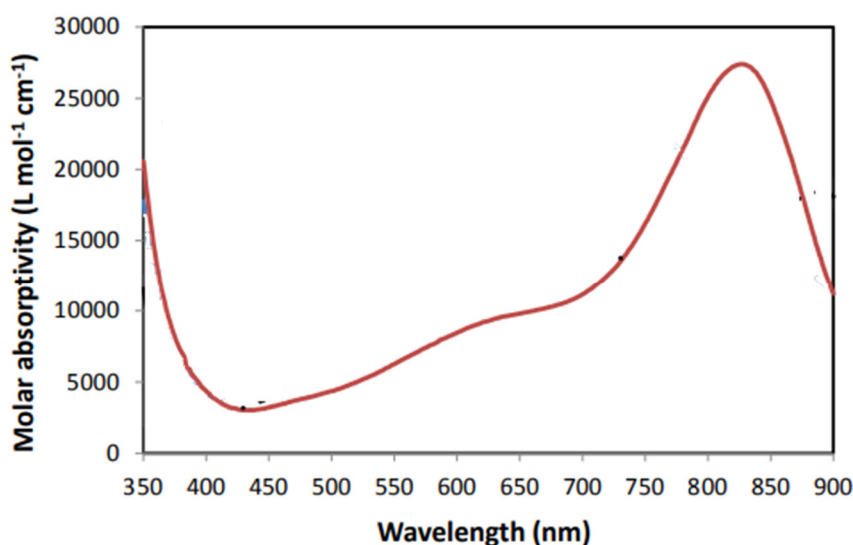
1. Αρχικά, το φωσφορικό ιόν αντιδρά με το τετραένυδρο μολυβδαινικό αμμώνιο σε όξινο περιβάλλον και σχηματίζει φωσφορομολυβδαινικό αμμώνιο, ένα άχρωμο εξασθενές φωσφορικό σύμπλοκο του μολυβδαινίου $[(\text{PO}_4\text{Mo}_{12}\text{O}_{36})^{3-}]$.



Το σύμπλοκο έχει τη δομή ιόντος Keggin:



2. Στη συνέχεια παρουσίασας ασκορβικού οξέος, το οποίο χρησιμοποιείται ως **αναγωγικό** μέσο, μετατρέπεται σε σύμπλοκο ετεροπολυμολυβδαινίου ($\text{PO}_4\text{Mo}_4^{\text{V}}\text{Mo}_8^{\text{VI}}\text{O}_{36}$)⁷⁻. Η πεντασθενής μορφή του έχει μπλε–πορφυρό χρώμα γνωστό ως «μπλε του μολυβδαινίου» και παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 830 nm, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα. Η ένταση του μπλε χρώματος εξαρτάται από τη ποσότητα του συμπλόκου και κατ' επέκταση, από την αρχική ποσότητα του φωσφορικού οξέος. Η θέρμανση είναι παράγοντας που επιταχύνει το δεύτερο στάδιο.



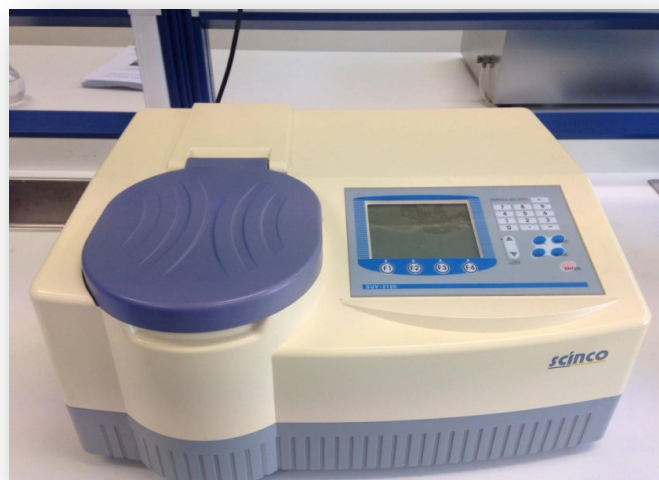
Ένταση της απορρόφησης του συμπλόκου ως προς το μήκος κύματος, με αναγωγικό το ασκορβικό οξύ.

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τη μέτρηση φωσφορικών σε διάφορα διαλύματα, όχι μόνο σε αναψυκτικά. Ενδείκνυται επίσης για τον προσδιορισμό φωσφορικών σε δείγματα πόσιμου και θαλάσσιου νερού, καθώς και σε άλλα περιβαλλοντικά δείγματα. Υπάρχουν πολλές παραλλαγές της, κυρίως ως προς το αναγωγικό μέσο που χρησιμοποιείται.



Οργανολογία

Για τις μετρήσεις της απορρόφησης χρησιμοποιείται ένα φασματοφωτόμετρο UV-VIS, μονής δέσμης, πολλαπλών θέσεων.



Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια – Όργανα:

- Πρότυπο διάλυμα P_2O_5 των 100 ppm
- Ammonium molybdate tetrahydrate - $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$
- Ascorbic acid - $C_6H_8O_6$
- π. H_2SO_4
- Αναψυκτικό τύπου cola
- Ογκομετρικές φιάλες
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Ποτήρια ζέσεως
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Πιπέτες ακριβείας μεταβλητού όγκου
- Κυψελίδες από πολυστυρένιο
- Συσκευή Shaker (μπαλαρίνα)
- Υδατόλουτρο
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατού (UV-VIS)
(μονής δέσμης πολλαπλών θέσεων)

Παράμετροι - οργάνου:

- Μήκος κύματος φασματοφωτόμετρου: 830 nm
- Θερμοκρασία υδατόλουτρου: 50°C

1. Πρότυπο διάλυμα:

Παρασκευάζονται 50 ml πρότυπου διαλύματος P_2O_5 συγκέντρωσης 4 ppm από αρχικό πρότυπο διάλυμα των 100 ppm.

Υπολογίστε τον όγκο που πρέπει να πάρετε από το αρχικό πρότυπο διάλυμα για να πραγματοποιήσετε την αραιώση.

Το αρχικό πρότυπο παρασκευάζεται διαλύοντας 0.1941 g ξηρού KH_2PO_4 σε 1 lt απιονισμένου νερού και εκφράζεται σε ppm P_2O_5 . Το αρχικό πρότυπο σας δίνεται από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.

2. Άγνωστο δείγμα (διάλυμα τύπου Cola):

Ως άγνωστο δείγμα θα είναι ένα δείγμα αναψυκτικού τύπου Cola. Πριν την ανάλυση, το δείγμα πρέπει να παραμείνει σε ατμοσφαιρική πίεση τουλάχιστον για 24 ώρες ώστε να απομακρυνθεί το CO_2 . Στη συνέχεια, αραιώνεται σε νερό σε αναλογία 1/20 και τελικό όγκο 50 ml.

Υπολογίστε τον όγκο που πρέπει να πάρετε από το αναψυκτικό για να πραγματοποιήσετε την αραιώση.

3. Αναγωγικό μέσο:

Αρχικά παρασκευάζονται τα εξής τρία διαλύματα:

- A. **Ammonium molybdate:** Διάλυση 0.500 g ammonium molybdate tetrahydrate σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml, με απιονισμένο νερό.
- B. **Διάλυμα ασκορβικού οξέος:** Διάλυση 0.440 g ασκορβικού οξέος σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml, με απιονισμένο νερό.
- Γ. **Διάλυμα H_2SO_4 :** Αραιώση 17 ml πυκνού θεικού οξέος σε ογκομετρική φιάλη των 200 ml, με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αυτό σας δίνεται από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.

Στη συνέχεια παίρνετε με ακρίβεια ογκομετρικού κυλίνδρου:

- 7.8 ml από το διάλυμα A
- 12.0 ml από το διάλυμα B
- 25.0 ml από το διάλυμα Γ (στον απαγωγό)
- και συμπληρώνετε σε όγκο 50 ml σε ογκομετρική φιάλη, με απιονισμένο νερό.

Το μίγμα αυτό αποτελεί το αναγωγικό μέσο.

Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, το μπλε σύμπλοκο δημιουργείται σε δύο στάδια.

- Κατά το **πρώτο στάδιο**, το μολυβδαίνιο σε όξινες συνθήκες (διαλύματα A και Γ) αντιδρά με το φωσφορικό ιόν και σχηματίζεται το αρχικό άχρωμο σύμπλοκο του εξασθενούς μολυβδαινίου.
- Στο **δεύτερο στάδιο**, παρουσία του αναγωγικού μέσου (διάλυμα B) και με την βοήθεια θέρμανσης, δημιουργείται το σύμπλοκο με τη πεντασθενή μορφή του μολυβδαινίου, το οποίο έχει χαρακτηριστικό **μπλε-πορφυρό χρώμα**.

Στην συγκεκριμένη άσκηση, τα αντιδραστήρια προστίθενται όλα μαζί (περιέχονται στο αναγωγικό μίγμα) και θερμαίνονται ταυτόχρονα, οπότε τα δύο στάδια λαμβάνουν χώρα διαδοχικά, χωρίς διακοπή.

4. Προετοιμασία δειγμάτων:

Ως άγνωστο δείγμα χρησιμοποιείται το αραιωμένο αναψυκτικό τύπου cola που παρασκευάστηκε προηγουμένως. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης φωσφόρου θα γίνει με την μέθοδο της προσθήκης γνωστής ποσότητας προτύπου.

Οι αραιώσεις πραγματοποιούνται απευθείας σε δοκιμαστικούς σωλήνες, χρησιμοποιώντας πιπέτες ακριβείας μεταβλητού όγκου.

Αρχικά, σε όλα τα δείγματα (εκτός από το τυφλό) προσθέτετε την ίδια ποσότητα από το αραιωμένο αναψυκτικό (0.25 ml) και στη συνέχεια την αντίστοιχη ποσότητα από το πρότυπο διάλυμα, ξεκινώντας από 0.0 ml από το 1^ο δείγμα και αυξάνοντας κατά 0.5 ml σε κάθε επόμενο, έως τα 2.0 ml στο 5^ο δείγμα. Σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες (δείγματα και τυφλό) προστίθεται 2.0 ml από το αναγωγικό μίγμα και συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 5.0 ml, υπολογίζοντας κάθε φορά την απαιτούμενη ποσότητα.

Θα παρασκευαστούν τρεις σειρές διαλυμάτων ($A_1 \dots A_5$, $B_1 \dots B_5$, $\Gamma_1 \dots \Gamma_5$), ώστε στο άγνωστο δείγμα να υπολογιστεί η συγκέντρωση του φωσφόρου τρεις φορές ανεξάρτητα, δίνοντας τρία αποτελέσματα, από τα οποία θα υπολογιστούν η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση.

Όγκος (ml)	Άγνωστο	Πρότυπο διάλυμα	Αναγωγικό μίγμα	Απιονισμένο νερό
Τυφλό	0.0	0.0	2.0	3.0
A_1, B_1, Γ_1	0.25	0.0	2.0	2.75
A_2, B_2, Γ_2	0.25	0.5	2.0	2.25
A_3, B_3, Γ_3	0.25	1.0	2.0	1.75
A_4, B_4, Γ_4	0.25	1.5	2.0	1.25
A_5, B_5, Γ_5	0.25	2.0	2.0	0.75

Στο τυφλό (blank) δείγμα δεν προστίθεται ούτε αραιωμένο αναψυκτικό ούτε πρότυπο διάλυμα, αλλά μόνο τα 2.0 ml από το αναγωγικό μίγμα και το απαιτούμενο με απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 5.0 ml.

