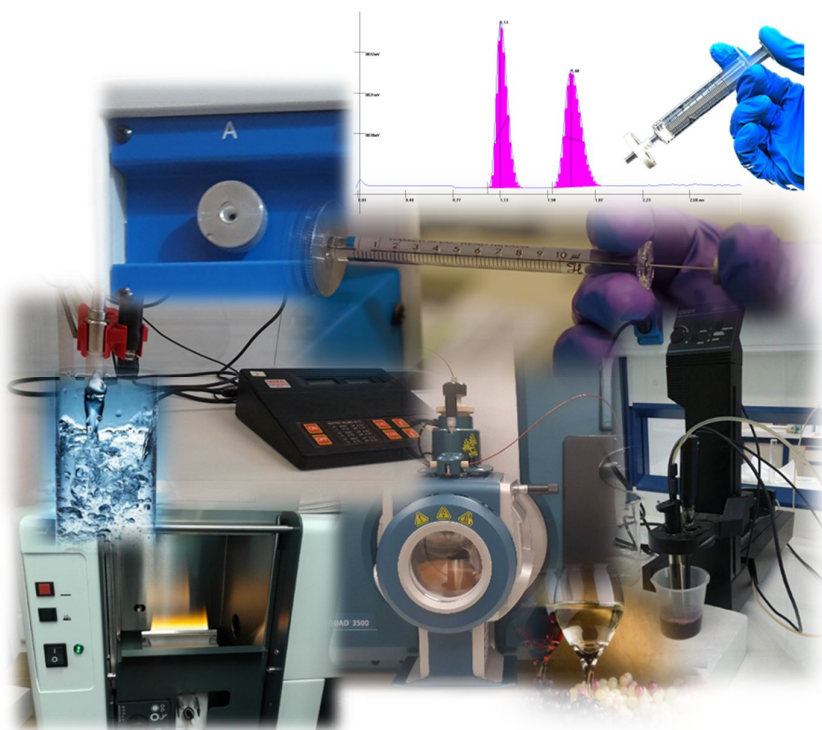


Εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας I & II

Εργαστηριακές Σημειώσεις & Πειραματικές ασκήσεις



Τμήμα Χημείας
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Γιώργος Κουβαράκης

Γιάννης Σαριδάκης

Νίκος Χανιωτάκης

Σπύρος Περγαντής

Ηράκλειο - 2024

Περιεχόμενα

Γενικές Πληροφορίες.....	1
Κανονισμός Εργαστηρίων.....	2
Το βιβλίο εργαστηρίου (Lab Book)	4
Αναφορά:	5
Εμφάνιση Αναφοράς:	5
Σφάλματα.....	6
Συστηματικά σφάλματα:	7
Τυχαία (ή ακαθόριστα) σφάλματα:	7
Σημαντικά και δεκαδικά ψηφία.....	8
Στατιστικά	10
• Μέση Τιμή (\bar{X}):	10
• Τυπική Απόκλιση (Standard Deviation - SD):	10
• Μέσος όρος πληθυσμού (μ):	11
• Τυπική απόκλιση της μέσης τιμής (Standard Error of the Mean - SEM):	12
• Κριτήρια για Απόρριψη Αμφίβολης Τιμής (Q-test):	12
Χρήσιμα Σημεία.....	15
Μονάδες Συγκέντρωσης Διαλύματος	15
Αραιώσεις	17
Διαλύματα ακριβούς συγκέντρωσης	17
Τιτλοδότηση – Ποτενσιομετρικές Τιτλοδοτήσεις	18
Σιφώνια:.....	20
Πιπέτες ακριβείας μεταβλητού όγκου (μικροσιφώνια):	21
Πιπέτες για πτητικά διαλύματα	25
Σύριγγα υγρών:	28
Ζυγοί ακριβείας.....	31

Φιάλες αερίων σε υψηλή πίεση.....	33
Διαγράμματα:	38
1.Εξίσωση 1 ^{ου} βαθμού (καμπύλη αναφοράς).....	38
2.Εξίσωση 2 ^{ου} βαθμού	38
3.Εύρεση τομής δύο ευθειών	39
4.Δημιουργία σιγμοειδούς καμπύλης.....	39
5.Δημιουργία διαγράμματος πρώτης παραγώγου	39
Περίγραμμα Ασκήσεων Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας I & II	40
Γενικές Εισηγήσεις	47
Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατού (UV – Vis).....	47
Ηλεκτρόδιο Υάλου	51
Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography - GC).....	53
1.Κινητή φάση (φέρον αέριο):	53
2.Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector):.....	54
3.Εσωτερικό πρότυπο (Internal Standard, IS):.....	56
4.Διαλύτης:	57
5.Αναλυτική στήλη:.....	57
6.Ανιχνευτής	60
7.Καταγραφικό	62
Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC)	63
Είδη υγρής χρωματογραφία	63
Ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας αποτελείται:	65
1.Κινητή φάση:	65
2.Αντλία:.....	66
3.Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector):.....	68
4.Στήλη:	70
5.Σύστημα καταστολής σήματος:.....	73

6.Ανιχνευτής:	74
7.Καταγραφικό.....	76
Ασκήσεις Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας I:.....	77
Άσκηση – Προσδιορισμός pKa του δείκτη bromothymol blue	77
Άσκηση – Ποτενσιομετρική μέτρηση του pH	86
Άσκηση – Ανάλυση Κρασιών	94
Άσκηση – Ανάλυση Λιπαρών Υλών - Ελαιόλαδο	117
Άσκηση – Αγωγιμομετρία.....	128
Άσκηση – Ανάλυση ιόντων K ⁺ στο νερό με επιλεκτικό Ηλεκτρόδιο	144
Άσκηση – Πολαρογραφικός προσδιορισμός ιόντων Cd ²⁺ και Pb ²⁺	152
Ασκήσεις Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας II:.....	165
Άσκηση – Αέρια Χρωματογραφία με ανιχνευτή Ιονισμού Φλόγας (GC-FID).....	165
Άσκηση – Αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή Θερμικής Αγωγιμότητας (GC-TCD).....	175
Άσκηση – Υγρή Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (RPLC).....	187
Άσκηση – Ιοντική Χρωματογραφία (IC).....	197
Άσκηση – Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης	208
Άσκηση – Προσδιορισμός συγκέντρωσης Φωσφόρου σε ποτά Κόλας.....	226
Άσκηση – Προσδιορισμός Σχετικής Μοριακής Μάζας (Mr) Πρωτεΐνης με την χρήση Φασματομετρίας Μάζας Ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS).....	234
Παράρτημα – Οδηγίες Λειτουργία Οργάνων	249
1) Πρόγραμμα INTEGRAL για τις ασκήσεις:	249
α. Ιοντική Χρωματογραφία	249
β. Υγρή Χρωματογραφία Αντίστροφη Φάσης.....	249
γ. Αέρια Χρωματογραφία με ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας	249
2) Λειτουργικό Chrom-Card για τηνΑέρια Χρωματογραφία (GC-FID):	252
3) Λειτουργία Ατομικής Απορρόφησης Agilent 55B	258
Βιβλιογραφία	262

Γενικές Πληροφορίες

Τα εργαστηριακά πειράματα σκοπεύουν στο να αναπτύξουν την ικανότητα των σπουδαστών στη ανάλυση δειγμάτων από διάφορες πηγές, στη λύση συνηθισμένων προβλημάτων που υπάρχουν στις φυσικοχημικές αναλύσεις και να εφαρμόσουν την διδασκόμενη αναλυτική θεωρία αποκτώντας την αντίστοιχη εργαστηριακή εμπειρία.

Είναι σπουδαίο να αναπτυχθεί η δυνατότητα στη σχεδίαση και αποπεράτωση των πειραμάτων με προσοχή και αποτελεσματικότητα.

Οι σπουδαστές εργάζονται στα εργαστήρια μόνον κατά τις ώρες λειτουργίας τους, για ειδικές περιπτώσεις διακανονισμοί πρέπει να γίνονται από πριν με τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.

Καθώς τα πειράματα γίνονται "κυκλικά" θα πρέπει να τηρείται η σειρά και η ημερομηνία που έχει καθοριστεί.

Κάθε φοιτητής έχει το δικό του lab book που θα πρέπει να το έχει μαζί του σε κάθε άσκηση. Σε αυτό θα αναφέρονται για την άσκηση που πραγματοποιείται, τα κύρια σημεία της θεωρίας και της οργανολογίας καθώς και λεπτομερής αναφορά στη πειραματική διαδικασία. Κατά τη διάρκεια εκτέλεση της άσκησης θα συμπληρώνετε από σχόλια και παρατηρήσεις που προκύπτουν καθώς επίσης από τις πειραματικές μετρήσεις. Το lab book είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για να είναι δυνατή η επανάληψη του πειράματος από εσάς ή από κάποιο τρίτο καθώς και για μελλοντικές χρήσεις και για το λόγο αυτό θα πρέπει να τηρείται και να συμπληρώνετε επαρκώς.

Οι πειραματικές τιμές θα παραδίδονται σε πρωτόκολλο που θα αναφέρει:

- Το τίτλο του πειράματος
- Την ημερομηνία διεξαγωγής του
- Το όνομα της ομάδας
- Τα ονόματα των φοιτητών
- Τις πειραματικές μετρήσεις

Παράδειγμα:

Πολυρογραφία	
Ημερομηνία:	/ /20
Ομάδα:	

Cd ²⁺ (ppb)	Cd ²⁺ (mm)	Pb ²⁺ (ppb)	Pb ²⁺ (mm)
blank		blank	
20		30	
30		45	
40		60	
50		75	
60		90	

Cd ²⁺ (ppb)	Cd ²⁺ (mm)	Pb ²⁺ (ppb)	Pb ²⁺ (mm)
blank		blank	
άγνωστο		άγνωστο	

Όνομα	Επίθετο	ΑΜ	Βαθμός

άγνωστο	ppb
Cd ²⁺	
Pb ²⁺	

Κανονισμός Εργαστηρίων

Κατά τη παρουσία στο Εργαστήριο:

Γενικοί κανόνες:

- Δεν παίρνεται περιττά προσωπικά αντικείμενα καθώς δημιουργούν πρόβλημα στην ελευθερία των κινήσεων.
- Απαγορεύεται το κάπνισμα, το φαγητό ή ποτό.
- Να χρησιμοποιούνται πάντα **προστατευτικά γυαλιά και μπλούζα εργαστηρίου**.
Οι φακοί επαφής απαγορεύονται.
- Προσοχή στη καθαριότητα του εργαστηρίου:
 - Αν ένα αντιδραστήριο χυθεί, πρέπει να καθαρίζεται αμέσως
 - Τα σκουπίδια να μπαίνουν στο δοχείο για τα ακάθαρτα αντιδραστήρια
 - Να διατηρείτε πάντα καθαρά, το πάγκο εργασίας, τα σκεύη καθώς και τα όργανα που χρησιμοποιείτε.
- Πριν την αναχώρησή σας να ελέγχετε ότι είναι κλειστές οι παροχές νερού, αερίων κ.τ.λ.
- Να γνωρίζετε που βρίσκονται το κουτί πρώτων βοηθειών, οι πυροσβεστήρες καθώς και τα ντους έκτακτης ανάγκης.
- Απαγορεύεται η είσοδος στο Εργαστήριο, σε άτομα που δεν έχουν σχέση με την εργασία.

Κατά τη διάρκεια του Πειράματος:

Χρήση οργάνων/σκευών/αντιδραστηρίων:

- Η χρήση των οργάνων του Εργαστηρίου απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή. Αν υπάρχει οποιαδήποτε αμφιβολία στη λειτουργία τους, απευθυνθείτε στον υπεύθυνο του Εργαστηρίου.
- Ελέγχετε τις ηλεκτρικές συσκευές αν βρίσκονται σε ασφαλή κατάσταση και τα καλώδια αν εφάπτονται με πηγές θερμότητας.
- Οι απαγωγοί πρέπει να παραμένουν καθαροί και να χρησιμοποιούνται μόνο για τη χρήση επικίνδυνων ή εύφλεκτων υλικών.
- Το απιονισμένο νερό πρέπει να τοποθετείτε στους υδροβολείς. Απαγορεύεται το πλύσιμο δοχείων κατευθείαν από το κεντρικό δοχείο αποθήκευσης.
- Το τελικό ξέπλυμα των γυαλικών γίνεται μόνο με απιονισμένο νερό, προσοχή όχι με χαρτί. Αν εσωτερικά υπάρχουν σταγόνες που θα επηρεάζουν, αυτές αφαιρούνται ξεπλένοντας με λίγο το διάλυμα που θα τοποθετηθεί ή με ξήρανση στο φούρνο.
- Στο φούρνο του Εργαστηρίου δεν πρέπει να τοποθετούνται κλειστά σκεύη καθώς και πλαστικά. Τα γυαλικά που είναι για ξήρανση θα πρέπει να πλένονται με απιονισμένο νερό και **όχι με ακετόνη**.
- Απαγορεύεται η χρήση σιφωνίων με το στόμα πάντα να χρησιμοποιείτε τα αντίστοιχα πουάρ.
- Ποτέ δεν επιστρέφονται αντιδραστήρια στις αρχικές τους φιάλες. Προσέχετε ώστε να παίρνετε τις απαιτούμενες ποσότητες που χρειάζεστε.
- Αποφεύγετε την επαφή με κάθε χημική ένωση ή διάλυμα .
- Πολλές τοξικές ουσίες απορροφούνται από το δέρμα γι' αυτό χρησιμοποιείτε γάντια σε ανάλογες περιπτώσεις.
- Όταν ένα αντιδραστήριο τελειώνει, να ενημερώνετε τον υπεύθυνο του Εργαστηρίου.

Το βιβλίο εργαστηρίου (Lab Book)

Σκοπός του βιβλίου εργαστηρίου είναι με βάση αυτό κάποιος άλλος να μπορεί να αναπαράγει το πείραμα και τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν με αυτό. Για τον λόγο αυτό θα πρέπει να περιέχει όλες τις απαιτούμενες πληροφορίες ώστε να είναι δυνατή η αναπαραγωγή του πειράματος καθώς και ο λόγος πραγματοποίησής του

Να έχει σκληρό εξώφυλλο για την προστασία του στις συνθήκες εργαστηρίου και κατά προτίμηση να είναι σε μικρό ή μεσαίο μέγεθος ώστε να είναι πρακτικό στην χρήση του.

Θα πρέπει να είναι μόνο για τα εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας I και II και να μην περιλαμβάνει σημειώσεις άλλων εργαστηρίων ή μαθημάτων.

Θα περιλαμβάνει

- **Τον τίτλο της άσκησης**
- **Τον σκοπό της άσκησης**
- **Θεωρία - Οργανολογία:** Περιγραμματακά ένα μικρό μέρος της θεωρίας, μόνο ότι είναι σημαντικό και στην οργανολογία τις βασικές αρχές του κάθε οργάνου περιγραμματακά.
- **Πειραματικό:** Αναλυτική περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας, να περιλαμβάνονται οι παράμετροι των οργάνων, οι παρασκευές των διαλυμάτων, οι αραιώσεις και γενικά όλα τα βήματα ώστε να μπορεί να αναπαραχθεί πιστά το πείραμα.
- **Αποτελέσματα:** να γράφονται όλα τα αποτελέσματα του πειράματος

Κατά την διάρκεια του πειράματος συμπληρώνεται με σχόλια και παρατηρήσεις

Αναφορά:

- Η αναφορά γίνεται ανά ομάδα.
- Θα είναι σε ηλεκτρονική μορφή, σε αρχείο pdf ή word ή με αντίστοιχο πρόγραμμα.
- Η παράδοση της γίνεται με αποστολή e-mail: gkouvarakis@uoc.gr
καθώς και στα υπόλοιπα μέλη της ομάδας.
- Η παράδοση αναφορά θα είναι **έως 1 εβδομάδα μετά τη διεξαγωγή του πειράματος**
- Καθυστερημένη αναφορά θα έχει:

μείωση: 1 (ένα) βαθμό ανά ημέρα, μέχρι 4 ημέρες

μετά το πέρας των 4 ημερών η αναφορά δεν θα γίνεται αποδεκτή

Εμφάνιση Αναφοράς:

1. Περίληψη

2. **Οργανολογία:** Περιγραμματακά μόνο ότι είναι σημαντικό και στην οργανολογία τις βασικές αρχές του κάθε οργάνου περιγραμματακά.

3. Πειραματικό μέρος

- a) Αντιδραστήρια, γυαλικά, σκεύη, κλπ.
- b) Παράμετροι οργάνου (σε όποια άσκηση είναι απαραίτητο)
- c) Πειραματική διαδικασία
(Περιγραφή πειράματος, δημιουργία διαλυμάτων και αραιώσεων)
- d) Αποτελέσματα - Ανάλυση:
 - i. Μετρήσεις
 - ii. Υπολογισμοί - Στατιστικά - Διαγράμματα

4. Σχόλια - Σφάλματα

5. Συμπεράσματα

6. Βιβλιογραφία

Σφάλματα

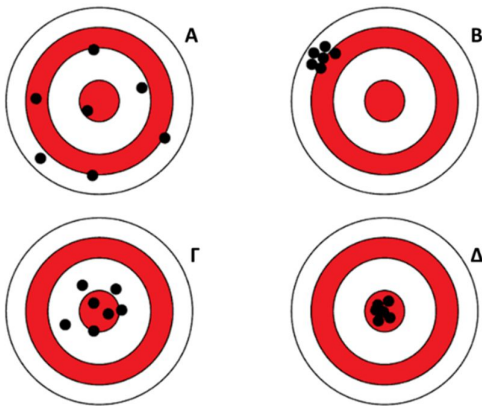
Κάθε μέτρηση που πραγματοποιείται είναι το αποτέλεσμα της **ακρίβειας (accuracy)** και της **επαναληψιμότητας (precision)**.

Ακρίβεια (accuracy): Η ακρίβεια ενός αναλυτικού αποτελέσματος χαρακτηρίζει τη συμφωνία της πειραματικής τιμής προς την αληθινή τιμή

Επαναληψιμότητα (precision): Η επαναληψιμότητα μιας σειράς μετρήσεων χαρακτηρίζει τη συμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ τους, δηλαδή δείχνει πόσο κοντά μεταξύ τους βρίσκονται τα αποτελέσματα. Καλή επαναληψιμότητα δηλώνει ότι η διασπορά των μετρήσεων είναι μικρή, δηλαδή τα αποτελέσματα βρίσκονται κοντά το ένα με το άλλο.

Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα αποτελούν το μέτρο της αξιοπιστίας ενός αναλυτικού αποτελέσματος και γενικότερα μιας αναλυτικής μεθόδου. Η ακρίβεια εκφράζεται συνήθως με το σφάλμα, ενώ η επαναληψιμότητα εκφράζεται με τη τυπική απόκλιση. Καλή επαναληψιμότητα δεν συνεπάγεται αναγκαστικά και καλή ακρίβεια, γιατί είναι δυνατό να υπεισέρχεται στις μετρήσεις συστηματικό σφάλμα, που να επηρεάζει εξίσου όλες τις μετρήσεις, χωρίς να αλλοιώνει με αυτόν το τρόπο την επαναληψιμότητα τους. Κακή επαναληψιμότητα συνήθως συνεπάγεται κακή ακρίβεια, που μπορεί να βελτιωθεί με εκτέλεση μεγάλου αριθμού μετρήσεων, με τη προϋπόθεση ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα. Καλή ακρίβεια προϋποθέτει συνήθως και καλή επαναληψιμότητα.

Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα των στόχων:



Παράδειγμα	Ακρίβεια	Επαναληψιμότητα
A	κακή	κακή
B	κακή	καλή
Γ	καλή	κακή
Δ	καλή	καλή

Στο παράδειγμα A υπάρχει κακή ακρίβεια και επαναληψιμότητα, στο B καλή επαναληψιμότητα αλλά κακή ακρίβεια, στο Γ καλή ακρίβεια αλλά καλή επαναληψιμότητα και στο Δ καλή τόσο ακρίβεια όσο και επαναληψιμότητα.

**Η ακρίβεια επηρεάζεται από τα συστηματικά σφάλματα
ενώ η επαναληψιμότητα από τα τυχαία σφάλματα.**

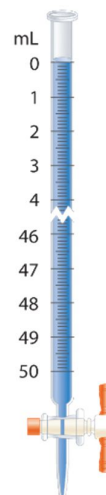
Έτσι, εάν η πραγματική μέτρηση έχει υψηλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα, το αποτέλεσμα θα είναι απαλλαγμένο από σφάλματα.

Συστηματικά σφάλματα:

Είναι τα σφάλματα του οργάνου που οφείλονται σε ατέλειες στον εξοπλισμό, το σφάλμα αυτό μπορεί να είναι ή μόνο θετικό ή μόνο αρνητικό. Το σφάλμα αυτό είναι σταθερό, επανάληψη της μέτρησης, θα έχει το ίδιο σφάλμα.

Παραδείγματα:

- στη κακή βαθμονόμηση των οργάνων
 - Σφάλμα στη βαθμονόμηση ενός σιφωνίου
 - Σφάλμα στη βαθμονόμηση μιας προχοϊδας
 - Σφάλμα ενός pH-μέτρου λόγω κακής βαθμονόμησης κ.α.
- στη λανθασμένη λειτουργία των οργάνων
- σε εξωτερικά αίτια που μπορεί να αλλάξουν τα αποτελέσματα του πειράματος (υγρασία, πίεση, θερμοκρασία κ.λπ.)



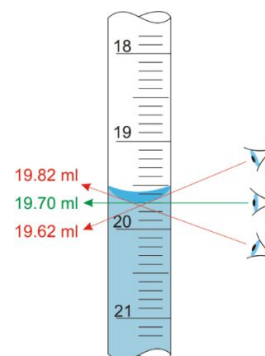
Το συστηματικό σφάλμα είναι σταθερό, μπορεί να ανιχνευθεί και να διορθωθεί

Τυχαία (ή ακαθόριστα) σφάλματα:

Είναι τα σφάλματα που δημιουργούνται από μη ελεγχόμενες παραμέτρους σε μια μέτρηση, έχει την ίδια πιθανότητα να είναι θετικό ή αρνητικό. Το τυχαίο σφάλμα δεν είναι σταθερό, επανάληψη της μέτρησης θα δώσει διαφορετική τιμή στο σφάλμα.

Παραδείγματα:

- Μη καθαρά γυαλικά ή αντιδραστήρια
- Σφάλματα που οφείλονται στο παρατηρητή
 - Λάθος στην ανάγνωση της ένδειξης της προχοϊδας
 - Λάθος στη ποσότητα που προστέθηκε



Το τυχαίο σφάλμα δεν μπορεί να εξαλειφθεί αλλά μπορεί να μειωθεί με πολλές επαναλήψεις των μετρήσεων στο πείραμα

Ένας εύκολος τρόπος να διακρίνεται αν ένα σφάλμα είναι συστηματικό ή τυχαίο είναι ότι συνήθως τα συστηματικά σφάλματα οφείλονται στον εξοπλισμό ενώ τα τυχαία στον αναλυτή.

Σημαντικά και δεκαδικά ψηφία

Σημαντικά Ψηφία:

Οι υπολογισμοί στις πρακτικές επιστήμες (όπως στη χημεία, φυσική κ.λπ.) γίνονται με τιμές που έχουν τις ρίζες τους σε πειραματικές μετρήσεις και όλες οι πειραματικές μετρήσεις περιέχουν ένα ποσοστό λάθους. Πάντα και ιδιαίτερα στην αναλυτική χημεία, πρέπει οι υπολογισμοί να γίνονται με το μεγαλύτερο αριθμό σημαντικών ψηφίων (αλλά όχι περισσότερα) που επιτρέπει η πειραματική ακρίβεια.

Ο επιστήμονας δείχνει πόσο καλή είναι η τιμή που παρουσιάζει με το να αναφέρει όλα τα ψηφία που γνωρίζονται συν ένα. Τα γνωστά συν το υπό ερώτηση τελευταίο ψηφίο, είναι τα σημαντικά ψηφία. Παραδείγματος χάριν, ένας όγκος 35.26 ml περιέχει τέσσερα σημαντικά ψηφία, εκ των οποίων τα τρία (3,5, και 2) είναι γνωστά με σιγουριά 100% ενώ το τέταρτο (6) όχι.

Οι κύριοι κανόνες είναι:

1. Οι αριθμητικοί συντελεστές και οι φυσικές σταθερές θεωρείται ότι έχουν άπειρο πλήθος σημαντικών ψηφίων.
2. Παρουσία υποδιαστολής, ως τελευταίο σημαντικό ψηφίο καταμετράται το δεξιότερο ψηφίο, ακόμα κι αν είναι το μηδέν.
3. Τα μηδενικά ψηφία πριν από το πρώτο αριθμό δεν υπολογίζονται.
4. **Λογάριθμοι:** Όσα σημαντικά ψηφία έχει ο αριθμός που λογαριθμείται, τόσα ψηφία κρατάτε στη μάντισσα.

Παραδείγματα:

111.111 6 σημαντικά ψηφία

1110 4 σημαντικά ψηφία

1110.0 5 σημαντικά ψηφία

7.260x10¹⁴ 4 σημαντικά ψηφία

0.0001 1 σημαντικό ψηφίο

0.0100 3 σημαντικά ψηφία

$\log(339) = 2.5301997 \sim 2.530$ κρατάτε 3 ψηφία στη μάντισσα

Για να αποφεύγονται τα λάθη

ένας ασφαλής τρόπος είναι να δίνονται τα αποτελέσματα σε δυνάμεις του 10.

Πρόσθεση και Αφαίρεση

Στις προσθέσεις και στις αφαιρέσεις ο κανόνας είναι ότι το τελικό αποτέλεσμα με θα έχει τόσα δεκαδικά ψηφία όσα είχε και η τιμή με τα λιγότερα δεκαδικά.

Παραδείγματα:

8.91 – 6.434 = 2.476 ~ 2.75 (δύο δεκαδικά)

6.82 – 6.731 = 0.079 ~ 0.08 (δύο δεκαδικά)

3.7 + 0.682 = 4.382 ~ 4.4 (ένα δεκαδικό)

Πολλαπλασιασμός και Διαίρεση

Στους πολλαπλασιασμούς και στις διαιρέσεις το τελικό αποτέλεσμα θα έχει τόσα σημαντικά ψηφία όσα είχε και η τιμή με τα **λιγότερα σημαντικά ψηφία**.

Παραδείγματα:

$$2.2 \times 4 = 8.8 \sim 9 \quad (\text{ένα σημαντικό ψηφίο})$$

$$\frac{5.61 \times 7.891}{9.1} = 4.8647 \sim 4.9 \quad (\text{δύο σημαντικά ψηφία})$$

$\frac{5.61 \times 7.891}{9} = 4.9187 \sim 4.92$ (τρία σημαντικά ψηφία, το 9 θεωρείται αρθρικός συντελεστής και έχει άπειρα σημαντικά ψηφία, κανόνας 4)

Σύνθετες πράξεις

Προσοχή: δεν στρογγυλοποιείται στα ενδιάμεσα στάδια αλλά παρακολουθείται το **σωστό αριθμό σημαντικών ψηφίων** και στρογγυλοποιείται μόνο στο **τελικό αποτέλεσμα**. Αν κάνετε στρογγυλοποίηση σε κάθε βήμα τότε το τελικό αποτέλεσμα θα είναι λάθος.

Στρογγυλοποίηση

Συνήθως το αριθμητικό αποτέλεσμα των πράξεων δίνει ένα αριθμό με πολλά σημαντικά και δεκαδικά ψηφία. Κρατάτε τόσα σημαντικά και δεκαδικά ψηφία στο τελικό αποτέλεσμα σύμφωνα με τους παραπάνω κανόνες. Όμως η τιμή του τελευταίου ψηφίου επηρεάζεται από τα επόμενα σύμφωνα με τους κανόνες στρογγυλοποίησης.

Για τη στρογγυλοποίηση ο αριθμός μετά το τελευταίο αριθμό που έχει κρατηθεί γίνεται:

1. Αν έχει τη τιμή 1, 2, 3, 4 δεν επηρεάζεται και μένει ο ίδιος
2. Αν έχει τη τιμή 6, 7, 8, 9 στρογγυλοποιείται προς τα πάνω
3. Αν έχει τη τιμή 5:
 - a. Αν δεν έχει υπάρχει άλλος αριθμός μετά το 5 τότε:
 - I. αν το προηγούμενο ψηφίο είναι άρτιος παραμένει όπως είναι
 - II. αν το προηγούμενο ψηφίο είναι περιττός τότε αυξάνεται κατά μία μονάδα
 - b. Όμως αν υπάρχει άλλος αριθμός μετά το 5 τότε στρογγυλοποιείται προς τα πάνω

Παραδείγματα:

αν το αποτέλεσμα έχει δύο σημαντικά ψηφία τότε γίνεται

$$4.382 \sim 4.4 \quad (\text{κανόνας 2})$$

$$2.475 \sim 2.48 \quad (\text{κανόνας 3. a. II})$$

$$2.4851 \sim 2.49 \quad (\text{κανόνας 3. b})$$

Ισχύει ο κανόνας:

Το τελικό αποτέλεσμα δεν μπορεί να έχει μεγαλύτερη ακρίβεια από την ακρίβεια των αρχικών μετρήσεων

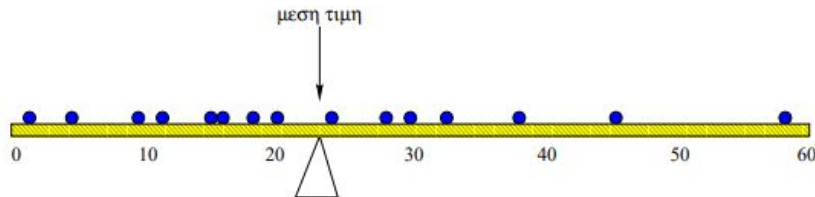
Στατιστικά

- **Μέση Τιμή (\bar{X}):**

Η μέση τιμή μπορεί να θεωρηθεί το 'κέντρο ισορροπίας' των δεδομένων.

Παράδειγμα:

Για να γίνει κατανοητή η φυσική της σημασία ως θεωρηθεί μία σανίδα πάνω στην οποία σκορπίζονται ένα αριθμός από σφαιρίδια ίδιας μάζας. Το σημείο στήριξης της σανίδας (ώστε να ισορροπεί σε οριζόντια θέση) είναι η μέση τιμή της θέσης των σφαιριδίων πάνω στη σανίδα.



Ο μαθηματικός τύπος είναι το άθροισμα των τιμών διαιρούμενο με το πλήθος τους.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n}$$

Προσοχή:

η ακρίβεια του τελικού αποτελέσματος δεν μπορεί να είναι μεγαλύτερη από την ακρίβεια της αρχικής μέτρησης.

Παράδειγμα:

Γίνονται 3 μετρήσεις pH στο ίδιο δείγμα με την χρήση ενός pH-μέτρου και δίνει 6.2, 6.4 και 6.5

Η μέση τιμή θα είναι:

$$\bar{X} = \frac{6.2+6.4+6.5}{3} = \frac{19.1}{3} = 6.3666$$

Σύμφωνα με τους κανόνες το τελικό αποτέλεσμα θα έχει 3 σημαντικά ψηφία οπότε θα είναι 6.37, όμως δεν μπορεί η ακρίβεια του αποτελέσματος να είναι μεγαλύτερη από την ακρίβεια του οργάνου, το pH-μετρο ακρίβεια ενός δεκαδικού οπότε και το τελικό αποτέλεσμα θα πρέπει να δοθεί με την ίδια ακρίβεια, έτσι το pH του δείγματος θα είναι **6.4**.

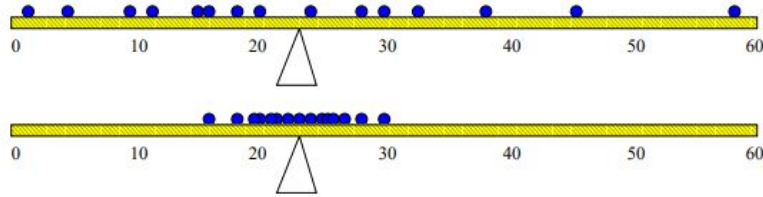
- **Τυπική Απόκλιση (Standard Deviation - SD):**

Η τυπική απόκλιση S_x εκφράζει (όπως δηλώνει η ονομασία της), τη απόκλιση των δεδομένων από τη μέση τιμή, δηλαδή μέχρι πόσο περίπου αναμένεται μια τυπική τιμή της X να απέχει από τη μέση τιμή.

Σε δύο πειράματα οι μετρήσεις μπορεί να έχουν την ίδια μέση τιμή αλλά να διαφέρουν σημαντικά ως προς τη διασπορά τους, στο ένα πείραμα οι μετρήσεις είναι περισσότερο συγκεντρωμένες γύρω από τη μέση τιμή από το άλλο. Προκύπτει η ανάγκη ύπαρξης ενός τρόπου υπολογισμού της διακύμανσης των τιμών γύρω από τη μέση τιμή. Η τυπική απόκλιση που εκφράζει το μέτρο διασποράς γύρω από τη μέση τιμή.

Παράδειγμα:

Στη σανίδα με τα βαριδία, έχουν το ίδιο κέντρο ισορροπίας (μέση τιμή) αλλά διαφορετική κατανομή των βαριδιών πάνω στη σανίδα, στη πρώτη έχουν μεγαλύτερη διασπορά από ότι στη δεύτερη που είναι πιο συγκεντρωμένα στη μέση τιμή. Στη πρώτη θα υπάρξει μεγαλύτερη τυπική απόκλιση από τη δεύτερη.



<https://users.auth.gr/dkugiu/Teach/CivilEngineer/descriptive.pdf>

Ο μαθηματικός τύπος είναι η τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων της διαφοράς της κάθε τιμής από τη μέση τιμή, προς το βαθμός ελευθερίας. Βαθμός ελευθερίας είναι ο αριθμός των μετρήσεων μείον ένα ($n - 1$):

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Ισχύει ο κανόνας ότι όταν η τυπική απόκλιση δίνεται ως \pm της μέσης τιμής θα πρέπει να έχει ίδιο αριθμό δεκαδικών ψηφίων με τη μέση τιμή.

- **Μέσος όρος πληθυσμού (μ):**

Εκτός από τον μέσο όρο του δείγματος (\bar{x}) υπάρχει και ο μέσος όρος πληθυσμού (μ):

στο μέσο όρο δείγματος (\bar{x}) το n είναι ο αριθμός των δειγμάτων:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n}$$

στο μέσο όρο του πληθυσμού (μ) το N είναι ο αριθμός των δειγμάτων σε όλο τον πληθυσμό:

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_N}{N}$$

Παράδειγμα: σε ένα πληθυσμό από 100 δείγματα, μετρούνται μόνο τα 30 δείγματα τυχαία, η μέση τιμή τους είναι ο μέσος όρος του δείγματος, αν μετρηθούν όλα τα δείγματα και τα 100, η μέση τιμή τους είναι ο μέσο όρος του πληθυσμού.

Ο μέσος όρος του δείγματος χρησιμοποιείται κυρίως για την εκτίμηση του μέσου όρου πληθυσμού όταν ο μέσος όρος του πληθυσμού δεν είναι γνωστός καθώς ο μέσος όρος δείγματος και ο μέσο όρος του πληθυσμού αναμένετε να έχουν την ίδια τιμή. Για την διασπορά του πληθυσμού χρησιμοποιείται η τυπική απόκλιση της μέσης τιμής

- **Τυπική απόκλιση της μέσης τιμής (Standard Error of the Mean - SEM):**

Είναι η τυπική απόκλιση διά τη τετραγωνική ρίζα των αριθμών των μετρήσεων (N):

$$S\bar{X} = \frac{Sx}{\sqrt{n}}$$

το SEM είναι ένας ενδιάμεσος όρος στον υπολογισμό του διαστήματος εμπιστοσύνης του μέσου όρου του πληθυσμού.

Παράδειγμα: Σε μια μελέτη η μέση τιμή των δειγμάτων που αναλύονται είναι μόνο μια προσέγγιση της μέσης τιμής του πληθυσμού. Αν η μελέτη επαναληφθεί πολλές φορές θα υπάρχουν διαφορετικές τιμές της μέση τιμή του δείγματος κάθε φορά. Το SEM περιγράφει την διασπορά αυτών των μέσων τιμών, μια μεγάλη τιμή δείχνει ότι οι τιμές αυτές έχουν μια μεγάλη διασπορά ενώ μια μικρή τιμή δείχνει ότι είναι ομαδοποιημένοι. Επομένως το SEM είναι ένα μέτρο της ακρίβειας του μέσου όρου των δειγμάτων της μελέτης.

Έτσι όταν σαν αποτέλεσμα δίνεται η μέση τιμή των δειγμάτων η διασπορά τους θα δίνεται με την τυπική απόκλιση:

$$\bar{x} \pm SD$$

Ενώ όταν το αποτέλεσμα δίνεται η μέση τιμή του πληθυσμού η διασπορά τους θα δίνεται μέσω της τυπική απόκλιση της μέση τιμής σύμφωνα με το τύπο:

$$\mu = \bar{x} \pm t \cdot S\bar{x}$$

όπου t είναι το student-t και παίρνει τιμές ανάλογα με τον αριθμό των μετρήσεων στο όριο εμπιστοσύνης 95% είναι:

N	2	3	4	5	6	7	8	9	10
t _{95%}	12.70	4.30	3.18	2.78	2.57	2.45	2.37	2.31	2.26

Ισχύει ο κανόνας ότι όταν δίνεται ως \pm της μέσης τιμής θα πρέπει να έχει ίδιο αριθμό δεκαδικών ψηφίων με τη μέση τιμή.

- **Κριτήρια για Απόρριψη Αμφίβολης Τιμής (Q-test):**

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων όταν τα δεδομένα περιέχουν μια τιμή η οποία φαίνεται να διαφέρει πολύ από τις υπόλοιπες, ή από το μέσο όρο, πρέπει να υπάρξει η ερώτηση εάν η τιμή αυτή πρέπει να κρατηθεί ή όχι. Το Q-Test, είναι στατιστικό κριτήριο και μπορεί να βοηθήσει για να αποφασιστεί αν θα κρατηθεί ή όχι η υπό αμφισβήτηση τιμή.

Αυτό το τεστ εφαρμόζεται ως ακολούθως :

- Αν $X_{\text{αμφιβ.}}$ είναι η αμφίβολη τιμή, τοποθετούνται όλα τα δεδομένα με αύξουσα σειρά,
- Υπολογίζεται το $Q_{\text{πειραματικό}}$

$$Q_{\text{πειραματικό}} = \frac{|X_{\text{αμφιβ}} - X_{\text{πλησιεστ}}|}{X_{\text{μεγ.}} - X_{\text{ελαχ.}}}$$

- Εάν $Q_{\text{πειραματικό}} > Q_{\text{θεωρητικό}}$ τότε η τιμή απορρίπτεται
- Το Q-test δεν πρέπει να χρησιμοποιείται περισσότερο από δυο φορές συνεχώς.
- Συνήθως χρησιμοποιείται το 90% κριτήριο

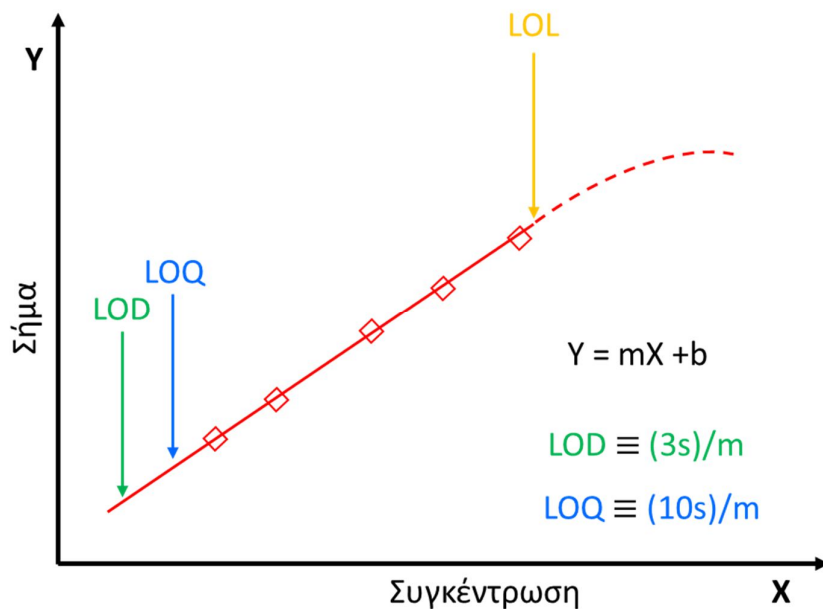
Q θεωρητικό		
N	90%	95%
3	0.941	0.970
4	0.765	0.829
5	0.642	0.710
6	0.560	0.620
7	0.507	0.568

Όριο Ανίχνευσης (LOD) Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ) και Όριο Γραμμικότητας (LOL)

Σε μια καμπύλη αναφοράς στον άξονα των X τοποθετούνται οι συγκεντρώσεις του αναλυτή και στον άξονα των Y οι μετρήσεις. Η εξίσωση που προκύπτει με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων δίνει μια εξίσωση πρώτου βαθμού που έχει την μορφή:

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

όπου: **m** η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης
b η τεταγμένη



➤ Ευαισθησία (Sensitivity, m):

Είναι η μεταβολή του σήματος προς την μεταβολή της συγκέντρωσης του αναλυτή, δηλαδή είναι η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης. Δίνει την ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει μικρές διαφορές

στην αναλυόμενη ουσία, όσο πιο απότομη είναι η κλίση τόσο πιο ευαίσθητη είναι η μέθοδος καθώς μικρή αλλαγή στη συγκέντρωση θα έχει μεγάλη μεταβολή στο σήμα

Ευαισθησία = κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης

➤ **Όριο Ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD):**

Είναι η μικρότερη ποσότητα ουσίας που μπορεί να ανιχνευθεί με την συγκεκριμένη μέθοδο. δίνει σήμα σημαντικά διαφορετικό από το λευκό, η τιμή αυτή δεν αποτελεί αξιόπιστη μέτρηση, είναι απλά μία τιμή συγκέντρωσης πάνω από αυτή του τυφλού.

$$\text{Όριο ανίχνευσης} \equiv \frac{3 \cdot s}{m}$$

όπου: m η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης
 s η τυπική απόκλιση της κλίσης

➤ **Όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ):**

Είναι η μικρότερη ποσότητα που μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια, δηλαδή να προσδιοριστεί ποσοτικά με αποδεκτή ακρίβεια και επαναληψιμότητα.

$$\text{Όριο ποσοτικοποίησης} \equiv \frac{10 \cdot s}{m}$$

όπου: m η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης
 s η τυπική απόκλιση της κλίσης

➤ **Όριο γραμμικότητας (limit of linearity, LOL):**

Είναι η συγκέντρωση από την οποία αποκλίνει η καμπύλη βαθμονόμησης από την γραμμικότητα.

Όταν δεν υπολογίζεται το όριο γραμμικότητας, τότε ως πάνω όριο θεωρείται η τιμή του μεγαλύτερου προτύπου της καμπύλης Βαθμονόμησης.

Γενικά ισχύει ότι σε ένα άγνωστο δείγμα αν η τιμή του αποτελέσματος είναι:

- **Μικρότερη από το όριο ανίχνευσης:**
τότε ως αποτέλεσμα δίνεται το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, δεν μπορεί να δοθεί τιμή μικρότερη από αυτό.
- **Μεγαλύτερη από το όριο ανίχνευσης αλλά μικρότερη από το όριο ποσοτικοποίησης**
τότε η τιμή του αποτελέσματος δεν έχει μεγάλη ακρίβεια, δεν είναι πολύ αξιόπιστη, δίνεται όμως ως αποτέλεσμα καθώς είναι μεγαλύτερη από το όριο ανίχνευσης. Κανονικά θα πρέπει είτε με κάποιο τρόπο να αυξηθεί το σήμα του άγνωστου δείγματος ώστε το αποτέλεσμα να είναι μεγαλύτερο από το όριο ποσοτικοποίησης είτε να τροποποιηθεί η μέθοδος ανάλυσης ώστε το όριο ποσοτικοποίησης να είναι μικρότερο.
- **Μεγαλύτερη από το όριο ποσοτικοποίησης και μικρότερη από το μεγαλύτερο πρότυπο της καμπύλης βαθμονόμησης**

τότε η τιμή του αποτελέσματος έχει την ακρίβεια της μεθόδου, θεωρείται αξιόπιστη και δίνεται κανονικά.

- **Μεγαλύτερη από το μεγαλύτερο πρότυπο της καμπύλης βαθμονόμησης**

τότε η τιμή του αποτελέσματος δεν έχει μεγάλη ακρίβεια, δεν είναι πολύ αξιόπιστη, δίνεται όμως ως αποτέλεσμα καθώς είναι μεγαλύτερη από το όριο ανίχνευσης. Κανονικά θα πρέπει να δημιουργηθεί μια νέα καμπύλη βαθμονόμησης με μεγαλύτερα πρότυπα ώστε να καλύπτουν τις συγκεντρώσεις του άγνωστου δείγματος.

Χρήσιμα Σημεία

Μονάδες Συγκέντρωσης Διαλύματος

Στα διαλύματα υπάρχουν πολλές μορφές με την οποία εκφράζεται η συγκέντρωση του διαλύματος. Ο αναλυτής θα πρέπει με ευκολία να μπορεί να μετατρέψει από τη μια μορφή σε μια άλλη ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε πειράματος. Παρακάτω παρουσιάζονται οι βασικές μονάδες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται:

- **Molarity (M):** Μοριακότητα όταν η ουσία χρησιμοποιείται με τη μορφή μορίων δηλ. είναι τα mol διαλυμένης ουσίας που περιέχονται σε 1 lit υδάτινου διαλύματος

$$M = \frac{\text{αριθμός mol διαλυμένης ουσίας}}{1 \text{ lit διαλύματος νερού}}$$

- **Normality (N):** Κανονικότητα όταν η ουσία χρησιμοποιείται με τη μορφή ιόντων δηλ. είναι τα γραμμοϊσοδύναμα (eq) διαλυμένης που περιέχονται σε 1 lit υδάτινου διαλύματος.

$$N = \frac{\text{αριθμός (eq)ισοδυνάμων διαλυμένης ουσίας}}{1 \text{ lit διαλύματος νερού}}$$

- **Επί τοις εκατό:**

- **% w/w** (περιεκτικότητα % βάρος κατά βάρος)
Εκφράζει τα g διαλυμένης ουσίας που περιέχονται σε 100 g διαλύματος
- **% w/v** (περιεκτικότητα % βάρος κατά όγκο)
Εκφράζει τα g διαλυμένης ουσίας που περιέχονται σε 100 ml διαλύματος
- **% v/v** (περιεκτικότητα % όγκο κατά όγκο)
Εκφράζει τα ml διαλυμένης ουσίας που περιέχονται σε 100 ml διαλύματος

- **Μορφές του τύπου μάζα προς όγκο:**

- **g/L** (gr διαλυμένης ουσίας ανά λίτρο δείγματος)
- **mg/ml** (mg διαλυμένης ουσίας ανά ml διαλύματος)
- **μg/l** (μl διαλυμένης ουσίας ανά λίτρο διαλύματος)

- **Οι εκφράσεις "μέρη στο..." (parts per..., pp...)**

- **ppm** (parts per million, μέρη στο εκατομμύριο)
αντιστοιχεί σε καθαρό αριθμό 10^{-6}
- **ppb** (parts per billion, μέρη στο δισεκατομμύριο)
αντιστοιχεί σε καθαρό αριθμό 10^{-9}
- **ppt** (parts per trillion, μέρη στο τρισεκατομμύριο)
αντιστοιχεί σε καθαρό αριθμό 10^{-12}

Μόνο στα υδατικά διαλύματα επειδή η πυκνότητα του νερού είναι 1 kg/l ισχύει:

- το **1 ppm** αντιστοιχεί σε **1 mg/L**
- το **1 ppb** αντιστοιχεί σε **1 µg/L**
- το **1 ppt** αντιστοιχεί σε **1 ng/L**

Παράδειγμα 1: Για να παρασκευαστεί ένα πρότυπο διάλυμα ιόντων Na⁺, ζυγίζονται 0.0250 gr NaCl και διαλύονται σε 250 ml νερού. Ποια είναι η συγκέντρωση των ιόντων Na⁺ σε ppm; Δίνονται το μοριακό βάρος του NaCl 58.44, και τα ατομικά βάρη Na=22.99.

Απάντηση: Ζυγίζονται 0.0250 gr NaCl σε 250 ml δηλ. 0.250 lit, απιονισμένο νερό (διάλυμα Α) οπότε:

$$C_A = m/v = 0.0250 \text{ gr}/0.250 \text{ lit} = 0.100 \text{ gr/lit NaCl}$$

$$\text{Διαιρώντας με το MW του NaCl γίνεται } C_B = 0.100/58.44 \text{ mole/lit} = 0.00171 \text{ M NaCl}$$

Τα mole NaCl είναι ίδια με τα mole Na (έχει πλήρη διάσταση σε υδατικό διάλυμα) οπότε θα είναι:

0.00171 M Na. Πολλαπλασιάζοντας με το ατομικό βάρος του Na τα mole γίνονται μάζα, οπότε:

$$0.00171 * 22.99 \text{ gr/lit} = 0.03934 \text{ gr/lit Na} \text{ ή αλλιώς } 39.34 \text{ mgr/lit Na}$$

Στα υδατικά διαλύματα ισχύει ότι **1 ppm = 1 mgr/lit** οπότε η συγκέντρωση των ιόντων Na θα είναι 3.934 ppm.

Παράδειγμα 2: Ζυγίζονται 0.5 mg πρωτεΐνης και προστίθενται 5 ml μεθανόλης, 0.5 ml οξικού οξέος και το διάλυμα αραιώνεται με απιοντισμένο νερό σε τελικό όγκο 50 ml. Ποια είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε ppm; Δίνονται οι πυκνότητες σε Kg/l: για το H₂O 1.000, την MeOH 0.792 και για το CH₃COOH 1.049.

Απάντηση: Ζυγίζονται 0.5 mg πρωτεΐνης σε τελικό όγκο διαλύματος 50 ml (0.050 lit) οπότε:

$$C = m/v = 0.5 \text{ mg}/0.050 \text{ lit} = 10 \text{ mg/lit πρωτεΐνης}$$

Όμως το τελικό διάλυμα δεν είναι υδατικό, περιέχει ποσότητες οργανικών διαλυτών (μεθανόλη και οξικού οξέος) οπότε δεν ισχύει ο κανόνας 1 mg/lit = 1 ppm, αυτός ισχύει μόνο τα υδατικά διαλύματα λόγω του ότι η πυκνότητα του νερού είναι 1.00 kg/lit. Όταν το διάλυμα δεν είναι υδατικό ή είναι μίγμα διαλυτών, θα πρέπει να υπολογιστεί η πυκνότητα του τελικού διαλύματος. Θεωρώντας ότι η διάλυση της πρωτεΐνης δεν επηρεάζει τον τελικό όγκο του διαλύματος, τότε από τα 50 ml του διαλύματος τα 5 ml θα είναι η μεθανόλη, τα 0.5 ml το οξικό οξύ και τα υπόλοιπα (44.5 ml) θα είναι το απιοντισμένο νερό. Οπότε η πυκνότητά του τελικού διαλύματος θα είναι:

$$\begin{aligned} D &= (D_{\text{MeOH}} * V_{\text{MeOH}} + D_{\text{CH}_3\text{COOH}} * V_{\text{CH}_3\text{COOH}} + D_{\text{H}_2\text{O}} * V_{\text{H}_2\text{O}}) / V \\ &= (0.792 \text{ Kg/lit} * 0.005 \text{ lit} + 1.049 \text{ Kg/lit} * 0.0005 \text{ lit} + 1.000 \text{ Kg/lit} * 0.0445 \text{ lit}) / 0.05 \text{ lit} \\ &= 0.9797 \text{ Kg/lit} \end{aligned}$$

Έτσι η συγκέντρωση του διαλύματος σε ppm θα είναι:

$$C = 10 \text{ mg/lit} = 10 * 10^{-6} \text{ Kgr/lit} = 10 * 10^{-6} / 0.9797 = 10.21 * 10^{-6} = \mathbf{10.21 \text{ ppm πρωτεΐνης}}$$

Αραιώσεις

Κατά τη πειραματική διαδικασία πολλές φορές χρειάζεται να γίνουν αραιώσεις και δημιουργία των επιθυμητών διαλυμάτων.

Βασική προϋπόθεση για μια σωστή αραιώση είναι η σωστή χρήση:

1. των σιφωνίων
2. των πιπετών ακριβείας μεταβλητού όγκου
3. των ογκομετρικών φιαλών
4. καθώς και των υπόλοιπων σκευών που χρησιμοποιούνται σε μια αραιώση και ιδιαίτερα στη χρήση ζυγών ακριβείας 3 ή 4 δεκαδικών.

Ένα πολύ συνηθισμένο λάθος που παρατηρείται η λανθασμένη χρήση των σιφωνίων και των πιπετών ακριβείας μεταβλητού όγκου καθώς επίσης και ο μη σωστός υπολογισμός της αραιώσης.

Σχεδόν για όλες τις αραιώσεις χρειάζεται απλά να εφαρμοστεί ο τύπος της αραιώσης:

$$C_{\text{αρχ.}} \cdot V_{\text{αρχ.}} = C_{\text{τελ.}} \cdot V_{\text{τελ.}}$$

Παράδειγμα 1: Από ένα διάλυμα KCl 10^{-3} M και να παρασκευαστούν 100 ml διαλύματος KCl 10^{-4} M:

Απάντηση: Με την χρήση του τύπου $C_{\text{αρχ.}} \cdot V_{\text{αρχ.}} = C_{\text{τελ.}} \cdot V_{\text{τελ.}}$

$$\rightarrow 10^{-3} \text{ M} \cdot x = 10^{-4} \text{ M} \cdot 100 \text{ ml} \rightarrow x = 10^{-4}/10^{-3} \cdot 100 \text{ ml} \rightarrow x = 10 \text{ ml}$$

Έτσι σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml τοποθετούνται με ακρίβεια 10 ml KCl και αραιώνονται μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

Παράδειγμα 2: Να παρασκευαστούν 100 ml διαλύματος 20 ppm ιόντων Cl⁻:

Απάντηση: Τα 20 ppm Cl⁻ αντιστοιχούν σε 20 mg/lit Cl⁻ καθώς το διάλυμα είναι υδατικό, διαιρώντας με το ατομικό βάρος του Cl⁻ θα γίνουν mole:

$$C = 20 \text{ mg/lit} / MW_{\text{Cl}^-} = 20 / 35.45 \text{ mole/lit Cl}^- = 0.5642 \text{ mole/lit Cl}^-$$

Τα mole Cl⁻ είναι τα ίδια με τα mole του NaCl καθώς υπάρχει πλήρη διάσταση του και πολλαπλασιάζοντας με το μοριακό βάρος του NaCl τα mole θα γίνου μάζα.

$$C = 0.5642 \text{ mole/lit} * MW_{\text{NaCl}} = 0.5642 * 58.45 \text{ gr/lit NaCl} = 32.97 \text{ gr/lit NaCl}$$

οπότε στα 100 ml (0.1 lit) θα είναι 3.297 gr NaCl

Ζυγίζονται με ακρίβεια σε ζυγό 3 ή 4 δεκαδικών 3.297 g NaCl

και αραιώνονται με απιονισμένο νερό σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml.

Διαλύματα ακριβούς συγκέντρωσης

Πολλές φορές χρειάζεται να παρασκευαστούν διαλύματα ακριβούς συγκέντρωσης θα χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα διαλύματα. Όταν τα διαλύματα είναι μικρής συγκέντρωσης, η ποσότητα που απαιτείται να ζυγιστεί είναι τόσο μικρή που ακόμα και με του ζυγούς ακριβείας 4 δεκαδικών είναι αρκετά δύσκολο.

Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα αυτό παρασκευάζεται αρχικά ένα πιο πυκνό διάλυμα (πχ 10 με 100 φορές πυκνότερο), αυτό έχει ως αποτέλεσμα η απαιτούμενη προς ζύγιση ποσότητα να είναι πιο μεγάλη και έτσι να περιορίζεται το λάθος στην ζύγιση. Έτσι ζυγίζονται με ακρίβεια η επιθυμητή ποσότητα και παρασκευάζεται το αρχικό πυκνό διάλυμα, στη συνέχεια με την κατάλληλη αραίωση παρασκευάζεται το τελικό διάλυμα στην επιθυμητή συγκέντρωση.

Παράδειγμα:

Παρασκευή διαλύματος 0.001 M KCl 100 ml ακριβούς συγκέντρωσης.

Τα 0.001 M αντιστοιχούν σε 0.001 mol/lit, το KCl έχει μοριακό βάρος 74.5513, έτσι στα 100 ml διαλύματος αντιστοιχούν 0.0075 g KCl. Χρησιμοποιείται ζυγός των 4^{ων} δεκαδικών για τη ζύγιση της ποσότητας αυτής, καθώς το σφάλμα στο 4^ο δεκαδικό είναι αρκετά μεγάλο δημιουργείται μεγάλο σφάλμα. Για τον λόγο αυτό ζυγίζεται μια ποσότητα 10 φορές μεγαλύτερη, δηλ. 0.0750 g, έτσι περιορίζεται πολύ το σφάλμα της ζύγισης.

Διαλύετε τη ποσότητα αυτή στα 100 ml με την χρήση ογκομετρικής φιάλης, δημιουργώντας έτσι ένα διάλυμα αρχικής συγκέντρωσης 0.01 M που είναι 10 φορές πιο πυκνό από το διάλυμα που θέλετε να παρασκευάσετε.

Για την παρασκευή του τελικού διαλύματος γίνεται μια απλή αραίωση:

$$C_{\text{αρχ.}} \cdot V_{\text{αρχ.}} = C_{\text{τελ.}} \cdot V_{\text{τελ.}} \rightarrow$$

$$V_{\text{αρχ.}} = (0.001\text{M} \cdot 100\text{ml}) / 0.01\text{M} \rightarrow$$

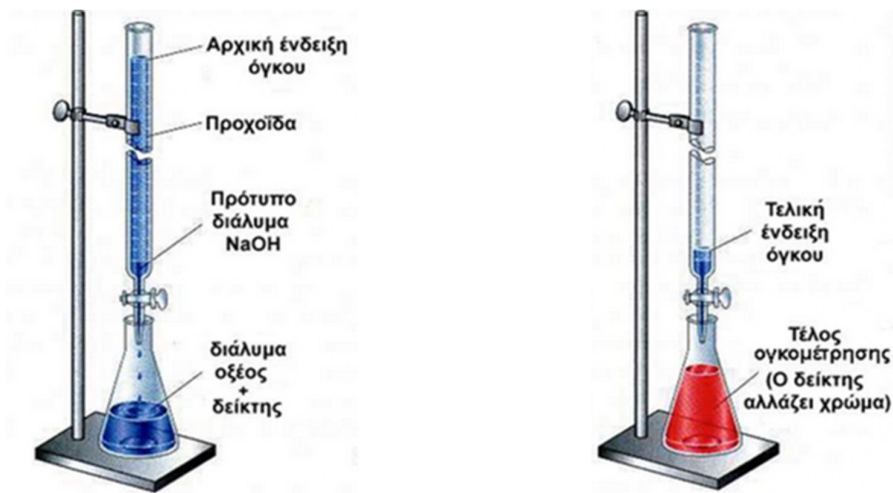
$$V_{\text{αρχ.}} = 10 \text{ ml}$$

Με την χρήση του κατάλληλου σιφωνίου ή με πιπέτα ακριβείας μεταβλητού όγκου μεταφέρετε η απαιτούμενη ποσότητα του αρχικού διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και αραιώνεται μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

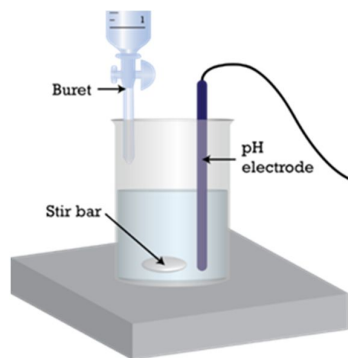
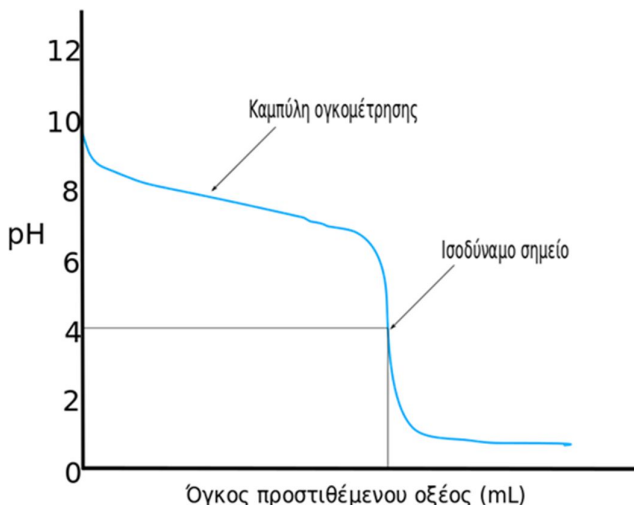
Τιτλοδότηση – Ποτενσιομετρικές Τιτλοδοτήσεις

Σε πολλές ασκήσεις του εργαστηρίου θα χρειαστεί να κάνετε αρκετές τιτλοδοτήσεις.

• **Τιτλοδότηση** είναι η διαδικασία κατά την οποία μια ουσία (τιτλοδότης) προστίθεται σε μία άλλη (αναλυτής) και παρατηρείται με την χρήση ενός δείκτη ή ποτενσιομετρικά μέχρι να αντιδράσει όλος ο αναλύτης. Από την απαιτούμενη ποσότητα (**τελικό σημείο**) υπολογίζεται η ποσότητα του αναλυτή.



- **Ποτενσιομετρική Τιτλοδότηση** είναι η διαδικασία η οποία συνεχίζεται μέχρι το τέλος, καταγράφεται ποτενσιομετρικά (συνήθως με τη χρήση κάποιου ηλεκτροδίου) και δημιουργείται ένα σιγμοειδές διάγραμμα, της καταγραφής του σήματος ως προς τον όγκο κατανάλωσης του τιτλοδότη, από το οποίο υπολογίζεται το **ισοδύναμο σημείο** του.

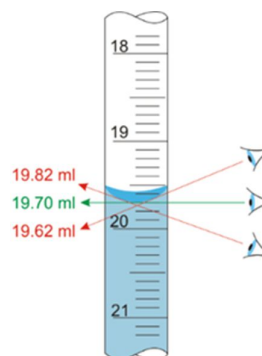


- **Προχοΐδα:**

Κάθε φορά πριν την χρήση της θα πρέπει να γίνεται ένα πολύ καλό ξέπλυμα με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια με τον τιτλοδότη που θα χρησιμοποιηθεί.

Κατά το γέμισμα της χρειάζεται προσοχή ώστε:

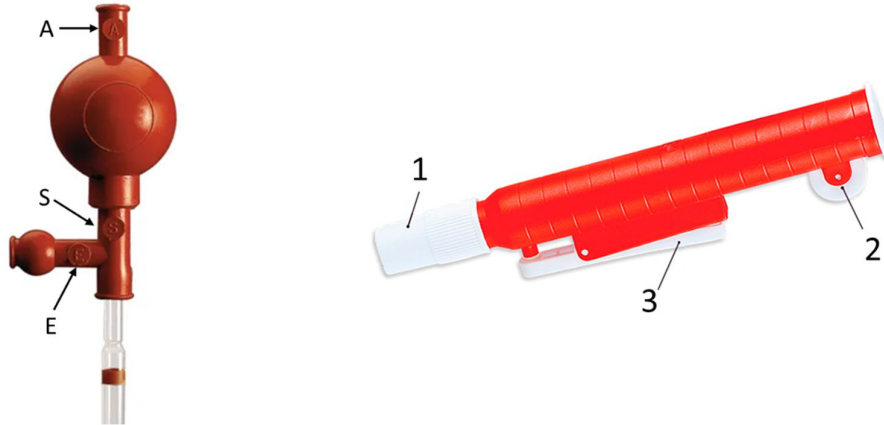
- α. **Να μην δημιουργηθεί κάποια φυσαλίδα**, συνήθως όταν δημιουργείται εγκλωβίζεται στο μέρος κάτω από την στρόφιγγα. Στην περίπτωση αυτή για την απομάκρυνση της ανοίγεται απότομα την στρόφιγγα ώστε η δυνατή ροή να μπορέσει να την απομακρύνει.



- β. Η προχοΐδα θα πρέπει να γεμίσει πλήρως με τον τιτλοδότη δηλ. να ξεκινήσει από το την ένδειξη μηδέν (0). Θα πρέπει το κάτω μέρος του κώνου να είναι ακριβώς στο μηδέν, κοιτάζοντας όμως στο ίδιο επίπεδο, διαφορετικά η ένδειξη είναι λάθος.

Σιφώνια:

Υπάρχουν δύο ειδών σιφώνια, τα πληρώσεων και τα μέτρησης. Τα πληρώσεων έχουν καλύτερη ακρίβεια από τα μέτρησης και για τον λόγο αυτό προτιμώνται όταν αυτό είναι δυνατό. Για την αναρρόφηση των διαλυμάτων χρησιμοποιούνται δύο τύπων πουάρ:



1. Τα πουάρ με τρεις βαλβίδες (A, S και E), την A (air) για να αδειάσει η φούσκα από τον αέρα, η S (sample) για να τραβήξετε το δείγμα και η E (empty) για να αδειάσετε το περιεχόμενο του σιφωνίου.

Πως γίνεται η χρήση του:

Αρχικά πιέζεται η βαλβίδα A και ταυτόχρονα πιέζεται και η φούσκα απομακρύνεται ο αέρας από αυτή. Στη συνέχεια τοποθετείτε το σιφώνιο μέσα στο διάλυμα και πιέζοντας την βαλβίδα S η φούσκα τραβάει αέρα από το σιφώνιο και έτσι γίνεται αναρρόφηση του δείγματος μέσα σε αυτό. Τέλος, πιέζεται η βαλβίδα E η οποία σπάει το κενό, με αποτέλεσμα να μπαίνει αέρας στο σιφώνιο και να αδειάζει το διάλυμα με την βοήθεια της βαρύτητας.

2. Το πουάρ με την ροδέλα αποτελείται από ένα σύνδεσμο (1) στο κάτω μέρος όπου τοποθετείται το σιφώνιο, την ροδέλα του εμβόλου (2) και το μοχλό απομάκρυνσης (3)

Πως γίνεται η χρήση του:

Αρχικά τοποθετείται το σιφώνιο στον σύνδεσμο στο κάτω μέρος στη συνέχεια με την ροδέλα μετακινείται το εσωτερικό έμβολο και μέσω της υποπίεσης που δημιουργείται γίνεται αναρρόφηση του δείγματος στο σιφώνιο. Τέλος πιέζοντας τον μοχλό απομάκρυνσης σπάει το κενό, μπαίνει αέρας στο σιφώνιο και αδειάζει με την βοήθεια της βαρύτητας. Δεν αδειάζετε ποτέ το σιφώνιο γυρνώντας την ροδέλα, πάντα θα πρέπει να πιέζεται τον μοχλό απομάκρυνσης ώστε να σπάει το κενό και να αδειάζει με την βοήθεια της βαρύτητας.

Προσοχή:

- Προσοχή το σιφώνιο θα πρέπει να αδειάσει με την βοήθεια της βαρύτητας, δεν θα πρέπει να το υποβοηθήσετε. Η σταγόνα που παραμένει μέσα στο σιφώνιο είναι μέσα στο συστηματικό σφάλμα που έχει δοθεί από τον κατασκευαστή.
- Δεν πρέπει γυρίζετε ποτέ το σιφώνιο ανάποδα, υπάρχει ο κίνδυνος καθώς το σιφώνιο είναι πλάγια το διάλυμα να πάει στο πουάρ, αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα αφενός να επιμολύνει το διάλυμα, αφετέρου να χαλάσει το πουάρ.
- Το σιφώνιο θα πρέπει πάντα να είναι σε κάθετη θέση, αν για κάποιο λόγο στάζει, τότε δεν έχει τοποθετηθεί σωστά στο πουάρ. Αν συνεχίζει να στάζει, τότε πιθανόν το πουάρ, να παρουσιάζει κάποιο πρόβλημα και χρειάζεται αντικατάσταση.

Τα πουάρ με την ροδέλα έχουν χρώματα, ανάλογα με τον όγκο που μπορούν να τραβήξουν:

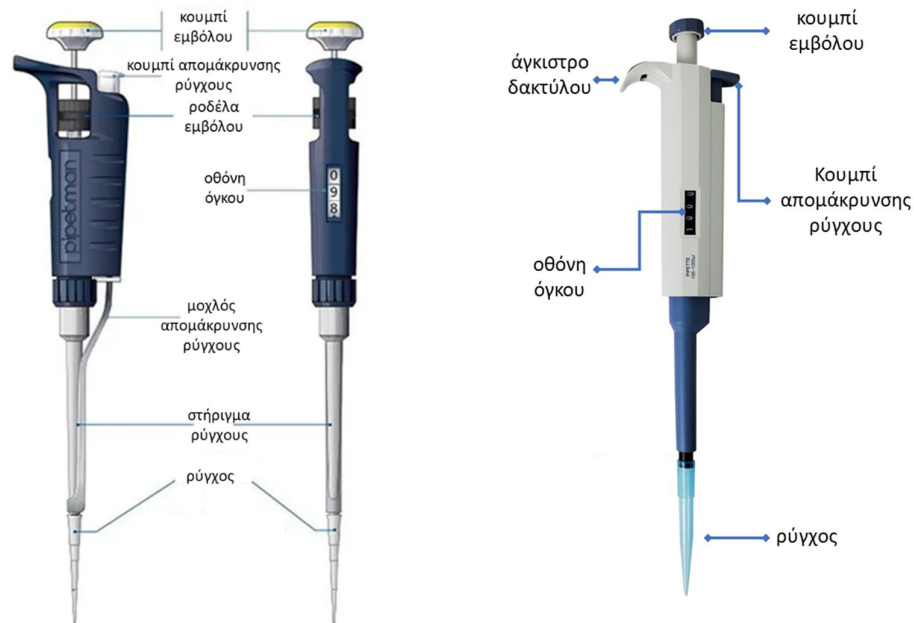
- Το κίτρινο είναι μέχρι 0.2 ml
- Το μπλε είναι μέχρι 2 ml
- Το πράσινο είναι μέχρι 10 ml
- Το κόκκινο είναι μέχρι 25 ml

Γενικά τα πουάρ με τις βαλβίδες θεωρούνται καλύτερα αλλά χρειάζεται εμπειρία στην χρήση τους σε σχέση με τα πουάρ με την ροδέλα που είναι πιο εύχρηστα. Στο εργαστήριο χρησιμοποιούνται πουάρ με την ροδέλα και κυρίως του κόκκινου χρώματος ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο εύρος όγκων.

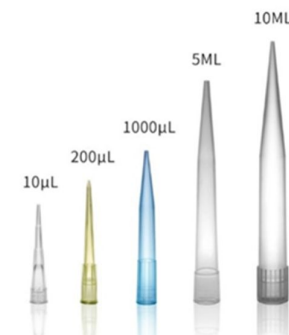


Πιπέτες ακριβείας μεταβλητού όγκου (μικροσιφώνια):

Για την ακριβή μεταφορά όγκου διαλύματος, εκτός από τα σιφώνια υπάρχουν οι πιπέτες μεταβλητού όγκου μεγάλης ακρίβειας (μικροσιφώνια) που χρησιμοποιούνται για την μεταφορά ποσότητας διαλύματος από μερικά μl έως δεκάδες ml. Η αρχή λειτουργία τους στηρίζεται σε ένα εσωτερικό έμβολο που καθώς ανεβαίνει δημιουργεί υποπίεση με την οποία γίνεται αναρρόφηση του διαλύματος, μεταβάλλοντας την θέση του εμβόλου, μεταβάλλεται και ο όγκος που θα αναρροφηθεί.



Η πιπέτα αποτελείται από το κουμπί του εμβόλου, συνήθως υπάρχει και μια ροδέλα που συνδέεται σε αυτό, με αυτά τα δύο μετακινείτε την θέση του εμβόλου ώστε να ρυθμιστεί ο επιθυμητός όγκος, ο οποίος φαίνεται στην οθόνη της πιπέτας. Στην άκρη της πιπέτας τοποθετείται ένα ρύγχος, συνήθως μιας χρήσεων που μετά την χρήση του απομακρύνεται με το κουμπί απομάκρυνσης. Το ρύγχος δεν πρέπει να απομακρύνεται με τα χέρια επειδή μπορεί να έχει χρησιμοποιηθεί σε διαλύματα που είναι επιβλαβή (πχ οξέα). Τα ρύγγη είτε πηγαίνουν στα απόβλητα είτε πλένονται και ξαναχρησιμοποιούνται ανάλογα τις απαιτήσεις της κάθε άσκησης.



Ανάλογα τον όγκο συλλογής, χρησιμοποιείται η αντίστοιχη πιπέτα και το αντίστοιχο ρύγχος. Κάθε πιπέτα μεταβλητού όγκου είναι κατασκευασμένη για να λειτουργεί σε ένα συγκεκριμένο εύρος όγκου. Είναι πολύ σημαντικό η ρύθμιση του όγκου να είναι μέσα σε αυτά τα όρια, διαφορετικά αφενός ο όγκος που θα συλλεγεί θα είναι λάθος, αφετέρου το ελατήριο που ρυθμίζει την θέση του εμβόλου της, θα συμπιεστεί ή θα τραβηχτεί εκτός των ορίων αντοχής του και θα χαλάσει.

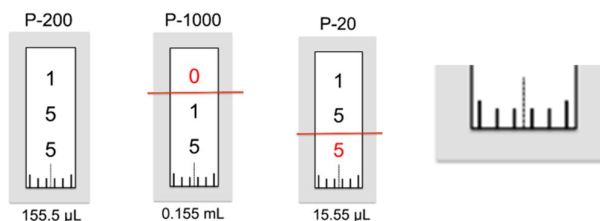
Είναι σημαντικό πριν την χρήση της κάθε πιπέτας να ξέρετε τα όρια λειτουργία της, αν δεν αναγράφονται θα πρέπει να τα βρείτε από το εγχειρίδιο της.

Ένα από τα πιο συνηθισμένα λάθη είναι ότι διαβάζετε λάθος την ένδειξη του όγκου στην οθόνη της πιπέτας. Θα πρέπει να την διαβάσετε σωστά, διαφορετικά θα τραβήξετε διαφορετικό όγκο από τον επιθυμητό και υπάρχει η πιθανότητα να βγείτε εκτός των ορίων της πιπέτας κάνοντας ζημιά σε αυτήν, προσπαθώντας να βάλετε ένα όγκο που δεν είναι πραγματικός. Στις περισσότερες πιπέτες η οθόνη αυτή δεν είναι ψηφιακή αλλά μηχανική, έτσι δεν υπάρχει κάποια ασφάλεια ώστε να σταματήσει αυτόματα όταν είναι εκτός ορίων, με αποτέλεσμα αν συνεχίζετε να μετακινείτε την ροδέλα του εμβόλου μπορείτε να βγείτε εύκολα εκτός ορίων, ειδικά αν έχετε λάθος εκτίμηση για τον όγκο που έχει η οθόνη της.



Συνήθως η οθόνη έχει τρεις αριθμούς με τις υποδιαϊρέσεις, δεν έχει όμως μονάδες μέτρησης, θα πρέπει να ξέρετε αν αναφέρονται σε µl ή ml, κάτι που από τα όρια λειτουργίας της πιπέτας μπορείτε να το καταλάβετε. Το χρώμα που έχουν οι αριθμοί είναι μαύρο ή κόκκινο και έχουν σημασία, για να καταλάβετε πως λειτουργούν αναφέρονται παρακάτω μερικά παραδείγματα:

Παράδειγμα:



- Στην πιπέτα P-200 της εταιρείας Gilson η οποία έχει όρια από 20 έως 200 µl και οι τρεις αριθμοί είναι μαύροι τότε είναι ότι φαίνεται (MMM) στο παράδειγμα έχει την τιμή 155 και οι μονάδες θα είναι σε µl καθώς η τιμή αυτή είναι μέσα στα όρια.
- Στην πιπέτα P-1000 της εταιρείας Gilson η οποία έχει όρια από 100 έως 1000 µl, ο πρώτος αριθμός είναι **κόκκινος** και οι άλλοι δύο μαύροι, αυτό γίνεται για να διακριθούν μεταξύ τους. Στην πραγματικότητα υπάρχει μια υποδιαστολή μετά τον **κόκκινο** (K.MM). Στο παράδειγμα θα έχει την τιμή 0.15 όμως οι μονάδες δεν μπορεί

να είναι σε ml καθώς το κατώτατο όριο της πιπέτας είναι 100 μl, οπότε θα είναι σε ml, δηλ. θα έχει την τιμή 0.15 ml ή αλλιώς 150 μl.