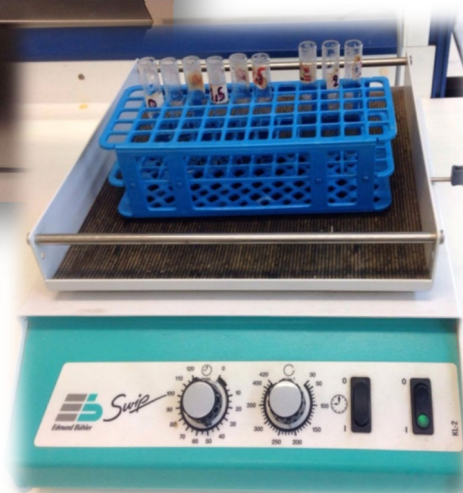
Αν σας δοθεί και δεύτερο άγνωστο δείγμα, αυτό θα μετρηθεί μόνο μία φορά, ως μια επιπλέον σειρά δειγμάτων Δ ($\Delta_1 \dots \Delta_5$).

Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες καλύπτονται με parafim και τοποθετούνται αρχικά στην «μπαλαρίνα» (shaker) σε ήπια ανάδευση για 1 με 2 λεπτά, για ομογενοποίηση.

Στη συνέχεια τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους 50 °C για 45 λεπτά.



**Τοποθετείται τους
δοκιμαστικούς σε υδατόλουτρο
στους 50 °C για 45 λεπτά**

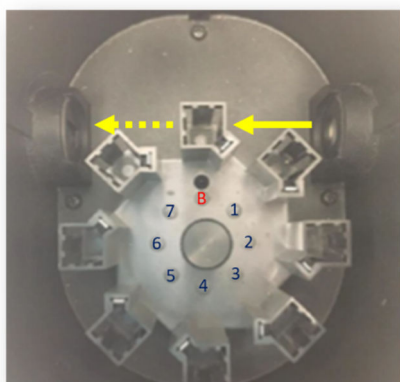


Μετά την πάροδο του απαιτούμενου χρόνου, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται ξανά στη μπαλαρίνα για περίπου 5 λεπτά, ώστε τα διαλύματα να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Επανατοποθετείται με PARAFIM τους δοκιμαστικούς σωλήνες από τους οποίους έχει απομακρυνθεί. Αναδεύονται ήπια και γεμίζονται απευθείας οι κυψελίδες με τα διαλύματα (**χωρίς την χρήση πιπέτας pasteur**). Οι κυψελίδες τοποθετούνται στο φασματοφωτόμετρο, έτσι ώστε η δέσμη της ακτινοβολίας να διέρχεται από την σωστή πλευρά της κάθε κυψελίδας και πραγματοποιείται μέτρηση στα 830 nm.

Προσοχή: το τυφλό δείγμα πρέπει να τοποθετηθεί στη σωστή θέση.

Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιείται είναι μονής δέσμης πολλαπλών θέσεων. Υπάρχει ειδική θέση για το τυφλό δείγμα και επτά θέσεις για τα δείγματα. Από το λογισμικό, ενεργοποιούνται μόνο οι θέσεις όπου έχουν τοποθετηθεί δείγματα (F3), καθώς η θέση του τυφλού είναι πάντα ενεργή. Ρυθμίζεται το μήκος κύματος (F1) στα 830 nm και πατώντας το κουμπί της μέτρησης (F2), πραγματοποιείται η μέτρηση της απορρόφησης. Η μέτρηση γίνεται πρώτα στο τυφλό δείγμα και στη συνέχεια σε κάθε δείγμα ξεχωριστά. Η τιμή του τυφλού αφαιρείται από κάθε μέτρηση, ώστε ως τελικό αποτέλεσμα να λαμβάνεται η διαφορά τους.



Αποτελέσματα και ανάλυση

Καταγράφετε τις απορροφήσεις για τα δείγματα ($A_1 \dots A_5$, $B_1 \dots B_5$, $\Gamma_1 \dots \Gamma_5$).

Παράδειγμα:

Για την πρώτη σειρά (Α):

Δείγμα	Απορρόφηση
A_1	0.354
A_2	0.493
A_3	0.624
A_4	0.757
A_5	0.888

Για την δεύτερη σειρά (Β):

Δείγμα	Απορρόφηση
B_1	0.356
B_2	0.491
B_3	0.625
B_4	0.757
B_5	0.893

Για την τρίτη σειρά (Γ):

Δείγμα	Απορρόφηση
Γ_1	0.361
Γ_2	0.495
Γ_3	0.626
Γ_4	0.758
Γ_5	0.900

Εύρεση συγκέντρωσης P_2O_5 στα άγνωστα διαλύματα:

Για κάθε σειρά (Α, Β και Γ) κατασκευάζεται η αντίστοιχη καμπύλη με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, όπου:

- Στον άξονα των Υ τοποθετούνται οι τιμές της απορρόφησης.
- Στον άξονα των Χ η συγκέντρωση του πρότυπου δείγματος που έχει προστεθεί, εκφρασμένη σε ppm P_2O_5 .

Στο 1^ο δείγμα δεν έχει προστεθεί πρότυπο, οπότε η συγκέντρωση σε P_2O_5 είναι 0 ppm. Στο 2^ο δείγμα έχει προστεθεί 0.5 ml από το πρότυπο των 4 ppm σε P_2O_5 , καθώς ο τελικός όγκος στο δοκιμαστικό σωλήνα είναι 5 ml, η συγκέντρωση του δείγματος είναι:

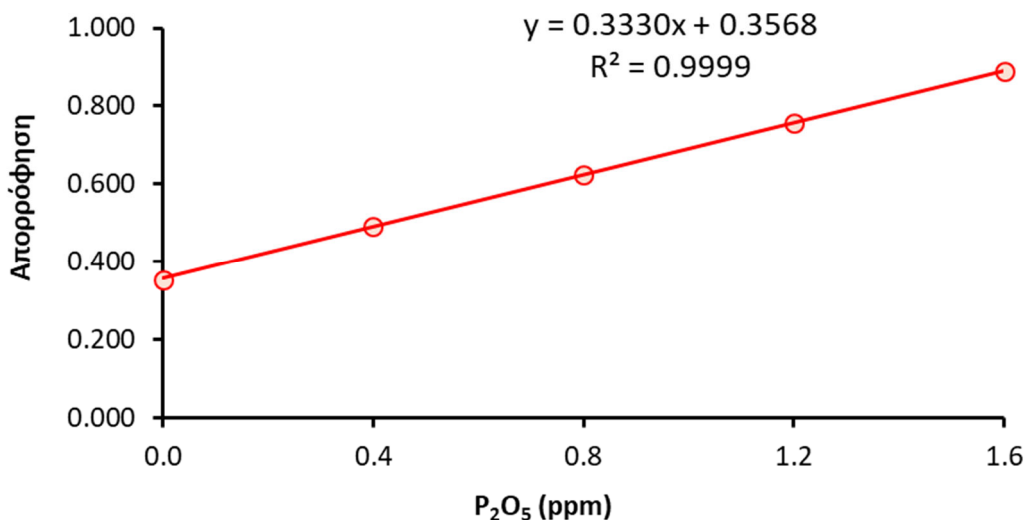
$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \rightarrow C_2 = C_1 * \frac{V_1}{V_2} \rightarrow C_2 = 4\text{ppm} * \frac{0.5 \text{ ml}}{5.0 \text{ ml}} \rightarrow C_2 = 0.4 \text{ ppm } P_2O_5$$

Αντίστοιχα:

- το 3^ο δείγμα είναι 0.8 ppm P_2O_5 ,
- το 4^ο δείγμα είναι 1.2 ppm P_2O_5 ,
- το 5^ο δείγμα είναι 1.6 ppm P_2O_5 .

Έτσι για τη σειρά Α θα είναι:

P_2O_5 (ppm)	Απορρόφηση
$C_1 = 0.0$	0.354
$C_2 = 0.4$	0.493
$C_3 = 0.8$	0.624
$C_4 = 1.2$	0.757
$C_5 = 1.6$	0.888



Η εξίσωση που προκύπτει από την παλινδρόμηση είναι της μορφής:

$$Y = m \cdot X + b$$

Η προέκταση της ευθείας στο σημείο που τέμνει τον άξονα των X είναι η αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος, όταν δηλαδή $Y = 0$. Λύνοντας την εξίσωση θα είναι:

$$X = \left| \frac{-b}{m} \right|$$

Το αποτέλεσμα πρέπει να είναι θετικό, καθώς η συγκέντρωση δεν μπορεί να λάβει αρνητικές τιμές.

Παράδειγμα: Για την εξίσωση $Y = 0.3330 \cdot X + 0.3568$, η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος (σειρά A) είναι 1.0716 ppm P₂O₅.

Αυτή είναι η συγκέντρωση του δείγματος στον δοκιμαστικό σωλήνα εκφρασμένη σε P₂O₅, με τις αραιώσεις που έχουν πραγματοποιηθεί. Στην άσκηση έγιναν αραιώσεις:

1. Αρχική αραιώση 1/20 του αναψυκτικού τύπου cola.
2. Δευτερεύουσα αραιώση κατά την προετοιμασία στον δοκιμαστικό σωλήνα: προστέθηκαν 0.25 ml από το αραιωμένο δείγμα σε τελικό όγκο 5 mL (αραιώση 1/20).

Επίσης, το τελικό αποτέλεσμα πρέπει να είναι σε P (φώσφορο) και όχι σε P₂O₅. Έτσι η συγκέντρωση σε P στο αρχικό διάλυμα υπολογίζεται από την παρακάτω σχέση:

$$P(\text{ppm}) = 20 \cdot 20 \cdot X (\text{ppm P}_2\text{O}_5) \cdot 2 \cdot \frac{31 (P)}{142 (P_2O_5)}$$

Όπου:

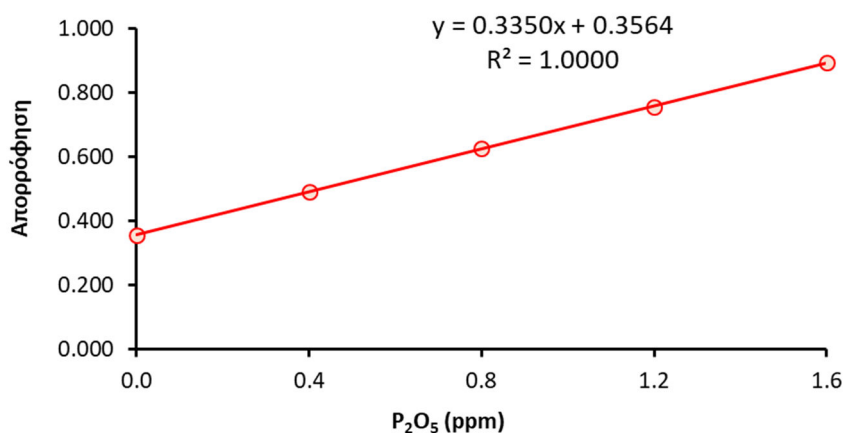
- **X**: η συγκέντρωση (σε ppm P₂O₅) που υπολογίστηκε από την μέθοδο ης γνωστής.
- Ο πρώτος παράγοντας **20** αντιστοιχεί στην αρχική αραιώση 1/20.
- Ο δεύτερος παράγοντας **20** αντιστοιχεί στη δεύτερη αραιώση (προστέθηκαν 0.25 ml σε τελικό όγκο τα 5 ml, οπότε έγινε μια δεύτερη αραιώση 1/20).
- Ο παράγοντας $2 \times (31/142)$ μετατρέπει από P₂O₅ σε P, λαμβάνοντας υπόψη ότι 1 mol P₂O₅ δίνει 2 mol P. (MW: P₂O₅ = 142, P = 31).