- Στην πιπέτα P-20 της εταιρείας Gilson η οποία έχει όρια από 2 έως 20 μl, οι δύο πρώτοι αριθμοί είναι μαύροι και ο τρίτος **κόκκινος**, σε αυτή την περίπτωση η υποδιαστολή θα είναι πριν τον **κόκκινο** αριθμό (MM.K). Στο παράδειγμα θα έχει την τιμή 15.5 με μονάδες μl, δηλ. 15.5 μl μια τιμή που είναι μέσα στα όρια.

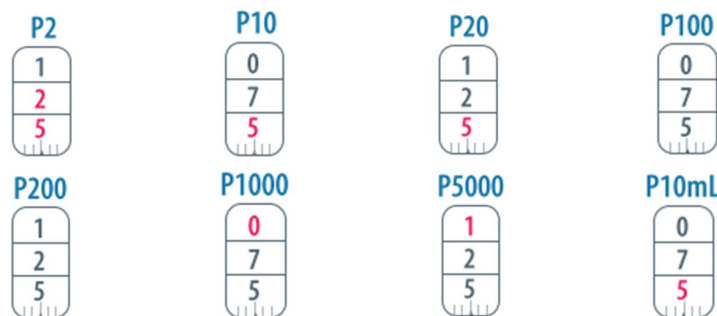
Παρατηρείται ότι μετά τους αριθμούς υπάρχει μια κλίμακα που δεν πρέπει να αγνοηθεί, αυτή δίνει τις υποδιαιρέσεις στον τελευταίο αριθμό. Στο παράδειγμα της πιπέτας P-200, μετακινώντας την ροδέλα του εμβόλου από την τιμή 155 πηγαίνετε στην επόμενη 156. Θα είναι ακριβώς στο 5 ή στο 6, όταν ή ένδειξη είναι ακριβώς πάνω στην μεγάλη γραμμή της κλίμακας. Μεταξύ των αριθμών 5 και 6 υπάρχουν 4 μικρές γραμμές που αντιστοιχούν σε υποδιαιρέση 0.2, για παράδειγμα αν ήταν στην 1^η μικρή γραμμή θα είναι 155.2, στην 2^η μικρή γραμμή 155.4, στην 3^η 155.6, στην 4^η 155.8 και μετά είναι η μεγάλη γραμμή οπότε 156.0. επίσης, έχει νόημα όταν είναι μεταξύ δύο μικρών γραμμών αλλά μόνο όταν είναι ακριβώς στην μέση, αν για παράδειγμα είναι στη μέση της 2^{ης} και τις 3^{ης} μικρής γραμμής θα είναι στη μέση του 0.4 και 0.6 δηλ. θα είναι 0.5. Έτσι, στην ρύθμιση του όγκου της κάθε πιπέτας μπορείτε να χρησιμοποιήσετε τις υποδιαιρέσεις σταματώντας πάνω σε μια γραμμή (μικρή ή μεγάλη) ή ακριβώς στην μέση μεταξύ δύο γραμμών, δεν μπορείτε όμως να την εισάγετε πιο κοντά σε μια γραμμή από μια άλλη, θα πρέπει να είναι ή ακριβώς πάνω σε μια γραμμή ή ακριβώς στην μέση τους. Στο προηγούμενο παράδειγμα η πιπέτα P-200 είναι ρυθμισμένη σε όγκο 155.5 μl, η πιπέτα P-100 σε όγκο 0.155 ml δηλ. 155 μl και η πιπέτα P-20 σε όγκο 15.55 μl.

Για την ρύθμιση του όγκου:

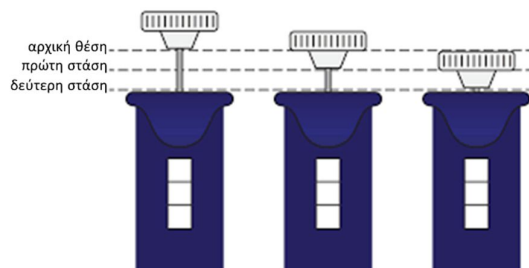
- Όταν **μειώνεται τον όγκο**, φτάνετε αργά στην επιθυμητή τιμή χωρίς να την περάσετε.
- Όταν **αυξάνεται το όγκο**, περνάτε την επιθυμητή τιμή κατά το 1/3 της στροφής και στη συνέχεια μειώνεται αργά μέχρι την επιθυμητή τιμή χωρίς να την περάσετε.

Άσκηση:

Σε τι όγκο έχουν ρυθμιστεί οι πιπέτες στα παρακάτω παραδείγματα;



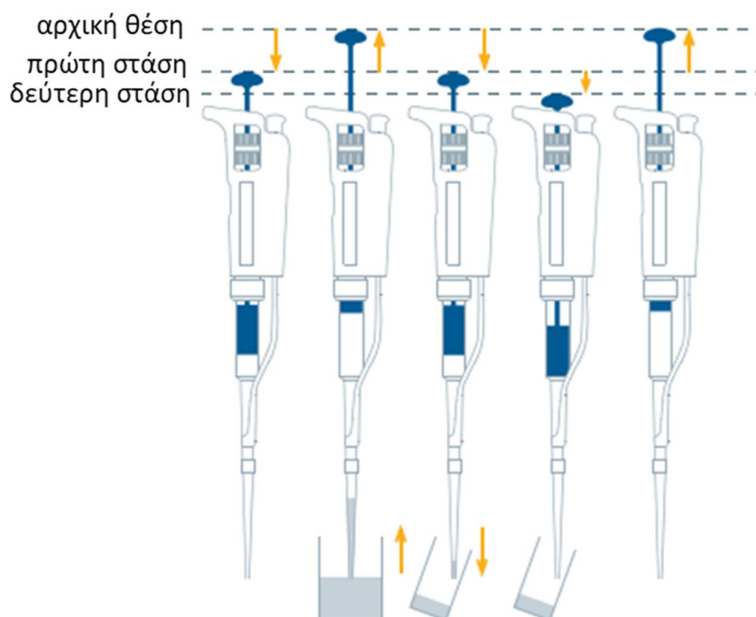
Η κίνηση του εμβόλου έχει δύο στάσεις, μέχρι την πρώτη στάση το κατέβασμα είναι μαλακό και σε αυτήν είναι ο επιθυμητός όγκος στον οποίο ρυθμίζεται η πιπέτα. Στη συνέχεια μέχρι την δεύτερη στάση το κατέβασμα είναι σκληρό και χρησιμοποιείται μόνο για να απομακρυνθεί η σταγόνα από το ρύγχος της πιπέτας κατά την διαδικασία του αδειάσματος της.



Πως γίνεται η χρήση της:

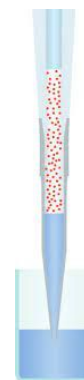
Αρχικά πιέζεται το έμβολο μέχρι την πρώτη στάση και η πιπέτα σε κάθετη θέση βυθίζεται το ρύγχος στο διάλυμα, στο σωστό βάθος με βάση το μοντέλο της πιπέτας (3 – 4 mm). Αφήνεται το έμβολο αργά και ομαλά μέχρι να φτάσει στην επάνω θέση για να αναρροφήσετε τον καθορισμένο όγκο του διαλύματος. Περιμένετε τον απαιτούμενο χρόνο (1 – 2 sec) ανάλογα με το μοντέλο της πιπέτας και στη συνέχεια την απομακρύνετε, **πάντα όμως**

σε κάθετη θέση. Τοποθετήστε το άκρο του ρύγχους στο εσωτερικό τοίχωμα του δοχείου υποδοχής υπό γωνία (10° – 40°) και πιέσετε το έμβολο αργά και ομαλά μέχρι την πρώτη στάση. Περιμένετε τουλάχιστον ένα δευτερόλεπτο και στη συνέχεια πιέσετε το έμβολο μέχρι την δεύτερη στάση ώστε να απομακρυνθεί τυχόν σταγόνα από το άκρο του ρύγχους, **δεν πρέπει να μείνει καμία σταγόνα στην άκρη του ρύγχους.** Κρατήστε πατημένο το έμβολο πλήρως προς τα κάτω καθώς αφαιρείτε την πιπέτα. Απομακρύνεται το ρύγχος χρησιμοποιώντας τον μοχλό απομάκρυνσης, **όχι με τα χέρια.**



Προσοχή:

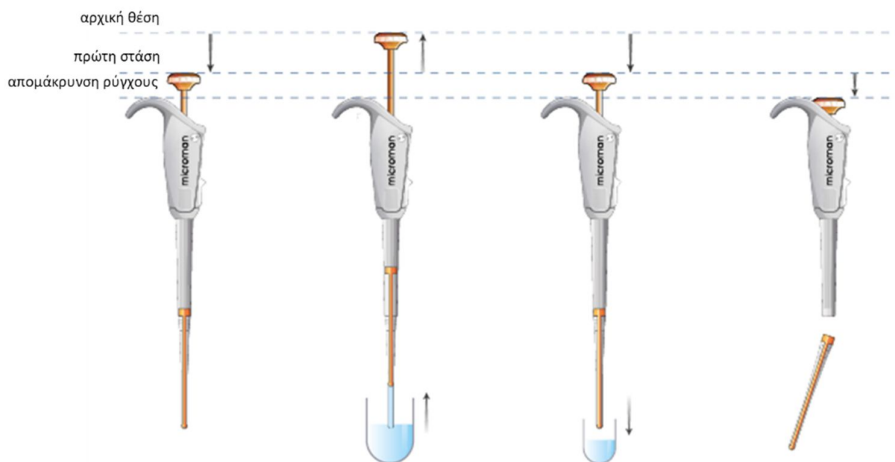
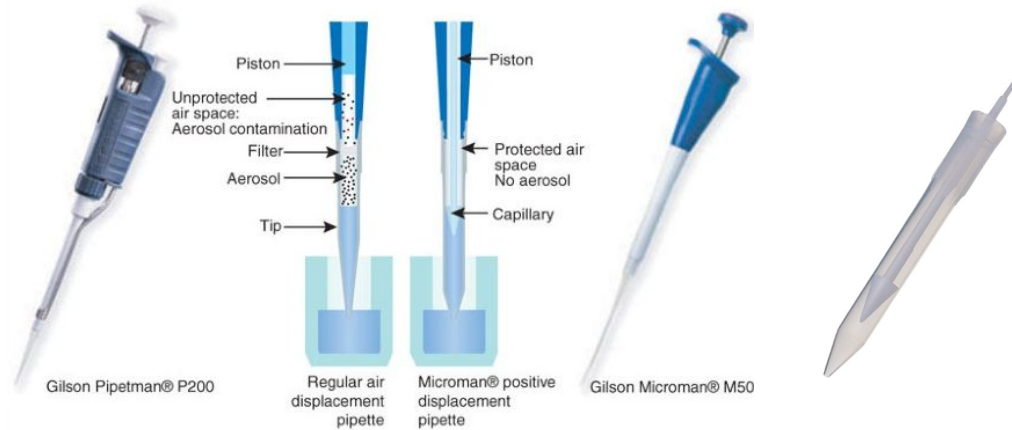
1. Το ρύγχος πριν χρησιμοποιηθεί για την συλλογή του όγκου, θα πρέπει αρχικά να προξεπλυθεί με το διάλυμα ώστε να είναι υγρό, στεγνό ρύγχος συλλέγει λάθος όγκο. Επίσης (κυρίως για πτητικούς διαλύτες) με τον τρόπο αυτό γίνεται κορεσμός με αέρα στο διάστημα μεταξύ του συλλεγόμενου διαλύματος και στις άκρες του πιστονιού της πιπέτας, αν δεν είναι σωστός ο κορεσμός, το διάλυμα δεν θα μπορεί να κρατηθεί σωστά στο ρύγχος και θα αρχίσει να στάζει από την άκρη του.
 - a. Για να προξεπλυθεί κάνετε την διαδικασία που αναφέρθηκε προηγούμενος δηλ. τραβάτε και αφήνετε τον όγκο του διαλύματος 2-3 φορές πριν την τελική συλλογή. Στη συνέχεια κάνετε την συλλογή του όγκου κανονικά.
 - b. Αν το ρύγχος χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για συλλογή ίδιου όγκου από το ίδιο διάλυμα, δεν χρειάζεται να προξεπλυθεί ξανά, είναι ήδη υγρό.
 - c. Αν το ρύγχος χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για συλλογή μεγαλύτερου όγκου, από το ίδιο διάλυμα θα πρέπει να γίνει η διαδικασία για να προξεπλυθεί, καθώς ένα μέρος του ρύγχους θα είναι στεγνό.
 - d. το ίδιο ρύγχος δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για συλλογή διαφορετικού διαλύματος, θα πρέπει να αντικατασταθεί, το καινούργιο ρύγχος θα πρέπει να προξεπλυθεί.
2. Η πιπέτα μεταφέρετε πάντα σε κάθετη θέση, διαφορετική στάση θα μπορούσε:
 - a. Μέρος του διαλύματος να περάσει μέσα στην πιπέτα, καταστρέφοντας την.
 - b. Στην άκρη του ρύγχους να περάσει αέρας, χαλώντας έτσι το κενό με το οποίο κρατείτε το διάλυμα μέσα στο ρύγχος με αποτέλεσμα να αρχίσει να στάζει.
3. Κατά την αναρρόφηση του διαλύματος θα πρέπει να προσέχετε ώστε το ρύγχος να παραμένει μέσα στο διάλυμα, διαφορετικά θα τραβήξει και αέρα.
4. Αν στάζει το άκρο του ρύγχους:
 - a. Κάνετε ξανά την διαδικασία ξεπλύματος πολλές φορές
 - b. Βγάλετε και ξαναβάλτε το ρύγχος σωστά
 - c. Αντικαταστήστε το ρύγχος
 - d. Αν το πρόβλημα δεν λυθεί μάλλον η πιπέτα είναι ελλειμματική, στην περίπτωση αυτή ενημερώστε τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.



5. Ο όγκος συλλογής δεν είναι σωστός
 - a. Κάνετε ξανά τη διαδικασία συλλογής αργά και σωστά όπως περιγράφεται παραπάνω.
 - b. Κάνετε ξανά την διαδικασία ξεπλύματος πολλές φορές
 - c. Βγάλετε και ξαναβάλετε το ρύγχος σωστά
 - d. Αντικαταστήσετε το ρύγχος
 - e. Αν το πρόβλημα δεν λυθεί μάλλον η πιπέτα είναι ελλειμματική, στην περίπτωση αυτή ενημερώστε τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.
6. Ο χρόνος μεταξύ της συλλογής του διαλύματος μέχρι την απομάκρυνση του δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 20 sec, διαφορετικά υπάρχει η πιθανότητα να αρχίσει να στάζει από το άκρο του ρύγχους. Για τον λόγο αυτό εξυπηρετεί τα δοχεία συλλογής και απομάκρυνσης του διαλύματος να είναι σε κοντινή απόσταση.

Πιπέτες για πτητικά διαλύματα

Για την συλλογή πτητικών διαλυμάτων όταν χρησιμοποιούνται κλασικές πιπέτες θα πρέπει να γίνει η διαδικασία του προξεπλύματος πολλές φορές ώστε να υπάρχει καλός κορεσμός στο διάστημα μεταξύ του διαλύματος και του πιστονιού της πιπέτας, διαφορετικά θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν ειδικές πιπέτες που δέχονται ειδικά ρύγχη για πτητικές ενώσεις. Τα ρύγχη αυτά έχουν εσωτερικό έμβολο που δεν αφήνει κενό διάστημα μετά το διάλυμα, αποτρέποντας έτσι την εξάτμιση του στο εσωτερικό του ρύγχους και κατά επέκταση την διαρροή του από την άκρη του. Λόγω του εσωτερικού εμβόλου, τα ρύγχη αυτά είναι πιο ακριβά από τα κανονικά που χρησιμοποιούνται στις κλασικές πιπέτες.



Στις πιπέτες αυτές ο τρόπος λειτουργίας τους είναι διαφορετικός, εδώ στην άκρη του πιστονιού υπάρχει ένα άγκιστρο με το οποίο δεσμεύεται το έμβολο του ρύγχους, έτσι η κίνηση του δημιουργείται στο πιστόνι μεταφέρεται στο έμβολο. επίσης, υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση στην χρήση των δύο στάσεων του εμβόλου του πιστονιού της πιπέτας. Η πρώτη στάση είναι όπως τις κανονικές πιπέτες, χρησιμοποιείται για την συλλογή και απομάκρυνση του επιθυμητού όγκου. Η διαφοροποίηση είναι στην χρήση της δεύτερης στάσης, όπου σε αυτές τις πιπέτες

χρησιμοποιείται για την εκτίναξη (απομάκρυνση) του ρύγχους, όχι για την απομάκρυνση της τελευταίας σταγόνας. Εδώ δεν υπάρχει τελευταία σταγόνα, καθώς το διάλυμα απομακρύνεται με την πίεση του εμβόλου του ρύγχους, απομακρύνεται όλο το διάλυμα χωρίς να μείνει καμία σταγόνα στο άκρο του, για τον λόγο αυτό η δεύτερη στάση χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση του ρύγχους, καταργώντας τον μοχλό απομάκρυνσης που υπάρχει στις κλασικές πιπέτες.







Προσοχή:

1. Το ρύγχος πριν χρησιμοποιηθεί για την συλλογή του όγκου, θα πρέπει και εδώ να προξεπλυθεί με το διάλυμα ώστε να είναι υγρό, στεγνό ρύγχος συλλέγει λάθος όγκο.
2. Η δεύτερη στάση χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση του ρύγχους, πολύ προσοχή στην χρήση της πιπέτας, καθώς πολλές φορές από κεκτημένη ταχύτητα πατάτε τη δεύτερη στάση, όπως γίνεται στις κλασικές πιπέτες, **με αποτέλεσμα το ρύγχος να πέσει μέσα στο διάλυμα**. Στην περίπτωση αυτή το διάλυμα θα πρέπει να κατασκευαστεί ξανά και το ρύγχος να πάει στα απόβλητα.

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται πληροφορίες για τα διάφορα μοντέλα της εταιρείας Gilson όπως τα όρια λειτουργίας, το βάθος βύθισης και ο χρόνος αναμονής στο τέλος της συλλογής του διαλύματος.

PIPETMAN Classic model	Βάθος βύθισης ρύγχους στο διάλυμα (mm)	Χρόνος αναμονής (sec)	Ελάχιστος όγκος (μl)	Μέγιστος όγκος (μl)	
P2		1	1	0.2	2
P10		1	1	1	10
P20		2-3	1	2	20
P100		2-4	1	20	100
P200		2-4	1	50	200
P1000		2-4	2-3	200	1000
P5000		3-6	4-5	1000	5000
P10ml		5-7	4-5	1 (ml)	10 (ml)

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται πληροφορίες για τα όρια λειτουργίας στα μοντέλα MICROMAN της εταιρείας Gilson που καλύπτουν εύρος όγκου από 1 έως 1000 μL .

MICROMAN E model		Ελάχιστος όγκος (μl)	Μέγιστος όγκος (μl)
M10		1	50
M25		3	25
M50		20	50
M100		10	100
M250		50	250
M1000		100	1000

Σύριγγα υγρών:

Ένας άλλος τρόπος μεταφοράς πολύ μικρών ποσοτήτων υγρών (μερικά μl) είναι με σύριγγα υγρών. Η σύριγγα υγρών είναι μια βαθμονομημένη γυάλινη σύριγγα, που επιτρέπει την συλλογή πολύ μικρών όγκων υγρών. Αποτελείται από τον μεταλλικό μοχλό, από ένα παξιμάδι ασφαλείας που επιτρέπει το χαλάρωμα ή σύσφιξη της κίνησης του εμβόλου, το έμβολο το οποίο καταλήγει στο πιστόνι που βρίσκεται στο γυάλινο μέρος της σύριγγας και στο τέλος είναι η βελόνα. Τραβώντας το μοχλό, τραβιέται το έμβολο και το πιστόνι, δημιουργώντας υποπίεση μέσω της οποίας γίνεται αναρρόφηση του διαλύματος, για το λόγο αυτό η διαδικασία πρέπει να γίνεται αργά και ομαλά και να περιμένετε λίγο χρόνο στο τέλος (1 με 2 sec) ώστε να ολοκληρωθεί. Αν κάνετε βιαστικά ή απότομα την διαδικασία υπάρχει η πιθανότητα να τραβηχτεί φυσαλίδα αέρα.



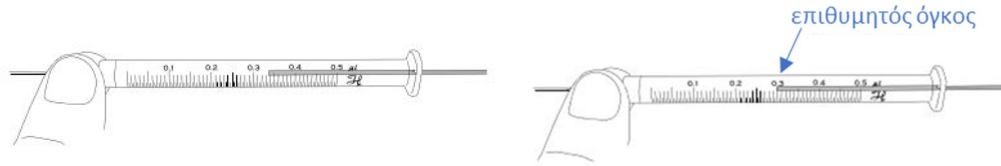
Ο τύπος της βελόνας που προσαρμόζεται στη σύριγγα, εξαρτάται από την χρήση που θα γίνει, για εισαγωγή δείγματος σε αέριο χρωματογράφο, η μύτη της σύριγγας θα πρέπει να είναι μυτερή ώστε να μπορέσει να τρυπήσει το septum στον εισαγωγέα του χρωματογράφου, λεπτομέρειες για τον τρόπο εισαγωγής δίνονται στην γενική εισήγηση της αέριας χρωματογραφίας καθώς και στις ασκήσεις με τους αέριους χρωματογράφους. Για την εισαγωγή σε υγρό χρωματογράφο, η μύτη της βελόνας πρέπει να είναι επίπεδη ώστε να έχει καλή εφαρμογή στο σύστημα εισαγωγής του. Επίσης, διαφορετική άκρη στην βελόνα χρησιμοποιείται σε αυτόματους δειγματολήπτες (autosampler).



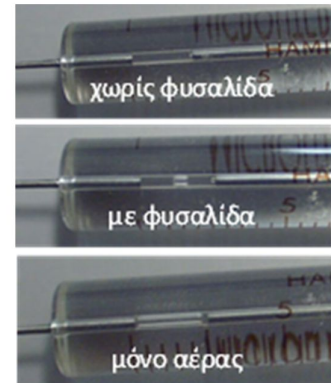
Τρόπος χρήσης:

Η σύριγγα αρχικά θα πρέπει να ξεπλυθεί ώστε να είναι καθαρή πριν την χρήση της, ξεπλένεται πρώτα με τον διαλύτη και στη συνέχεια με το διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί. Μετά την χρήση θα πρέπει να ξεπλυθεί ξανά με τον διαλύτη ώστε να αποθηκευτεί καθαρή. Η συλλογή του διαλύματος πρέπει να γίνεται με αργή και ομαλή κίνηση του εμβόλου, ώστε η αναρρόφηση του διαλύματος να γίνεται ομαλά χωρίς να δημιουργούνται φυσαλίδες. Πάντα η ποσότητα του δείγματος που συλλέγεται θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από την επιθυμητή και σε δεύτερο στάδιο αδειάζετε την επιπλέον ποσότητα, ώστε να φτάσετε στον επιθυμητό όγκο. Αυτό γίνεται κυρίως για δύο λόγους:

1. Ελέγχετε αν υπάρχει φυσαλίδα μέσα στο διάλυμα και καθώς δεν μπορείτε να δείτε τι γίνεται μέσα στην βελόνα, καθώς είναι μεταλλική, τραβάτε μεγαλύτερη ποσότητα για τον έλεγχο και καθώς αδειάζετε θα είσαστε σίγουροι ότι δεν θα υπάρχει φυσαλίδα ούτε μέσα στην βελόνα.
2. Κατά το άδειασμα μπορείτε να δείτε πιο καλά το έμβολο από την σωστή γωνία και έτσι πολύ πιο εύκολα και με μεγαλύτερη ασφάλεια να πάτε στην επιθυμητή τιμή του όγκου, από ότι θα γινόταν κατά την διαδικασία της συλλογής.



Αν κατά την διαδικασία της συλλογή του διαλύματος τραβήξετε κάποια φυσαλίδα αέρα, θα πρέπει να την αφαιρέσετε διαφορετικά η ποσότητα του διαλύματος θα είναι λάθος. Συνήθως η φυσαλίδα εγκλωβίζεται και η διαδικασία αφαίρεση της είναι δύσκολη και επίμονη. Ένας τρόπος για την απομάκρυνση της είναι να τραβήξετε (αργά και ομαλά) μεγάλη ποσότητα διαλύματος (σχεδόν στα όρια της σύριγγας) και να την αδειάζετε απότομα με μια κίνηση, επαναλάβετε την διαδικασία αρκετές φορές μέχρι την απομάκρυνση της. Κατά την διαδικασία αυτή αν δεν θέλετε να χρησιμοποιείτε το διάλυμα συλλογής θα μπορείτε να την κάνετε χρησιμοποιώντας τον διαλύτη, στο τέλος όμως θα πρέπει να ξεπλύνετε και με το διάλυμα πριν την συλλογή του επιθυμητού όγκου.



Προσοχή:

- Μην αφήνετε ποτέ τη σύριγγα στον πάγκο (πάντα μέσα στην συσκευασία της) μπορεί να πέσει και να σπάσει.
- Πάντα πριν και μετά την χρήση της θα πρέπει να καθαρίζεται
- Κατά την εισαγωγή του δείγματος ειδικά στους αέριους χρωματογράφους που τρυπάει το sept η βελόνα, θέλει ιδιαίτερη προσοχή καθώς λάθος χειρισμός στραβώνει την βελόνα.
- Κατά την συλλογή του διαλύματος θέλει προσοχή όταν πλησιάζετε τα όρια της σύριγγας να μην σας βγει το έμβολο, αυτός είναι ένας επιπλέον λόγος για να γίνει η διαδικασία συλλογής αργά και ομαλά, επιπλέον αποφεύγεται να φτάσετε στα όρια της αν αυτό δεν είναι απαραίτητο. Παράδειγμα, για συλλογή όγκου 1 μl με σύριγγα των 5μl, θα τραβήξετε αρχικά περίπου στα 3 μl και στη συνέχεια θα μειώσετε μέχρι να φτάσετε ακριβώς στο 1 μl.
- Μερικές φορές η βελόνα φράζει και δεν μπορείτε να τραβήξετε διάλυμα, στην περίπτωση αυτή αναφέρετε το στον υπεύθυνο του εργαστηρίου.
- Αν η κίνηση του εμβόλου είναι πολύ σκληρή ή πολύ μαλακή, ξεβιδώστε ή βιδώστε αντίστοιχα το παξιμάδι ασφαλείας ώστε να προσαρμόσετε την κίνηση του εμβόλου στη σωστή ευαισθησία.
- Προσοχή όταν τραβάτε το έμβολο μην σας βγει από την σύριγγα.
- Όταν έχετε τραβήξει φυσαλίδα αυτό είναι εμφανές καθώς θα υπάρχουν δύο φάσεις (αέρια και υγρή) τότε κάνετε την διαδικασία αφαίρεση της. Όμως αν για κάποιο λόγο έχετε τραβήξει μόνο αέρια, είναι δύσκολο να το διαπιστώσετε καθώς θα υπάρχει μόνο μία φάση (αέρια) δεν διαφέρει πολύ από το να έχετε μόνο διαλύτη. Ένας εύκολος τρόπος για να διαπιστώσετε είναι αφού έχετε αφαιρέσει τον σύριγγα από το διάλυμα να τραβήξετε το έμβολο, ώστε το διάλυμα που βρίσκεται μέσα στην βελόνα να περάσει μέσα στην σύριγγα και στη συνέχεια να τραβήξετε λίγο αέρα στην άκρη της. Αν είχατε τραβήξει κανονικά διάλυμα, θα δείτε την φάση του διαλύματος και του αέρα, ο αέρας αυτός είναι στην άκρη της σύριγγας δεν είναι μια εκφοβισμένη φυσαλίδα και απομακρύνεται κατά την διαδικασία αδειάσματος για να πάτε στον επιθυμητό όγκο. Αν όμως θα δείτε μια μόνο φάση, αυτή θα είναι του αέρα.
- Αν τραβάτε μόνο αέρα, συνήθως η κίνηση του εμβόλου είναι πολύ μαλακή και δεν μπορεί να κάνει υποπίεση, σφίξετε το παξιμάδι ασφαλείας του εμβόλου και δοκιμάστε ξανά, αν συνεχίσετε να τραβάτε αέρια πολύ πιθανόν να έχει φράξει η βελόνα, σε αυτή την περίπτωση ενημερώστε τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.
- Η βελόνα περιέχει ένα όγκο, ο επιθυμητός όγκος είναι αυτός μέσα στο γυάλινο μέρος της σύριγγας, δεν περιλαμβάνει αυτόν της βελόνας, η βελόνα είναι σχεδιασμένη ώστε να κάθεται ακριβώς στο σημείο μηδενικής διαβάθμισης της σύριγγας. Για τον λόγο αυτό, η διαδικασία εισαγωγής τους δείγματος στους

αέριους χρωματογράφους, πρέπει να γίνεται ακριβώς όπως περιγράφεται στην γενική εισήγηση της αέριας χρωματογραφίας και στις αντίστοιχες ασκήσεις, ώστε να αποφευχθεί η αύξηση του νεκρού όγκου.

- Οι σύριγγες δεν πρέπει να τοποθετούνται στο φούρνο καθώς καταστρέφεται η βαθμονόμησή τους.
- Κάποια μοντέλα που έχουν πολύ λεπτό μοχλό εμβόλου, θέλουν ιδιαίτερη προσοχή κατά την εισαγωγή του δείγματος κυρίως στους αέριους χρωματογράφους που ασκείτε κάποια πίεση, καθώς λάθος χειρισμός μπορεί να το στραβώσουν το έμβολο.

Για τις ασκήσεις της αέριας χρωματογραφίας χρησιμοποιούνται σύριγγες Hamilton RN σειράς 800 των 5 ή 10 μl. Οι σύριγγες αυτές:

- έχουν χοντρό μοχλό εμβόλου και έτσι αποφεύγεται η πιθανότητα να στραβώσει
- έχουν ένα μεταλλικό μέρος πριν το γυάλινο, με αποτέλεσμα κατά την χρήση της δεν έρχεστε σε επαφή με το γυάλινο μέρος που βρίσκεται το διάλυμα και έτσι αποφεύγονται σφάλματα λόγω πιθανής θέρμανσης από την επαφή σας
- έχουν αποσπώμενη βελόνα και έτσι μπορεί να αντικατασταθεί όταν αυτό είναι απαραίτητο

Στις ασκήσεις της υγρής χρωματογραφίας χρησιμοποιούνται σύριγγες Hamilton των 50 ή 100 μl. Οι σύριγγες αυτές:

- Έχουν λεπτό μοχλό εμβόλου όμως για την εισαγωγή του δείγματος στους υγρούς χρωματογράφους δεν ασκείται κάποια ιδιαίτερη πίεση σε αυτόν.
- Έχει μόνο γυάλινο μέρος, όμως καθώς ο όγκος συλλογής του διαλύματος είναι σχετικά μεγάλος, το σφάλμα λόγω πιθανής θέρμανσης από τον χειριστή είναι πολύ μικρό.
- Έχουν αποσπώμενη βελόνα και έτσι μπορεί να αντικατασταθεί όταν αυτό είναι απαραίτητο.

Ζυγοί ακριβείας

Η λειτουργία ενός ζυγού στηρίζεται σε ένα ηλεκτρομαγνητικό πηνίο που αντισταθμίζει την κίνηση του αντικειμένου λόγω της βαρύτητας. Όσο μεγαλύτερο είναι το βάρος του αντικειμένου, τόσο περισσότερο ρεύμα χρειάζεται το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο, αυτό καταγράφεται και με βάση την βαθμονόμηση του η ένδειξη μετατρέπεται σε μονάδες βάρους.

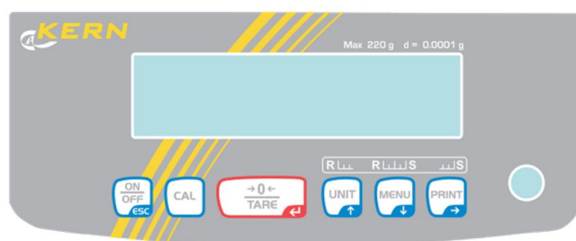
Ένας ζυγός αποτελείται από τα γυάλινα πορτάκια με το χερούλι τους δημιουργώντας ένα θάλαμο προστασίας από τα ρεύματα του αέρα, την φυσαλίδα ευθυγράμμισης, τα περιστρεφόμενα ποδαράκια ευθυγράμμισης, την οθόνη, το κουμπάκι ενεργοποίησης, το κουμπάκι του απόβαρου, το κουμπάκι των μονάδων μέτρησης καθώς και το κουμπάκι της βαθμονόμησης, εσωτερικά περιλαμβάνει το πιάτο ζύγισης, όπου τοποθετείται η ποσότητα προς ζύγιση. Στους ζυγούς των 4^{ων} δεκαδικών η σταθεροποίησή τους επηρεάζεται από την υγρασία και για την αφαίρεση της έχει τοποθετηθεί μέσα στα πορτάκια silica gel, για τον λόγο αυτό θα πρέπει να είναι **πάντα κλειστά τα πορτάκια** ώστε να μην καταστραφεί.



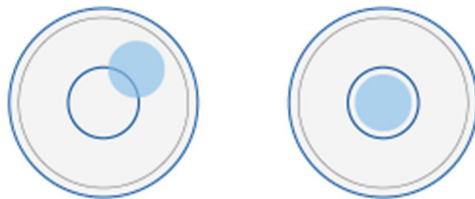
Στο εργαστήριο της Αναλυτικής Χημείας υπάρχουν τρεις ζυγοί των 4^{ων} δεκαδικών, ένας των 3^{ων} δεκαδικών και ένας των 2^{ων} δεκαδικών, ανάλογα με την ακρίβεια της κάθε ζύγισης επιλέγεται ο κατάλληλος ζυγός. Οι ζυγοί των 3^{ων} και 4^{ων} δεκαδικών έχουν πορτάκια ώστε ο ζυγός να απομονώνεται, καθώς το ρεύμα αέρα εμποδίζει την σταθεροποίησή του.

Τρόπος χρήσης:

Αρχικά επιλέγεται τον ζυγό που θα χρησιμοποιήσετε με βάση την ακρίβεια της ζύγισης που θέλετε και με βάση το μέγιστο βάρος που μπορεί να δεχτεί ο κάθε ζυγός. Δεν πρέπει να ξεπεράσετε το μέγιστο βάρος τους ζυγού καθώς τότε καταστρέφεται, αυτό θέλει πολύ προσοχή γιατί ενώ μπορεί το επιθυμητό βάρος της ζύγισης να είναι μικρό, θα πρέπει να υπολογίσετε στο συνολικό βάρος δηλ. και το βάρος του σκεύους που θα χρησιμοποιείτε. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται βαρκούλες ζύγισης που έχουν πολύ μικρό βάρος, όμως σε κάποιες ασκήσεις θα χρειαστεί να ζυγίσετε σε κάποιο σκεύος όπως πχ σε κωνικές ή ογκομετρικές φιάλες, σε αυτές τις περιπτώσεις θα πρέπει να είσατε προσεκτικοί στην επιλογή του ζυγού, στην περίπτωση που δεν είσατε σίγουροι ζητήστε την βοήθεια του υπευθύνου του εργαστηρίου.



Αφού επιλεγεί ο κατάλληλος ζυγός, ελέγχεται αν είναι ευθυγραμμισμένος. Πάνω στον ζυγό στο μπροστινό ή στο πίσω μέρος, θα υπάρχει ένα στρογγυλό παραθυράκι που περιέχει υγρό με μια φυσαλίδα εσωτερικά. Η φυσαλίδα αυτή θα πρέπει να είναι ακριβώς στο κέντρο του κύκλου τότε είναι ευθυγραμμισμένος. Στην περίπτωση που η φυσαλίδα δεν είναι ακριβώς στο κέντρο, περιστρέψτε τα ποδαράκια ευθυγράμμισης μέχρι να ευθυγραμμίσετε τον ζυγό, δηλ. η φυσαλίδα να πάει ακριβώς στο κέντρο του κύκλου. Αν δυσκολεύεστε να τον ευθυγραμμίσετε, ζητήσετε την βοήθεια του υπεύθυνου του εργαστηρίου, **μη ζυγίσετε αν ο ζυγός δεν είναι ευθυγραμμισμένος**, η ζύγιση δεν θα είναι σωστή.



Στη συνέχεια πατάτε το κουμπί ενεργοποίησης του ζυγού και τοποθετείτε στον ζυγό το σκεύος ζύγισης (πχ την βαρκούλα) και με **κλειστά τα πορτάκια** μηδενίζεται το απόβαρο πατώντας το αντίστοιχο κουμπί. Βάζετε την επιθυμητή ποσότητα και **μετράτε με κλειστά τα πορτάκια**, περιμένετε να σταθεροποιηθεί η μέτρηση και να βγάλετε τις μονάδες μέτρησης. Αν κατά την διαδικασία της ζύγισης σας πέσει ποσότητα εκτός του σκεύους ζύγισης, θα πρέπει να τη αφαιρέσετε, διαφορετικά η μετρούμενη τιμή θα είναι λάθος. Κατά την διάρκεια της ζύγισης, μην ακουμπάτε τον πάγκο και μην δημιουργείτε δονήσεις ή ρεύματα αέρα, καθώς αυτά επηρεάζουν την σταθεροποίηση του ζυγού. Όταν τελειώσετε την ζύγιση, αφού αφαιρέσετε το σκεύος με την ποσότητα που έχετε ζυγίσει, αφήνετε **τον ζυγό καθαρό** και πάντα **με κλειστά τα πορτάκια**, ώστε να μην καταστρέψετε η silica gel που είναι τοποθετημένη στο εσωτερικό του ζυγού για την αφαίρεση της υγρασίας. Τέλος, μηδενίζετε ξανά τον ζυγό, το σωστό είναι ο ζυγός να έχει την ένδειξη μηδέν και όχι το δικό σας απόβαρο.

Αν ο ζυγός σας βγάλεει το εικονίδιο της βαθμονόμησης, θα πρέπει να γίνει βαθμονομηθεί πριν την ζύγιση σας, στην περίπτωση αυτή ζητήσετε την βοήθεια του υπεύθυνου του εργαστηρίου. Η βαθμονόμηση σε κάποιους ζυγούς γίνεται αυτόματα, έχουν εσωτερικά πρότυπα και σε κάποιους γίνεται χειροκίνητα με εξωτερικά πρότυπα όμως και στους δύο τύπους θα πρέπει κατά διαστήματα να ελέγχονται με εξωτερικά πρότυπα βαράκια.

Σκευή που έχουν τοποθετηθεί αρχικά στον φούρνο θα πρέπει να έρθουν πρώτα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν χρησιμοποιηθούν για ζύγιση, διαφορετικά η ζύγιση δεν θα μπορεί να σταθεροποιηθεί.

Στο τέλος κάθε εργαστηριακής ημέρας, θα πρέπει να γίνεται εκτενή καθαριότητα των ζυγών από την ομάδα καθαριότητας. Με τις οδηγίες του υπεύθυνου του εργαστηρίου και με κλειστό ζυγό, αφαιρείται το πιάτο ζύγισης και καθαρίζεται και εσωτερικά ο ζυγός.

Φιάλες αερίων σε υψηλή πίεση

Σε πολλές ασκήσεις χρησιμοποιούνται αέρια υψηλής καθαρότητας, αυτά βρίσκονται μέσα σε μεταλλικές φιάλες σε αέρια μορφή, συμπιεσμένα. Σε μια καινούργια φιάλη η πίεση του αερίου αρχικά είναι κοντά στα 200 bar δηλ. κοντά στα 197 atm (1 bar = 0.987 atm) αυτή η πίεση είναι πάρα πολύ μεγάλη και για την ασφαλή εκτόνωση της χρησιμοποιούνται ρυθμιστές πίεσης.



Οι ρυθμιστές πίεσης έχουν δύο μανόμετρα, το εσωτερικό (προς το μέρος της φιάλης) καταγράφει την πίεση του αερίου μέσα στην φιάλη, αρχικά είναι στα 200 bar και καθώς αδειάζει η πίεση αυτή μειώνεται. Το εξωτερικό μανόμετρο που δείχνει την πίεση εξόδου του αερίου, η πίεση αυτή καθορίζεται από μια βαλβίδα ροής που έχει ο ρυθμιστής πίεσης και είναι η επιθυμητή πίεση που χρειάζεστε. Έτσι, επιτυγχάνεται η ομαλή εκτόνωση της φιάλης καθώς από τα 200 bar κατεβαίνει σε πίεση 3 – 5 bar ανάλογα με της ανάγκες της κάθε άσκησης. Η ρύθμιση της ροής εξόδου γίνεται μόνο από την βαλβίδα ροής που περιέχεται στον ρυθμιστή πίεσης, η βαλβίδα που βρίσκεται πάνω στην φιάλη του αερίου είναι μόνο για να ανοίξει ή να κλείσει την παροχή του αερίου από την φιάλη, δεν μπορεί να γίνει ρύθμιση ροής από αυτή. Το άνοιγμα γίνεται με περιστροφή της βαλβίδας ανάποδα με την κίνηση των δεικτών του ρολογιού και το κλείσιμο με περιστροφή της όπως την κίνηση των δεικτών. Μερικοί ρυθμιστές πίεσης έχουν μια επιπλέον βαλβίδα παροχής η οποία ανοίγει και κλείνει την παροχή του αερίου από την έξοδο του ρυθμιστή, η βαλβίδα αυτή δεν είναι βαλβίδα ροής.

Η ρύθμιση της ροής γίνεται μόνο με την βαλβίδα ροής.

Ανάλογα με την χρήση του αερίου, χρησιμοποιούνται αέρια διαφορετικής καθαρότητας, πάνω στην φιάλη υπάρχει σήμανση που δείχνει την καθαρότητα του αερίου, αυτή είναι ένας αριθμός με ένα δεκαδικό, που δείχνει πόσο επί της εκατό (%) περιέχεται το αέριο στο σύνολο του μίγματος. Ο αριθμός πριν την υποδιαστολή δίνει πόσα 9 είναι στο % και ο αριθμός μετά την υποδιαστολή δίνει το τελευταίο ψηφίο του %. Η καθαρότητα ενός αερίου έχει μεγάλη διαφορά στην τιμή αγοράς του έτσι για λόγους οικονομίας χρησιμοποιείται πάντα το λιγότερο καθαρό αέριο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κάθε όργανο και άσκηση.

Παράδειγμα:

- Σε ένα αέριο άζωτο (N_2) έχει την ένδειξη 4.6 οπότε θα έχει συνολικά 4 εννιάρια (9) και μετά από αυτά θα έχει την τιμή 6, δηλ. θα είναι 99.996% καθαρό ως προς το N_2 . Ο αριθμός 4 αναφέρεται στο σύνολο των 9 (πριν και μετά την υποδιαστολή στο %)
- Σε ένδειξη 4.7, θα έχει συνολικά πάλι 4 εννιάρια (9) και μετά από αυτά θα έχει την τιμή 7, δηλ. θα είναι 99.997%
- Σε ένδειξη 4.8, θα έχει συνολικά πάλι 4 εννιάρια (9) και μετά από αυτά θα έχει την τιμή 8, δηλ. θα είναι 99.998%
- Η ένδειξη 4.9 στην πραγματικότητα είναι 5 εννιάρια (9) οπότε θα έχει τη μορφή 5.0, δηλ. θα είναι 99.999%
- Η ένδειξη 6.0 αντιστοιχεί σε 6 εννιάρια (9) οπότε θα είναι 99.9999%
- υπάρχουν και ποιο χαμηλής ποιότητας αερίων όπως πχ το βιομηχανικό, σε αυτά δεν δίνεται κάποιος κωδικός αριθμός απλά η διάκριση γίνεται ονομαστικά

Προσοχή:

- Αν στο τέλος της εργαστηριακής ημέρας πρέπει να κλείσει η παροχή του αερίου, να είσαστε σίγουροι ότι έχετε κλείσει καλά όλες της βαλβίδες παροχής (από την φιάλη και από τον ρυθμιστής πίεσης αν έχει). Μικρή διαρροή θα έχει σαν αποτέλεσμα αφενός την ασφάλεια του εργαστηρίου (αν το αέριο είναι εύφλεκτο ή τοξικό πχ H₂, C₂H₂, CO) αφετέρου θα αδειάσει το περιεχόμενο της φιάλης που αυτό θα έχει σαν αποτέλεσμα να μην μπορέσει να πραγματοποιηθεί η άσκηση την επόμενη εργαστηριακή ημέρα και θα έχει και ένα μεγάλο κόστος αντικατάστασης του αερίου, συνήθως 300 με 400 €.
- Όταν η πίεση εξόδου είναι μεγαλύτερη ή μικρότερη από την επιθυμητή, ρυθμίστε την προσεκτικά από την βαλβίδα ροή του ρυθμιστής πίεσης. Κατά την αύξηση της, βλέπετε άμεση ανταπόκριση ενώ κατά την μείωση της χρειάζεται κάποιος χρόνος για να γίνει η εκτόνωση της από το σύστημα του οργάνου με το οποίο είναι συνδεδεμένο.
- Όταν η πίεση στο εσωτερικό μανόμετρο (πίεση του αερίου μέσα στην φιάλη) είναι πολύ μικρή, κάτω από 3 με 5 bar, η φιάλη έχει σχεδόν αδειάσει από το αέριο, στην περίπτωση αυτή ενημερώστε τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.
- Μετά την αντικατάσταση μια παλιάς φιάλης αερίου με μια καινούργια, γίνεται πάντα έλεγχος για μικροδιαρροές στις συνδέσεις του ρυθμιστής πίεσης, αυτό γίνεται τοποθετώντας σαπουνάδα και βλέποντας αν δημιουργούνται ή όχι φυσαλίδες από την διαρροή του αερίου. Στην περίπτωση που δημιουργούνται, σφίγγονται καλύτερα οι συνδέσεις του ρυθμιστή πίεσης και ελέγχετε ξανά.

Υπάρχουν διαφορετικοί ρυθμιστές πίεσης ανάλογα με το αέριο, στα επικίνδυνα αέρια το σπείρωμα σύνδεσης με την φιάλη είναι ανάποδο, αυτό γίνεται για λόγους ασφαλείας, ώστε να υπάρχει αυξημένη προσοχή κατά την σύνδεση τους.



Χρωματική κωδικοποίηση και σήμανση φιαλών αερίου:

Τα αέρια που χρησιμοποιούνται μερικά είναι επικίνδυνα, εύφλεκτα ή τοξικά, ο χρήστης θα πρέπει να ξέρει την επικινδυνότητα του κάθε αερίου που χρησιμοποιεί. Υπάρχει σήμανση που διευκολύνει για αυτό, τόσο με το χρώμα της φιάλης όσο και με μια ετικέτα επικινδυνότητας.

A. Χρωματική κωδικοποίηση:

Το σύστημα χρωματικού κωδικού της φιάλης αερίου έχει σχεδιαστεί για να παρέχει μια άμεση οπτική ένδειξη που αναγνωρίζει το περιεχόμενο για πρακτικούς λόγους και λόγους ασφαλείας. Εφαρμόζονται διαφορετικά χρώματα στον ώμο και στην κορυφή του κυλίνδρου για να υποδηλώσουν διαφορετικές κατηγορίες αερίων, π.χ. αδρανές, εύφλεκτα, οξειδωτικά και σε ορισμένες περιπτώσεις, ειδικά αέρια. Για παράδειγμα, ένας κύλινδρος οξυγόνου είναι λευκός στην κορυφή, το ήλιο είναι καφέ, το άζωτο είναι μαύρο και το αργό είναι σκούρο πράσινο. Το χρώμα του σώματος της φιάλης αερίου (σε αντίθεση με το πάνω μέρος) δεν σημαίνει τίποτα και εξαρτάται από την προτίμηση του κατασκευαστή.

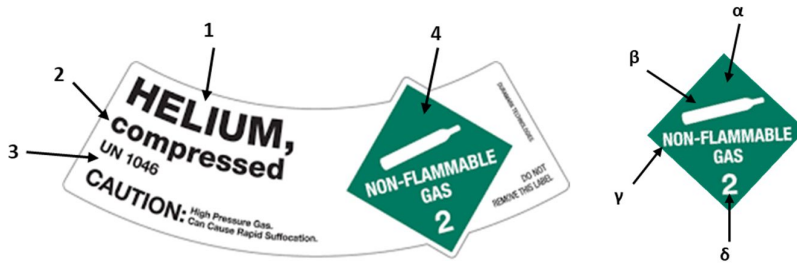
Χρωματική ταξινόμηση

	με το είδος του αερίου	Με την επικινδυνότητα
Μαρόν*	 Ακετυλένιο	Ανοιχτό πράσινο  Αδρανής
Άσπρο	 Οξυγόνο	Κόκκινο  Εύφλεκτα
Σκούρο πράσινο	 Αργό	
Μαύρο	 Άζωτο	
Γκρι	 Διοξείδιο του άνθρακα	
Καφέ	 Ήλιο	

*χρώμα Μαρόν: είναι μια μεσαία σκούρα σκιά του κόκκινου

B. Σήμανση φιαλών:

Οι ετικέτες επικινδυνότητας παρέχουν αρκετές πληροφορίες, όπως:



A. Το όνομα του αερίου (1).

B. Σε τη μορφή βρίσκεται το αέριο (2).

C. τον αριθμός UN (3):

Ο αριθμός UN (United Nations) είναι ένας τετραψήφιος κωδικός που χρησιμοποιείται για την αναγνώριση επικίνδυνων υλικών και έχει τιμές από UN0004 έως UN3600.

D. Την πινακίδα επικινδυνότητας hazmat (4):

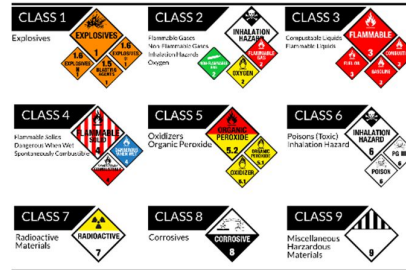
Έχει το σχήμα διαμαντιού και περιλαμβάνει:

I. Το χρώμα (α): Εκτός από τους αριθμούς ταξινόμησης, οι ετικέτες αναγνωρίζονται πιο εύκολα από τα διαφορετικά τους χρώματα, έτσι:

- Το πορτοκαλί είναι για εκρηκτικά υλικά, συμπεριλαμβανομένων προϊόντων όπως δυναμίτης, πυρομαχικά ή πυροτεχνήματα.
- Το κόκκινο είναι για εύφλεκτα προϊόντα όπως βενζίνη, οινόπνευμα εντριβής, μογιό ή ακετόνη.
- Το πράσινο είναι για μη εύφλεκτης ουσίες όπως συμπιεσμένα ή υγροποιημένα αέρια.
- Το κίτρινο είναι για τη μεταφορά οξειδωτικών - όπως το νιτρικό αμμώνιο, το νιτρικό κάλιο ή το νιτρικό οξύ - που είναι πιθανό να καούν όταν αναμειγνύονται με οξυγόνο.
- Το λευκό είναι για δηλητηριώδεις και βιο-επικίνδυνες ουσίες όπως βαφές, οξέα και ιατρικά απόβλητα.
- Το μπλε είναι για υλικά που μπορούν να γίνουν εύφλεκτα όταν συνδυάζονται με νερό, όπως το νάτριο, το ασβέστιο και το κάλιο.
- Ένα μισό κόκκινο και άσπρο είναι σημάδι που υποδηλώνει την παρουσία ουσιών που μπορούν να αναφλεγούν όταν εκτεθούν στον αέρα, όπως αλκάλια αλουμινίου και λιθίου ή λευκός φώσφορος.
- Οι κόκκινες και άσπρες ρίγες είναι για εύφλεκτα στερεά όπως σπύρτα και μαγνήσιο.
- Το κόκκινο και το κίτρινο είναι για οργανικά υπεροξειδία που μπορούν να αναφλεγούν ή να εκραγούν, συμπεριλαμβανομένου του υπεροξειδίου της μεθυλαιθυλοκετόνης και του υπεροξειδίου του βενζοϋλίου.
- Το κίτρινο και το λευκό είναι για ραδιενεργές ουσίες που βρίσκονται συχνά στον ιατρικό εξοπλισμό.
- Το μισό λευκό και το μισό μαύρο είναι για διαβρωτικά υλικά που μπορούν να ερεθίσουν και να βλάψουν το δέρμα, συμπεριλαμβανομένων των μπαταριών, του υδροχλωρικού οξέος, του θειικού οξέος και του υδροξειδίου του νατρίου.
- Το λευκό με κόκκινες κάθετες ρίγες είναι για διάφορα επικίνδυνα εμπορεύματα, συμπεριλαμβανομένων μη ταξινομημένων, επικίνδυνων για το περιβάλλον ουσιών όπως ο αμίαντος και ο ξηρός πάγος.



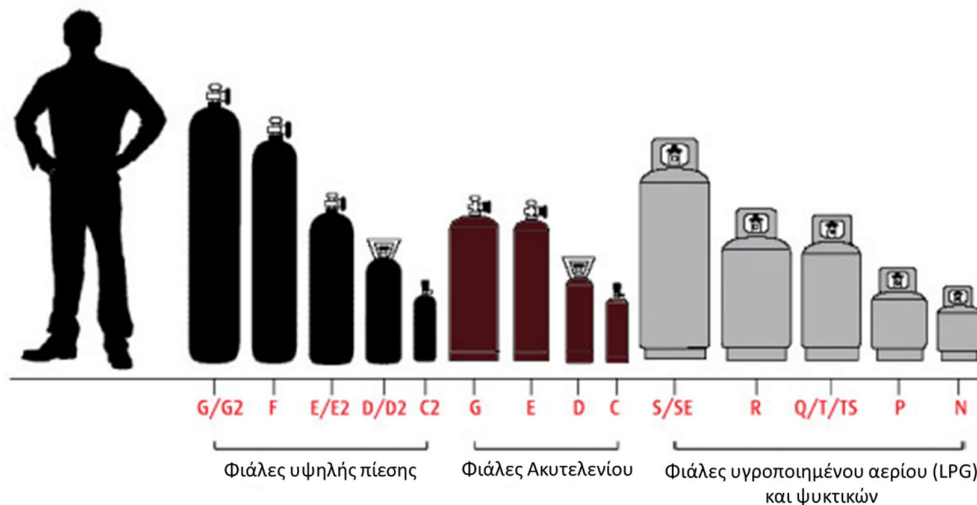
- II. Γραφικά (β): Χρησιμοποιούνται εικονογραφήσεις για να ενισχύσουν τον κίνδυνο του περιεχομένου τους, για παράδειγμα, για τοξικά τα υλικά χρησιμοποιείται μια εικόνα κρανίου ενώ για τα ραδιενεργά υλικά υπάρχει ένα σύμβολο ακτινοβολίας.
- III. Λέξεις (γ): Ανάλογα με το περιεχόμενο κάθε δοχείου, η ετικέτα έχει διάφορους όρους όπως: «Spontaneously Combustible - αυθόρμητα εύφλεκτο», «Explosive - εκρηκτικό», «Non flammable Gas - μη εύφλεκτο αέριο», «Oxygen - οξυγόνο», «Poison - δηλητήριο», «Poison - εύφλεκτο» και άλλα.
- IV. Την κατηγορία επικινδυνότητας (δ), υπάρχουν 9 κατηγορίες:
- Κλάση 1: εκρηκτικά υλικά
 - Κλάση 2: εύφλεκτα, μη εύφλεκτα και τοξικά αέρια
 - Κλάση 3: εύφλεκτα υγρά
 - Κλάση 4: εύφλεκτα, αυθόρμητα εύφλεκτα και αντιδραστικά στο νερό στερεά
 - Κλάση 5: οξειδωτικά και οργανικά υπεροξειδία
 - Κλάση 6: τοξικά υγρά και στερεά
 - Κλάση 7: ραδιενεργά υλικά
 - Κλάση 8: διαβρωτικά υλικά
 - Κλάση 9: διάφορα υλικά



Κάθε κατηγορία διακρίνεται σε υποκατηγορίες, στα αέρια είναι:

- 2.1: εύφλεκτα αέρια
- 2.2: μη εύφλεκτα αέρια
- 2.3: τοξικά αέρια

Υπάρχουν διάφορα είδη φιαλών ως προς την χωρητικότητά τους και το είδος του αερίου που περιέχουν. Στο εργαστήριο χρησιμοποιούνται φιάλες υψηλής πίεσης καθώς και φιάλες ακυτελενίου.



Παραδείγματα ετικετών αερίων που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο:

	<ul style="list-style-type: none"> • Άζωτο (N_2) • UN1066 • συμπιεσμένο αέριο • πράσινη ετικέτα • μη εύφλεκτο αέριο • κατηγορία κινδύνου 2.2
	<ul style="list-style-type: none"> • Υδρογόνο (H_2) • UN1049 • συμπιεσμένο αέριο • κόκκινη ετικέτα • εύφλεκτο αέριο • κατηγορία κινδύνου 2.1
	<ul style="list-style-type: none"> • Ήλιο (He) • UN1046 • συμπιεσμένο αέριο • πράσινη ετικέτα • μη εύφλεκτο αέριο • κατηγορία κινδύνου 2.2
	<ul style="list-style-type: none"> • Αργό (Ar) • UN1006 • συμπιεσμένο αέριο • πράσινη ετικέτα • μη εύφλεκτο αέριο • κατηγορία κινδύνου 2.2
	<ul style="list-style-type: none"> • Συνθετικός Αέρας ($O_2 + N_2$) • UN1002 • συμπιεσμένο αέριο • πράσινη ετικέτα • μη εύφλεκτο αέριο • κατηγορία κινδύνου 2.2
	<ul style="list-style-type: none"> • Ακετυλένιο (C_2H_2) • UN1001 • διαλυμένο αέριο • κόκκινη ετικέτα • εύφλεκτο αέριο • κατηγορία κινδύνου 2.1

Διαγράμματα:

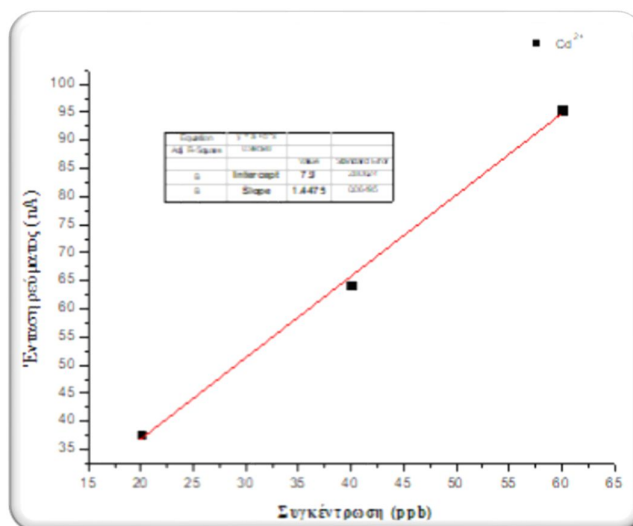
Για την επεξεργασία των δεδομένων που συλλέγονται είναι απαραίτητο να κατασκευαστούν διαγράμματα με τη χρήση κάποιου υπολογιστικού προγράμματος, όπως είναι το Origin ή το Excel ή κάποιο άλλο αντίστοιχο. Πάντα στον άξονα των Χ είναι οι συγκεντρώσεις και στον άξονα των Υ οι μετρούμενες τιμές.

Οδηγίες για τη δημιουργία τους έχουν γίνει με το υπολογιστικό πρόγραμμα Origin, σας δίνονται αναλυτικά στα βίντεο της κάθε άσκησης καθώς και στα αντίστοιχα βίντεο του κάθε είδους διαγράμματος που βρίσκονται στη πλατφόρμα του e-class του μαθήματος.

Τα είδη των διαγραμμάτων που χρησιμοποιούνται είναι:

1. Εξίσωση 1^{ου} βαθμού (καμπύλη αναφοράς)

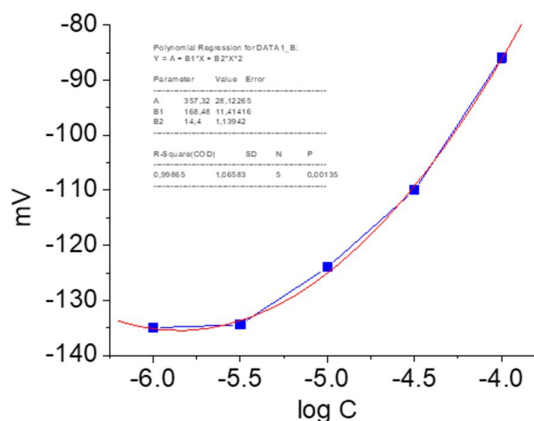
Για τη δημιουργία μιας καμπύλης αναφοράς (ή καμπύλη βαθμονόμησης) είναι απαραίτητη η δημιουργία μιας ευθείας 1^{ου} βαθμού με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Η εξίσωση που δημιουργείται είναι της μορφής $Y = aX + b$, όπου a είναι η κλίση της ευθείας (ή ευαισθησία της μεθόδου) και b η τεταγμένη. Το πόσο καλή είναι η ευθεία δίνεται από το λόγο R (ή R^2). Όσο πιο κοντά στη μονάδα είναι τόσο πιο καλά προσαρμόζονται τα σημεία στην ευθεία που έχει δημιουργηθεί. Τιμές μικρότερες από 0.99 δεν θεωρούνται πολύ καλές και συνήθως οφείλονται σε λάθη που έχει πραγματοποιήσει ο πειραματιστής κατά τη διάρκεια του πειράματος καθώς όμως και σε σφάλματα που δημιουργούνται κατά τη διαδικασία εκτέλεσης της άσκησης. Καμπύλες βαθμονόμησης χρησιμοποιούνται σε πολλές ασκήσεις.



Σε κάθε άσκηση που χρησιμοποιείται καμπύλη αναφοράς 1^{ου} βαθμού θα πρέπει να υπολογίζονται τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου και να χρησιμοποιούνται όταν αυτό είναι απαραίτητο.

2. Εξίσωση 2^{ου} βαθμού

Η εξίσωση που δημιουργείται θα έχει τη μορφή $Y = aX^2 + bX + c$. Το R^2 είναι δείκτης του πόσο καλή εφαρμογή έχουν τα σημεία πάνω στη καμπύλη και κατά επέκταση πόσο πετυχημένη ήταν η διαδικασία των μετρήσεων. Η λύση της εξίσωσης γίνεται με τη χρήση της διακρίνουσας, από τις πραγματικές λύσεις χρησιμοποιείται αυτή που είναι μέσα στα όρια των πρότυπων διαλυμάτων. Εξίσωση 2^{ου} βαθμού χρησιμοποιείται στην άσκηση του προσδιορισμού ιόντων K καθώς και στην άσκηση GC-TCD.



3. Εύρεση τομής δύο ευθειών

Αρχικά δημιουργούνται δύο διαφορετικές ευθείες 1^{ου} βαθμού:

$$1) Y = a_1X + b_1 \text{ και } 2) Y = a_2X + b_2$$

Στο σημείο τομής των δύο ευθειών οι τιμές των Y είναι ίσες οπότε θα ισχύει:

$$a_1X + b_1 = a_2X + b_2,$$

όπου λύνοντας την εξίσωση ως προς X, υπολογίζεται η τιμή του. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται στην άσκηση της αγωγιμομετρίας.

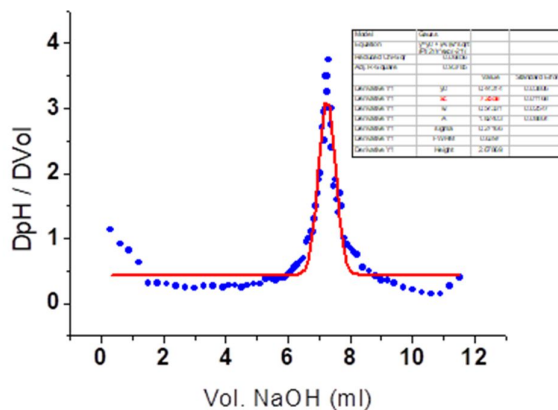
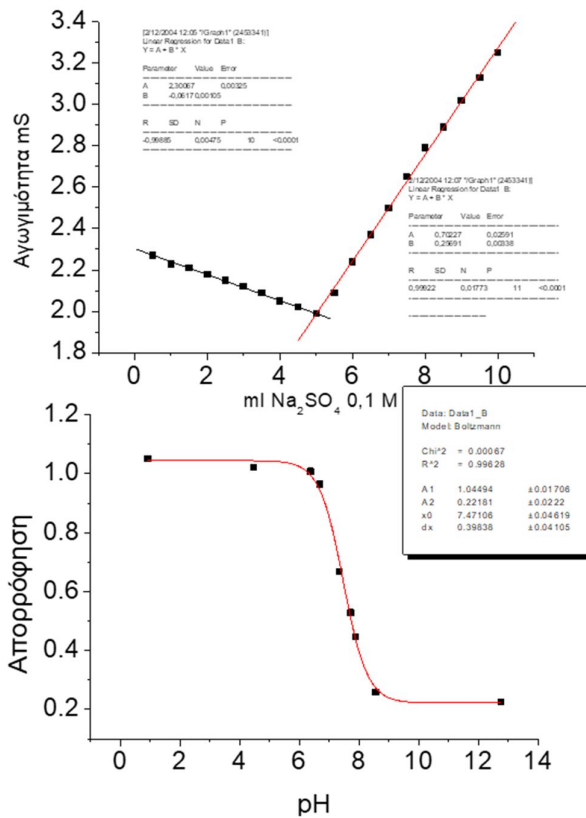
4. Δημιουργία σιγμοειδούς καμπύλης

Δημιουργείται η σιγμοειδής καμπύλη και στη συνέχεια υπολογίζεται το ισοδύναμο σημείο της. Το διάγραμμα αυτό χρησιμοποιείται στην άσκηση του προσδιορισμού του pKa ενός δείκτη καθώς και στην άσκηση του pH.

5. Δημιουργία διαγράμματος πρώτης παραγώγου

Δημιουργείται αρχικά ένα σιγμοειδές διάγραμμα και στη συνέχεια από αυτό δημιουργείται το διάγραμμα της πρώτης παραγώγου από το οποίο υπολογίζεται το ισοδύναμο σημείο. Ο υπολογισμός του ισοδύναμου σημείου από το διάγραμμά της 1^{ης} παραγώγου είναι πιο ακριβές από το ισοδύναμο σημείο που υπολογίζεται από τη σιγμοειδή καμπύλη. Το διάγραμμα αυτό χρησιμοποιείται στην άσκηση του pH.

Τα βίντεο για κάθε διάγραμμα είναι στο e-class του μαθήματος καθώς και στο κανάλι του εργαστηρίου στο youtube:



Εργ. Αναλυτικής I:



<https://www.chemistry.uoc.gr/eclass/modules/document/?course=CHEM-UNDER114>

Εργ. Αναλυτικής II:



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

Youtube:



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

Περίγραμμα Ασκήσεων Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας I & II

Οι ασκήσεις του εργαστηρίου είναι σχεδιασμένες ώστε να καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος της θεωρίας και της οργανολογίας της Αναλυτικής Χημείας. Κάθε εργαστηριακή περίοδο περιλαμβάνει επτά ασκήσεις, με το πρώτο κύκλο να δίνει έμφαση περισσότερο στην ηλεκτροχημεία και στις τεχνικές πάνω σε αυτή και στο δεύτερο κύκλο ασκήσεων στη χρωματογραφία και σε τεχνικές διαχωρισμού και ανίχνευσης. Μια σύντομη περιγραφή τους δίνεται παρακάτω:

A. στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας I:

1. Προσδιορισμός pK_a του δείκτη bromothymol blue

Θεωρία

- Εξίσωση Henderson – Hasselbalch
- Περί Δεικτών – bromothymol blue
- Νόμος Beer – Lambert

Οργανολογία

- Περί Φασματοφωτόμετρου UV/VIS
- pH-μετρο – Ηλεκτρόδιο υάλου

Πειραματικό

- Προσδιορισμός pK_a του δείκτη bromothymol blue



2. Ποτενσιομετρική μέτρηση του pH

Θεωρία

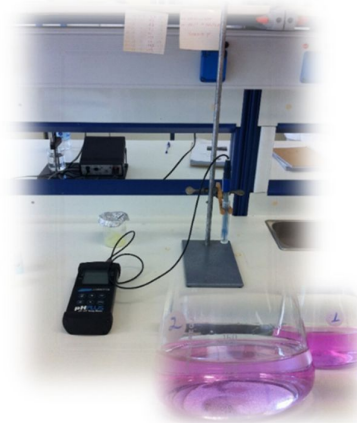
- Ποτενσιομετρικές τιτλοδοτήσεις
- Περί ογκομετρήσεων

Οργανολογία

- pH-μέτρο – Ηλεκτρόδιο υάλου

Πειραματικό

- Δημιουργία πρότυπου τιτλοδότη και βαθμονόμηση του με τιτλοδότηση
- Ανάλυση άγνωστου δείγματος με ποτενσιομετρική τιτλοδότηση



3. Ανάλυση Κρασιών

Θεωρία

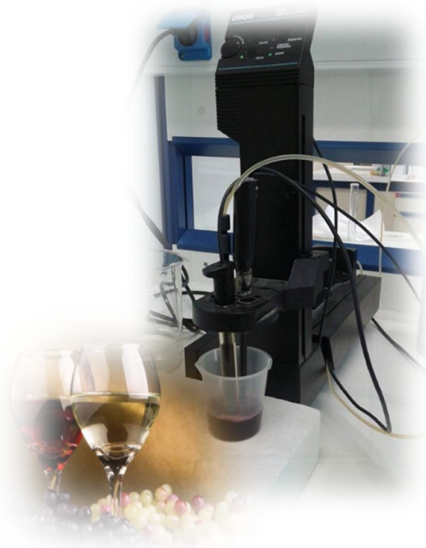
- Αυτόματες τιτλοδοτήσεις
- Περί κρασιών (ποικιλίες, κατηγορίες κλπ.)
- Μέθοδοι και χημεία για:
 - α) Σάκχαρα
 - β) Ελεύθερη οξύτητα (pH)
 - γ) Ολική Οξύτητα
 - δ) Θειώδη (ελεύθερα και ολικά)
 - ε) Αλκοόλη

Οργανολογία

- Ηλεκτρόδιο οξειδοαναγωγής (redox)
- Επιλεκτικό ηλεκτρόδιο φθορίου (fluoride)
- Ηλεκτρόδιο υάλου pH

Πειραματικό

- Υπολογισμός σε δείγμα από κρασί σε
 - α) τα σάκχαρα
 - β) την ελεύθερη (pH) και ολική οξύτητα
 - γ) το ελεύθερο και ολικό διοξείδιο του θείου
 - δ) την αλκοόλη



4. Ανάλυση Λιπαρών Υλών - Ελαιόλαδο

Θεωρία

- Περί ελαιόλαδου
- Οξείδωση λιπαρών υλών, αριθμός υπεροξειδίων
- Ιωδομετρική τιτλοδότηση
- Φασματοφωτομετρικές τιμές ελαιόλαδου
- Κατηγορίες ελαιόλαδου

Οργανολογία

- Φασματοφωτόμετρο - UV/VIS

Πειραματικό

- Προσδιορισμός Αριθμού Υπεροξειδίων (Α.Υ.) λαδιού μέσω τιτλοδότησης
- Προσδιορισμός φασματοφωτομετρικών τιμών λαδιού (Κ)



5. Αγωγιμομετρία

Θεωρία

- Αγωγιμότητα – Βασικοί όροι
- Σταθερά κυψέλης ηλεκτροδίου
- Αγωγιμομετρικές τιτλοδοτήσεις
- Πρότυπη καμπύλη

Οργανολογία

- Αγωγιμόμετρο - ηλεκτρόδιο πλατίνας

Πειραματικό

- Εύρεση της σταθερά της κυψέλης ηλεκτροδίου
- Εύρεση της συγκέντρωσης του BaCl_2 με τιτλοδότηση
- Εύρεση της συγκέντρωσης αγνώστου CaSO_4 μέσω καμπύλης αναφοράς από πρότυπα δείγματα



6. Ανάλυση ιόντων K^+ στο νερό με επιλεκτικό Ηλεκτρόδιο

Θεωρία

- Περί νερών (επιτραπέζια – φυσικά – μεταλλικά)
- Περί Καλίου
- Χημικοί αισθητήρες - επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων
- Valinomycin

Οργανολογία

- Επιλεκτικό ηλεκτρόδιο K

Πειραματικό

- Δημιουργία πρότυπων δειγμάτων
- Ποσοτικός προσδιορισμός ιόντων K σε δείγματα νερού μέσω καμπύλης αναφοράς



7. Πολαρογραφικός προσδιορισμός ιόντων Cd^{2+} και Pb^{2+}

Θεωρία

- Βαρέα μέταλλα (pb, cd)
- Περί Hg
- Απαέρωση και η σημασία της
- Είδη πολαρογραφίας:
 - a) Βολταμετρία
 - b) Κυκλική βολταμετρία
 - c) Βολταμετρία τετραγωνικού κύματος
 - d) Διαφορική παλμική πολαρογραφία
 - e) Αναδιαλυτική τεχνική

Οργανολογία

- Πολαρογράφος:
 - a) Ηλεκτρόδιο εργασίας (σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου)
 - b) αναφορικό ηλεκτρόδιο (Ag/AgCl)
 - c) βοηθητικό ηλεκτρόδιο (carbon)

Πειραματικό

- Προσδιορισμός Μολύβδου και καδμίου σε άγνωστο δείγμα (μέσω καμπύλων αναφορά από πρότυπα δείγματα)



B. Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας II

1. Αέρια Χρωματογραφία με ανιχνευτή Ιονισμού Φλόγας (GC-FID)

Θεωρία

- Περί Αέριας Χρωματογραφίας
- Τριχοειδείς στήλες
- τεχνική του διαμοιρασμού (split)
- Χρήση εσωτερικού πρότυπου
- ανιχνευτής FID



Οργανολογία

- Αέριος Χρωματογράφος με ανιχνευτή FID (GC Focus – Thermo Finnigan)

Πειραματικό

- Δημιουργία πρότυπου διαλύματος αλκοολών και μέτρηση των συντελεστών κατακράτησης τους (RRF)
- Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός αλκοολών σε:
 - a) άγνωστο δείγμα
 - b) σε ποτά προερχόμενα από απόσταξη (πχ ρακή)

2. Αέρια Χρωματογραφία με ανιχνευτή Θερμικής Αγωγιμότητας (GC-TCD)

Θεωρία

- Περί Αέριας Χρωματογραφίας
- Πληρωμένες στήλες
- On - column εισαγωγέας
- Περί Van Deemter
- ανιχνευτής TCD

Οργανολογία

- Αέριος Χρωματογράφος με ανιχνευτή TCD (GC – GOW MAC)

Πειραματικό

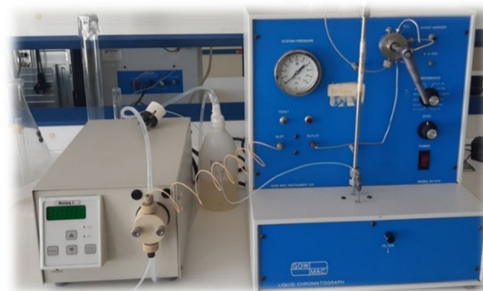
- Προσδιορισμός βέλτιστης ταχύτητας ροής
- Ποιοτικός προσδιορισμός άγνωστου δείγματος



3. Υγρή Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RPLC)

Θεωρία

- Περί υγρής χρωματογραφίας
- Μελέτη της Μεθόδου Κατανομής στην RPLC
- Για θεωρία Hansch
- Κολώνες στην RPLC (C18)
- βαλβίδα εισαγωγής δείγματος (6 θέσεων)



Οργανολογία

- Υγρή Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (LC – GOW MAC)

Πειραματικό

- Προσδιορισμός της απόδοσης του συστήματος μέσω των συντελεστών Hansch
- Ποιοτικός προσδιορισμός άγνωστου δείγματος με τη χρήση προτύπων