Έτσι η αρχική συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος για την πρώτη σειρά είναι $C_A = 187.1 \text{ ppm (P)}$.

Με τον ίδιο τρόπο υπολογίζεται τη συγκέντρωση P και στις δύο επόμενες σειρές του άγνωστου δείγματος:

Για τη σειρά Β:

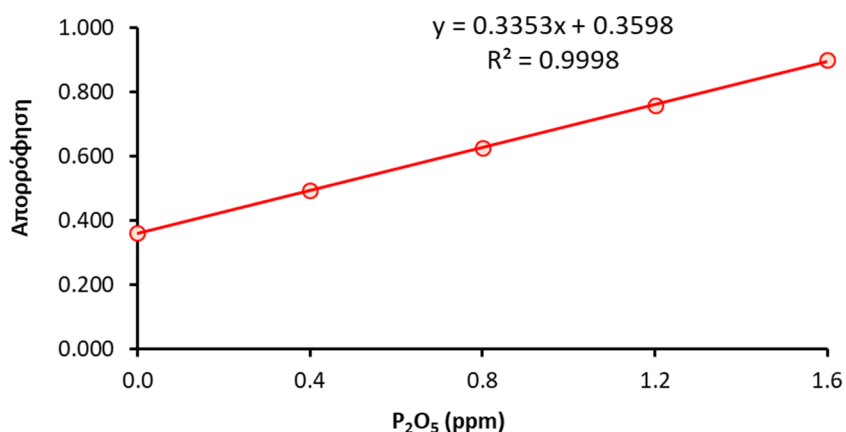
P ₂ O ₅ (ppm)	Απορρόφηση
0.0	0.356
0.4	0.491
0.8	0.625
1.2	0.757
1.6	0.893



Δίνοντας τελικό αποτέλεσμα C_B = 185.8 ppm (P).

Για τη σειρά Γ:

P ₂ O ₅ (ppm)	Απορρόφηση
0.0	0.361
0.4	0.495
0.8	0.626
1.2	0.758
1.6	0.900



Δίνοντας τελικό αποτέλεσμα C_Γ = 187.4 ppm (P).

Σε περίπτωση που κάποια τιμή φαίνεται αμφισβητήσιμη, η αξιοπιστία της ελέγχεται με το **Q-test** για να διαπιστωθεί αν πρέπει να απορριφθεί.

Διάλυμα	Συγκέντρωση P (ppm)
C _A	187.1
C _B	185.8
C _Γ	187.4

Στα τελικά αποτελέσματα υπολογίζεται η **μέση τιμή** και η **τυπική απόκλιση** της συγκέντρωσης φωσφόρου (P, σε ppm) στο αναψυκτικό.

Συγκέντρωση αγνώστου σε P	ppm
Μέση τιμή	186.8
Τυπική απόκλιση	0.9

Βίντεο:

Αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας παρουσιάζεται στο βίντεο της άσκησης στη ιστοσελίδα του μαθήματος στο e-class καθώς και στο κανάλι του εργαστηρίου στο youtube:



Εργ. Αναλυτικής II:



<https://www.chemistry.uoc.gr/eclass/modules/document/?course=CHEM-UNDER115>

Youtube:



<https://www.youtube.com/channel/UCrrDdUXUiTxyhezA140Rlew>

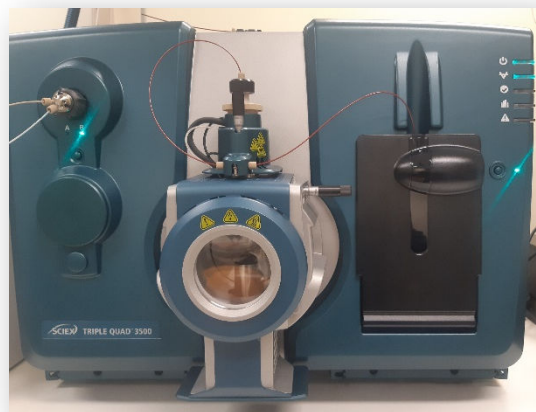
Ερωτήσεις Κατανόησης:

1. Περιγράψετε τη μέθοδο «μπλε του μολυβδαινίου».
2. Ποιος είναι ο ρόλος του ασκορβικού οξέος στη μέθοδο «μπλε του μολυβδαινίου»;
3. Η καμπύλη αναφοράς δίνεται από την εξίσωση: $Y = 0.4500 \cdot X + 0.080$, όπου Y η απορρόφηση και X η συγκέντρωση των πρότυπων διαλυμάτων σε ppm P_2O_5 . Υπολογίσετε την συγκέντρωση του αρχικού δείγματος σε ppm P.
4. Στα 830 nm χρησιμοποιήσατε κυψελίδες από πλαστικό, θα μπορούσατε να χρησιμοποιήσετε κυψελίδες γυάλινες ή από χαλαζία;

Άσκηση – Προσδιορισμός Σχετικής Μοριακής Μάζας (Mr) Πρωτεΐνης με την χρήση Φασματομετρίας Μάζας Ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS)

Σκοπός της άσκησης είναι:

Ο προσδιορισμός της σχετικής μοριακής μάζας πρωτεΐνης με την χρήση φασματομετρίας μάζας ηλεκτροψεκασμού και η εξοικείωσης των φοιτητών με την τεχνική αυτή.

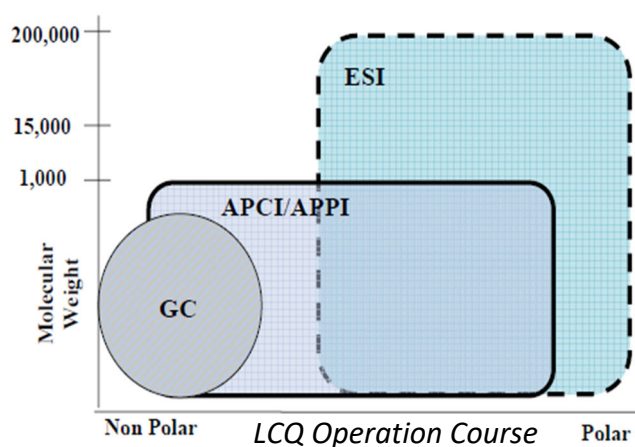


Ο ηλεκτροψεκασμός (Electrospray Ionization – ESI) είναι τεχνική ήπιας ιοντοποίησης, κατάλληλη για την ανάλυση μεγάλων βιομορίων, όπως οι πρωτεΐνες. Το δείγμα σε υγρή μορφή ψεκάζεται υπό υψηλή τάση, δημιουργώντας φορτισμένα σταγονίδια. Καθώς ο διαλύτης εξατμίζεται, τα μόρια αποκτούν φορτίο και οδηγούνται στον αναλυτή μάζας, επιτρέποντας τον προσδιορισμό της σχετικής μοριακής τους μάζας (Mr).

Ο John Fenn, το 1984 ανέδειξε πρώτος τη δυνατότητα χρησιμοποίησης της φασματομετρίας μάζας ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization Mass Spectrometry, ESI-MS) για την ανάλυση βιολογικών μορίων μεγάλης μοριακής μάζας. Για την τεχνική που ανέπτυξε, τιμήθηκε με μέρος του βραβείου Nobel Χημείας το 2002.

Ο ηλεκτροψεκασμός είναι μια τεχνική “ήπιου ιοντισμού” (δηλαδή δεν προκαλεί θραυσματοποίηση των μορίων που αναλύονται), η οποία πραγματοποιείται υπό ατμοσφαιρική πίεση. Υπερισχύει έναντι άλλων τεχνικών φασματομετρίας μάζας, όπως ο Χημικός Ιονισμός σε Ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, APCI) και ο φωτοϊονισμός σε Ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric Pressure PhotoIonisation, APPI), που ενώ είναι επίσης ήπιες τεχνικές, προκαλούν κάποια θραυσματοποίηση.

Η τεχνική του ESI μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση ισχυρά πολικών, μη πτητικών και θερμικά ασταθών ενώσεων, μικρής και μεγάλης μοριακής μάζας. Αντίθετα, οι τεχνικές APCI, APPI εφαρμόζονται σε μικρότερα και πιο άπολα μόρια. Στον ESI το εύρος των μοριακών βαρών που μπορούν να αναλυθούν φτάνει μέχρι περίπου 100.000 Da, λόγω της δυνατότητας πολλαπλής φόρτισης, ενώ η APCI χρησιμοποιείται συνήθως για την ανάλυση μικρών μορίων με μοριακές μάζες έως περίπου 2000 Da. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά έχουν καθιερώσει τη φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού ως μια από τις κυριότερες και πιο ευαίσθητες μεθόδους ανάλυσης πρωτεϊνών, καθώς και άλλων μεγαλομορίων.

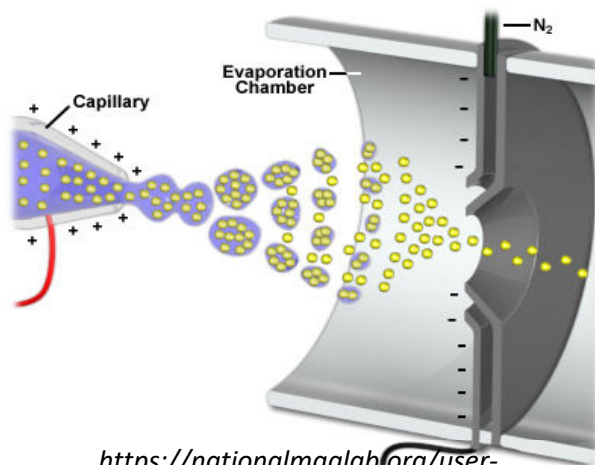


Ιοντισμός Μορίων με Ηλεκτροψεκασμό:

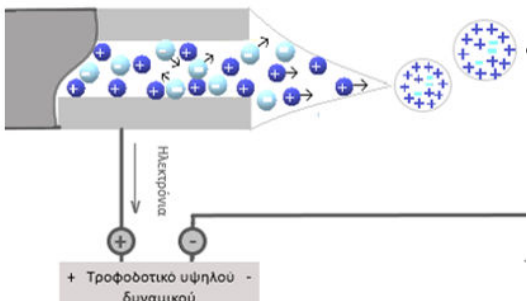
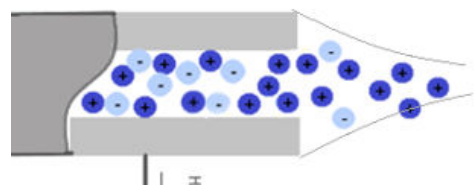
Στην τεχνική του ηλεκτροψεκασμού, τα ιόντα του αναλύτη που προϋπάρχουν στο διάλυμα του δείγματος, μεταφέρονται στην αέρια φάση μέσω ψεκασμού του υγρού δείγματος υπό την επίδραση ηλεκτρικού ισχυρού πεδίου (ηλεκτροψεκασμός – electrospray) και με τη βοήθεια ενός αδρανούς αερίου.