4. Ιοντική Χρωματογραφία (IC)

Θεωρία

- Περί ιοντικής χρωματογραφίας
- Στήλες ιονταλλαγής
- Καταστολείς σήματος διαλύτη
- Αγωγιμομετρικός ανιχνευτής
- βαλβίδα εισαγωγής δείγματος (6 θέσεων)



Οργανολογία

- Ιοντική Χρωματογραφία για ανάλυση κατιόντων

Πειραματικό

- Δημιουργία πρότυπων διαλυμάτων
- Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός μέσω καμπύλων αναφοράς
 - a) Άγνωστου δείγματος
 - b) Δείγμα από το νερό του δικτύου του Πανεπιστημίου

5. Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης (AA)

Θεωρία

- Περί τεχνικής της Ατομικής Απορρόφησης
- Ατομοποίηση με φλόγα
- Λάμπες κοίλης καθόδου
- Περί Μαγνησίου και Ασβεστίου



Οργανολογία

- Ατομική Απορρόφηση με τη χρήση φλόγας (Agilent 55B)

Πειραματικό

- Δημιουργία πρότυπων διαλυμάτων
- Ποσοτικός προσδιορισμός Μαγνησίου και Ασβεστίου σε:
 - A. Άγνωστο δείγμα
 - B. Πόσιμα εμφιαλωμένα νερά
 - C. Πόσιμα νερά δικτύων
 - D. Νερό από το δίκτυο του Πανεπιστημίου

6. Προσδιορισμός συγκέντρωσης Φωσφόρου σε ποτά κόλας

Θεωρία

- Περί φασματοφωτομέτρου UV/VIS
- Μέθοδος «μπλε του μολυβδαινίου»
- Φωσφορικό οξύ στις κόλες

Οργανολογία

- Φασματοφωτόμετρο UV-VIS μονής δέσμης – πολλαπλών θέσεων

Πειραματικό

- Δημιουργία πρότυπων διαλυμάτων
- Προσδιορισμός φωσφορικού οξέος σε ποτά κόλας μέσω καμπύλης αναφοράς



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

Θεωρία

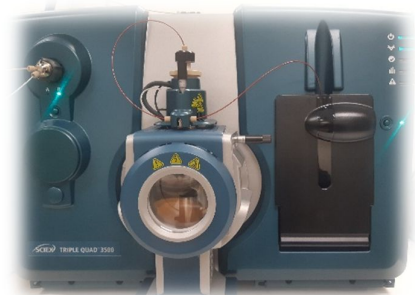
- Περί Φασματοσκοπία μάζας
- Τεχνική του ηλεκτροψεκασμού
- Πρωτεΐνες

Οργανολογία

- Φασματόμετρο με σύστημα ηλεκτροψεκασμού (Triple Quad 3500 – Sciex)

Πειραματικό

- Προσδιορισμός μοριακού βάρους πρωτεΐνης



Γενικές Εισηγήσεις

Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατού (UV – Vis)

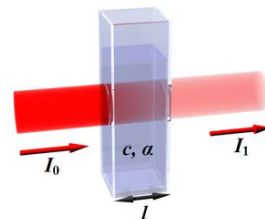
Διαπερατότητα-Απορρόφηση

Διαπερατότητα είναι το κλάσμα του φωτός που περνά από το δείγμα και έχει εύρος από 0 έως 1,

$$T=I_i/I_o$$

Η απορρόφηση συνδέεται με τη διαπερατότητα με το τύπο:

$$A=-\log(T)$$



Νόμος Beer - Lambert

Η απορρόφηση A είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωσή της ουσίας (c) και δίνεται από την εξίσωση:

$$A = \varepsilon * b * c$$

Όπου: **c** : η συγκέντρωση της ουσίας σε mol/L (M).

b: το μήκος της οπτικής διαδρομής σε cm (αντιστοιχεί στο πάχος της κυψελίδας)

ε: συντελεστής απορροφητικότητας (ή συντελεστής απόσβεσης)σε M⁻¹cm⁻¹

(η γραμμομοριακή απορροφητικότητα είναι χαρακτηριστικό της ουσίας που

δηλώνει πόσο φως απορροφάτε σε συγκριμένο μήκος κύματος)

Προϋποθέσεις για να ισχύει ο νόμος του Beer - Lambert:

1. Η ακτινοβολία να είναι μονοχρωματική
2. Μοναδικό φαινόμενο να είναι η απορρόφηση
3. Να είναι όγκος του διαλύματος ομοιόμορφος
4. Κάθε σωματίδιο να απορροφά ανεξάρτητα και να μην αλληλοεπιδρά με τα άλλα σωματίδια του διαλύματος

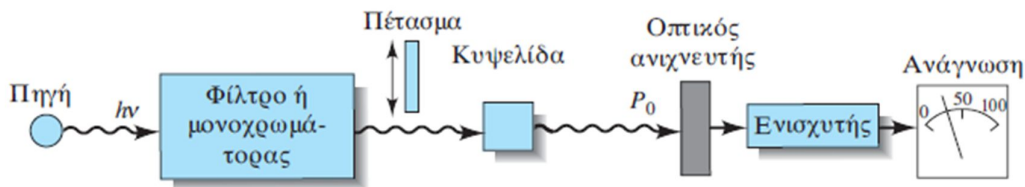
Ο νόμος του Beer-Lambert εφαρμόζεται και σε υλικά που περιέχουν περισσότερα του ενός συστατικά που απορροφούν με τη προϋπόθεση ότι δεν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Η ολική απορρόφηση του συστήματος δίνεται από τη σχέση:

$$A_{ολική}=A_1+A_2+A_3+...+A_n$$

Τα βασικά μέρη ενός φασματοφωτόμετρου είναι:

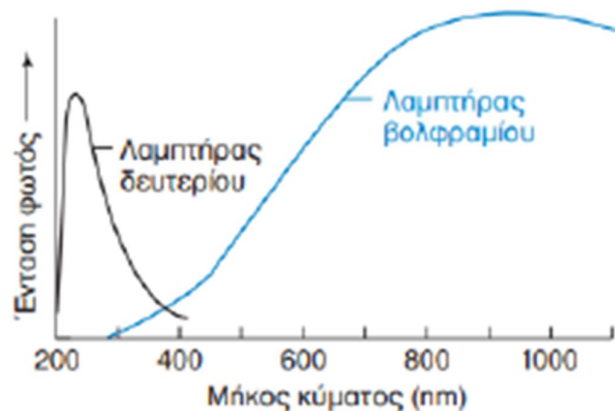
1. Η πηγή της ακτινοβολίας
2. Ο μονοχρωμάτορας
3. Η κυψελίδα με το δείγμα
4. Ο ανιχνευτής
5. Το καταγραφικό





Η πηγή της ακτινοβολίας διαφοροποιείται ανάλογα με το επιθυμητό μήκος κύματος. Σε ένα φασματοφωτόμετρο ορατού υπεριώδους περιέχονται δύο πηγές:

1. μία για τη περιοχή του ορατού (400 – 800 nm) που χρησιμοποιείται μια απλή λάμπα πυρακτώσεως από βολφράμιο (400 πάνω από 1000 nm).
2. και μία για τη περιοχή του υπεριώδους (200 – 400 nm) που χρησιμοποιείται μια λάμπα δευτερίου.



Το φάσμα που εκπέμπεται από τις λάμπες μετατρέπεται σε μονοχρωματικό περνώντας μέσα από ένα μονοχρωμάτορα (συνήθως ένα πρίσμα). Στη συνέχεια η ακτινοβολία διέρχεται από την κυψελίδα που περιέχει το δείγμα. Υπάρχει διάκριση μεταξύ των υλικών που είναι κατασκευασμένη η κυψελίδα ανάλογα το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται. Στη περιοχή του υπεριώδους δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν γυάλινες (ή από πολυστυρένιο) κυψελίδες επειδή σε αυτή τη περιοχή απορροφούν. Ένας εύκολος τρόπος να το θυμόμαστε αυτό είναι ότι τα γυαλιά ηλίου χρησιμοποιούνται επειδή απορροφάνε την UV ακτινοβολία του ήλιου, στη περιοχή αυτή χρησιμοποιούνται κυψελίδες από quartz (χαλαζία). Στη περιοχή του ορατού χρησιμοποιούνται οι γυάλινες (ή πλαστικές) κυψελίδες, μπορούν όμως να χρησιμοποιηθούν και κυψελίδες από χαλαζία καθώς δεν απορροφούν σε αυτή τη περιοχή, αποφεύγεται όμως η χρήση τους λόγω του υψηλού κόστους του υλικού.

Η ακτινοβολία στη συνέχεια πηγαίνει στον ανιχνευτή που συνήθως είναι ένας απλός φωτοπολλαπλασιαστής, ότι φωτόνιο πέσει πάνω του το μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα.

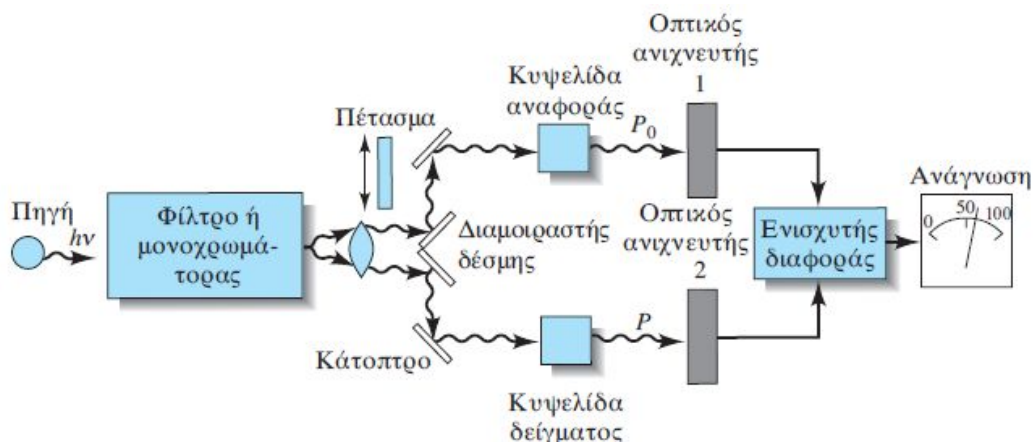
Το σήμα που δίνει ο ανιχνευτής ενισχύεται μέσω ενός ηλεκτρονικού κυκλώματος και τέλος καταγράφεται σε ένα καταγραφικό που μπορεί να είναι ένα ηλεκτρονικός υπολογιστής, μια απλή οθόνη ή ένας plotter.

Τα φασματοφωτόμετρα διακρίνονται σε μονής δέσμης και σε διπλής δέσμης.

Το **μονής δέσμης** έχει τα μέρη που έχουν ήδη αναφερθεί, με μία θέση για την κυψελίδα του δείγματος. Σε αυτό αρχικά τοποθετείται το τυφλό δείγμα, καταγράφεται τη τιμή του, στη συνέχεια το

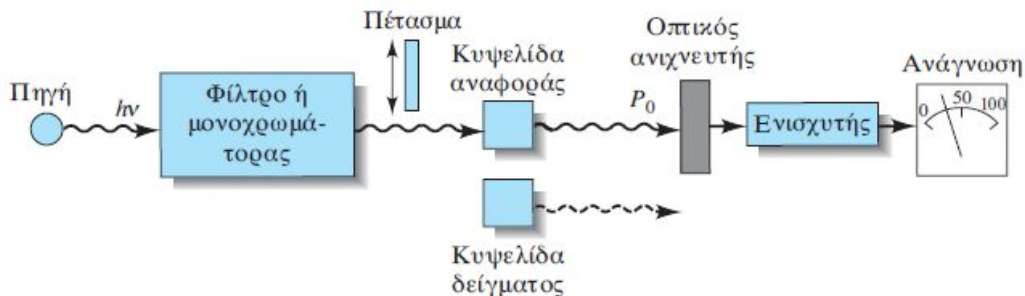
αφαιρείτε και τοποθετείτε στη θέση του το δείγμα προς ανάλυση, καταγράφετε τη τιμή του και αφαιρείτε τη τιμή του τυφλού.

Στο φασματοφωτόμετρο **διπλής δέσμης**, η οργανολογία διαφοροποιείται ως εξής:



Οι πηγές είναι όπως και στη μονή δέσμη, η ακτινοβολία περνάει πάλι από ένα μονοχρωμάτορα ώστε να γίνει μονοχρωματική ακτινοβολία και στη συνέχεια διαχωρίζεται σε δύο μέρη. Το ένα μέρος περνάει από την κυψελίδα που είναι τοποθετημένο το τυφλό δείγμα και το άλλο μέρος από την κυψελίδα με το δείγμα προς ανάλυση. Υπάρχουν δύο ανιχνευτές, ένας για κάθε κυψελίδα με αποτέλεσμα να γίνεται ταυτόχρονη μέτρηση του τυφλού και του προς ανάλυση δείγματος. Τα σήματα των ανιχνευτών ενισχύονται, καταγράφονται, αφαιρείται από το προς ανάλυση δείγμα η τιμή του τυφλού, δίνοντας κατευθείαν την τελική τιμή. Τα φωτόμετρα αυτά έχουν υψηλότερο κόστος αγοράς λόγω της ύπαρξης επιπλέον οργανολογίας και κυρίως των δύο ανιχνευτών.

Εκτός από τα παραπάνω φασματοφωτόμετρα, υπάρχει και το **μονής δέσμης διπλής θέσης**. Σε αυτό η οργανολογία του είναι παραπλήσια με αυτό της μονής δέσμης, μόνο που έχει δύο θέσεις για τις κυψελίδες, μία για το τυφλό και μία για το δείγμα.



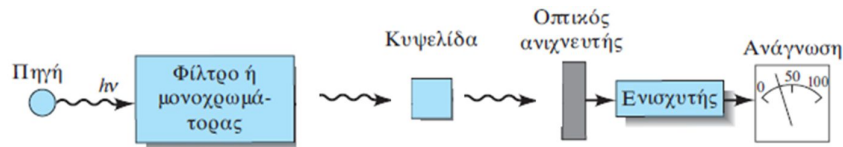
Και εδώ υπάρχει η πηγή ακτινοβολίας, η ακτινοβολία διέρχεται από ένα μονοχρωμάτορα όπου γίνεται μονοχρωματική και στη συνέχεια διέρχεται από την κυψελίδα με το τυφλό δείγμα, πηγαίνει στον ανιχνευτή, στον ενισχυτή, στο καταγραφικό και στη συνέχεια αλλάζει κατεύθυνση και μετά το μονοχρωμάτορα πηγαίνει στην κυψελίδα με το προς ανάλυση δείγμα, μετά πάλι στον ανιχνευτή, στον ενισχυτή και στο καταγραφικό. Οι δύο μετρήσεις (τυφλού και δείγματος) δεν γίνονται ταυτόχρονα (όπως σε αυτό της διπλής δέσμης) αλλά γίνονται διαδοχικά η μία μετά την άλλη, όμως και σε αυτή τη περίπτωση αφαιρείται από τη τιμή του δείγματος η τιμή του τυφλού και δίνει την τελική τιμή.

Επίσης υπάρχουν και τα φασματοφωτόμετρα μονής δέσμης, πολλαπλών θέσεων. Έχει συνολικά οκτώ θέσεις, μία για το τυφλό και επτά θέσεις δειγμάτων. Εδώ δεν αλλάζει κατεύθυνση η δέσμη αλλά περιστρέφονται οι θέσεις. Η τιμή του τυφλού καταγράφεται αυτόματα στη μνήμη και αφαιρείται από κάθε μέτρηση των δειγμάτων με αποτέλεσμα να βλέπετε τελικά τη πραγματική τιμή.

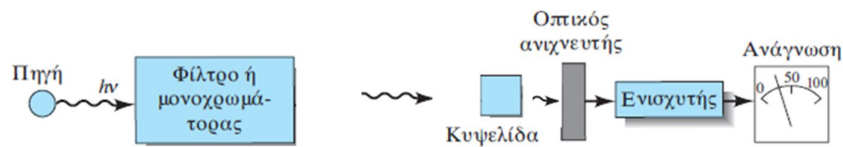


Ασκήσεις:

Τοποθετείτε δείγμα σε μια κυψελίδα μήκους 1 cm όπως φαίνεται παρακάτω και δίνει μια τιμή στην απορρόφηση πχ. 0.800.

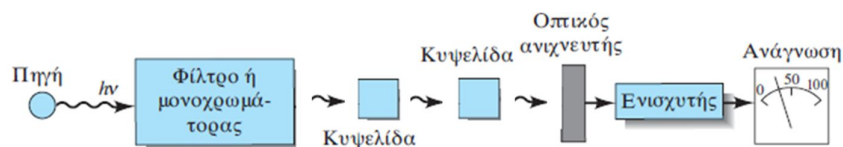


1. Τοποθετείτε την ίδια κυψελίδα με το ίδιο δείγμα σε διαφορετική θέση πιο κοντά στον ανιχνευτή. Η απορρόφηση που θα μετρηθεί θα είναι ίδια με τη προηγούμενη τιμή, μεγαλύτερη ή μικρότερη και γιατί;



2. Τοποθετείτε δύο ίδιες κυψελίδες με το ίδιο δείγμα όπως πριν, σε σειρά όπως φαίνεται παρακάτω. Τι απορρόφηση θα μετρηθεί και για γιατί;

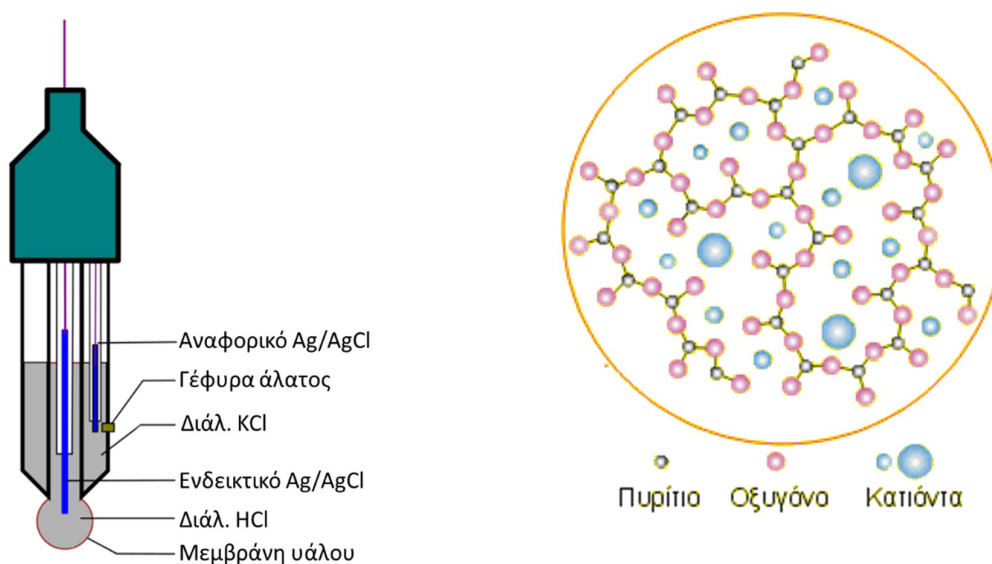
- a. Ίδια με πριν (δηλ. $A = 0.800$),
- b. διπλάσια ($2A$),
- c. μικρότερη του A ,
- d. μεγαλύτερη του A
- e. ή κάτι μεταξύ A και $2A$.



Ηλεκτρόδιο Υάλου

Αποτελείται από δύο ημιστοιχεία, ένα αναφορικό και ένα ενδεικτικό. Το αναφορικό είναι ένα ηλεκτρόδιο του οποίου το δυναμικό παραμένει σταθερό, στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι ένα ηλεκτρόδιο αργύρου με επικάλυψη από χλωριούχο άργυρο $\text{Ag(s)} \mid \text{AgCl(aq)}$ σε διάλυμα KCl το οποίο επικοινωνεί με το σύστημα μέσω μιας γέφυρας άλατος.

Το ενδεικτικό ηλεκτρόδιο αποτελείται από μία μεμβράνη υάλου. Η μεμβράνη στην οποία οφείλεται η επιλεκτικότητα του είναι από γυαλί και το εσωτερικό του αποτελείται και αυτό από ένα σύρμα αργύρου με επικάλυψη από χλωριούχο άργυρο $\text{Ag(s)} \mid \text{AgCl(aq)}$ σε διάλυμα HCl (και όχι KCl όπως ήταν στο αναφορικό), για τη λειτουργία του ηλεκτροδίου είναι απαραίτητη η παρουσία πρωτονίων στο εσωτερικό διάλυμα.

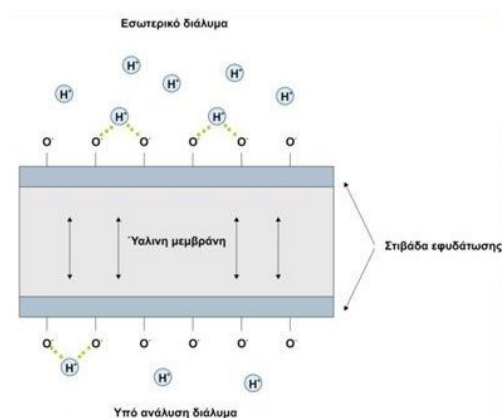
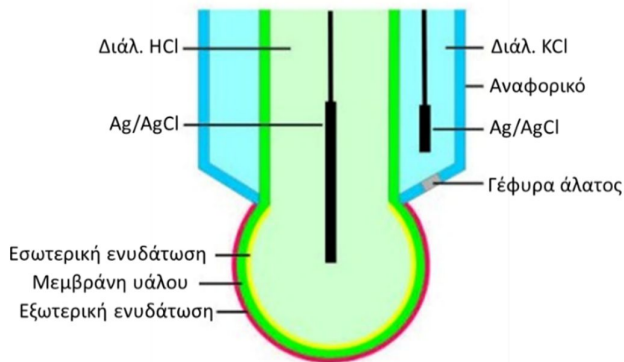


Η επιλεκτικότητα οφείλεται στη γυάλινη μεμβράνη πάχους 0.2 – 0.5 mm, η χημική σύσταση της μεμβράνης αποτελείται κυρίως από πυρίτιο, η δομή του οποίου δημιουργεί ένα πλέγμα στο χώρο στον οποίο υπάρχουν οπές, κάποιες από αυτές είναι συμπληρωμένες από κατιόντα κυρίως ιόντα νατρίου (Na^+) και κάποιες από αυτές κενές. Η μεμβράνη του υάλου ενυδατώνεται εσωτερικά από το εσωτερικό διάλυμα HCl και εξωτερικά από δείγμα με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ενυδατωμένες μορφές (μία εσωτερικά και μία εξωτερικά). Στις ενυδατωμένες αυτές μορφές μέρος του πλέγματος είναι μέσα στα διαλύματα, έτσι οξυγόνα του πλέγματος είναι μέσα σε αυτά τα διαλύματα.

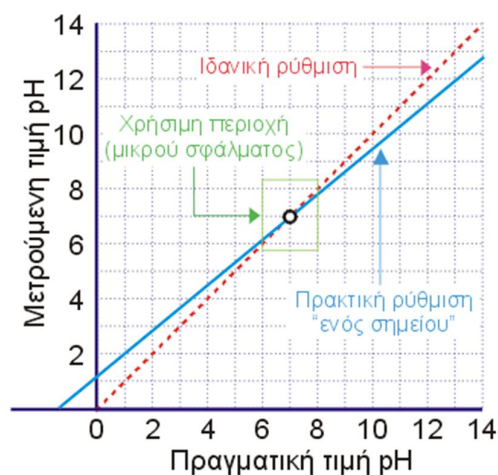
Σε ένα διάλυμα με χαμηλό pH, θα υπάρχουν πολλά πρωτόνια, οπότε αυτά θα πάνε προς τα οξυγόνα του εξωτερικού ενυδατωμένου πλέγματος με αποτέλεσμα να συγκεντρωθούν στο κάτω μέρος του πλέγματος. Έτσι θα δημιουργηθεί ένα πλεόνασμα θετικού φορτίου που θα απωθήσει τα κατιόντα του πλέγματος να πάνε σε κενές θέσεις προς τα πάνω και έτσι να συγκεντρωθούν στο πάνω μέρος του (μέσα όμως στο πλέγμα). Αυτό θα δημιουργήσει ένα θετικό φορτίο στο πάνω μέρος του που θα απωθήσει τα πρωτόνια που είναι συνδεδεμένα στα οξυγόνα του ενυδατωμένου εσωτερικού πλέγματος, αλλάζοντάς έτσι τη συγκέντρωση του εσωτερικού διαλύματος.

Αντίστοιχα σε ένα διάλυμα με υψηλό pH θα φύγουν πρωτόνια από τα οξυγόνα του εξωτερικού ενυδατωμένου πλέγματος, δημιουργώντας έτσι ένα αρνητικό φορτίο που θα τραβήξει τα κατιόντα του πλέγματος σε κενές θέσεις προς τα κάτω. Αυτό θα δημιουργήσει ένα αρνητικό φορτίο στο πάνω μέρος του πλέγματος και έτσι πρωτόνια του εσωτερικού διαλύματος να συνδεθούν με τα οξυγόνα της εσωτερικής

ενυδατωμένης μεμβράνης για να το εξισορροπήσουν, με αποτέλεσμα να αλλάξει η συγκέντρωση του εσωτερικού διαλύματος.

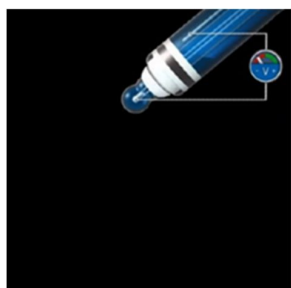


Δεν μεταφέρονται πρωτόνια από το διάλυμα του δείγματος στο εσωτερικό διάλυμα του ηλεκτροδίου (όπως συνήθως γίνεται στα επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων) αλλά η διαφοροποίηση του εσωτερικού διαλύματος γίνεται έμμεσα μέσω της εξισορρόπησης των φορτίων. Αυτή η απόκριση χρειάζεται λίγο χρόνο, έτσι όταν γίνεται η μέτρηση pH ενός διαλύματος χρειάζεται κάποιο χρονικό διάστημα για να αποκατασταθεί η ισορροπία των φορτίων. Για τη σωστή λειτουργία και γρήγορη απόκριση θα πρέπει πριν από τη κάθε χρήση του pH-μέτρου να γίνεται η βαθμονόμηση του. Αυτή γίνεται με τη χρήση διαλυμάτων γνωστών τιμών pH συνήθως με τιμές 4, 7 και 10. Για την καμπύλη βαθμονόμησης χρειάζονται δύο σημεία. Χρησιμοποιούνται τα διαλύματα με τιμές 4 και 7 όταν είναι να μετρηθούν όξινα δείγματα και τα διαλύματα με τιμές 7 και 10 όταν είναι να μετρηθούν αλκαλικά δείγματα. Υπάρχουν και pH-μετρά που χρησιμοποιούν καμπύλη τριών σημείων, σε αυτή τη περίπτωση θα χρησιμοποιηθούν και τα τρία διαλύματα με pH 4, 7 και 10.



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 I:



<https://www.chemistry.uoc.gr/eclass/modules/document/?course=CHEM-UNDER114>

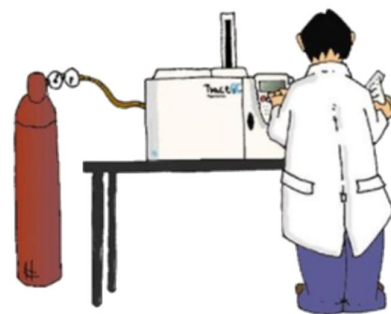
Youtube:



<https://www.youtube.com/channel/UCrDdUXUiTxyhezA140RIew>

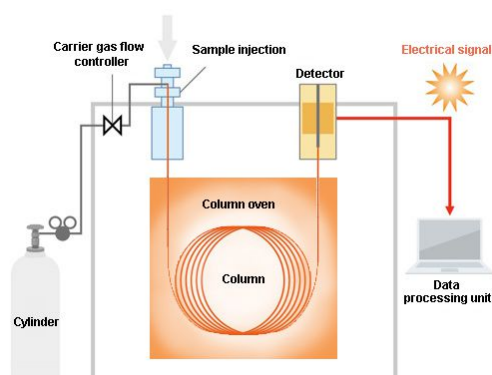
Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography - GC)

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 αρχικά εξατμίζεται μέσω ενός εισαγωγέα και εισάγεται στη χρωματογραφική στήλη με την βοήθεια της ροής ενός αδρανούς αερίου (φέρον αέριο) που είναι συνήθως N_2 , H_2 , He ή Ar και αποτελεί την κινητή φάση.



Τα μέρη ενός αερίου χρωματογράφου είναι παραπλήσια με αυτά της υγρής χρωματογραφίας με την βασική διαφορά ότι η κινητή φάση είναι ένα αδρανές αέριο και όχι κάποιος 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 (φέρον αέριο):

Η κινητή φάση είναι ένα αδρανές αέριο, υψηλής καθαρότητας, συνήθως N_2 , H_2 , He ή Ar το οποίο βρίσκεται σε φιάλη υψηλής πίεσης.



Συνήθως χρησιμοποιούνται φιάλες B50 δηλαδή φιάλες των 50 λίτρων που το αέριο βρίσκεται σε πίεση 200 bar (δηλ. 197.385 atm ή 2900 psi, 1 atm είναι 1.013 bar και 1 bar είναι 14.5 psi). Η πίεση είναι αρκετά υψηλή και για το λόγο αυτό χρειάζεται ελεγχόμενη εκτόνωση και αυτό γίνεται με τη χρήση ενός μειωτήρα. Ο μειωτήρας συνδέεται στην έξοδο της φιάλης, και έχει δύο μανόμετρα για ενδείξεις. Η εσωτερική (προς τη φιάλη) μετράει τη πίεση του αερίου μέσα στη φιάλη, αρχικά είναι 200 bar και, καθώς μειώνεται η ποσότητα του αερίου, αυτή πέφτει μέχρι που σχεδόν μηδενίζεται και χρειάζεται αντικατάσταση του περιεχομένου της. Η εξωτερική ένδειξη, δείχνει τη πίεση του αερίου στην έξοδο του μανομέτρου που πηγαίνει προς το χρωματογράφο. Επιτρέπει πίεση εξόδου μέχρι και 10 bar και καθορίζεται από την βαλβίδα που βρίσκεται στο κάτω μέρος του. Όταν η ροή του φέροντος αερίου ρυθμίζεται από το χρωματογράφο, επιλέγεται μια πίεση εξόδου περίπου 3 - 5 bar και η ρύθμιση της ροής γίνεται από το λογισμικό του χρωματογράφου. Αν ο χρωματογράφος δεν έχει αυτή τη δυνατότητα, τότε η ρύθμιση γίνεται από τη κεντρική βαλβίδα (B) του μειωτήρα και



Φιάλες παροχής αερίων (He , Air, H_2)

μετράτε η ροή (στην έξοδο από το χρωματογράφο) με ένα ροόμετρο, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή ροή. Η βαλβίδα πάνω στη φιάλη (Α) δεν μπορεί να ρυθμίσει τη ροή, είναι βαλβίδα on-off. Το ίδιο ισχύει και με την εξωτερική βαλβίδα του μειωτήρα (Γ). Κατά το άνοιγμα και το κλείσιμο της λειτουργίας του χρωματογράφου, ανοίγετε και κλείνετε τις βαλβίδες Α και Γ χωρίς να χρειάζεται να αλλάξει η κεντρική βαλβίδα (Β) του μειωτήρα ώστε να μην μεταβληθεί η ροή του αερίου.

Τα αέρια που χρησιμοποιούνται είναι υψηλής καθαρότητας, τόσο για τη προστασία του χρωματογράφου, όσο και για να υπάρχει πιο καθαρό σήμα στον ανιχνευτή. Συνήθως χρησιμοποιούνται αέρια με καθαρότητα 5.0 δηλ. 99.999% καθαρότητα (5 εννιάρια συνολικά).

2. Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector):

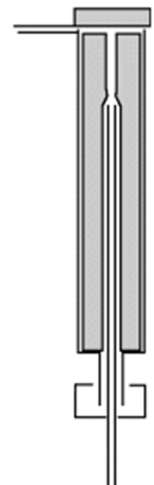
Υγρό μίγμα των ουσιών εισάγεται αρχικά σε ένα εισαγωγέα (injector) σε υψηλή θερμοκρασία, όπου εξατμίζεται άμεσα και με την βοήθεια του φέροντος αερίου εισάγεται στη στήλη διαχωρισμού.



Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με σύριγγα, η βελόνα της οποίας τρυπάει ένα ελαστικό διάφραγμα (septum) που βρίσκεται μέσα στον εισαγωγέα. Το septum έχει την ιδιότητα να μπορεί να τρυπηθεί και να κλείσει ξανά αεροστεγώς για αρκετές φορές, έτσι αποφεύγεται διαρροή από αυτό. Υπάρχουν τρεις κυρίως τρόποι εισαγωγής που ο κάθε ένας έχει διαφορετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η επιλογή του επιθυμητού τρόπου εξαρτάται από τις ενώνεις που είναι να διαχωριστούν καθώς και από τη στήλη διαχωρισμού που χρησιμοποιείται.

1. On Column

Το υγρό μίγμα εισάγεται απευθείας μέσα στη στήλη. Αυτό προϋποθέτει ότι η στήλη είναι σχετικά μεγάλης διαμέτρου ώστε να μπορέσει η βελόνα της σύριγγας να εισέλθει μέσα σε αυτή. Διαφορετικά χρησιμοποιούνται ειδικές σύριγγες με πολύ λεπτή βελόνα. Η αρχή της στήλης βρίσκεται μέσα στον εισαγωγέα για να μπορέσει να φτάσει η άκρη της βελόνας.



1. Πλεονεκτήματα

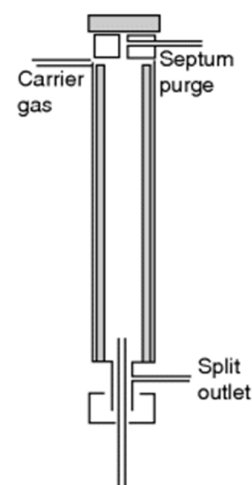
- υψηλή ευαισθησία
- ενδείκνυται και για θερμό-ασταθείς ενώσεις (με το να εισάγονται άμεσα μέσα στη στήλη, ο χρόνος παραμονής στις υψηλές θερμοκρασίες του εισαγωγέα είναι περιορισμένος και έτσι προστατεύονται θερμό-ασταθείς ενώσεις)
- άμεση μεταφορά του δείγματος μέσα στη στήλη και έτσι δημιουργία στενών κορυφών (μικρή δια πλάτυση).

2. Μειονεκτήματα

- Χρησιμοποιείται μόνο για στήλες πληρώσεως και τριχοειδείς ευρείας διαμέτρου (ώστε να έχει τη δυνατότητα η βελόνα της σύριγγας να εισέλθει)
- Μικρή διαχωριστική ικανότητα της στήλης (με αυτό το τρόπο εισαγωγής δείγματος, εισέρχεται μεγάλη ποσότητα δείγματος και έτσι μειώνεται η διαχωριστική ικανότητα)

II. Split

Το υγρό μίγμα εισέρχεται σε ένα θάλαμο (liner), όπου ένα μέρος του θα πάει προς τη στήλη και το υπόλοιπο θα αποβληθεί προς το περιβάλλον από την έξοδο split. Επομένως, με τον τρόπο αυτό μόνο ένα ποσοστό του μίγματος εισέρχεται τελικά στη στήλη. Το ποσοστό αυτό καθορίζεται από τις ροές του φέροντος αερίου και τη ροή στην βαλβίδα split. Η ροή στο θάλαμο περιλαμβάνει τη ροή που πάει στη στήλη και τη ροή που πάει στην βαλβίδα split, π.χ. για συνολική ροή 200 ml/min και ροή της κινητής φάσης 1 ml/min, μέσα στο θάλαμο το δείγμα αραιώνεται στα 200 ml/min και στη στήλη πηγαίνει όσο είναι η κινητή φάση (δηλ. 1 ml/min) ενώ το υπόλοιπο (199 ml/min) πηγαίνει στην βαλβίδα split και από εκεί αποβάλλεται στο περιβάλλον. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να πηγαίνει στη στήλη το 1/200 του δείγματος, έτσι αν γίνει η εισαγωγή 1 μl δείγματος θα μπει στη στήλη το 1/200 μl. Αυτή είναι μια πολύ μικρή ποσότητα δείγματος που είναι σχεδόν αδύνατον να μπει με σύριγγα υγρών. Ο μόνος εναλλακτικός τρόπος εισαγωγής θα ήταν να γίνει αραιώση του δείγματος πριν την εισαγωγή του, γεγονός οικονομικά ακριβό (από τη χρήση των διαλυτών), χρονοβόρο αλλά και με σφάλματα που επέρχονται κατά τη διαδικασία της αραιώσης.



1. Πλεονεκτήματα

- Υψηλή διαχωριστική ικανότητα της στήλης (λόγω του ότι μικρή ποσότητα του δείγματος μπαίνει στη στήλη)
- Προστασία της στήλης (λόγω του ότι μικρό μέρος του δείγματος μπαίνει στη στήλη)
- Δυνατότητα εισαγωγής δειγμάτων χωρίς αραιώση από πριν (γίνεται στη χρήση του)

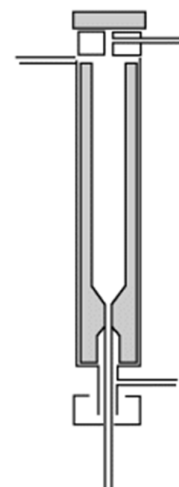
2. Μειονεκτήματα

οφείλονται κυρίως στη παρουσία του θαλάμου αραιώσης:

- Δεν ενδείκνυται για θερμό-ασταθείς ενώσεις (λόγω του χρόνου που μένει το δείγμα μέσα στο θάλαμο μέχρι να το διανύσει)
- Αργή μεταφορά του δείγματος μέσα στη στήλη (λόγω του θαλάμου) δημιουργώντας πεπλατυσμένες κορφές.
- Περισσότερο χρόνο στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα, η στήλη θα πρέπει να παραμείνει περισσότερη ώρα στην αρχική της θερμοκρασία μέχρι να μπει όλο το δείγμα από τον θάλαμο στη στήλη.