Αραιό διάλυμα αναλύτη, με την βοήθεια αντλίας, διέρχεται με ροή 3 – 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ μέσω τριχοειδούς σωλήνα από ανοξείδωτο χάλυβα, στο άκρο του οποίου εφαρμόζεται υψηλό δυναμικό, 2 – 5 kV. Το δυναμικό αυτό είναι θετικό ή αρνητικό, ανάλογα με το είδος των ιόντων που θέλουμε να αναλύσουμε. Στην παρούσα άσκηση θα αναλυθούν θετικά ιόντα της πρωτεΐνης, οπότε θα εφαρμοστεί θετικό δυναμικό στην άκρη του τριχοειδούς σωλήνα και αρνητικό στην είσοδο του φασματόμετρου. Μεταξύ του τριχοειδούς σωλήνα και της εισόδου του φασματόμετρου δημιουργείται ένα βαθμιδωτό ηλεκτρικό πεδίο, το οποίο κατευθύνει τα θετικά ιόντα προς το εσωτερικό του οργάνου.

Με την εφαρμογή θετικού δυναμικού στην άκρη του τριχοειδούς σωλήνα, τα θετικά ιόντα του διαλύματος κινούνται προς την επιφάνεια του και την εμπλουτίζουν, ενώ τα αρνητικά απομακρύνονται. Το



<https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/esi>



τμήμα του διαλύματος που εξέρχεται από την άκρη του τριχοειδούς είναι θετικά φορτισμένο και σχηματίζει τον “κώνο Taylor”.

Καθώς συγκεντρώνονται συνεχώς θετικά φορτία, κάποια στιγμή οι απωστικές δυνάμεις Coulomb που αναπτύσσονται μεταξύ τους υπερβαίνουν το “όριο Rayleigh” και τότε ο “κώνος Taylor” υφίσταται σχάση, αποσπώντας μικρές θετικά φορτισμένες σταγόνες που περιέχουν τον αναλύτη καθώς και τον διαλύτη. Το “όριο Rayleigh” είναι το σημείο στο οποίο οι απωστικές δυνάμεις Coulomb μεταξύ των φορτίων εξισορροπούνται με την επιφανειακή τάση του υγρού.

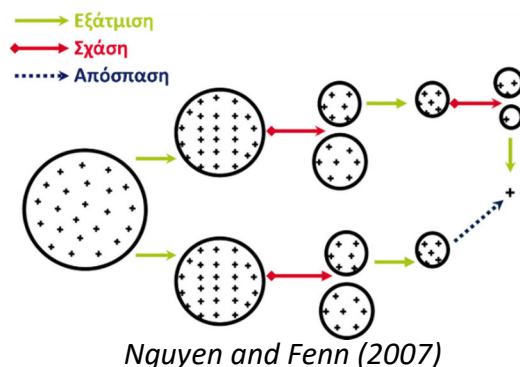
Η διάμετρος των σταγόνων που δημιουργούνται εξαρτάται από:

- το εφαρμοζόμενο δυναμικό
- την ταχύτητα ροής του διαλύματος
- η ροή του βοηθητικού αερίου
- το είδος του διαλύτη
- το είδος του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται

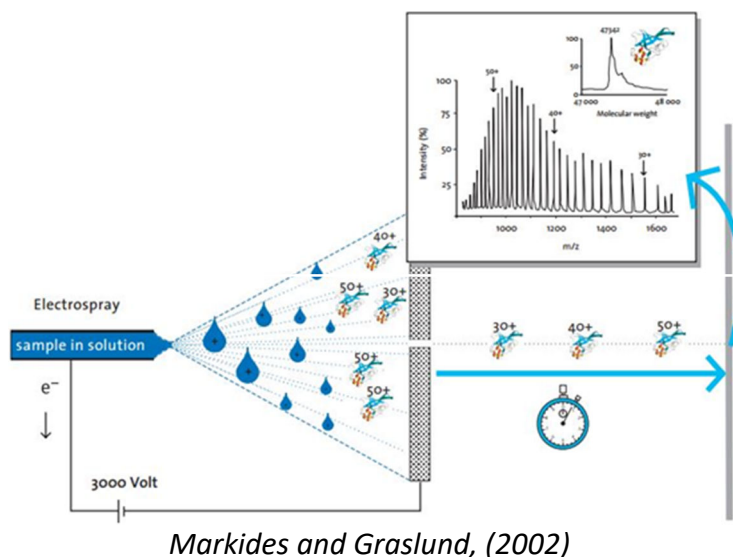
Οι φορτισμένες σταγόνες κατευθύνονται προς την είσοδο του φασματόμετρου λόγω του διαβαθμισμένου δυναμικού, υπό το ρεύμα αδρανές αερίου (N_2). Κατά την διαδρομή τους, οι σταγόνες απαλλάσσονται από τον διαλύτη με εξάτμιση, ώστε στο να εισέρχονται στο φασματόμετρο μόνο τα φορτισμένα μόρια του αναλύτη.

Η διαδικασία σχηματισμού ιόντων στην αέρια φάση επιτυγχάνεται με τρεις κυρίως μηχανισμούς:

1. Εξάτμιση του διαλύτη λόγω του ρεύματος του αδρανούς αερίου (N_2).
2. Σχάση της σταγόνας σε μικρότερες, καθώς η εξάτμιση του διαλύτη μειώνει το μέγεθος της σταγόνας και οι θετικά φορτισμένες ομάδες πλησιάζουν, αυξάνοντας τις απωστικές δυνάμεις Coulomb. Όταν οι δυνάμεις αυτές υπερβούν το “όριο Rayleigh”, η σταγόνα διασπάται.
3. Απόσπαση κάποιου φορτισμένου μορίου του αναλυτή από την σταγόνα.



Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και είναι μια ήπια, χωρίς να προκαλεί θραυσματοποίηση των μορίων του αναλυτή. Φορτισμένα μόρια της πρωτεΐνης που προϋπάρχουν στο διάλυμα μεταφέρονται στην αέρια φάση απαλλαγμένα από μόρια του διαλύτη. Στη συνέχεια, χωρίς θραυσματοποίηση, διαχωρίζονται και καταγράφονται από το φασματόμετρο μάζας ως προς τον λόγο της μάζας προς το φορτίο (m/z), δίνοντας ένα φάσμα της έντασης ή της σχετικής αφθονίας των ιόντων ως προς τον λόγο m/z .



Οργανολογία:

Το φασματοφωτόμετρο μάζας που χρησιμοποιείται το Triple Quad 3500 της εταιρείας Sciex.



Τα κύρια μέρη του φασματομέτρου είναι:

1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος (αντλία)
2. Σύστημα ηλεκτροψεκασμού
3. Σύστημα εστίαση δέσμης ιόντων (Qjet και Q₀)
4. Τετράπολο
5. Ανιχνευτής
6. Καταγραφικό

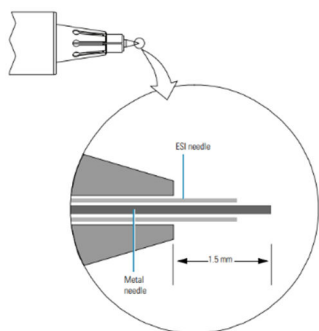
1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος:

Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος είναι ένας μηχανισμός στον οποίο τοποθετείται μια απλή σύριγγα υγρών που συνδέεται με το σύστημα ηλεκτροψεκασμού μέσω σωλήνα πολύ μικρής διαμέτρου. Από το λογισμικό του οργάνου ελέγχεται η ταχύτητα με την οποία πιέζεται το έμβολο της σύριγγας, διοχετεύοντας το σύστημα με μια ελεγχόμενη ροή δείγματος ~ 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.



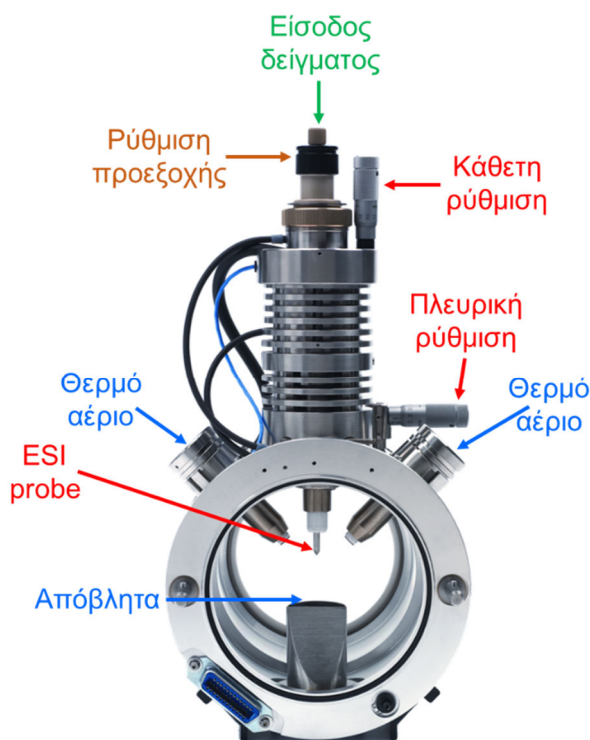
2. Σύστημα ηλεκτροψεκασμού:

Το σύστημα ηλεκτροψεκασμού περιλαμβάνει τον τριχοειδή σωλήνα (ESI probe), από το οποίο εξέρχεται το δείγμα σε μορφή αερολύματος με την βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου και ροή αερίου. Στον τριχοειδή εφαρμόζεται το θετικό φορτίο, ενώ το αρνητικό φορτίο (η γείωση δηλαδή) εφαρμόζεται στην είσοδο του φασματομέτρου. Στην πραγματικότητα, επειδή το υλικό του τριχοειδή σωλήνα είναι πολυμερές, το θετικό φορτίο εφαρμόζεται στον ανοξείδωτο σωλήνα μέσα από τον οποίο βγαίνει ο τριχοειδής και λόγω την κοντινής απόστασης είναι σαν να εφαρμόζεται απευθείας στον τριχοειδή σωλήνα.



Η απόσταση του τριχοειδούς από τον ανοξείδωτο σωλήνα παίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία του αερολύματος και ρυθμίζεται μέχρι να υπάρχει το βέλτιστο αποτέλεσμα. Επίσης, γίνεται κάθετη και πλευρική (οριζόντια) ρύθμιση της θέσης του, ώστε να εστιάζεται καλύτερα με την είσοδο του οργάνου.