III. Splitless

Ο τρόπος λειτουργίας είναι παραπλήσιος με αυτόν του split. Υπάρχει και εδώ ένας θάλαμος (liner) όπου εισάγεται το δείγμα, όμως η βαλβίδα split είναι κλειστή και έτσι όλο το δείγμα που εισάγεται σε αυτόν πηγαίνει στη στήλη, οπότε δεν γίνεται αραιώση του δείγματος. Η συνολική ροή του θαλάμου πρέπει να είναι παραπλήσια με τη ροή της κινητής φάσης, αφού δεν έχει ροή η βαλβίδα split. 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 ανοικτός 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 (σχεδόν όλο το δείγμα μπαίνει στη στήλη)
- απλός στη χρήση

2. Μειονεκτήματα

οφείλονται και εδώ όπως και στο split κυρίως στη παρουσία του θαλάμου αραίωσης:

- Δεν ενδείκνυται για θερμό-ασταθείς ενώσεις (λόγω του χρόνου που μένει το δείγμα μέσα στο θάλαμο μέχρι να το διανύσει)
- Αργή μεταφορά του δείγματος μέσα στη στήλη (λόγω του θαλάμου) δημιουργώντας πεπλατυσμένες κορφές.
- Περισσότερο χρόνο στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα, η στήλη θα πρέπει να παραμείνει περισσότερη ώρα στην αρχική της θερμοκρασία μέχρι να μπει όλο το δείγμα από το θάλαμο στη στήλη.

Ο λόγος η λειτουργία splitless έναντι της λειτουργίας split είναι εάν τα προς ανάλυση δείγματα είναι αραιά, με την λειτουργία split πραγματοποιείται περαιτέρω αραίωση τους, με αποτέλεσμα το σήμα να είναι πολύ μικρό. Η λειτουργία του splitless μοιάζει με αυτή της on column όμως η αλλαγή του συστήματος σε on column λειτουργία, απαιτεί την μετακίνηση της στήλης πιο ψηλά, ώστε να μπορεί να τη φτάσει η βελόνα της σύριγγας (μια διαδικασία χρονοβόρα που προκαλεί και φθορές στη στήλη), και το είδος της στήλης να επιτρέπει την on column λειτουργία (να έχει το κατάλληλο πλάτος). Αντίθετα, η αλλαγή από την split στη splitless λειτουργία, είναι σχετικά απλή και γρήγορη. Αλλάζει μόνο ο εσωτερικός θάλαμος (liner), από το λειτουργικό του οργάνου ρυθμίζεται το κλείσιμο της βαλβίδας split και η συνολική ροή, χωρίς να χρειαστεί να γίνει μετακίνηση της θέσης της στήλης.

3. Εσωτερικό πρότυπο (Internal Standard, IS):

Ένα μεγάλο πρόβλημα κατά την εισαγωγή δείγματος είναι ότι πάντα υπάρχουν απώλειες και δεν εισάγεται με ακρίβεια η επιθυμητή ποσότητα του δείγματος στο χρωματογράφο. Αυτό οφείλεται κυρίως στους παρακάτω λόγους.

- Η ποσότητα του δείγματος που λαμβάνεται με τη σύριγγα έχει σφάλμα, τόσο από την ίδια τη σύριγγα όσο και από το χειριστή.
- Κατά την εισαγωγή του δείγματος στον injector δημιουργούνται απώλειες.
- Ο ίδιος ο εισαγωγέας κατά τη λειτουργία του δημιουργεί απώλειες.

Όλα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα να υπάρχουν σημαντικές απώλειες του δείγματος, οι οποίες δεν είναι σταθερές. Όμως η αέρια χρωματογραφία είναι μια τεχνική που εκτός από τον ποιοτικό διαχωρισμό μπορεί να κάνει και ποσοτικό με πολύ μεγάλη πιστότητα. Το συγκεκριμένο πρόβλημα διορθώνεται με τη χρήση εσωτερικού προτύπου. Ως εσωτερικό πρότυπο επιλέγεται μια ένωση, διαφορετική από αυτές που περιέχει το δείγμα, η οποία προστίθεται σε γνωστή ποσότητα στο δείγμα. Όποιες απώλειες θα έχει το δείγμα κατά τη διαδικασία εισαγωγής του, τις ίδιες απώλειες θα έχει και το εσωτερικό πρότυπο. Έτσι μετρώντας την ποσότητα του εσωτερικού προτύπου μπορεί 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 υπήρχαν 40% απώλεια στην ποσότητα του εσωτερικού προτύπου που έφτασε στη στήλη. Την ίδια απώλεια θα έχει και το δείγμα. Με τον τρόπο αυτό διορθώνεται το συγκεκριμένο σφάλμα.

Τα κύρια κριτήρια επιλογής ενός εσωτερικού πρότυπου είναι τα εξής:

- Να είναι μια ένωση που να μην υπάρχει στο δείγμα.
- Μια ένωση με φυσικοχημικές ιδιότητες παραπλήσιες με αυτές του δείγματος, ώστε με το υπάρχον θερμοκρασιακό πρόγραμμα να βγαίνει μέσα στους επιθυμητούς χρόνους, όχι όμως πάνω στις ενώσεις του δείγματος.
- Η επιφάνεια ολοκλήρωσης να είναι παραπλήσια με αυτές των ενώσεων του δείγματος.
- Να διαλύεται στο διαλύτη που χρησιμοποιείται για το δείγμα
- Κατά προτίμηση να μην είναι τοξική
- Κατά προτίμηση να είναι οικονομική

Όταν στη χρωματογραφία χρησιμοποιείται εισαγωγέας με βρόχο (loop) δεν είναι αναγκαία η χρήση εσωτερικού πρότυπου για την ποσοτική ανάλυση του. Ο λόγος είναι ότι ο βρόχος επιτρέπει να μπαίνει μέσα στο χρωματογράφο πάντα η ίδια ποσότητα του δείγματος, όσο είναι ο όγκος του βρόχου. Μόνο λόγω λάθους στο χειρισμό μπορεί να μπει διαφορετική ποσότητα. Αν παρόλα αυτά υπήρχε και εσωτερικό πρότυπο η επιφάνεια ολοκλήρωσης της κορυφής του θα ήταν πάντα η ίδια (πχ 100) αφού πάντα θα έμπαινε η ίδια ποσότητα.

4. Διαλύτης:

Ο διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί για τη διάλυση του δείγματος θα πρέπει να έχει τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

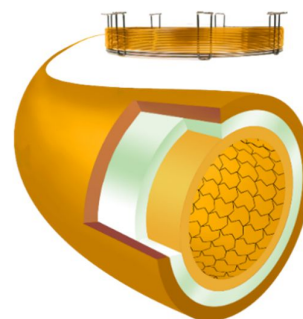
- Να διαλύει όλες τις ενώσεις καθώς και το εσωτερικό πρότυπο
- να μην αντιδράει με τις ενώσεις και το εσωτερικό πρότυπο
- να έχει χαμηλό σημείο ζέσεως. Αυτό είναι πολύ χρήσιμο ώστε να βγαίνει πρώτα ο διαλύτης (πριν τις ενώσεις του δείγματος) και έτσι να αποφευχθεί αφενός η υπερκάλυψη του σήματος των ενώσεων από το σήμα του διαλύτη και αφετέρου η στήλη να μην είναι φορτωμένη όταν εξέρχονται οι ενώσεις του δείγματος, μειώνοντας έτσι τη διαχωριστική της ικανότητα. Ο διαλύτης είναι σε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα από τις ενώσεις του δείγματος και έτσι το σήμα που δίνει είναι πολύ - πολύ μεγαλύτερο.
- κατά προτίμηση να μην είναι τοξικός
- κατά προτίμηση να είναι οικονομικός

5. Αναλυτική στήλη:

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

Η στατική φάση της στήλης μπορεί να είναι είτε σε στερεή μορφή, τότε είναι η Στερεά Αέρια Χρωματογραφία (GSC) είτε σε υγρή μορφή, τότε είναι η Υγρή Αέρια Χρωματογραφία (GLC ή απλά GC). Στη στερεά στατική φάση ο διαχωρισμός γίνεται με τη προσρόφηση των ουσιών του μίγματος πάνω στην ενεργή επιφάνεια της, ενώ στην υγρή στατική φάση ο διαχωρισμός του οφείλεται στη διαφορά των συντελεστών κατανομής της κάθε ουσίας του μίγματος μεταξύ της υγρής (στατικής) και αέριας (κινητής φάσης).

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



Η στήλη διαχωρισμού βρίσκεται μέσα σε ένα θερμαινόμενο φούρνο, όπου με τη χρήση ενός θερμοκρασιακού προγράμματος, μεταβάλλεται η θερμοκρασία του επηρεάζοντας το συντελεστή κατανομής της κάθε ένωσης μεταξύ της υγρής στατικής και αέριας κινητής φάσης μεταβάλλοντας έτσι το χρόνο κατακράτησης της.

Ο διαχωρισμός των ενώσεων γίνεται κυρίως με τα παρακάτω κριτήρια:

- Φορτίο
- Μέγεθος
- Πολικότητα
- Σημείο ζέσεως

Η πολικότητα είναι ένα κριτήριο για την επιλογή της στήλης, που όμως παίζει ρόλο και στο διαχωρισμό. Γενικά ισχύει ότι πολικές στήλες διαχωρίζουν πολικές ενώσεις και οι μη πολικές στήλες διαχωρίζουν μη πολικές ενώσεις

Το σημείο ζέσεως των ενώσεων είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία του κατάλληλου θερμοκρασιακού προγράμματος, για τη λειτουργία του φούρνου του χρωματογράφου, ώστε να επιτευχθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός. Ο φούρνος του χρωματογράφου θα πρέπει:

- να έχει την ίδια θερμοκρασία σε όλα τα μέρη του, ώστε η στήλη που περιέχει να θερμαίνεται ομοιόμορφα σε όλα σημεία της.
- να μπορεί να θερμαίνεται με το ρυθμό που ορίζει το θερμοκρασιακό πρόγραμμα
- να μπορεί να κρυώνει γρήγορα ώστε να είναι έτοιμος για το επόμενο δείγμα

Η δημιουργία του θερμοκρασιακού προγράμματος εξαρτάται από τα σημεία ζέσεως των ενώσεων. Οι ενώσεις καθώς εξέρχονται από τον εισαγωγέα (injector) και εισάγονται στη στήλη είναι σε αέρια μορφή. Η θερμοκρασία της στήλης (δηλ. του φούρνου) θα πρέπει να είναι χαμηλότερη από το χαμηλότερο σημείο ζέσεως τους, ώστε μόλις εισέρθουν στη στήλη να συγκρατηθούν από την υγρή στατική φάση και καθώς αυξάνει η θερμοκρασία της στήλης, μόλις φτάσει στο σημείο ζέσεως της η ένωση από την υγρή φάση να εξατμιστεί και να πάει στην αέρια φάση, όπου θα παρασυρθεί από την κινητή φάση και θα εξέρθει από τη στήλη. Έτσι ξεκινώντας από μια θερμοκρασία χαμηλότερη από τα σημεία ζέσεως και αυξάνοντας σταδιακά επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των ενώσεων. Επεμβαίνοντάς στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα τροποποιούνται οι χρόνοι κατακράτησης της κάθε ένωσης. Τέτοιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα χρησιμοποιείται στην άσκηση με FID ανιχνευτή, ενώ στην άσκηση με ανιχνευτή TCD που δεν έχει θερμοκρασιακό πρόγραμμα, χρησιμοποιείται θερμοκρασία μεγαλύτερη από το μεγαλύτερο σ.ζ. των ενώσεων.

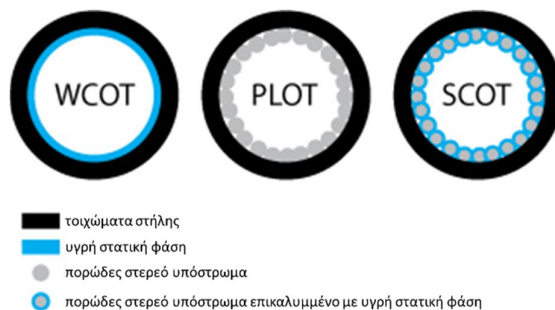
Η τελική θερμοκρασία του φούρνου θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από όλα τα σημεία ζέσεως ώστε να απομακρυνθούν από τη στήλη όλες οι ενώσεις καθώς και ο διαλύτης τους.

I. Τριχοειδείς Στήλες

Οι στήλες πληρώσεως, γενικά, είναι στήλες που η διάμετρος τους είναι αρκετά μεγάλη, το μήκος τους σχετικά μικρό και είναι γεμισμένες με πληρωτικό υλικό. Αντίθετα οι τριχοειδείς στήλες είναι στήλες όπου η διάμετρος τους είναι πολύ μικρή, μικρότερη από 1mm, (είναι τόσο λεπτή σαν τρίχα), έχουν μεγάλο μήκος (μερικές δεκάδες μέτρα) και έτσι έχουν πολύ μεγάλο αριθμό θεωρητικών πλακών, με αποτέλεσμα να έχουν μεγάλη διαχωριστική ικανότητα.



Οι τριχοειδείς διακρίνονται σε τρεις διαφορετικού τύπους:



- I. **Wall – Coated Open Tubular column (WCOT)** τα εσωτερικά τοιχώματα της στήλης είναι επικαλυμμένα με μια λεπτή επιφάνεια υγρής στατικής φάσης
- II. **Porous – Layer Open Tubular column (PLOT)** τα εσωτερικά τοιχώματα της στήλης είναι επικαλυμμένα με πορώδες στερεό υπόστρωμα, όπως αλουμίνα, silica gel κ.α.
- III. **Support – Coated Open Tubular column (SCOT)**, είναι όπως ο τύπος PLOT μόνο που τα στερεά υποστρώματα είναι επικαλυμμένα με μια λεπτή επιφάνεια υγρής στατικής φάσης

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

1. Πλεονεκτήματα:

- Μεγάλος αριθμός θεωρητικών πλακών (μέχρι 500.000 σε σχέση με τις στήλες πλήρωσης 20.000), οπότε καλύτερη διαχωριστική ικανότητα
- Χρησιμοποιείται μικρότερη ποσότητα δείγματος (ng)
- Μικρότερος χρόνος έκλουσης άρα και ανάλυσης
- Μικρότερες θερμοκρασίες διαχωρισμού
- με 3 – 4 στήλες που διαφέρουν ως προς τη πολικότητα, καλύπτεται σχεδόν όλο το φάσμα των ενώσεων που μπορούν να διαχωριστούν
- Μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ανιχνευτές που χρειάζονται μικρή ποσότητα δείγματος, όπως ένας φασματογράφος μάζας κτλ.

2. Μειονεκτήματα:

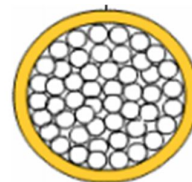
- Δεν ενδείκνυται για πυκνά δείγματα
- Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί εύκολα για on column εισαγωγή
- Δεν χρησιμοποιείται για κλασματικό διαχωρισμό των ενώσεων

II. Πληρωμένες Στήλες

Οι πληρωμένες στήλες περιέχουν λεπτά σωματίδια στερεού υλικού στήριξης καλυμμένα με μη πτητική υγρή στατική φάση, το ίδιο το στερεό αποτελεί τη στατική φάση. Συγκρινόμενες με τις ανοικτές σωληνοειδείς στήλες, οι πληρωμένες στήλες έχουν μεγαλύτερη χωρητικότητα δείγματος αλλά δίνουν πιο πλατιές κορυφές, έχουν



μεγαλύτερους χρόνους κατακράτησης και μικρότερη διαχωριστική ικανότητα. Παρά τη μικρότερη διαχωριστική ικανότητα, οι πληρωμένες στήλες χρησιμοποιούνται για παρασκευαστικούς διαχωρισμούς, οι οποίοι απαιτούν μεγαλύτερη ποσότητα στατικής φάσης, ή για το διαχωρισμό αερίων που δεν κατακρατούνται ισχυρά. Οι πληρωμένες στήλες συνήθως κατασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα ή γυαλί και κατά κανόνα έχουν διάμετρο 3-6mm και μήκος 1-5m. Το



στερεό υλικό στήριξης είναι συχνά οξείδια του πυριτίου. Σε μία πληρωμένη στήλη, το ομοιόμορφο μέγεθος σωματιδίων μειώνει τον όρο των πολλαπλών διαδρομών στην εξίσωση Van Deemter, συνεπώς μειώνει το ύψος πλάκας και αυξάνει τη διαχωριστική ικανότητα. Το μικρό μέγεθος σωματιδίων μειώνει το χρόνο που απαιτείται για την εξισορρόπηση μιας ουσίας, συνεπώς βελτιώνει την αποδοτικότητα της στήλης. Το μέγεθος των σωματιδίων εκφράζεται σε μικρόμετρα ή σε μονάδες mesh, που αναφέρονται στο μέγεθος του πλέγματος το οποίο τα σωματίδια περνούν ή κατακρατούνται.

1. Πλεονεκτήματα:

- μπορεί να δεχτεί μεγάλη ποσότητα δείγματος και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε ανιχνευτές που είναι λιγότερο ευαίσθητοι
- μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε on column όσο και σε split εισαγωγή
- μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κλασματικό διαχωρισμό των ενώσεων

2. Μειονεκτήματα:

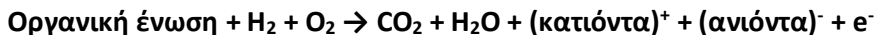
- μικρός αριθμός θεωρητικών πλακών και έτσι μικρή διαχωριστική ικανότητα
- δεν μπορεί να συνδεθεί σε ανιχνευτές που έχουν μικρό όριο στη ποσότητα του δείγματος.

6. Ανιχνευτής

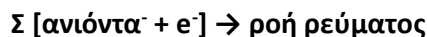
Οι ανιχνευτές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην αέρια χρωματογραφία είναι αρκετοί, θα αναφερθούν μόνο οι δύο που χρησιμοποιούνται στις δύο ασκήσεις των προπτυχιακών εργαστηρίων της Αναλυτικής Χημείας, στον ανιχνευτή Ιονισμού Φλόγας (FID) και στον Θερμικής Αγωγιμότητας (TCD).

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

Η αρχή λειτουργίας του βασίζεται στη μεταβολή της αγωγιμότητας που προκαλείται από τον ιοντισμό μιας οργανικής ένωσης όταν καίγεται σε φλόγα υδρογόνου – αέρα. Κατά τη καύση της οργανικής ένωσης καίγεται ο άνθρακας παράγοντας CO_2 , H_2O , κατιόντα, ανιόντα και ηλεκτρόνια:

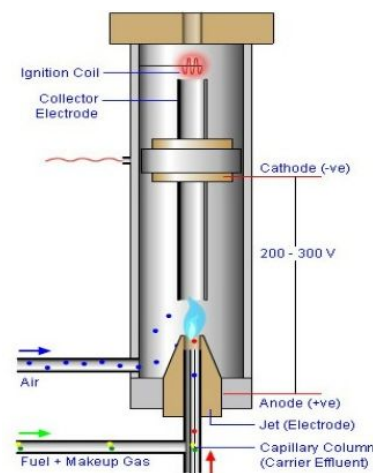


Η ανίχνευση γίνεται με μέτρηση του ρεύματος που δημιουργείται εξ αιτίας των ανιόντων και των ηλεκτρονίων.



Τα ιόντα συλλέγονται πάνω σε ένα ζεύγος πολωμένων ηλεκτροδίων μέσα στον ανιχνευτή, το ρεύμα που παράγεται ενισχύεται και καταγράφεται.

Τα ηλεκτρόνια που παράγονται κατά τη καύση του C εξαρτώνται και από την οξειδωτική κατάσταση του C που καίγεται. Έτσι ενώσεις παρόλο που έχουν ίδιο αριθμό ανθράκων δίνουν διαφορετικό σήμα. Πχ στην άσκηση FID, ενώ το ακετονιτρίλιο και η αιθανόλη έχουν 2 άτομα άνθρακα, δίνουν διαφορετικό σήμα λόγω της διαφορετικής οξειδωτικής τους κατάστασης.



Makeup:

Για τη λειτουργία του ανιχνευτή, εκτός της ροής του υδρογόνου και του αέρα που χρειάζονται για τη φλόγα συνήθως χρειάζεται μια επιπλέον ροή από ένα αδρανές αέριο που ονομάζεται makeup. Ως αέριο συνήθως χρησιμοποιείται το ίδιο με το αέριο της κινητής φάσης. Η λειτουργία του makeup είναι για να βοηθήσει στη μεταφορά των ενώσεων από τη στήλη προς τον ανιχνευτή και χρειάζεται όταν η ροή της κινητής φάσης είναι μικρή (πχ 1 ml/min), ενώ αν η ροή της κινητής φάσης είναι μεγάλη (πχ 30 ml/min) τότε δεν χρειάζεται η χρήση του makeup αφού η ίδια η ροή της κινητής φάσης είναι αρκετή για τη σωστή λειτουργία του ανιχνευτή.

1. Πλεονεκτήματα

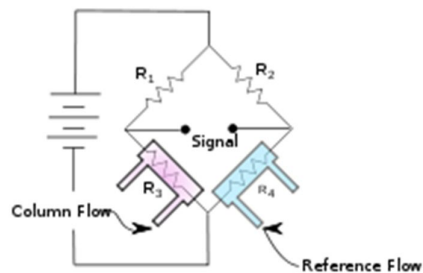
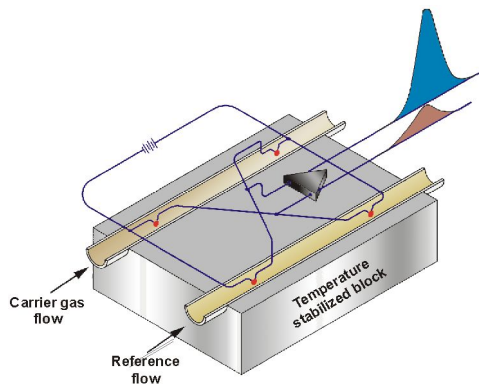
- 'Βλέπει' μόνο άνθρακα, έτσι είναι πολύ γενικός ανιχνευτής, μπορεί να ανιχνεύσει σχεδόν όλες τις ενώσεις .
- Έχει πολύ μεγάλο εύρος γραμμικότητας, περίπου 10^7 (δηλ. 7 τάξεις μεγέθους). Είναι τόσο γραμμικός που για τη καμπύλη βαθμονόμησης του χρειάζεται μόνο ένα σημείο (μαζί με το 0 δίνουν την ευθεία)
- Έχει πολύ μεγάλη ευαισθησία (10^{-13} g/s)
- Ανταποκρίνεται στη μάζα και όχι στη συγκέντρωση

2. Μειονεκτήματα

- Είναι καταστρεπτικός ανιχνευτής.
- Δεν ανιχνεύει ενώσεις που δεν έχουν άνθρακα πχ SO_2 , NO_x , ευγενή αέρια, αλλά και το CO_2
- Δεν παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία σε χαρακτηριστικές ομάδες (πχ καρβονυλο- αλογονο – ομάδες) ανιχνεύει μόνο τον άνθρακα.

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

Είναι ένας από τους πρώτους ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν στην αέρια χρωματογραφία, συχνά ο ανιχνευτής αυτός αναφέρεται και ως καθαρόμετρο.



Έχει δύο διαδρομές με αντιστάσεις, το θερμαινόμενο στοιχείο είναι ένα λεπτό σύρμα λευκόχρυσου, χρυσού ή βολφραμίου. Η ηλεκτρική αντίσταση αυτού του στοιχείου εξαρτάται από τη θερμική αγωγιμότητα του αερίου. Αρχικά, και στις δύο διαδρομές περνάει μόνο κινητή φάση και βρίσκονται σε μια θερμική ισορροπία. Στη συνέχεια, στη μία διαδρομή περνάει η κινητή φάση μαζί με τις ενώσεις ενώ στη δεύτερη παραμένει μόνο η κινητή φάση (διαδρομή αναφοράς). Καταγράφεται η διαφορά του δυναμικού μεταξύ της αντίστασης στη διαδρομή του δείγματος και της αντίστασης στη διαδρομή αναφοράς.



Η κινητή φάση είναι ένα αδρανές αέριο που έχει θερμική αγωγιμότητα 6 με 10 φορές μεγαλύτερη από τις ενώσεις που ανιχνεύονται. Έτσι όταν περνάει η κινητή φάση μαζί με τις ενώσεις, η θερμική αγωγιμότητα του μίγματος είναι μικρότερη από πριν, με αποτέλεσμα να 'κρυώνει' λιγότερο την αντίσταση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η τιμή της αντίστασης να μεταβάλλεται, όμως καθώς η ένταση του ρεύματος παραμένει σταθερή μεταβάλλεται και το δυναμικό της ($V=I \cdot R$). Αυτή η μεταβολή της διαφοράς του δυναμικού μεταξύ των δύο αντιστάσεων (από τη διαδρομή του δείγματος και από τη διαδρομή αναφοράς), καταγράφεται και δίνει τη κορυφή της ένωσης.

Ο ανιχνευτής είναι θερμαινόμενος ώστε να μην επηρεάζεται από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία του.

1. Πλεονεκτήματα

- Απλός
- Μη καταστρεπτικός (επιτρέπει τη συλλογή των εκλούμενων ουσιών μετά την ανίχνευση)
- Μεγάλη γραμμικότητα (περίπου πέντε τάξεων μεγέθους)
- Μπορεί να ανιχνεύει όλες τις ενώσεις (οργανικές και ανόργανες)

2. Μειονεκτήματα

- χαμηλή ευαισθησία (περίπου 10^{-8} g ουσίας/ ml φέροντος αερίου). Η χαμηλή ευαισθησία του συχνά καθιστά αδύνατη τη χρήση του με τριχοειδείς στήλες λόγω των πολύ μικρών δειγμάτων, που εισάγονται στις στήλες αυτές.

7. Καταγραφικό

Γίνεται μετατροπή του αναλογικού σήματος που δίνει ο ανιχνευτής σε ψηφιακό, με τη χρήση μια κατάλληλης κάρτας, και καταγράφεται με ένα κατάλληλο λογισμικό σε μια μονάδα ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC)

Στην υγρή χρωματογραφία ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Το δείγμα εισάγεται στη κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκκλύονται 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.

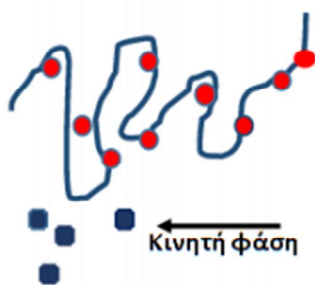
Η υγρή χρωματογραφία είναι σημαντική διότι οι περισσότερες ενώσεις δεν είναι αρκετά πτητικές. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιεί υψηλή πίεση για να αναγκάσει το διαλύτη να μετακινηθεί μέσω κλειστών στηλών που περιέχουν πολύ μικρά σωματίδια τα οποία επιτυγχάνουν διαχωρισμούς υψηλής διαχωριστικής ικανότητας.

Είδη υγρής χρωματογραφίας:

- I. Προσρόφησης
- II. Κατανομής
- III. Ιονανταλλαγής
- IV. Συγγένειας
- V. Αποκλεισμού μεγέθους ή διάχυσης πηκτής

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 αλληλεπιδράσεις διπόλου - διπόλου, Vander Waals και σε δεσμούς υδρογόνου.

Στερεή στατική φάση



Ο κόκκινος αναλύτης προσροφάτε 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 στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μείγματος μεταξύ της υγρής κινητής και της υγρής στατικής φάσης.



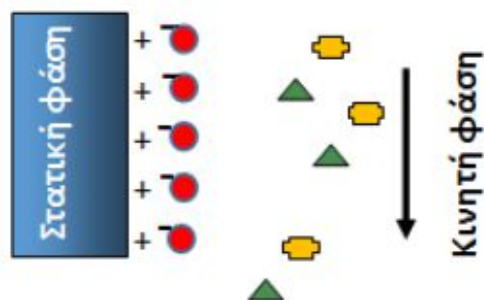
Ο κόκκινος αναλύτης κατανέμεται ισχυρότερα στην στατική φάση σε σχέση με το μπλε, οπότε καθυστερεί να εξέλθει.

III. Η χρωματογραφία **μοριακού αποκλεισμού (size exclusion chromatography)** εφαρμόζεται στο διαχωρισμό ενώσεων με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 10.000 Da. Εφαρμόζεται στην ανάλυση και το χαρακτηρισμό των πολυμερών ενώσεων (συμπεριλαμβανομένων και των πρωτεϊνών). Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μέγεθος (και το σχήμα) των μορίων των αναλυόμενων ενώσεων. Ενώ τα μικρά μόρια καθυστερούν εισερχόμενα στους πόρους των σωματιδίων της στατικής φάσης, τα μεγάλα μόρια δεν εισέρχονται στους πόρους της στατικής φάσης, και έτσι εξέρχονται πρώτα από τη στήλη.



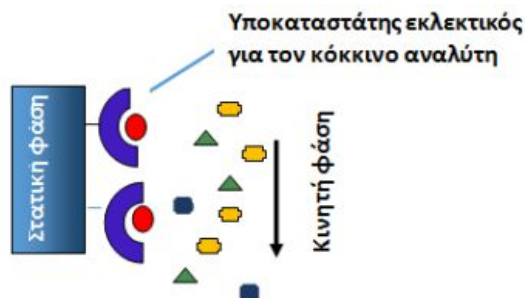
ο κόκκινος αναλύτης εισχωρώντας στους πόρους της στατικής φάσης καθυστερεί να εξέλθει σε σχέση με τους υπόλοιπους.

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 με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις 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, οι οποίοι είναι ακινητοποιημένοι στη στατική φάση.

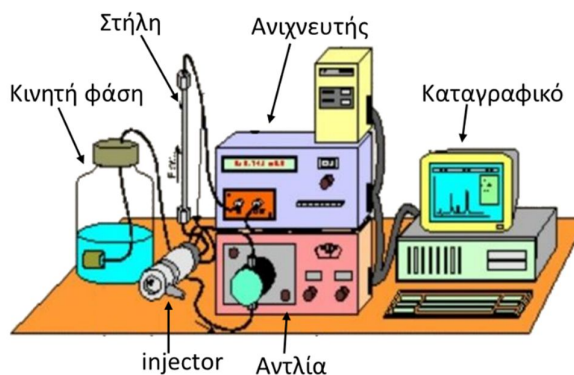


Ο κόκκινος αναλύτης δεσμεύεται από τη στατική φάση στην οποία υπάρχει ακινητοποιημένος υποκαταστάτης με εκλεκτική συγγένεια για το κόκκινο αναλύτη. Κατά συνέπεια, καθυστερεί να εξέλθει σε σχέση με τους υπόλοιπους.

Θα εξεταστούν 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. Σύστημα καταστολής σήματος (προαιρετικό)
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 είναι σταθερής συγκέντρωσης σε όλη τη διάρκεια της χρωματογραφίας (ισοκρατική έκλουση) ή να έχει μεταβαλλόμενη συγκέντρωση κατά τη διάρκεια χρωματογραφικού διαχωρισμού (βαθμιδωτή έκλουση). Στην περίπτωση της βαθμιδωτής έκλουσης, ξεκινάει από χαμηλή ισχύ η κινητή φάση και κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας μεγαλώνει με ένα ρυθμό που έχει επιλεγεί κατά την ανάπτυξη της μεθόδου. Συνήθως επιλέγεται όταν είναι να διαχωριστούν μίγματα ενώσεων που κατακρατούνται από τη στήλη με πολύ διαφορετική ισχύ. Έτσι αρχικά χρησιμοποιείται χαμηλή ισχύ της κινητής φάσης ώστε οι ενώσεις που κατακρατούνται από τη στήλη διαχωρισμού ασθενώς, να μπορέσουν να διαχωριστούν και να μην βγουν όλες μαζί. Στη συνέχεια όμως για να μπορέσει να γίνει έκλουση των υπολοίπων ενώσεων θα πρέπει η ισχύ της κινητής φάσης να αυξηθεί, διαφορετικά οι ενώσεις αυτές θα μείνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στη στήλη (ή και μόνιμα) αυξάνοντας έτσι κατά πολύ το χρόνο του χρωματογραφήματος.

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

1. **για τη χρωματογραφία ιονανταλλαγής:**
 - a. το φορτίο, τη 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. την πολικότητα και το μέγεθος των ενώσεων
 2. το είδος της στατικής φάσης
 3. το είδος του ανιχνευτή
 4. την τοξικότητα του
 5. το κόστος του

Φυσαλίδες:

Ένα από τα βασικότερα προβλήματα που δημιουργούνται κατά την έκλουση της κινητής φάσης είναι η δημιουργία φυσαλίδων αέρα μέσα σε αυτή. Κατά τη παρασκευή της κινητής φάσης, υπάρχει αέρας

διαλυμένος μέσα σε αυτή, που κατά την κίνηση της δημιουργεί φυσαλίδες. Οι φυσαλίδες αυτές του αέρα μπορούν να δημιουργήσουν διάφορα προβλήματα στη σύστημα της χρωματογραφίας όπως:

1. Κατά τη δίοδο στην αντλία του συστήματος, περιέχονται κάποιες βαλβίδες ροής όπου θα μπορούσαν να εγκλωβιστούν σε αυτές με αποτέλεσμα να αυξήσουν τη πίεση του συστήματος.
2. Να περάσουν στη χρωματογραφική στήλη όπου εκεί θα δημιουργήσουν δύο προβλήματα, αφενός θα μπορούσαν να αυξήσουν και εδώ τη πίεση του συστήματος, αφετέρου θα μπορούσαν να επηρεάσουν το διαχωρισμό των ενώσεων.
3. Τέλος θα μπορούσε η φυσαλίδα να καταλήξει στην κυψελίδα του ανιχνευτή. Αυτό αποτελεί το μεγαλύτερο πρόβλημα επειδή η φυσαλίδα αυτή θα εγκλωβιστεί μέσα σε αυτή, θα έχει τυχαία κίνηση, έτσι το σήμα μέσα στην κυψελίδα θα καταγράφεται, άλλοτε χωρίς τη φυσαλίδα, άλλοτε με τη φυσαλίδα και άλλοτε με μέρος της φυσαλίδας, αυτό θα δώσει ένα πολύ έντονο θόρυβο, επηρεάζοντας έτσι τα αποτελέσματα. Μερικές φορές ο θόρυβος αυτός είναι τόσο έντονος που μικρές κορυφές ενώσεων χάνονται μέσα σε αυτόν.

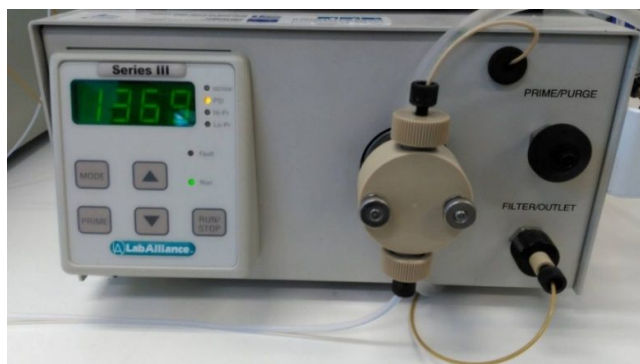
Απαέρωση:

Για την αποφυγή της δημιουργίας των φυσαλίδων κατά τη δημιουργία της κινητής φάσης γίνεται απαέρωση. Η απαέρωση μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους, οι κυριότεροι είναι η διοχέτευση μέσα σε αυτή ενός αδρανούς αερίου ή με τη χρήση υπερήχων. Ως αδρανές αέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί He ή N₂. Οι φυσαλίδες του αερίου που διοχετεύεται παρασύρουν το διαλυμένο αέρα του διαλύματος, απομακρύνοντας τον. Η διαδικασία αυτή κρατάει 10 με 15 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί όλος ο διαλυμένος αέρας. Για την απομάκρυνση με τους υπερήχους, ο διαλύτης τοποθετείται σε αυτούς για 15 με 20 λεπτά. Η δόνηση των μορίων του διαλύματος που γίνεται με τη χρήση των υπερήχων, απομακρύνει το διαλυμένο αέρα δημιουργώντας φυσαλίδες που φεύγουν στην ατμόσφαιρα.

Στη περίπτωση όμως που κατά τη διαδικασία της χρωματογραφικής ανάλυσης δημιουργηθούν φυσαλίδες, αυτές απομακρύνονται πριν από την εισαγωγή τους στην αντλία. Αυτό γίνεται με τη διαδικασία που αναλύεται στο μέρος της αντλίας. Σύγχρονα χρωματογραφικά συστήματα έχουν διαδικασία αυτόματης απομάκρυνσης των φυσαλίδων, με αποτέλεσμα να μην χρειάζεται καν η απαέρωση του διαλύτη της κινητής φάσης.

2. Αντλία:

Η αντλία καθορίζει τη ροή της κινητής φάσης με την παλινδρομική κίνηση ενός ή δύο πιστονιών, τα οποία τοποθετούνται σε σειρά ή παράλληλα. Η ροή δεν είναι συνεχής, αλλά είναι με παλμούς, όπως πάλλεται το πιστόνι, αυτό θα δημιουργούσε έντονο πρόβλημα τόσο στο διαχωρισμό όσο και στο τελικό σήμα στον ανιχνευτή. Για το λόγο αυτό μετά το πιστόνι υπάρχει ένας καταστολέας παλμών, όπου η ροή της αντλίας ομαλοποιείται και γίνεται συνεχής,



χωρίς διακυμάνσεις. Αυτός ο καταστολέας παλμών μπορεί απλά να είναι ένας σπειροειδής σωλήνας μεγάλου μήκους, όπου κατά τη διέλευση του διαλύτη γίνεται απόσβεση της διαταραχής της ροής. Τέτοιος καταστολέας παλμών υπάρχει στη χρωματογραφία στην άσκηση της RLPC. Άλλος τύπος καταστολέα παλμών είναι η χρήση μεμβράνης. Καθώς έρχεται η κινητή φάση κτυπάει πάνω στη μεμβράνη όπου αυτή πάλλεται και αποσβένει τη διαταραχή της ροής της, έτσι η ροή μετά από αυτήν είναι συνεχής. Η αντλία στην άσκηση της ιοντικής χρωματογραφίας έχει ως καταστολέα παλμών τέτοια μεμβράνη.