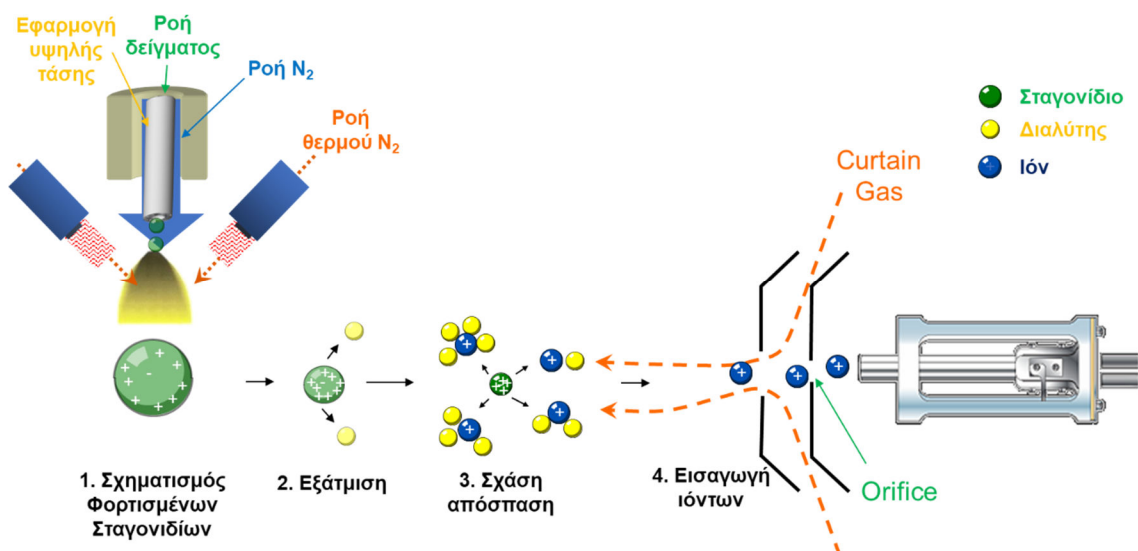
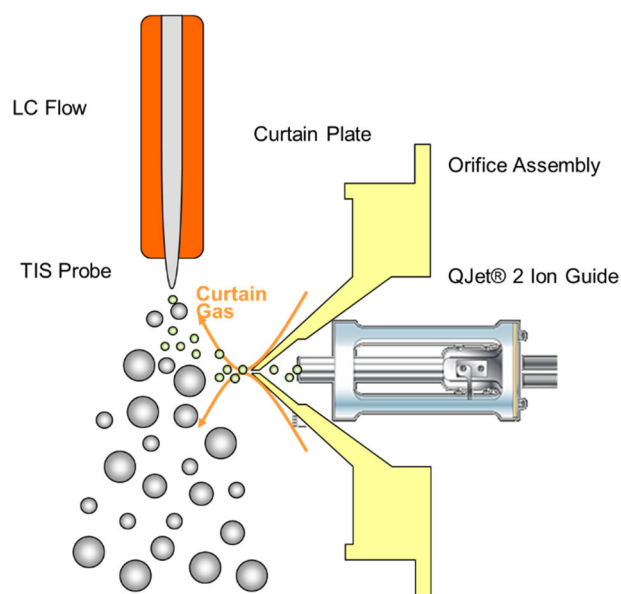
Το αέριο εκνέφωσης (nebulizer gas) βοηθά τόσο στο σχηματισμό σταγονιδίων κατά την διάρκεια του ηλεκτροψεκασμού όσο και στη ξήρανση τους. Παράλληλα, διοχετεύεται και δεύτερο αέριο από την πλάγια είσοδο του συστήματος (αέριο θέρμανσης, heating gas), το οποίο βοηθά στην εξάτμισης του διαλύτη των ιόντων, συμπυκνώνοντας τη φορτισμένη αναλυόμενη ουσία και παράγοντας έτσι ιόντα αέριας φάσης.

Η είσοδος του φασματομέτρου είναι σε κάθετη θέση ως προς τον τριχοειδή, αναγκάζοντας τα θετικά φορτισμένα μόρια να κάνουν στροφή 90 μοιρών για να εισέρθουν σε αυτόν. Έτσι, το όργανο προστατεύεται, καθώς τυχόν ακαθαρσίες ή μη φορτισμένα μόρια (που λόγω αδράνειας θα ακολουθήσουν ευθεία πορεία) οδηγούνται προς τα απόβλητα, ενώ μόνο τα θετικά φορτισμένα μόρια εισέρχονται. Στην είσοδο υπάρχει

επιπλέον ροή αερίου (αέριο παραπέτασμα, curtain gas) με ροή αντίθετη από την πορεία των ιόντων. Το αέριο αυτό απωθεί τα σταγονίδια διαλύτη και τα ουδέτερα μόρια, προστατεύοντάς τον οδηγό ιόντων Q_{jet} και το τετράπλο εστίασης Q_0 από μόλυνση.

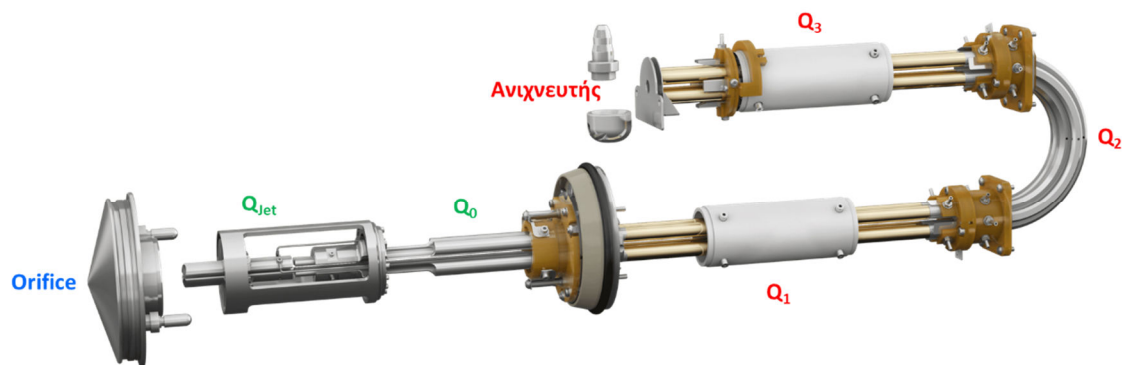
Και τα τρία αέρια (εκνέφωσης, θέρμανσης και παραπέτασμα) είναι αέριο άζωτο, το οποίο παράγεται από γεννήτρια αζώτου που τροφοδοτείται με ατμοσφαιρικό αέρα μέσω ειδικού αεροσυμπιεστή.

Η ένταση του δυναμικού για τον ηλεκτροψεκασμό είναι 5.5 kV. Οι ροές των αερίων εκνέφωσης και θέρμανσης είναι 18 και το αέριο παραπέτασμα 35. Η θερμοκρασία θέρμανσης του αερίου θέρμανσης και της πηγής ηλεκτροψεκασμού είναι 150°C.



Η είσοδος του οργάνου γίνεται μέσω μικρού στομίου (orifice). Η δέσμη των ιόντων εισέρχεται αρχικά στο Q_{jet} , έπειτα στο Q_0 και στη συνέχεια στα τετράπολα Q_1 , Q_2 και Q_3 και τέλος στον ανιχνευτή.

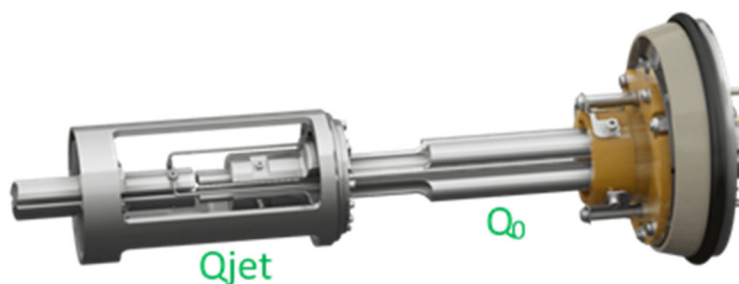
Το σύστημα ηλεκτροψεκασμού λειτουργεί σε ατμοσφαιρική πίεση. Κενό αρχίζει να δημιουργείται από την είσοδο του οργάνου (μερικά Torr), αυξάνοντας σταδιακά σε μερικά 10^{-3} Torr στη περιοχή των Q_{jet} και Q_0 και φτάνει περίπου στα 0.6×10^{-5} Torr στη περιοχή των τετράπολων και του ανιχνευτή.



Η διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού είναι μια ήπια τεχνική, κατά την οποία δεν γίνεται θραυσματοποίηση της πρωτεΐνης.

3. Σύστημα εστίαση δέσμης ιόντων :

Αποτελείται από τον οδηγό ιόντων Q_{jet} και το τετράπολο εστίασης Q_0 . Και τα δύο έχουν σκοπό την εστίαση της δέσμης ιόντων. Καθώς τα ιόντα εισάγονται στο όργανο σε συνθήκες κενού, η εστίασή τους είναι απαραίτητη για τη βελτίωση της μεταφοράς τους προς τα τετράπολα, αυξάνοντας την ευαισθησία.



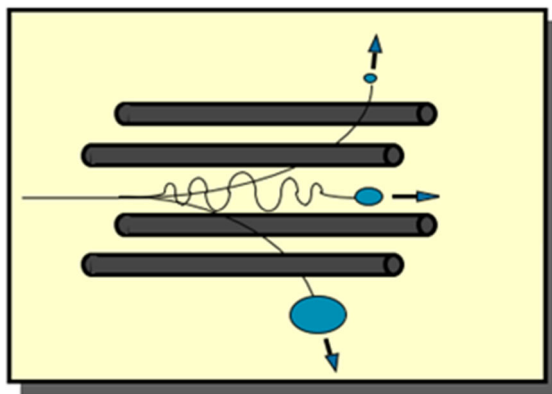
4. Τετράπολα:

Τα τετράπολα αποτελούν την «καρδιά» του φασματοφωτόμετρου. Υπάρχουν δύο ειδών: τα κλασικά (Quadrupoles) και οι κυψέλες σύγκρουσης (Collision Cell).

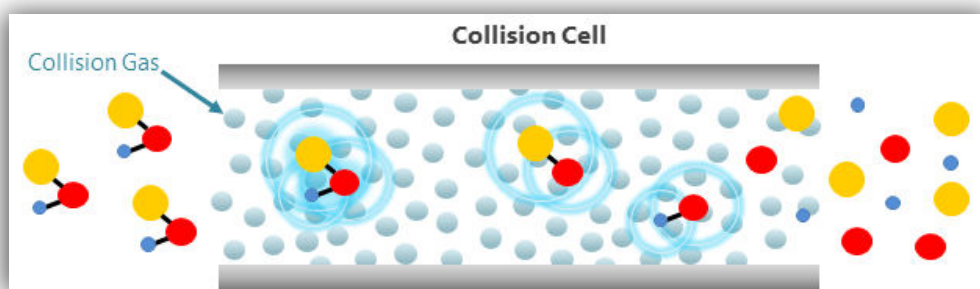
A. Κλασικά τετράπολα (Quadrupoles)

Μπορούν να λειτουργήσουν με τρεις τρόπους:

1. (RF) Απλή μεταφορά ιόντος, διατηρούν τα ιόντα σε πορεία.
2. (Scan) Σάρωση ιόντων, επιλέγουν κάθε ιόν ξεχωριστά με βάση τον λόγο m/z .
3. (Single Ion Monitoring, SIM) Επιλογή συγκεκριμένου ιόντος με βάση τον λόγο m/z .



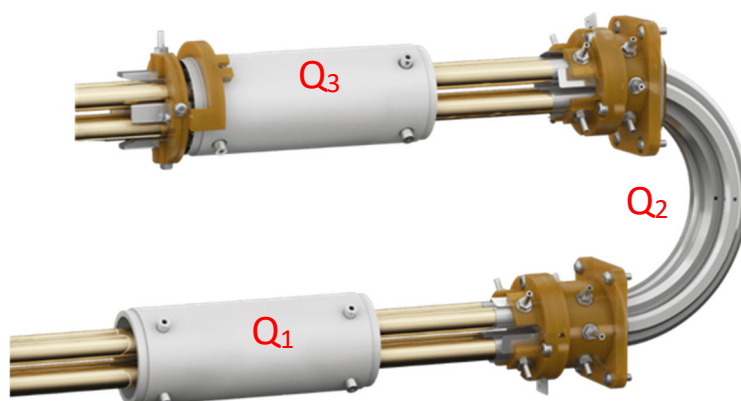
B. Οι κυψέλες σύγκρουσης (Collision Cell)



Έχουν δύο κυρίες λειτουργίες:

1. (RF) Απλή μεταφορά ιόντος, διατηρούν τα ιόντα σε πορεία.
2. (Fragmentation) Θραυσματοποίηση ιόντων, με την βοήθεια αερίου σύγκρουσης (collision gas) προκαλείται κατακερματισμός των πρόδρομων ιόντων και δημιουργία θραυσμάτων.

Το όργανο διαθέτει τρία τετράπολα το Q_1 το Q_2 και το Q_3 . Τα Q_1 και Q_3 είναι τα κλασικά, ενώ το Q_2 είναι τετράπολο κυψέλης σύγκρουσης.



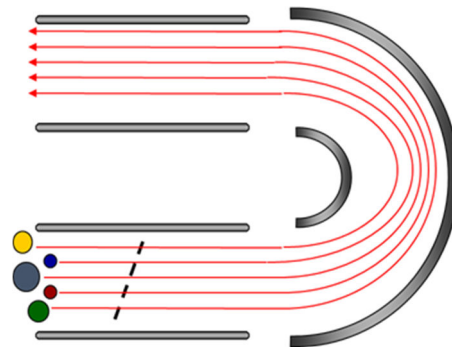
Το Triple Quad 3500 είναι ανιχνευτής MS/MS με δυνατότητα σάρωσης από 5 έως 2000 m/z με βήμα 0.1, δίνοντας πολλές διαφορετικές λειτουργίες.

Κύριες λειτουργίες:

- Σάρωση όλων των ιόντων:**

Το τετράπολο Q_1 σαρώνει τα ιόντα, ενώ τα τετράπολα Q_2 και Q_3 είναι σε λειτουργία μεταφοράς, έτσι φτάνουν σταδιακά όλα τα ιόντα στον ανιχνευτή.

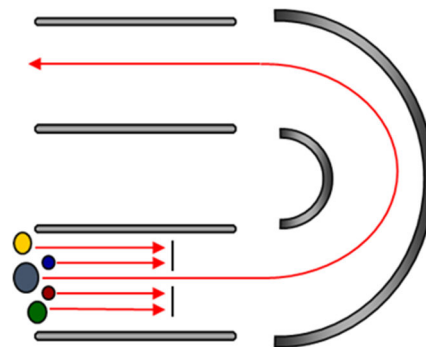
Τετράπολο	επιλογή
Q_1	Scan
Q_2	RF
Q_3	RF



- Παρακολούθηση ενός ιόντος:**

Το Q_1 επιλέγει ένα συγκεκριμένο ιόν, ενώ τα Q_2 και Q_3 είναι σε λειτουργία μεταφοράς, έτσι στον ανιχνευτή φτάνει μόνο το επιθυμητό ιόν.

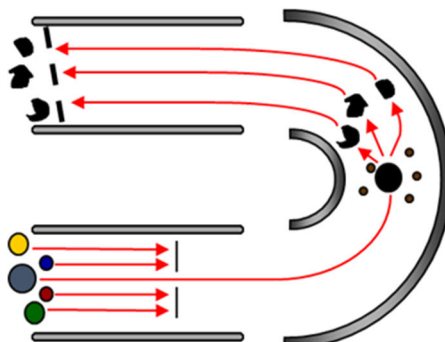
Τετράπολο	επιλογή
Q_1	SIM
Q_2	RF
Q_3	RF



- Σάρωση θραυσμάτων επιλεγμένου ιόντος:**

Το Q_1 επιλέγει ένα συγκεκριμένο ιόν, το Q_2 το θραυσματοποιεί και το Q_3 σαρώνει τα θραύσματα, τα οποία καταλήγουν στον ανιχνευτή και καταγράφονται.

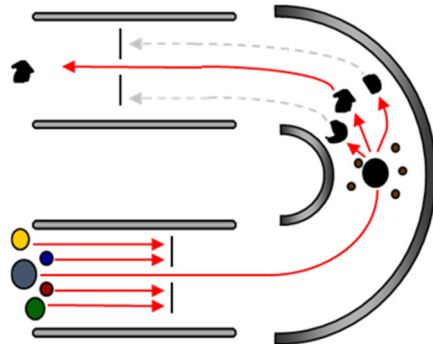
Τετράπολο	επιλογή
Q_1	SIM
Q_2	Fragmentation
Q_3	Scan



- **Επιλογή θραύσματος επιλεγμένου ιόντος:**

Το Q_1 επιλέγει ένα συγκεκριμένο ιόν, το Q_2 το θραυσματοποιεί και το Q_3 επιλέγει ένα συγκεκριμένο θραύσμα, έτσι φτάνει στον ανιχνευτή μόνο το επιλεγμένο θραύσμα από ένα συγκεκριμένο ιόν.

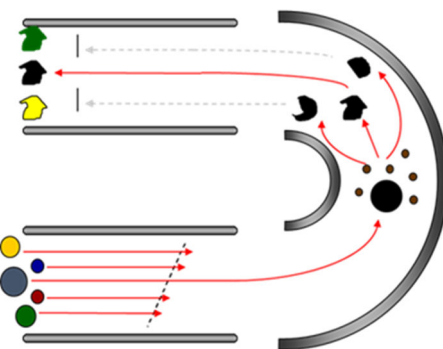
Τετράπολο	επιλογή
Q_1	SIM
Q_2	Fragmentation
Q_3	SIM



- **Αναζήτηση ιόντων που δίνουν το ίδιο τελικό θραύσμα:**

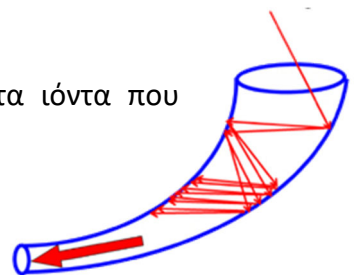
Το Q_1 σαρώνει, το Q_2 θραυσματοποιεί και το τετράπολο Q_3 πλέγει συγκεκριμένο θραύσμα, έτσι φτάνει στον ανιχνευτή μόνο το επιλεγμένο θραύσμα από το κάθε ιόν που μπορεί να το δώσει. Με την τεχνική αυτή διακρίνονται τα ιόντα που έχουν την δυνατότητα να δώσουν το συγκεκριμένο θραύσμα.

Τετράπολο	επιλογή
Q_1	Scan
Q_2	Fragmentation
Q_3	SIM



5. Ανιχνευτής:

Ο ανιχνευτής είναι ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής, ο οποίος καταγράφει τα ιόντα που εξέρχονται και δίνει το αντίστοιχο σήμα.



6. Καταγραφικό:

Το σήμα μετατρέπεται σε ψηφιακό, ενισχύεται και καταγράφεται από υπολογιστή με το κατάλληλο λογισμικό, δίνοντας ένα φάσμα μάζας της σχετικής έντασης των φορτίων ως προς τον λόγο m/z .

Για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με το θεωρητικό υπόβαθρο της τεχνικής ESI-MS και τον τρόπο υπολογισμού της σχετικής μοριακής μάζας της πρωτεΐνης είναι απαραίτητο να διαβάσετε:

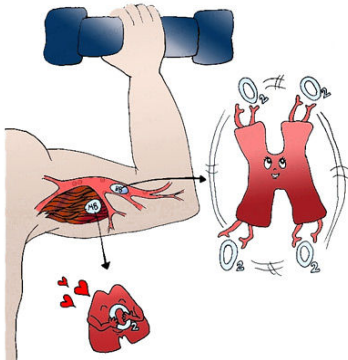
**το κεφ. 22 του Daniel C. Harris «Ποσοτική Χημική Ανάλυση»
(παράγραφος: Ηλεκτροψεκασμός και πρωτεΐνες)**

Για περισσότερα σχετικά με το μηχανισμό και τις εφαρμογές του ηλεκτροψεκασμού:

Simon J. Gaskell, Electrospray: Principles and Practice, Journal of Mass Spectrometry, 32, 677-688 (1997).

Ηλεκτροψεκασμός και Πρωτεΐνες:

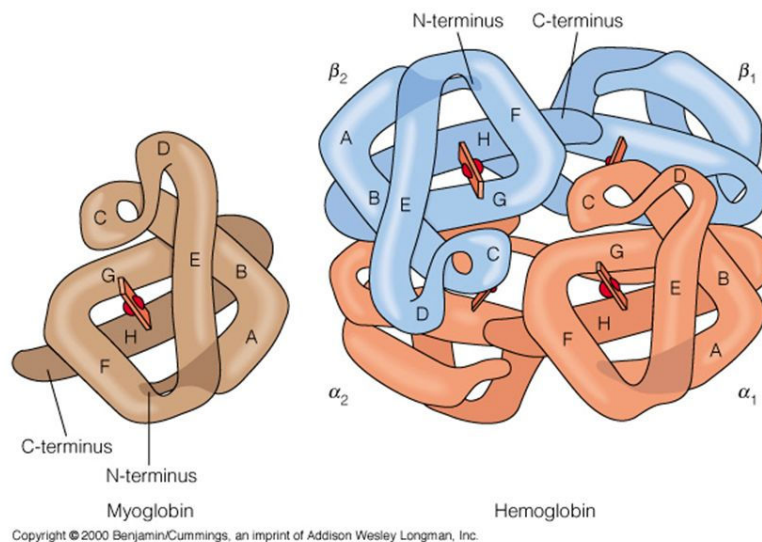
Οι πρωτεΐνες, ανάλογα με τα αμινοξέα που τις αποτελούν, περιέχουν ελεύθερες βασικές και όξινες ομάδες, οι οποίες ανάλογα με το pH του διαλύματος, μπορούν να δώσουν συνολικό θετικό ή αρνητικό φορτίο στην πρωτεΐνη. Για παράδειγμα, οι αμινομάδες της πρωτεΐνης συνήθως πρωτονιώνονται, ενώ τα καρβοξυλικά οξέα μπορούν να δράσουν ως δότες πρωτονίου της ομάδας $-OH$ και να αποκτήσουν αρνητικό φορτίο. Ο ηλεκτροψεκασμός μεταφέρει στην αέρια φάση τα ιόντα που ήδη προϋπάρχουν στο διάλυμα, στην περίπτωση των πρωτεϊνών, εισάγει πολλαπλά φορτισμένα ιόντα τους στην αέρια φάση, τα οποία στη συνέχεια αναλύονται με φασματομετρία μάζας, με βάση το m/z τους.