Το ενεργό λαμπάκι στην οθόνη δείχνει ποια λειτουργία είναι σε χρήση. Με το κουμπί “MODE” εναλλάσσονται οι επιλογές και με τα βελάκια (πάνω ή κάτω) αυξομειώνονται οι τιμές τους, όταν αυτό επιτρέπεται. Η πρώτη επιλογή είναι η ροή και δίνεται σε ml/min. Με τα βελάκια αυξομειώνεται ως την επιθυμητή τιμή (πχ 1 ml/min). Οι αλλαγές της τιμής πρέπει να γίνονται με κλειστή τη ροή της κινητής φάσης, ώστε να αποφευχθούν απότομες αλλαγές της που μπορούν να προκαλέσουν ζημιά στο σύστημα, ειδικά στη στήλη χρωματογραφίας. Η δεύτερη λειτουργία είναι η πίεση του συστήματος. Σε αυτήν γίνεται η καταγραφή της πίεσης του συστήματος (πχ 1169 psi), δεν μπορεί να αλλάξει με τα βελάκια, είναι απλά η πίεση του συστήματος. Οι στήλες χρωματογραφίας είναι καλά πακεταρισμένες και για να μπορέσει να περάσει η κινητή φάση μέσα από αυτή χρειάζεται υψηλή πίεση.

Η τελική τιμή της πίεσης εξαρτάται από:

1. το είδος της χρωματογραφικής στήλης
2. το είδος της κινητής φάσης
3. τη τιμή της ροής
4. το είδος τους ανιχνευτή
5. το αν υπάρχει καταστολέας σήματος (όπως στη χρωματογραφία ιονανταλλαγής)

Η τιμή της πίεσης του συστήματος, δίνει μια γρήγορη εικόνα για τη κατάσταση του. Αν η πίεση είναι μεγαλύτερη από την αναμενόμενη τότε είναι μια ένδειξη ότι είτε η χρωματογραφική στήλη έχει αρχίσει να μαζεύει ακαθαρσίες (οπότε θα πρέπει να γίνει η διαδικασία καθαρισμού), είτε ότι έχει περάσει κάποια φυσαλίδα και εμποδίζει την ομαλή ροή, είτε έχει γίνει κάποιο λάθος στο χειρισμό (πχ λάθος ροή, όσο μεγαλύτερη είναι η ροή της κινητής φάσης τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η πίεση του συστήματος). Υψηλή τιμή της πίεσης (πέραν της αναμενόμενης) εκτός του ότι θα μπορούσε να δημιουργήσει πρόβλημα στο διαχωρισμό των ενώσεων θα μπορούσε να δημιουργήσει και κάποια ζημιά στο σύστημα της χρωματογραφίας. Για το λόγο αυτό μπαίνει ένα όριο στην ανώτερη τιμή, ώστε αν ξεπεραστεί, να σταματήσει η λειτουργία της αντλίας και να αποφευχθεί έτσι μια πιθανή ζημιά στο σύστημα της χρωματογραφίας. Η επιλογή αυτή γίνεται στη τρίτη λειτουργία του μενού, όπου με τα βελάκια επιλέγεται η ανώτερη τιμή, πχ 1600 psi. Η τέταρτη λειτουργία είναι μια ελάχιστη τιμή της πίεσης, που και αυτή επιλέγεται με τα βελάκια, πχ 50 psi. Το όριο της ελάχιστης τιμής στην πίεση του συστήματος έχει τη χρησιμότητα στο ότι επειδή πολλές φορές τα συστήματα χρωματογραφίας λειτουργούν με auto sampler χωρίς ο χειριστής να βρίσκεται πάντα εκεί, αν για κάποιο λόγο δημιουργηθεί κάποια διαρροή (λόγω πχ υψηλής πίεσης κάποιο σωληνάκι ή σύνδεσμος φύγει από τη θέση του), ο διαλύτης που είναι κάποιο οξύ ή βάση ή κάποιος οργανικός διαλύτης, θα τρέχει εκτός συστήματος. Κατά τη διάρκεια της διαρροής η πίεση του συστήματος θα είναι σχεδόν μηδενική, έτσι βάζοντας ένα κάτω όριο το οποίο δεν μπορεί να οφείλεται σε πραγματικές συνθήκες λειτουργίας (πχ 50 psi), μόλις αυτό επιτευχθεί η αντλία σταματάει, αποφεύγοντας τις επιπτώσεις της πιθανής διαρροής.

Αφού οριστούν οι παράμετροι με το ‘**RUN/STOP**’ ξεκινάει η λειτουργία της αντλίας.

Όταν ξεκινήσει η ροή της κινητής φάσης ελέγχεται πάντα ότι δεν δημιουργούνται φυσαλίδες κοιτάζοντας το διαφανή σωλήνα μέσα από τον οποίο περνάει η κινητή φάση. Συνήθως αυτές εμφανίζονται με το ξεκίνημα της λειτουργίας, οπότε για την αποφυγή πιθανής εμφάνισης τους, γίνεται η διαδικασία της απομάκρυνσης τους.

Διαδικασία αφαίρεσης φυσαλίδων:

Με κλειστή τη ροή της αντλίας, Τοποθετείτε μία σύριγγα στη βαλβίδα ‘Prime/Purge’, την ανοίγετε (αριστερόστροφα) και πατάτε το κουμπί ‘Prime’. Όταν βεβαιωθείτε ότι έχετε αδειάσει πλήρως το σωλήνα από τις φυσαλίδες πατάτε πρώτα ‘Prime’ ώστε να σταματήσει η ροή, κλείνετε τη βαλβίδα (δεξιόστροφα)

και απομακρύνετε τη σύριγγα. Με το κουμπί 'Prime' δίνεται υψηλή ροή στο σύστημα (~ 50 ml/min) ώστε οι φυσαλίδες να κινηθούν γρήγορα και να απομακρυνθούν. Ανοίγοντας την βαλβίδα 'Prime/Purge' γίνεται εκτροπή της ροής της κινητής φάσης και αντί να συνεχίσει μέσα στο σύστημα της χρωματογραφίας πηγαίνει μέσω αυτής της βαλβίδας και συλλέγεται στη σύριγγα που έχει τοποθετηθεί.

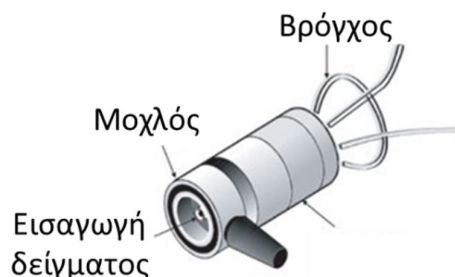
Προσοχή:

- Ανοίγετε και κλείνετε την βαλβίδα 'Prime/Purge' πάντα με κλειστή τη ροή της αντλίας, διαφορετικά γίνεται απότομη αλλαγή της πίεσης του συστήματος που μπορεί να προκαλέσει ζημιά.
- Πατάτε το κουμπί 'Prime' μόνο όταν είναι ανοικτή την βαλβίδα 'Prime/Purge' διαφορετικά η υψηλή ροή του Prime θα μπει στο σύστημα χρωματογραφίας, αυξάνοντας κατά πολύ τη πίεση του.

Σημείωση: Το πιστόνι της αντλίας συνδέεται και με ένα διάλυμα MeOH 10%v/v το οποίο βοηθάει στη λίπανση του. Πιθανόν φυσαλίδες σε αυτό δεν ενοχλούν, είναι ένα αυτόνομο σύστημα που ανακυκλώνεται που δεν έρχεται σε επαφή με την κινητή φάση.

3. Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector):

Το σύστημα εισαγωγής αποτελείται από μία βαλβίδα δύο θέσεων της φόρτισης (Load) και της εισαγωγής (inject), έχει έξι οπές (τρύπες) και ένα βρόχο καθορισμένου όγκου. Μπορεί να συνοδεύεται από σύστημα αυτόματης δειγματοληψίας ή η εισαγωγή του δείγματος να γίνεται χειροκίνητα με τη χρήση μια σύριγγας. Οι έξι οπές επικοινωνούν διαφορετικά ανάλογα τη θέση της βαλβίδας (Load / Inject).



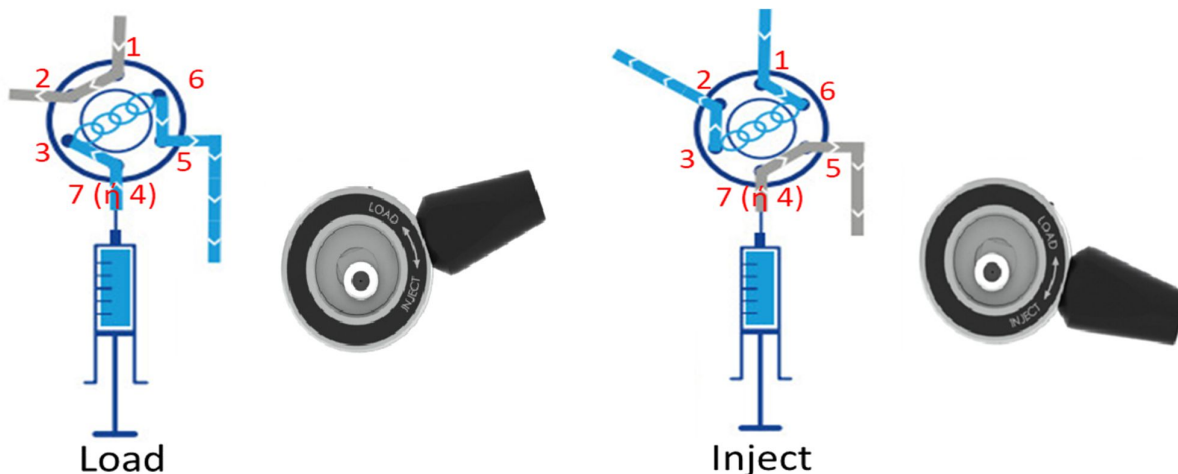
Οι έξι οπές συνδέονται:

- Η οπή 1 με την αντλία (ο διαλύτης καθώς έρχεται από την αντλία)
- Η οπή 2 με τη στήλη
- Η οπή 3 και η οπή 6 με το βρόχο (ή Loop)
- Η οπή 4 είναι η οπή που γίνεται εισαγωγή του δείγματος, στη περίπτωση που είναι συνδεδεμένος ένας αυτο sampler. Διαφορετικά όταν η εισαγωγή του δείγματος γίνεται χειροκίνητα με σύριγγα, υπάρχει μια 7 οπή που είναι στο κέντρο του συστήματος και σε αυτή Τοποθετείτε η σύριγγα.
- Η οπή 5 είναι συνδεδεμένη με τα απόβλητα



Ο μοχλός του συστήματος έχει δύο θέσεις, τη θέση φόρτισης (Load) ο μοχλός είναι προς τα πάνω και τη θέση εισαγωγής (Inject) ο μοχλός είναι προς τα κάτω. Στο εσωτερικό του υπάρχει ένα σύστημα με αυλάκια που συνδέει τις οπές ανά δύο μεταξύ τους. Καθώς μετακινείται ο μοχλός από τη μία θέση στην άλλη, περιστρέφεται το σύστημα αυτό με αποτέλεσμα οι οπές να συνδέονται διαφορετικά στη θέση Load και διαφορετικά στη θέση Inject.

Στη θέση **Load** συνδέονται οι οπές «1 και 2», «3 και 7 (ή 4)» και «5 και 6». Έτσι καθώς έρχεται ο διαλύτης από την αντλία εισέρχεται από την οπή 1 και εξέρχεται από την οπή 2 όπου πηγαίνει στη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με την οπή 7 και οδεύει προς την οπή 3 (που συνδέεται η Loop), περνάει μέσα από την Loop και φεύγοντας από την Loop εισέρχεται στην οπή 6. Η οπή 6 συνδέεται με την 5, από την οποία εξέρχεται το δείγμα πηγαίνοντας το πλεόνασμα του στα απόβλητα.



Στη θέση **Inject** περιστρέφεται το εσωτερικό σύστημα με τα αυλάκια και έτσι συνδέει τώρα την οπή «1 με την 6», «την 2 με την 3» και «την 7(ή 4) με την 5». Έτσι ο διαλύτης που έρχεται από την αντλία (οπή 1) μέσω της (οπής 6) πηγαίνει τώρα στην Loop (όπου με την υψηλή πίεση που έχει παρασύρει το δείγμα που είναι μέσα της). Η έξοδος της Loop είναι στην (οπή 3) η οποία συνδέεται με την (οπή 2) πηγαίνοντας το δείγμα στη στήλη. Οι άλλες δύο οπές είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους η 7 (εισαγωγή του δείγματος) με την 5 (τα απόβλητα). Έτσι αν στη θέση Inject επιχειρηθεί να γίνει εισαγωγή δείγματος, αυτό θα πάει κατευθείαν στα απόβλητα, αφού η Loop είναι συνδεδεμένη τώρα μεταξύ αντλίας και στήλης.

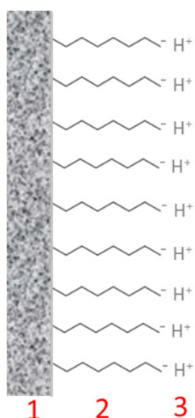
Προσοχή:

- Πρώτα το σύστημα είναι στη θέση Load (για να γεμίσει η Loop με το δείγμα) και στη συνέχεια γυρνάει στη θέση Inject ώστε το δείγμα που είναι στην Loop να πάει στη στήλη. Αν γίνει η εισαγωγή του δείγματος όταν το σύστημα είναι στη θέση Inject τότε όλο το δείγμα θα πάει στα απόβλητα.
- Η Loop είναι σταθερού όγκου, το πλεόνασμα του δείγματος θα πάει στα απόβλητα μέσω της οπής 5. Πάντα βάζετε παραπάνω δείγμα στην Loop, ώστε να ξεπλυθεί με το δείγμα. Ο κανόνας είναι ότι βάζετε τουλάχιστον 3 φορές τον όγκο της Loop, δηλ. αν η Loop είναι 20 μl τότε γίνεται εισαγωγή τουλάχιστον 60 μl δείγματος. Στην Loop θα μείνουν τα τελευταία 20 μl, τα υπόλοιπα θα πάνε στα απόβλητα.
- Η ποσότητα του δείγματος που εισάγεται στη κολόνα είναι πάντα η ίδια (όσος είναι ο όγκος της Loop) για το λόγο αυτό δεν χρειάζεται διόρθωση του όγκου εισαγωγής του δείγματος με εσωτερικό πρότυπο (όπως γίνεται στην άσκηση GC-FID). Ο μόνος τρόπος να μπει διαφορετική ποσότητα δείγματος είναι να μην γεμίσει σωστά η Loop.
- Αφού γεμίσει η Loop με το δείγμα **δεν αφαιρείτε** τη σύριγγα από την οπή (7). Περιστρέφετε το μοχλό τη θέση Inject (με τη σύριγγα μέσα στην οπή 7) καλό θα είναι αφού ολοκληρωθεί το χρωματογράφημα να αφαιρεθεί η σύριγγα. Αυτό γίνεται επειδή κατά την αφαίρεση τη σύριγγας από την οπή δημιουργείται μια μικρή υπό πίεση που τραβάει το δείγμα προς τα πίσω, με τον κίνδυνο να τραβήξει αέρα η Loop μέσω της οπής των αποβλήτων (5) που είναι συνδεδεμένη, και έτσι να ελαττωθεί ο όγκος του δείγματος που είναι μέσα στην Loop.

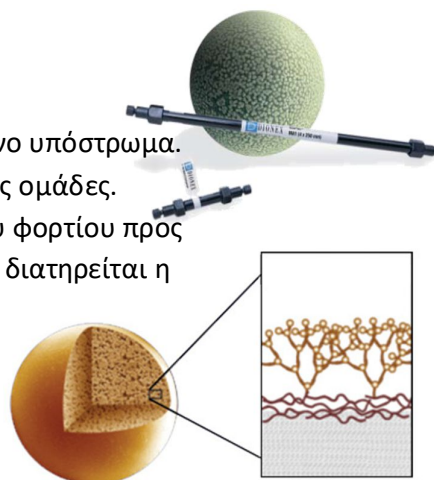
4. Στήλη:

I. Για τη χρωματογραφία ιονταλλαγής:

Στη άσκηση της Ιοντικής χρωματογραφίας χρησιμοποιείται στήλη πλήρωσης, όπου το πληρωτικό υλικό είναι ρητίνες ιονταλλαγής. Μια ιονταλλακτική ρητίνη αποτελείται από τρία κυρίως τμήματα:



1. Ένα μη διαλυτό οργανικό ή ανόργανο υπόστρωμα.
2. Τις δραστικές ιονταλλακτικές ομάδες.
3. Τα αντισταθμιστικά ιόντα αντίθετου φορτίου προς τις ιονταλλακτικές ομάδες έτσι ώστε να διατηρείται η ηλεκτρική ουδετερότητα.

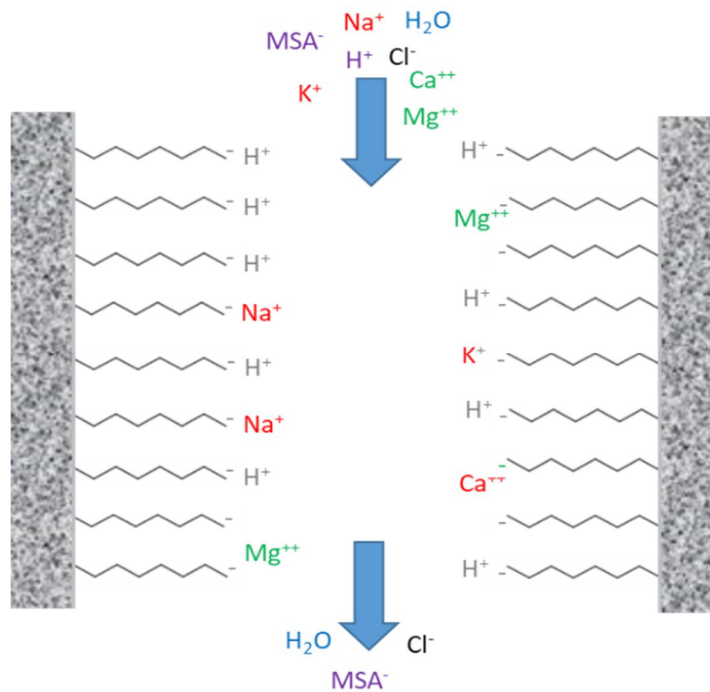


Το υλικό που κυριαρχεί στις στήλες της ιοντικής χρωματογραφίας είναι τα οργανικά πολυμερή του στυρενίου, ενώ χρησιμοποιείται και η πηκτή διοξειδίου του πυριτίου. Η χημική σταθερότητα είναι ένα σημαντικό πλεονέκτημα των οργανικών πολυμερών σε σχέση με τη πηκτή διοξειδίου του πυριτίου, που παρουσιάζει ευαισθησία σε αλκαλικό περιβάλλον.

Οι ρητίνες ιονταλλαγής πρέπει να διαθέτουν τα εξής χαρακτηριστικά ποιότητας προκειμένου να είναι κατάλληλες ως υλικό πλήρωσης στηλών ιοντικής χρωματογραφίας:

1. ταχύτητα ανταλλαγής των ιόντων όσο το δυνατόν μεγαλύτερη
2. χημική σταθερότητα σε ευρεία περιοχή pH
3. καλή μηχανική αντοχή και αντίσταση σε μεγάλες μεταβολές της πίεσης
4. αντίσταση στην αποσύνθεση κατά τη πλήρωση και τη ροή της κινητής φάσης. Μια ποικιλία υλικών έχει χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα ιονταλλακτικών ρητινών.

Η στήλη διακρίνεται σε δύο μέρη: την προστήλη και την κύρια στήλη. Η προστήλη είναι κατασκευασμένη με ακριβώς το ίδιο υλικό με αυτό της στήλης, έχει το ένα τρίτο του μήκους της κύριας στήλης και τοποθετείται πριν από αυτήν. Στην προστήλη θα συγκρατούνται όλες οι ενώσεις που δεσμεύονται μόνιμα από το υλικό της στήλης καθώς και όλες οι ακαθαρσίες του δείγματος αποφεύγοντας έτσι να περάσουν στη στήλη και να τη φθείρουν, προστατεύοντας την. Η προστήλη έχει μικρότερο κόστος και έτσι είναι εφικτό να αλλάζεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε αντίθεση με τη κύρια στήλη η οποία είναι ακριβή. Η κύρια στήλη, μαζί με τη προστήλη είναι υπεύθυνες για το χρωματογραφικό διαχωρισμό των ενώσεων του δείγματος.



Στην άσκηση IC θα γίνει ανάλυση κατιόντων, οπότε τα αντισταθμιστικά ιόντα, θα είναι ιόντα πρωτονίου που διοχετεύονται στη στήλη από το διαλύτη που είναι ένα οξύ (MSA, Methanesulfonic Acid, $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OH}$). Τα ιόντα αυτά, αντικαθίστανται συνεχώς με νέα ιόντα που τροφοδοτούνται από το διαλύτη, όμως πάντα υπάρχει ένα κατιόν σε δραστική ομάδα της ρητίνης ώστε να υπάρχει η ηλεκτρική ουδετερότητα. Καθώς το δείγμα εισάγεται στη στήλη, εισάγεται ένα μίγμα ιόντων, θετικών και αρνητικών. Ιόντα θετικά του δείγματος, όπως Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} τα οποία θα προσκολληθούν προσωρινά στις δραστικές ομάδες της ρητίνης, αντικαθιστώντας τα αντισταθμιστικά ιόντα του H^+ . Στη συνέχεια θα αντικατασταθούν ξανά από τα αντισταθμιστικά ιόντα του διαλύτη με αποτέλεσμα να αποδεσμευτούν και να φύγουν από τη στήλη. Τα ιόντα προσκολλώνται σε διαφορετικό χρόνο πάνω στις δραστικές ομάδες και για το λόγο αυτό θα φύγουν από τη στήλη σε διαφορετικό χρόνο πετυχαίνοντας έτσι το διαχωρισμό τους. Τα κριτήρια του διαχωρισμού είναι πρώτα το φορτίο, τα μονοσθενή ιόντα προσκολλώνται σε μία δραστική ομάδα, ενώ τα δισθενή σε δύο με αποτέλεσμα να προσκολλώνται πιο ισχυρά. Το δεύτερο κριτήριο είναι το μέγεθος του ιόντος. Όσο πιο μεγάλο είναι το ιόν, τόσο πιο κοντά στις δραστικές ομάδες θα βρεθεί και τόσο πιο εύκολα θα προσκολληθεί. Με βάση τα κριτήρια αυτά, πρώτα θα βγουν τα μονοσθενή (δηλ. Na^+ και K^+) και μετά τα δισθενή (Mg^{2+} και Ca^{2+}). 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+} . Οπότε η σειρά έκλουσης των ιόντων θα είναι: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} .

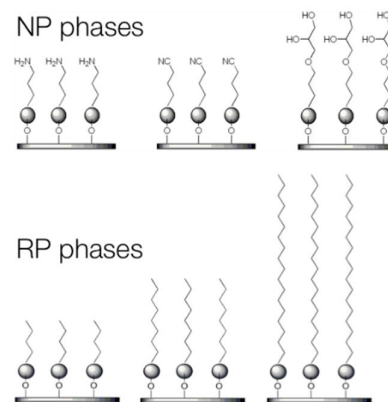
Όμως στο δείγμα μαζί με τα κατιόντα υπάρχουν και ανιόντα του. Το Na^+ δεν μπορεί να βρίσκεται μόνο του, θα έχει κάποιο ανιόν μαζί του για την ηλεκτρική ουδετερότητα όπως πχ το Cl^- . Τα ανιόντα αυτά δεν μπορούν να προσκολληθούν στις δραστικές ομάδες της στήλης (επειδή είναι αρνητικά φορτισμένες) και έτσι θα φύγουν άμεσα από τη στήλη. Ο χρόνος που εξέρχονται τα ιόντα αυτά, είναι στη πραγματικότητα ο νεκρός χρόνος, αφού δεν προσκολλώνται καθόλου στη στήλη, είναι δηλ. ο χρόνος που χρειάζεται το δείγμα να πάει από το σύστημα εισαγωγής στον ανιχνευτή χωρίς να προσκολληθεί καθόλου στη στήλη διαχωρισμού. Το δείγμα εκτός από τα ιόντα που περιέχει (κατιόντα και ανιόντα) το μεγαλύτερο του μέρος είναι νερό, καθώς τα δείγματά που συνήθως αναλύονται είναι της τάξης μερικών ppm ή ppb, δηλ. μέρη στο εκατομμύριο ή μέρη στο δισεκατομμύριο. Το νερό όμως δεν έχει φορτίο, οπότε θα βγει και αυτό στο νεκρό χρόνο μαζί με τα ανιόντα. Έτσι αρχικά στο χρωματογράφημα θα εμφανιστεί πρώτα μια μεγάλη κορυφή στο

χρόνο t_0 που θα οφείλεται στα ανιόντα και στο νερό του δείγματος και στη συνέχεια θα βγουν σταδιακά τα διάφορα κατιόντα.

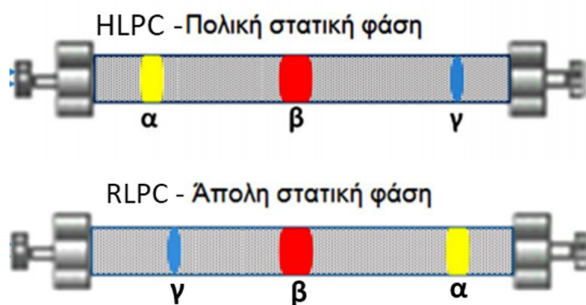
II. Για τη χρωματογραφία κατανομής:

Η χρωματογραφία κανονικής φάσης (HPLC) χρησιμοποιεί πολική στατική φάση και λιγότερο πολικό διαλύτη ενώ η χρωματογραφία αντίστροφη φάσης (RLPC) 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 στο διαχωριζόμενο μίγμα να αλληλοεπιδρούν ισχυρότερα με την πολική στατική φάση, σε σύγκριση με τις άπολες ενώσεις. Συνεπώς, οι λιγότερο πολικές ενώσεις διασχίζουν τη στήλη ταχύτερα και εκκλούνται από αυτήν νωρίτερα.



Το αντίστροφο της HPLC κανονικής φάσης, είναι η HPLC αντίστροφης φάσης (reverse phase HPLC δηλ. RLPC). Η στατική φάση αποτελείται από οξείδιο πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες με μακριές αλυσίδες υδρογονάνθρακα (C_{18}) οι οποίες προσδίδουν στη στατική φάση ιδιαίτερα άπολο χαρακτήρα. Η κινητή φάση είναι πολική και αποτελείται από μείγματα 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 στο διαχωριζόμενο δείγμα προσροφούνται ισχυρά στις αλυσίδες υδρογονάνθρακα, ενώ τα πολικά μόρια κινούνται ταχύτερα διαμέσου της στήλης και εκκλούνται νωρίτερα.



Χρωματογραφικός διαχωρισμός μίγματος αποτελούμενου από μόρια τριών τύπων που παρουσιάζονται ως:

κίτρινες, κόκκινες και μπλε ζώνες.

Τα μόρια ακολουθούν τη παρακάτω σειρά αυξανόμενης πολικότητας:

κίτρινο > κόκκινο > μπλε

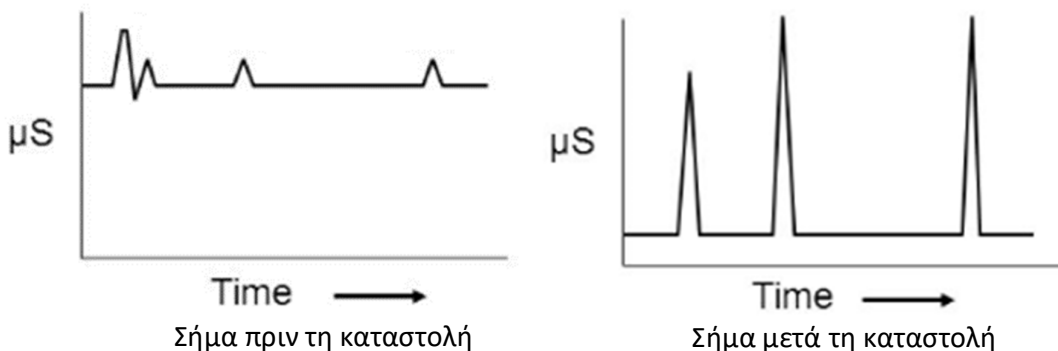
Σε οποιοδήποτε διαχωρισμό προπορεύονται τα μόρια ουσιών με πολικότητα αντίστοιχης της κινητής φάσης, ενώ καθυστερούν αυτά με πολικότητα αντίστοιχης της στατικής φάσης. Στη χρωματογραφία ισχύει η αρχή «τα όμοια διαχωρίζουν τα όμοια», που εφαρμόζεται εδώ με την έννοια ότι πολικές στήλες απαιτούνται για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

Η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης είναι η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη μορφή της υγρής χρωματογραφίας, οι περισσότερες εφαρμογές στο διαχωρισμό μικρών μορίων με RLPC βρίσκουν στις στήλες C_{18} .

5. Σύστημα καταστολής σήματος:

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

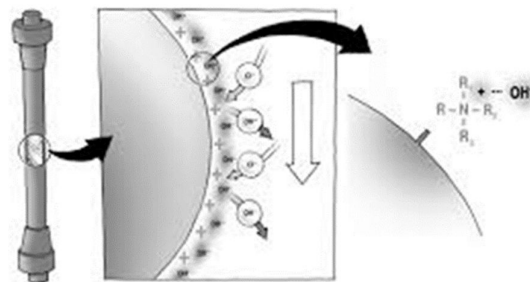
Όμως το σύστημα της χρωματογραφίας λειτουργεί με ένα διαλύτη το οποίο είναι ένα οξύ ή μια βάση. Αυτός ο διαλύτης από μόνος του έχει μια μεγάλη αγωγιμότητα ή οποία καταγράφεται στον ανιχνευτή και έτσι για να διακριθούν οι κορυφές των ιόντων, θα πρέπει να έχουν μεγαλύτερη αγωγιμότητα από το διαλύτη. Για το λόγο αυτό ανιχνεύονται μόνο πυκνά δείγματα, στα αραιά δείγματα, η αγωγιμότητα των ιόντων θα είναι μικρότερη από την αγωγιμότητα του διαλυτή και έτσι δεν θα εμφανίζονται καθόλου. Η αρχή λειτουργίας του συστήματος καταστολής είναι ότι καταστέλλει (εξουδετερώνει) το σήμα του διαλύτη, 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, οπότε έχει ιόντα H^+ και ιόντα MSA^- , στη ρητίνη θα αντικαθίστανται τα ιόντα MSA^- με OH^- . Έτσι ενώ στο σύστημα καταστολής θα εισέρχεται ο διαλύτης (δηλ. ιόντα H^+ και MSA^-) θα εξέρχονται ιόντα H^+ και OH^- (δηλ. νερό), αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα στον ανιχνευτή αντί για τα ιόντα του διαλύτη (MSA^-) θα έρχεται νερό που έχει πολύ μικρή αγωγιμότητα.

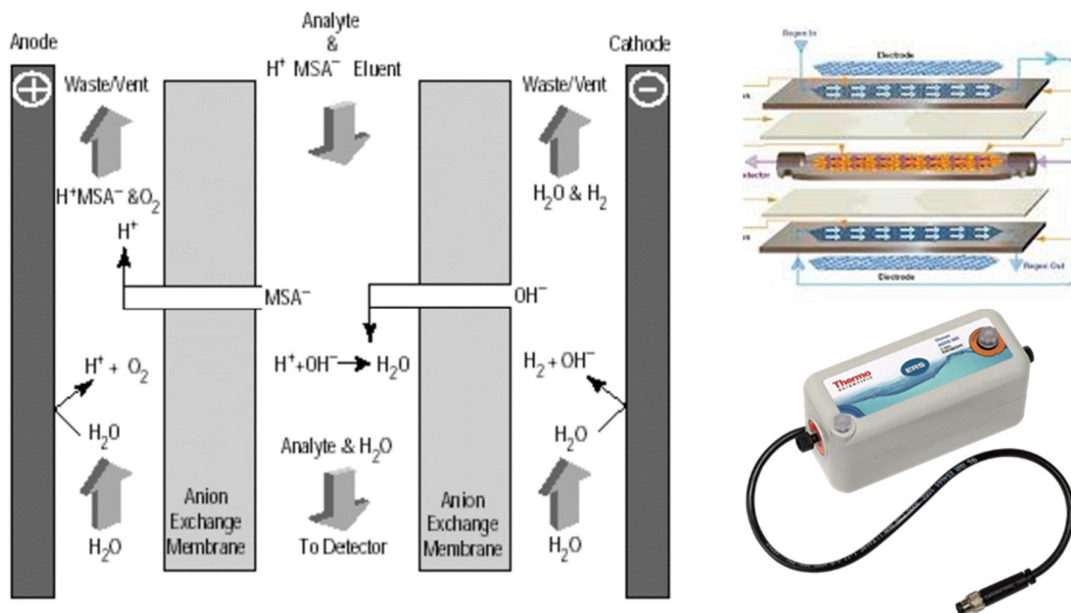


II. Με τη μορφή της μεμβράνης:

η λογική είναι η ίδια με πριν, δηλ. να αντικαθιστούν τα ιόντα MSA^- με ιόντα OH^- , αλλά αυτά παρέχονται με διαφορετικό τρόπο. Το σύστημα αποτελείται από τρία διαμερίσματα, ένα κεντρικό και δύο πλευρικά, ένα δεξιά και ένα αριστερά. Τα διαμερίσματα αυτά διαχωρίζονται από δύο ημιπερατές μεμβράνες, όπου η μια επιτρέπει τη διέλευση του ανιόντος του MSA^- και η δεύτερη του OH^- . Στις άκρες του συστήματος υπάρχουν δύο ηλεκτρόδια, στα οποία δίνεται ένα δυναμικό.

Στο δεξιό διαμέρισμα το ηλεκτρόδιο έχει αρνητικό δυναμικό και έτσι γίνεται κάθοδος, με αποτέλεσμα με τη διέλευση νερού μέσα από αυτό να παράγεται αέριο H_2 και ιόντα HO^- . Αντίθετα στο αριστερό διαμέρισμα το ηλεκτρόδιο έχει θετικό φορτίο και έτσι γίνεται άνοδος, με αποτέλεσμα 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 δύο ηλεκτρόδια εκτός της χρήσης τους για τη παραγωγή των ιόντων HO^- και H^+ απωθώντας ή έλκοντας τα δίνουν την κίνηση ώστε να μπορέσουν να μετακινηθούν από το ένα διαμέρισμα στο άλλο μέσω των ημιπερατών μεμβρανών. Έτσι το ιόν MSA^- θα πάει προς το αριστερό διαμέρισμα (έλκεται από τη θετική άνοδο) και στη συνέχεια από την έξοδο του συστήματος θα πάει στα απόβλητα. Τα ιόντα HO^- που παράγονται στο δεξιό διαμέρισμα, από την αρνητική κάθοδο θα απωθηθούν και μέσω της ημιπερατής μεμβράνης θα περάσουν στο κεντρικό διαμέρισμα (δεν θα συνεχίσουν προς στο αριστερό διαμέρισμα γιατί η επόμενη μεμβράνη είναι ημιπερατή μόνο για τα ιόντα MSA^-). Τα ιόντα OH^- μαζί με τα H^+ του διαλύτη θα δώσουν μόρια νερού. Έτσι ενώ στο κεντρικό διαμέρισμα αρχικά εισέρχονται ιόντα MSA^- και H^+ τελικά εξέρχεται νερό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στον ανιχνευτή αντί να πάει ένα οξύ (MSA) να πάει νερό, μειώνοντας έτσι το σήμα υποβάθρου.



Το μειονέκτημα του συστήματος με τη στήλη είναι ότι οι θέσεις αντικατάστασης των ιόντων είναι πεπερασμένες και έτσι μετά από κάποιο καιρό θα μειώνεται η αποτελεσματικότητα της και στο τέλος θα χρειαστεί να γίνει ανανέωση της. Αντίθετα στο σύστημα με τις μεμβράνες η παραγωγή των ιόντων γίνεται συνεχώς (μέση της ηλεκτρόλυσης) με αποτέλεσμα να υπάρχει το ίδιο επίπεδο καταστολή συνεχώς.

6. Ανιχνευτής:

Στην υγρή χρωματογραφία μπορεί να χρησιμοποιηθούν ένα πλήθος ανιχνευτών μεταξύ των οποίων είναι:

- Απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)
- Αγωγιμομετρικοί
- Φθορισμού
- Δείκτης Διάθλασης
- Ηλεκτροχημικοί
- Φασματομετρίας Μαζών

Θα αναφερθούν κυρίως στον αγωγιμομετρικό ανιχνευτή και στον απορρόφησης ορατού – υπεριώδους που χρησιμοποιούνται στις ασκήσεις της ιοντικής και της RLPC αντίστοιχα.

I. αγωγιμομετρικός (Conductivity):

Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιείται συνήθως σε ένα σύστημα ιοντικής χρωματογραφίας είναι ο αγωγιμομετρικός (Conductivity), μιας και τα όλα τα ιόντα έχουν αγωγιμότητα. Στο εσωτερικό του ανιχνευτή υπάρχει ένα κελί (cell) που περιέχει δύο ηλεκτρόδια μεταξύ των οποίων μετράτε η αγωγιμότητα. Καθώς διέρχονται μέσα από αυτόν τα ιόντα, η αγωγιμότητα που καταγράφεται μεγαλώνει μέχρι να φτάσει σε μια κορύφωση και στη συνέχεια μειώνεται καθώς τα ιόντα απομακρύνονται μέχρι να φτάσει ξανά στη τιμή υποβάθρου.



Δύο είναι οι νόμοι που καθορίζουν την αρχή λειτουργίας του:

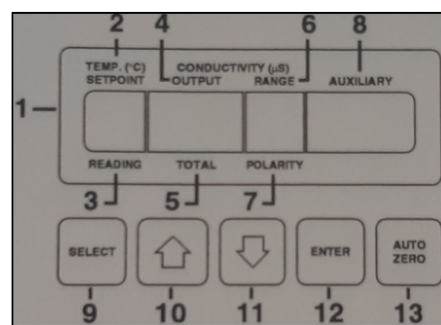
1. Ο νόμος του Ohm:

Η αγωγιμότητα είναι ανάλογη της έντασης του ρεύματος και αντίστροφος ανάλογη του φορτίου $G=I/E$

2. Ο νόμος του Kohlraush:

Περιγράφει την αρχή ανεξαρτησίας κίνησης των ιόντων. Κάθε ιόν συμμετέχει στην αγωγιμότητα ανεξάρτητα της παρουσίας ή όχι άλλων ιόντων. Έτσι η αγωγιμότητα είναι το άθροισμα των επιμέρους αγωγιμοτήτων του κάθε ιόντος. Καθώς η αγωγιμότητα επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, το κελί του ανιχνευτή πρέπει να θερμαίνεται σε μια θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία του δωματίου αλλά όχι πάρα πολύ μεγάλη (πχ 35 °C), ώστε να μην επηρεάζεται από τις μεταβολές που μπορεί να υπάρξουν.