Η πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται στην άσκηση είναι η μυογλοβίνη ή αλλιώς μυοσφαιρίνη (myoglobin). Η μυογλοβίνη είναι μια σχετικά μικρή πρωτεΐνη που αποτελείται από 153 αμινοξέα, περιέχει σίδηρο και μια μονάδα αίμης, παρόμοια με αυτή της αιμοσφαιρίνης. Είναι και αυτή μεταφορέας οξυγόνου στους σκελετικούς μύες, όπου και βρίσκεται, σε αντίθεση με την αιμοσφαιρίνη, η οποία έχει τέσσερις μονάδες αίμης και βρίσκεται στο αίμα. Η πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται στην άσκηση προέρχεται από καρδιακό μυ αλόγου, η πληροφορία αυτή είναι απαραίτητη για να βρείτε στη βιβλιογραφία

την σωστή σχετική μοριακή μάζα της πρωτεΐνης και να τη συγκρίνετε με εκείνη που θα υπολογίσετε στην αναφορά σας.

Myoglobin (Mb) and Hemoglobin (Hb)



Πειραματικό μέρος

Παρασκευή διαλύματος μυογλοβίνης:

Αρχικά, ετοιμάζεται το διάλυμα της μυογλοβίνης: ζυγίζονται 0.5 mg myoglobin, προστίθενται 5 ml μεθανόλης (MeOH), 0.5 ml οξικού οξέος (CH_3COOH) και το διάλυμα αραιώνεται με απιοντισμένο νερό σε τελικό όγκο 50 ml. Το διάλυμα παρασκευάζεται από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου μερικές ημέρες πριν ώστε να υπάρχει ο απαιτούμενος χρόνος για την πρωτονίωση της πρωτεΐνης.

Η προσθήκη του οξικού οξέος έχει ως αποτέλεσμα, αφενός να οξινιστεί το δείγμα και να δημιουργηθεί χαμηλό pH, πρωτονιώνοντας έτσι την αλυσίδα της πρωτεΐνης και αφετέρου, να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου της αλυσίδας (όχι οι ομοιοπολικοί δεσμοί) και να αναδιαταχθεί η τριτοταγής δομή της. Με αυτόν τον τρόπο, τα πρωτόνια του διαλύματος μπορούν να έχουν πρόσβαση και σε εσωτερικές ομάδες της αλυσίδας και να τις πρωτονιώσουν. Έτσι επιτυγχάνεται πολλαπλή πρωτονίωση της πρωτεΐνης απαραίτητο για τη συγκεκριμένη τεχνική.

Οι πρωτεΐνες έχουν μεγάλη μοριακή μάζα ακόμη και οι μικρές όπως η μυογλοβίνη έχει σχετική μοριακή μάζα περίπου 17000 Da. Το φασματόμετρο που χρησιμοποιείται στην συγκεκριμένη άσκηση μπορεί να ανιχνεύσει λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) μέχρι 2000. Συνεπώς, μόρια της πρωτεΐνης με μόνο ένα πρωτόνιο θα έχουν λόγο m/z κοντά στα 17000 (είναι εκτός ορίων του οργάνου), ενώ τα μόρια με δύο πρωτόνια θα έχουν m/z περίπου 8500 (πάλι εκτός ορίων). Μόρια που προσλαμβάνουν π.χ. 10 πρωτόνια θα έχουν m/z περίπου 1700 εντός των ορίων λειτουργίας. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η πολλαπλή πρωτονίωση της πρωτεΐνης. Στην πράξη, υπάρχουν μόρια με διάφορους βαθμούς πρωτονίωσης (ακόμα και με 1 ή 2 πρωτόνια), δίνοντας μια κατανομή φορτίων που σε ορισμένες περιπτώσεις μοιάζει με την κατανομή Gauss. Στο φάσμα όμως του οργάνου θα εμφανιστούν μόνο όσα έχουν λόγο m/z κάτω από 2000.

Η προσθήκη μεθανόλης βοηθά τόσο στο σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου της τριτοταγούς δομής, όσο και στη δημιουργία μικρότερων σταγονιδίων κατά τον ηλεκτροψεκασμό.

Εισαγωγή δείγματος:

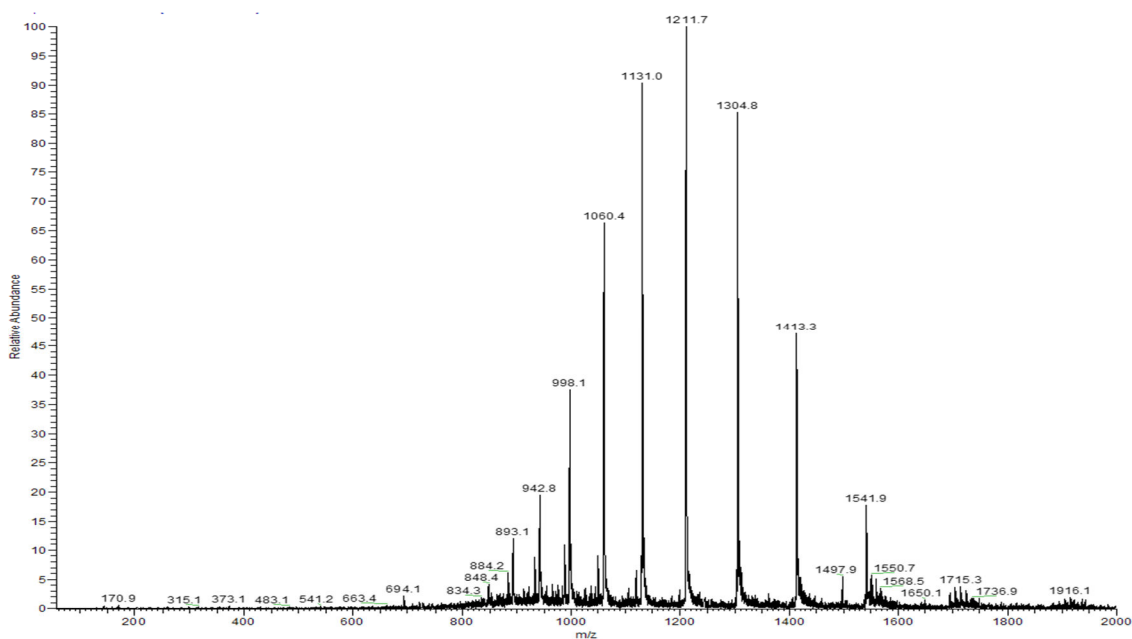
Για την εισαγωγή του δείγματος θα χρησιμοποιηθεί σύριγγα υγρών. Αρχικά, ξεπλένεται με διάλυμα $\text{MeOH} - \text{H}_2\text{O}$ (50%-50%), το οποίο θεωρείται το τυφλό (blank) και στη συνέχεια φορτώνεται με 300 – 400 μl διαλύματος μυογλοβίνης χωρίς φυσαλίδες. Τυχόν φυσαλίδες δεν δημιουργούν τα προβλήματα της υγρή χρωματογραφία, αλλά προκαλούν κενά στην αλληλουχία των φασμάτων, κάτι που καλό είναι να αποφεύγεται.

Η σύριγγα συνδέεται με τον τριχοειδή σωλήνα μέσω ειδικού συνδέσμου και τοποθετείται στην θέση της αντλίας σύριγγας. Μέσω του λογισμικού, το έμβολο τίθεται σε κίνηση, ενεργοποιώντας ταυτόχρονα (5.5 kV). Η πρωτεΐνη εισέρχεται στο φασματόμετρο με μια συνεχή ροή και μόλις φτάσει στον ανιχνευτή, το συνολικό σήμα αυξάνεται και εμφανίζονται τα φάσματά της στην οθόνη. Όταν καταγραφεί ο απαιτούμενος αριθμός φασμάτων, η διαδικασία ολοκληρώνεται. Ο μεγάλος αριθμός φασμάτων είναι επιθυμητός, καθώς μειωθεί τον θόρυβο.

Στη συνέχεια, η σύριγγα ξεπλένεται με το τυφλό διάλυμα ($\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ 50%-50%) και επαναφορτώνεται με 300 -400 μl από αυτό, το οποίο εισάγεται ξανά στο όργανο για έκπλυση. Το τυφλό δεν είναι καθαρό νερό, αλλά περιέχει και οργανικό διαλύτη (μεθανόλη), επειδή η πρωτεΐνη είναι ένα μεγάλο οργανικό μόριο, η παρουσία οργανικού διαλύτη βοηθά στον καθαρισμό. Μετά από λίγο χρόνο, τα φάσματα παύουν να είναι ευκρινή (επικρατεί θόρυβος) και το συνολικό σήμα μειώνεται, γεγονός που δείχνει ότι η πρωτεΐνη έχει απομακρυνθεί από το όργανο.

Φάσματα:

Το φάσμα της πρωτεΐνης θα έχει την παρακάτω μορφή:



Στον άξονα Χ είναι ο λόγος m/z από 50 έως 2000, που είναι τα όρια λειτουργίας του οργάνου, με διακριτική ικανότητα 0.1 και στον άξονα Υ είναι ένταση του σήματος. Το φάσμα που καταγράφεται είναι ο μέσος όρος όλων των φασμάτων που λήφθηκαν κατά την διάρκεια της μέτρησης, το συγκεκριμένο παράδειγμα, είναι ο μέσος όρος 138 φασμάτων. Επιδιώκεται η λήψη μεγάλου αριθμού φασμάτων για τον υπολογισμό του μέσου όρου, ώστε να μειωθεί αισθητά ο θόρυβος και να είναι ευδιάκριτες οι κύριες κορυφές της πρωτεΐνης. Ο θόρυβος είναι τυχαίος, δηλαδή άλλοτε θετικός και άλλοτε αρνητικός, οπότε με τη λήψη του μέσου όρου εξουδετερώνεται. Αντίθετα, μια κανονική κορυφή θα βγαίνει στο ίδιο σημείο και έτσι, ενισχύεται στον μέσο όρο.

Παρατηρείται ένα πλήθος κορυφών με κατανομή τύπου Gaussόπως, αναφέρθηκε προηγουμένως. Οι κορυφές που μας ενδιαφέρουν είναι οι μεγάλες, κύριες κορυφές που ανήκουν στην ίδια πρωτεΐνη. Διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον αριθμό των πρωτονίων που έχουν προσλάβει, έτσι ενώ έχουν την ίδια μοριακή μάζα, παρουσιάζουν διαφορετικό λόγο m/z , οδηγώντας στην εμφάνιση διαφορετικών κορυφών στο φάσμα. Ανάλογα με τον βαθμό πρωτονίωσης, η κατανομή αυτή μετατοπίζεται προς τα δεξιά ή προς τα αριστερά.

Κάθε κύρια κορυφή διαφέρει από την διπλανή της κατά φορτίο ± 1 .

- Προς τα αριστερά: +1, στο φορτίο (z αυξάνεται) και έτσι ο λόγος m/z μειώνεται.
- Προς τα δεξιά: -1, στο φορτίο (z μειώνεται) και έτσι ο λόγος m/z αυξάνεται.

Αν γίνει μεγέθυνση σε μια κύρια κορυφή, θα παρατηρηθούν δίπλα της κάποιες μικρότερες κορυφές, οι οποίες:

1. Δεν μπορεί να είναι:

a. θόρυβος:

Λόγω του μεγάλου αριθμού φασμάτων που συνεισφέρουν στον μέσο όρο, ο θόρυβος είναι πολύ μικρότερος.

b. θραύσματα της πρωτεΐνης:

Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού είναι μια ήπια τεχνική και δεν προκαλεί θραυσματοποίηση του μορίου.

2. Μπορεί να είναι:

a. Ισότοπα:

Η πιθανότητα ύπαρξη ισοτόπων σε ένα μόριο πρωτεΐνης είναι πολύ μεγάλη, λόγω του πλήθους των ατόμων που περιέχει η αλυσίδα της. Η πιθανότητα αυτή είναι ανάλογη με την αφθονία των ισοτόπων στη φύση. Π.χ. το ^{13}C σε σχέση με το ^{12}C βρίσκεται σε αναλογία 1.07%, οπότε για κάθε 100 άτομα C αναμένεται να υπάρχει περίπου ένα άτομο ^{13}C . Το ίδιο ισχύει και για τα υπόλοιπα στοιχεία. Έτσι, οι κορυφές αυτές αντιστοιχούν σε μόρια της ίδιας πρωτεΐνης που όμως έχουν διαφορετικά ισότοπα, με αποτέλεσμα διαφορετική μοριακή μάζα.

b. Τροποποίηση πρωτεΐνης:

Υπάρχει η πιθανότητα να έχουν τροποποιηθεί κάποια μόρια της πρωτεΐνης από ακαθαρσίες που ενδέχεται να βρίσκονται στο διάλυμα.

Παράδειγμα: Σε κάποιο καρβονύλιο ενός αμινοξέως θα μπορούσε να αντικατασταθεί ένα H^+ από ένα ιόν Na^+ . Αυτό θα αύξανε τη μοριακή μάζα κατά +22 (-1 λόγω H^+ , +23 λόγω Na^+). Άλλο παράδειγμα είναι η φωσφορυλίωση, δηλαδή η προσθήκη φωσφορικής ομάδας, που αυξάνει τη μοριακή μάζα κατά +96.

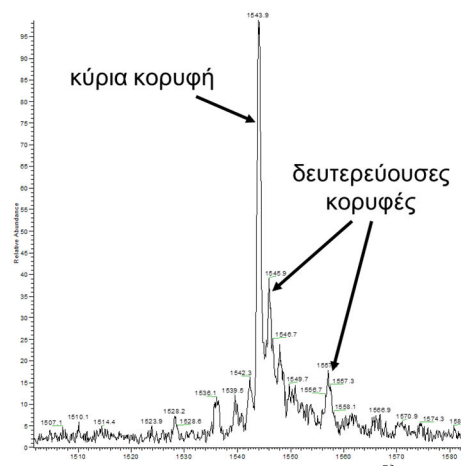
Όσο περισσότερος χρόνος έχει περάσει από την παρασκευή του διαλύματος, τόσο αυξάνεται η πιθανότητα τροποποίηση. Για τον λόγο αυτό, το διάλυμα δεν πρέπει να είναι ούτε πολύ παλιό (για να αποφευχθεί η τροποποίηση), ούτε πολύ καινούριο (για να έχει ολοκληρωθεί η πρωτονίωση).

Από την διαφορά της μικρής κορυφής σε σχέση με την κύρια, γνωρίζοντας το φορτίο z , μπορεί να υπολογιστεί η διαφορά μάζας του τροποποιημένου μορίου από το αρχικό. Από αυτήν τη διαφορά μπορεί να διαπιστωθεί εάν οφείλεται στην παρουσία ισοτόπων (και ποια) ή σε κάποια χημική τροποποίηση και σε αυτήν την περίπτωση, ποια είναι αυτή.

Υπολογισμός σχετικής μοριακής μάζας πρωτεΐνης:

Αρχικά καταγράφονται οι τιμές του λόγου m/z των κύριων κορυφών. Στο παράδειγμα θα είναι:

Κορυφή	Λόγος m/z
1	1541.9
2	1413.3
3	1304.8
4	1211.7
5	1131
6	1060.4
7	998.1
8	942.8
9	893.1



Υπολογίζεται της σχετικής μοριακής μάζας της πρωτεΐνης, όπως αναφέρεται στο κεφ. 22 του Β' Τόμου του Daniel C. Harris «Ποσοτική Χημική Ανάλυση» (παράγραφος: Ηλεκτροψεκασμός και πρωτεΐνες).

Κάνοντας σωστά τους υπολογισμούς για κάθε κύρια κορυφή, θα έχετε προσδιορίσει τη σχετική μοριακή μάζα της πρωτεΐνης:

Κορυφή	Μοριακή Μάζα (Da)
1	16949.8
2	16947.5
3	16949.3
4	16949.7
5	16949.9
6	16950.3
7	16950.6
8	16952.3
9	16949.7

Από αυτές τις τιμές θα υπολογίσετε τη μέση τιμή και την τυπική τους απόκλιση:

Μοριακή μάζα μυογλοβίνης:

16949.9 ± 1.2 Da

Αν, για κάποιο λόγο η τυπική απόκλιση είναι μεγάλη, πιθανόν να έχει γίνει κάποιο λάθος στους υπολογισμούς των μοριακών μαζών.

Αναφορά:

Για την σύνταξη της αναφορά σας, θα κάνετε τα εξής:

1. Περιγραφή για την τεχνική ESI-MS, καθώς και για το όργανο που χρησιμοποιείται.
2. Αναλυτική παρουσίαση της πειραματικής διαδικασίας και σχολιασμός του φάσματος σας.
3. Υπολογισμός της σχετικής μοριακής μάζας της πρωτεΐνης από το φάσμα σας, με όσο το δυνατόν περισσότερες κύριες κορυφές. Η ανάλυση να γίνει σε υπολογιστικό αρχείο που θα αποσταλεί μαζί με την αναφορά σας. Στο κείμενο της αναφοράς, να παρουσιαστεί πίνακας με όλα τα στάδια των υπολογισμών, ώστε να είναι δυνατή η διόρθωση τυχόν λαθών.
4. Υπολογισμός της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης των μοριακών μαζών που υπολογίστηκαν.
5. Σύγκριση της μέσης τιμής της σχετικής μοριακής μάζας της μυογλοβίνης που υπολογίστηκε, με την τιμή από την βιβλιογραφία για μυογλοβίνη από καρδιακό μυ αλόγου και να προσδιορισμός του επί της % το απόλυτο σφάλμα της μέτρησης σας.
6. Στο διάλυμα της μυογλοβίνης που χρησιμοποιήθηκε, να υπολογιστεί η συγκέντρωση της μυογλοβίνης σε $\mu\text{g/ml}$, καθώς και οι συγκεντρώσεις της MeOH και του CH_3COOH σε επί % (v/v).
7. Στο ίδιο διάλυμα, να υπολογιστεί η συγκέντρωση της μυογλοβίνης σε ppm , θεωρώντας ότι ο τελικός όγκος αραίωσης είναι 50 ml. Δίνονται οι πυκνότητες σε Kg/l : H_2O 1.000, MeOH 0.792, CH_3COOH 1.049.
8. Εκτός από το αρχείο της αναφοράς σας (σε μορφή pdf ή word), πρέπει να αποστείλετε και το υπολογιστικό αρχείο (σε μορφή excel ή origin) όπου θα περιέχονται όλοι οι υπολογισμοί των μοριακών μαζών.

**Ως αναφορά θεωρείται η αποστολή και των δύο αρχείων
(κείμενο και υπολογιστικό αρχείο)**

Αν ένα από τα δύο αρχεία δεν παραδοθεί, η αναφορά δεν βαθμολογείται.

Βίντεο:

Αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας παρουσιάζεται στο βίντεο της άσκησης στη ιστοσελίδα του μαθήματος στο e-class καθώς και στο κανάλι του εργαστηρίου στο youtube:



Εργ. Αναλυτικής II:



<https://www.chemistry.uoc.gr/eclass/modules/document/?course=CHEM-UNDER115>

Youtube:



<https://www.youtube.com/channel/UCrrDdUXUiTxyhezA14ORlew>

Ερωτήσεις Κατανόησης:

1. Για ποιο λόγο προστίθεται ποσότητα CH_3COOH στο διάλυμα της πρωτεΐνης και για ποιο λόγο ποσότητα MeOH ;
2. Οι μικρές κορυφές δίπλα σε μια κύρια κορυφή, σε τι οφείλονται;
3. Το όργανο που χρησιμοποιήσατε, τι είδους τετράπολλα διαθέτει;
4. Ποια μέθοδο λειτουργίας τετραπόλων χρησιμοποιήσατε;
5. Ποια είναι η διαφορά της μυογλοβίνης από την αιμοσφαιρίνη;
6. Κατά την διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού, σε ποιο στάδιο δημιουργούνται τα ιόντα;
7. Για να καταγράψετε το φάσμα αρνητικά φορτισμένης πρωτεΐνης, τι θα πρέπει να κάνετε;

Βιβλιογραφία

- Daniel C. Harris «Ποσοτική χημική ανάλυση».
- Daniel C. Harris & Charles A. Lucy «Αναλυτική Χημεία»
- Skoog Holler Nieman «Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης».
- Για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με το θεωρητικό υπόβαθρο της τεχνικής ESI-MS και το τρόπο υπολογισμού της σχετικής μοριακής μάζας της πρωτεΐνης είναι απαραίτητο να διαβάσετε: το κεφ. 22 του Β' Τόμου του Daniel C. Harris «Ποσοτική Χημική Ανάλυση» (παράγραφος: Ηλεκτροψεκασμός και πρωτεΐνες) ή κεφ. 22 του Daniel C. Harris & Charles A. Lucy «Αναλυτική Χημεία»
- Για περισσότερα σχετικά με το μηχανισμό και τις εφαρμογές του ηλεκτροψεκασμού διαβάστε: “Electrospray: Principles and Practice” Simon J. Gaskell, Journal of Mass Spectrometry, 32, 677-688 (1997).
- Markides, K. and Graslund, A., Mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) applied to biological macromolecules, Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry, 2002.
- Steve Nguyen and John B. Fenn, Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions, PNAS, vol. 104. no. 4, 1117, 2007
- Oliver Scherf - Clavel (PhD thesis), Impurity Profiling of Challenging Active Pharmaceutical Ingredients without Chromophore, 2016.
- Finnigan LCQ advantage – Training manual,
<https://www.cif.iastate.edu/sites/default/files/uploads/MS/LCQ/LCQ%20manual.pdf>
- LCQ Operation Course,
<https://www.concordia.ca/content/dam/artsci/research/cbams/docs/LCQ%20Operation%20Course.pdf>
- <https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/esi>