Η αγωγιμότητα που καταγράφει ο ανιχνευτής είναι το άθροισμα της αγωγιμότητας του διαλύτη (ο οποίος διέρχεται συνεχώς) και της αγωγιμότητας από το κάθε ιόν που εισέρχεται σε αυτόν. Η αγωγιμότητα του ιόντος είναι πολύ μικρότερη από αυτή του διαλύτη, λόγω της πολύ μικρής ποσότητας που εισέρχεται σε σχέση με το διαλύτη. Το ιόν είναι συνήθως σε τάξη μεγέθους των ppb ή ppt ενώ ο διαλύτης εισέρχεται με τη ροή της κινητής φάσης πχ 1 ml/min. Για παράδειγμα, αν η αγωγιμότητα του διαλύτη είναι 2000 µS και του ιόντος 50 µS τότε η συνολική αγωγιμότητα θα είναι 2050 µS. Επειδή η διαφορά από τα 2000 στα 2050 είναι πολύ μικρή, η κορυφή που θα δώσει το ιόν θα είναι και αυτή πολύ μικρή. Για το λόγο αυτό καταγράφεται η σχετική αγωγιμότητα και όχι η συνολική. Η σχετική αγωγιμότητα είναι η διαφορά της ολικής αγωγιμότητας από την αγωγιμότητα του διαλύτη, είναι δηλαδή η αγωγιμότητα που οφείλεται στα ιόντα μόνο. Πατώντας το κουμπί «auto zero» η τιμή που έχει εκείνη τη στιγμή η αγωγιμότητα θεωρείται μηδέν και κάθε μεταβολή από αυτήν θα είναι η σχετική αγωγιμότητα, έτσι μηδενίζεται εικονικά η αγωγιμότητά του διαλύτη. Στο προηγούμενο παράδειγμα με τη χρήση auto zero η σχετική αγωγιμότητα θα έχει τη τιμή 50 µS, όση δηλ. αγωγιμότητα οφείλεται στα ιόντα. Η κορυφή που εμφανίζεται θα οφείλεται σε αλλαγή της σχετικής αγωγιμότητας δηλαδή από τιμή 0 σε 50 µS, δημιουργώντας έτσι μια έντονη κορυφή.



Με το κουμπί “select” (9) γίνεται επιλογή της κάθε λειτουργία του μενού του ανιχνευτή και με τα βελάκια (10, 11) μεταβάλλεται η τιμή προς τα πάνω ή προς τα κάτω, όταν αυτό επιτρέπεται. Πατώντας το κουμπί “enter” (12) κατοχυρώνεται η αντίστοιχη τιμή. Στη θέση 2 ορίζεται η επιθυμητή θερμοκρασία του

κελιού και στη θέση 3 δίνεται η μετρούμενη θερμοκρασία του. Στη θέση 4 δίνεται η σχετική αγωγιμότητα και στη 5 η συνολική αγωγιμότητα.

Στη θέση 6 δίνεται η ευαισθησία του ανιχνευτή, η οποία μπορεί να μεταβληθεί από τις επιλογές του μενού. Η τιμή της ευαισθησίας είναι αντιστρόφως ανάλογη με την ευαισθησία του συστήματος, όσο πιο μεγάλη τιμή έχει τόσο λιγότερο ευαίσθητο είναι και εμφανίζονται μικρότερες οι κορυφές, πχ όταν η ευαισθησία από τιμή 10 πάει σε τιμή 100, η κορυφή του ιόντος θα βγει μικρότερη και ακριβώς 10 (όσο μεγάλωσε η τιμή της ευαισθησίας).

Η έξοδος του ανιχνευτή δίνει τάση ρεύματος σε volt η οποία καταγράφεται από το αντίστοιχο καταγραφικό. Η τάση που δίνει έχει ένα θετικό και ένα αρνητικό πόλο. Η πολικότητα αυτή φαίνεται στη θέση 7 και μπορεί να αντιστραφεί από τις επιλογές του μενού. Στη θέση 8 δίνονται οι μονάδες μέτρησης της τάσης (mV).

II. Απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-VIS):

Ο ανιχνευτής υπεριώδους είναι ο πιο συνηθισμένος ανιχνευτής στην HPLC, επειδή πολλές οργανικές ενώσεις απορροφούν στην υπεριώδη ακτινοβολία. Τα απλούστερα συστήματα

χρησιμοποιούν την εκπομπή ενός λαμπτήρα υδραργύρου στα 254 nm, στη περιοχή αυτή απορροφούν οι περισσότερες αρωματικές ενώσεις. Τα πιο εξελιγμένα συστήματα έχουν λαμπτήρες δευτερίου, ξένου για UV ή βολφραμίου για VIS, χρησιμοποιούν κυψελίδες ροής και συνήθως έχουν και ένα μονοχρωμάτορα ώστε να μπορεί να επιλεγεί το βέλτιστο μήκος κύματος υπεριώδους ή ορατού για τους αναλύτες.

Μια δέσμη φωτός μετράτε στην κινητή φάση η οποία εξέρχεται από τη στήλη και περνάει μέσα από το μονοχρωμάτορα και η ποσότητα του προσπίπτοντος φωτός μετράτε με τη βοήθεια ενός φωτοανιχνευτή είτε σε άλλες περιπτώσεις, μιας σειράς φωτοανιχνευτών. Η μέτρηση της απορρόφησης του φωτός στηρίζεται στο νόμο του Beer-Lambert: $A = \epsilon \cdot b \cdot c$

Όπου:

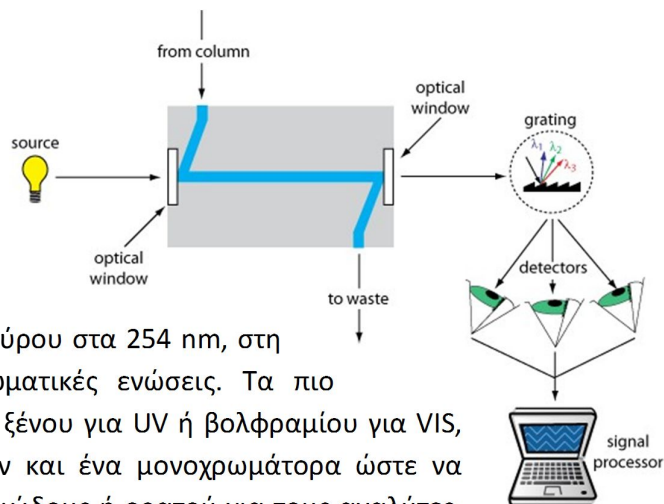
- ϵ είναι ο γραμμομοριακός συντελεστής απορρόφησης.
- b η οπτική διαδρομή σε cm.
- c η συγκέντρωση του αναλύτη.

Γενικά, ένας ιδανικός ανιχνευτής οποιουδήποτε τύπου είναι:

- ευαίσθητος σε χαμηλές συγκεντρώσεις κάθε αναλύτη.
- έχει γραμμική απόκριση.
- δεν προκαλεί δια πλάτυνση των χρωματογραφικών κορυφών.
- δεν είναι ευαίσθητος σε μεταβολές της θερμοκρασίας και της σύστασης του διαλύτη.

7. Καταγραφικό

Γίνεται μετατροπή του αναλογικού σήματος που δίνει ο ανιχνευτής σε ψηφιακό, με τη χρήση μια κατάλληλης κάρτας, και καταγράφεται με ένα αντίστοιχο λογισμικό σε μια μονάδα ηλεκτρονικού υπολογιστή.



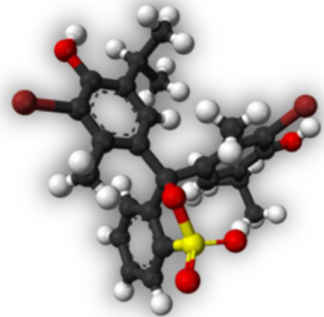
Ασκήσεις Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας Ι:

Άσκηση – Προσδιορισμός pKa του δείκτη bromothymol blue

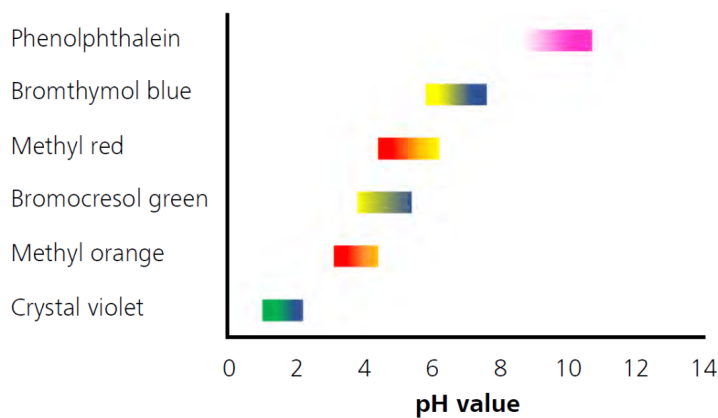
Σκοπός της άσκησης είναι:

Ο προσδιορισμός του pKa του δείκτη μπλε της βρωμοθυμόλης και εξοικείωση των φοιτητών με το ηλεκτρόδιο υάλου και με φασματοφωτόμετρο UV-Vis.

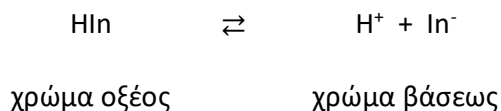
Οι δείκτες είναι χρωστικές ουσίες που ανήκουν στη κατηγορία των ασθενών οξέων ή ασθενών βάσεων. Χαρακτηριστικό τους είναι ότι το χρώμα των αδιάστατων μορίων είναι διαφορετικό από το χρώμα των ενδιαστάτων, η μεταβολή του pH αλλάζει το βαθμό διάστασης ενός δείκτη οπότε και την αναλογία ιόντων προς αδιάστατα μόρια και έτσι να αλλάζει το χρώμα του διαλύματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το χρώμα κάθε δείκτη εξαρτάται από τη τιμή του pH του διαλύματος που είναι ο δείκτης. Ένας δείκτης έχει ένα χρώμα σε όξινο περιβάλλον και διαφορετικό σε αλκαλικό.



Η συγκέντρωση των H⁺ που απαιτείται για να γίνει η αλλαγή του χρώματος του δείκτη εξαρτάται από τις ιδιότητες του δείκτη, υπάρχουν δείκτες που αλλάζουν χρώμα σε ουδέτερη, βασική ή όξινη περιοχή του pH.

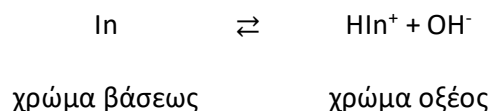


Για δείκτη οξέος:



όπου K_a η σταθερά διάστασης: $K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{In}^-]}{[\text{HIn}]}$

Αντίστοιχα για δείκτη βάσης:



όπου K_b η σταθερά υδρόλυσης: $K_b = \frac{[\text{HIn}^+][\text{OH}^-]}{[\text{In}]} = \frac{[\text{HIn}^+]\text{K}_w}{[\text{In}][\text{H}^+]}$

η σταθερά K_w είναι από την διάσταση του νερού $K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-]$

Από την εξίσωση της διάστασης προκύπτει η εξίσωση των **Henderson – Hasselbalch**

$$K_a = \frac{[H^+][In^-]}{[HIn]} \rightarrow \log K_a = \log \frac{[H^+][In^-]}{[HIn]} \rightarrow \log K_a = \log[H^+] + \log \frac{[In^-]}{[HIn]} \rightarrow$$

$$-\log[H^+] = -\log K_a + \log \frac{[In^-]}{[HIn]} \rightarrow \mathbf{pH = pK_a + \log \frac{[In^-]}{[HIn]}}$$

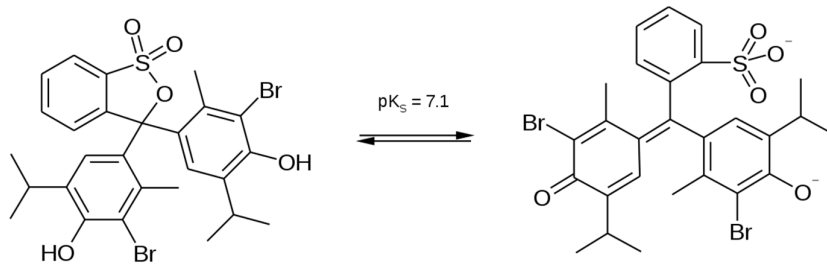
Όταν οι δύο μορφές του δείκτη είναι ίσες $[HIn] = [In^-]$ τότε ο λογάριθμος των δύο μορφών

$$\text{μηδενίζεται } \log\left(\frac{[In^-]}{[HIn]}\right) = \log(1) = 0 \text{ τότε } \mathbf{pK_a = pH}$$

Μπλε της βρωμοθυμόλης

Ο δείκτης μπλε της βρωμοθυμόλης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως γενικός δείκτης καθώς αν προστεθεί σε:

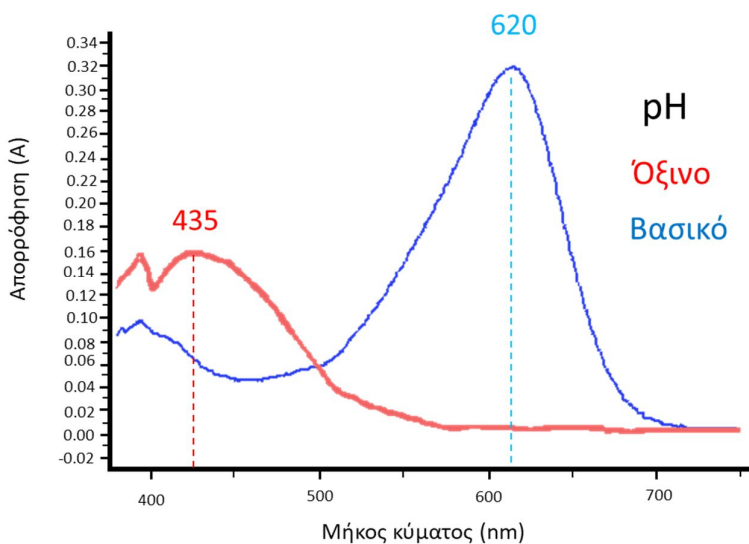
- α. όξινο διάλυμα ($pH < 6$) αποκτά **κίτρινο χρώμα**
- β. ουδέτερο διάλυμα αποκτά **πράσινο χρώμα**
- γ. βασικό διάλυμα ($pH > 7.6$) αποκτά **μπλε χρώμα**



Όξινη μορφή του δείκτη

Βασική μορφή του δείκτη

**Ο δείκτης μπλε της βρωμοθυμόλης έχει $pK_a = 7.10$
σκοπός της άσκησης είναι ο πειραματικός προσδιορισμός της**



Στο φάσμα απορρόφησης η όξινη μορφή του δείκτη (**κόκκινη γραμμή**) έχει μέγιστο στα 435 nm και η βασική μορφή (**μπλε γραμμή**) στα 620 nm.

Χρησιμοποιώντας το δείκτη και διαφορετικές ποσότητες από τα ρυθμιστικά διαλύματα $0.1 \text{ M H}_2\text{PO}_4^-$ και 0.1 M HPO_4^{2-} παρασκευάζονται 9 διαφορετικά διαλύματα τελικού όγκου 25 ml. Οι τιμές pH των διαλυμάτων θα είναι διαφορετικές για το κάθε ένα και θα κυμαίνονται από 1 έως 13, με αποτέλεσμα σε κάθε διάλυμα να υπάρχουν διαφορετικές αναλογίες των δύο μορφών του δείκτη, δίνοντας έτσι διαφορετικές χρωματικές αποχρώσεις, από το ανοικτό κίτρινο μέχρι το βαθύ μπλε.



Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια – Όργανα:

- Δείκτης bromothymol blue
- NaH_2PO_4
- Na_2HPO_4
- EtOH
- π. HCl
- NaOH 5 M
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Ποτήρια ζέσεως
- Σιφώνια
- Πιπέτες μεταβλητού όγκου
- Κυψελίδες: από πολυστυρένιο
- Πεχαμετρικό χαρτί
- pH- μετρο
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους - ορατού (UV-Vis) μονής δέσμης πολλαπλών θέσεων

Παράμετροι:

- Μήκη κύματος φασματοφωτόμετρου: 435 nm, 620 nm

Διαδικασία:

Αρχικά θα ετοιμάσετε το διάλυμά του δείκτη καθώς και δύο ρυθμιστικά διαλύματα:

A. Παρασκευή 20 ml διαλύματος 0.1 % w/v του δείκτη σε διάλυμα σε 20 % σε EtOH.

Το 0.1 % w/v είναι 0.1 gr στα 100 ml διαλύματος, οπότε στα 20 ml διαλύματος αντιστοιχούν 0.020 gr δείκτη δηλ. 20 mg. Ζυγίζετε τη ποσότητα του δείκτη σε ζυγό 4 δεκαδικών, χωρίς να επιμείνετε στο να είναι ακριβώς 20 mg, ζυγίζετε όσο πιο κοντά μπορείτε σε αυτή τη ποσότητα και σημειώνεται την τιμή.

Τα 20 ml διαλύματος περιέχουν 20 % EtOH δηλ. 4 ml EtOH και 16 ml H_2O . Τη ποσότητα του δείκτη τη διαλύετε πρώτα στην EtOH στον απαγωγό (μεταφέρετε τη ποσότητα της EtOH με ένα σιφώνιο) και στη

συνέχεια συμπληρώνετε με 16 ml από απιονισμένο νερό με ένα ογκομετρικό κύλινδρο, δεν χρειάζεστε μεγαλύτερη ακρίβεια για την παρασκευή αυτή.

B. Παρασκευή 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος NaH_2PO_4 0.1 M.

Τα 0.1 M αντιστοιχούν σε 15.601 gr στο λίτρο, οπότε στα 100 ml θα είναι 1.5601 gr. Ζυγίζετε σε ζυγό των $3^{\omega\upsilon}$ ή $4^{\omega\upsilon}$ δεκαδικών ψηφίων, κοντά στην επιθυμητή τιμή χωρίς να επιμείνετε στην απόλυτη τιμή. Μετρούνται 100 ml απιονισμένο H_2O με ογκομετρικό κύλινδρο και μεταφέρονται σε ποτήρι βρασμού, η προσθήκη της ποσότητας του NaH_2PO_4 γίνεται σταδιακά με συνεχή ανάδευση.

C. Παρασκευή 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος Na_2HPO_4 0.1 M.

Τα 0.1 M αντιστοιχούν 14.196 gr στο λίτρο οπότε στα 100 ml θα είναι 1.4196 gr. Όπως και πριν ζυγίζετε σε ζυγό των $3^{\omega\upsilon}$ ή $4^{\omega\upsilon}$ δεκαδικών ψηφίων, κοντά στην επιθυμητή τιμή χωρίς να επιμείνετε στην απόλυτη τιμή. Μετρούνται 100 ml απιονισμένο H_2O με ογκομετρικό κύλινδρο και μεταφέρονται σε ποτήρι βρασμού.

Η προσθήκη του Na_2HPO_4 πρέπει να γίνεται σε πολύ μικρά βήματα με συνεχή ανάδευση, διαφορετικά δημιουργούνται κρύσταλλοι οι οποίοι είναι δυσδιάλυτοι.

Για τη παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων δεν χρειάζεται μεγαλύτερη ακρίβεια, καθώς το pH του κάθε τελικού διαλύματος θα μετρηθεί με ακρίβεια.

Αφού έχουν ετοιμαστεί τα ρυθμιστικά διαλύματα και το διάλυμα του δείκτη, παρασκευάζονται 9 διαλύματα διαφορετικής τιμής pH προσθέτοντας διαφορετικές ποσότητες των δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων σύμφωνα με το παρακάτω πίνακα και θα προσθέσετε και από 1 ml από το διάλυμα του δείκτη. Σε όλα τα διαλύματα προσθέτετε πρώτα το νερό και στην συνέχεια τα ρυθμιστικά διαλύματα και τέλος την ποσότητα του δείκτη, ο τελικός όγκος των διαλυμάτων να είναι 25 ml.

Στο διάλυμα 1 αντί για ρυθμιστικά διαλύματα θα προστεθούν 3 σταγόνες από πυκνό HCl καθώς και στο διάλυμα 9 αντί για ρυθμιστικά διαλύματα θα προστεθούν 10 σταγόνες από διάλυμα NaOH 5 M.

Η μεταφορά των ρυθμιστικών διαλυμάτων γίνεται με τη χρήση σιφωνίων, πριν την προσθήκη τους θα πρέπει να αναδεύονται ώστε τα διαλύματα να είναι ομογενής.

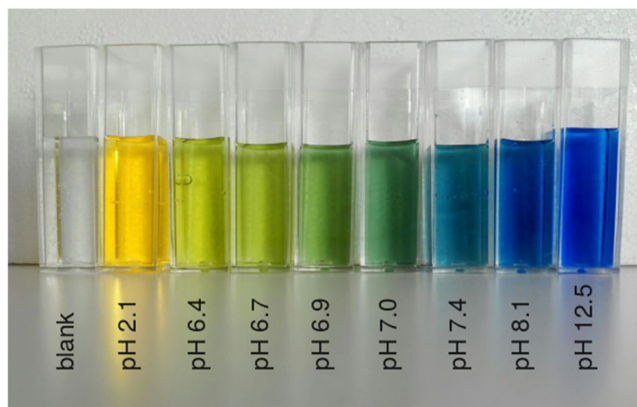
Το 1 ml του δείκτη προστίθεται με πιπέτα ακριβείας μεταβλητού όγκου είναι σημαντικό η ποσότητα του δείκτη να είναι η ίδια σε όλα τα διαλύματα

Διάλυμα	Δείκτης (ml)	διάλυμα H_2PO_4^- (ml)	Διάλυμα HPO_4^{2-}	H_2O (ml)
1	1	3σταγόνες π.HCl (όξινο)		24
2	1	5	0	19
3	1	5	1	18
4	1	10	5	9
5	1	5	10	9
6	1	1	5	18
7	1	1	10	13
8	1	0	5	19
9	1	10 σταγόνες NaOH 5M (βασικό)		24

Αρχικά γίνεται βαθμονόμηση του pH – μέτρου με τα πρότυπα διαλύματα 4, 7 και 10. Στη συνέχεια γίνονται οι μετρήσεις του pH των διαλυμάτων:

- Το διάλυμα με το πολύ όξινο pH (διάλυμα 1) και διάλυμα με το πολύ βασικό pH (διάλυμα 9) μετρούνται με πεχαμετρικό χαρτί. Οι τιμές αυτών των διαλυμάτων είναι ακραίες και δεν μπορούν να μετρηθούν σε ένα pH-μετρο για προστασία του. **Οι μετρήσεις πεχαμετρικό χαρτί γίνονται πριν την προσθήκη του δείκτη**, η προσθήκη του δείκτη δεν θα αλλάξει το pH του διαλύματος, όμως η προσθήκη του θα δυσκολέψει την χρωματική απόχρωση στο πεχαμετρικό χαρτί.
- Τα ενδιάμεσα διαλύματα (2 έως 8) μετρούνται διαδοχικά, από το πιο όξινο στο πιο βασικό με τη χρήση του pH-μέτρου.

Στη συνέχεια με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (UV – Viss) γίνονται οι μετρήσεις της απορρόφησης της όξινης μορφής του δείκτη στα 435 nm και στη συνέχεια της βασικής του στα 620 nm. Τα **διαλύματα αρχικά αναδεύονται** ώστε για να είναι ομοιόμορφα και μεταφέρονται στις κυψελίδες κατευθείαν **χωρίς τη χρήση πιπέτας paster**. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό.



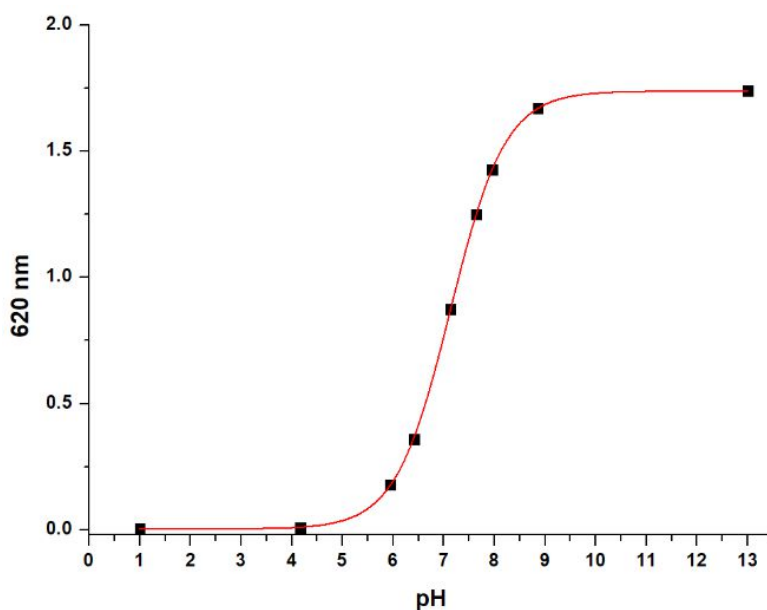
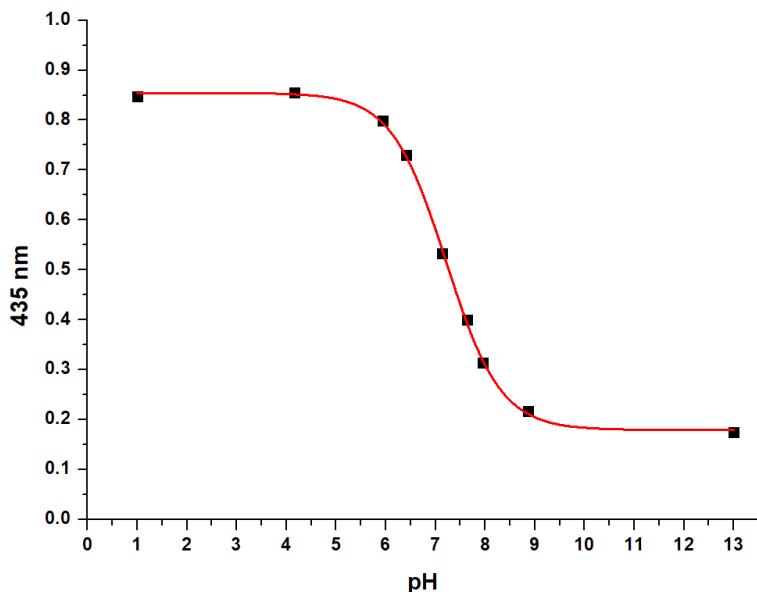
Αποτελέσματα και ανάλυση:

Παράδειγμα:

Στα 9 διαλύματα θα έχετε τις τιμές pH τους καθώς και τις τιμές απορρόφησης τους στα 435 nm και 620 nm.

Δείγμα	Τιμές pH	Απορρόφηση (435 nm)	Απορρόφηση (620 nm)
1	1.2	1.049	0.002
2	4.35	1.038	0.009
3	6.29	0.970	0.229
4	6.69	0.887	0.463
5	7.38	0.637	1.071
6	7.92	0.455	1.543
7	8.19	0.374	1.735
8	9.08	0.252	1.951
9	12.1	0.222	2.030

Από τις τιμές αυτές θα δημιουργηθούν δύο διαγράμματα όπου στο άξονα τον Y είναι οι τιμές της απορρόφησης και στον άξονα τον X οι τιμές του pH, ένα διάγραμμα για τις απορροφήσεις στα 435 nm και ένα στα 620 nm.



Στο ισοδύναμο σημείο του κάθε διαγράμματος οι δύο μορφές του δείκτη είναι ίσες και τότε σύμφωνα με την εξίσωση των Henderson – Hasselbalch η τιμή του pH είναι ίση με το pKa του δείκτη. Με το τρόπο αυτό υπολογίζεται η τιμή του pKa του δείκτη δύο φορές, μία από το διάγραμμα με τις απορροφήσεις στα 435 nm και μία από το διάγραμμα με τις απορροφήσεις στα 620 nm.

Στη συνέχεια θα δημιουργήσετε ένα ακόμα διάγραμμα που προκύπτει από την εξίσωση Henderson – Hasselbalch :

$$pH = pKa + \log \frac{[In^-]}{[HIn]}$$

$$\text{ή } \log \frac{[In^-]}{[HIn]} = pH - pKa$$

Στον άξονα του του Χ είναι οι τιμές του pH και στον άξονα του Y είναι ο λογάριθμος του λόγου των δυο μορφών του δείκτη $\log \left\{ \frac{[In^-]}{[HIn]} \right\}$. Για να τη δημιουργία του διαγράμματος αρχικά θα πρέπει να υπολογιστεί η όξινη και η βασική μορφή του δείκτη για κάθε διάλυμα.

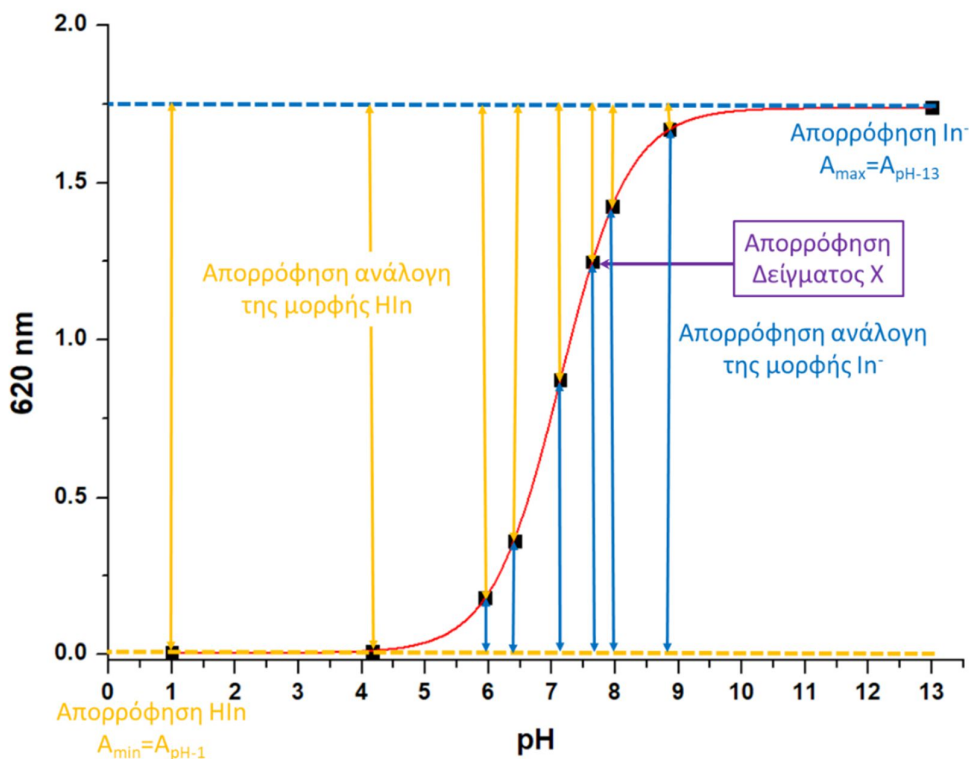
Από το νόμο των Νόμος Beer - Lambert ο λόγος των συγκεντρώσεων είναι ίσος με το λόγο των απορροφήσεων και υπολογίζονται από τις απορροφήσεις στα 620 nm με το παρακάτω τύπο:

$$\log \frac{[In^-]}{[HIn]} = \log \frac{Ax - A_{\min}}{A_{\max} - Ax}$$

Ο τύπος αυτός προκύπτει ως εξής: Από το διάγραμμα των απορροφήσεων στα 620 nm ως προς το pH καθώς στα 620 nm απορροφάει η βασική του μορφή, η απορρόφηση του 1^{ου} δείγματος είναι η ελάχιστη τιμή για την βασική μορφή του δείκτη, οπότε $A_1 = A_{\min}$. Η τιμή του 9^{ου} διαλύματος έχει την μέγιστη απορρόφηση $A_9 = A_{\max}$. Στα υπόλοιπα διαλύματα (πχ διάλυμα X) το πάνω μέρος της απορρόφησης μέχρι τη μέγιστη τιμή (κίτρινα βελιάκια) είναι ανάλογο της όξινης μορφής (HIn) καθώς ανεβαίνει σε τιμές pH αυτή μειώνεται και το κάτω μέρος είναι ανάλογο της βασικής μορφής (In-) όπου μεγαλώνει ανεβαίνοντας σε τιμές pH (μπλε βελιάκια).

Οπότε η βασική μορφή (In-) κάτω μέρος υπολογίζεται αφαιρώντας από τη τιμή της απορρόφησης του X δείγματος την ελάχιστη απορρόφηση ($Ax - A_{\min}$). Ενώ η όξινη μορφή (HIn) το πάνω μέρος υπολογίζεται αφαιρώντας από τη μέγιστη απορρόφηση τη τιμή της απορρόφησης του X δείγματος ($A_{\max} - Ax$). Με το τρόπο αυτό υπολογίζονται οι τιμές του λόγου για τα δείγματα 2 έως 8 (τα 1 και 9 χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της ελάχιστης και μέγιστης απορρόφησης αντίστοιχα).

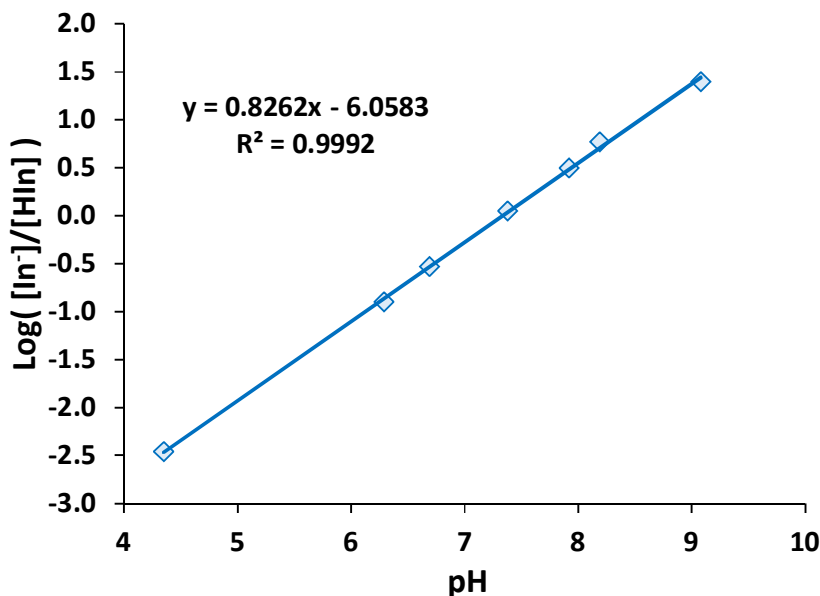
Οι τιμές αυτές μπορούν να υπολογιστούν τόσο για τις απορροφήσεις στα 435 nm όσο και στα 620 nm, όμως για ομοιομορφία των αναφορών υπολογίζονται στα 620 nm.



Υπολογίζονται οι τιμές του λόγου για τα δείγματα 2 έως 8 (τα δείγματα 1 και 9 χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της ελάχιστης και μέγιστης απορρόφησης αντίστοιχα).

Δείγμα	Τιμές pH	Απορρόφηση (620 nm)	$\text{Log} \frac{In-}{HIn}$
1	1.2	0.002	-
2	4.35	0.009	-2.46047
3	6.29	0.229	-0.89949
4	6.69	0.463	-0.53137
5	7.38	1.071	0.04716
6	7.92	1.543	0.50027
7	8.19	1.735	0.76898
8	9.08	1.951	1.39218
9	12.1	2.030	-

Από τις τιμές αυτές δημιουργείται το διάγραμμα που στον άξονα των X είναι οι τιμές του pH και στον άξονα του Y οι τιμές του λόγου $\log \frac{In-}{HIn}$



Όταν οι δύο μορφές του δείκτη είναι ίσες ο λογάριθμος του λόγου είναι μηδέν (δηλ. το $Y=0$) τότε η τιμή του pH είναι ίση με το pK_a . Οπότε λύνοντας την εξίσωση ως προς το X, υπολογίζεται το pH και επόμενος το pK_a του δείκτη.

Συνολικά έχουν υπολογιστεί τρεις φορές η τιμή του pK_a του δείκτη, δύο φορές από τα διαγράμματα απορρόφησης στα 435 nm και 620 nm και μία ακόμα από το διάγραμμα του λόγου των μορφών που

προκύπτει από την εξίσωση Henderson – Hasselbalch. Οι τιμές αυτές να δίνονται με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων.

	pKa
1	7.41
2	7.32
3	7.33

Οι τιμές αυτές θεωρούνται τελικά αποτελέσματα και σε αυτά θα κάνετε πλήρη στατιστική ανάλυση καθώς και ο υπολογισμός του απόλυτου σχετικού % σφάλματος συγκρίνοντας με τη θεωρητική τιμή pKa του δείκτη μπλε της βρωμοθυμόλης που είναι 7.10

Προσοχή:

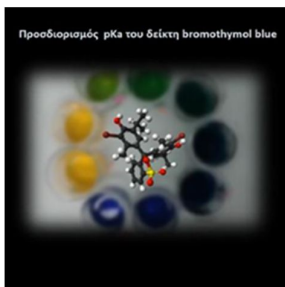
Στους υπολογισμούς στα δεκαδικά και σημαντικά ψηφία με βάση τους κανόνες τους

Θα υπολογίσετε

- Τη μέση τιμή (\bar{x}): $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N}$
- Τη τυπική απόκλιση (Sx): $Sx = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$
- Τη τυπική απόκλιση της μέσης τιμής ($S\bar{x}$): $S\bar{x} = \frac{Sx}{\sqrt{N}}$
- Το μέσο όρο του πληθυσμού (μ): $\mu = \bar{x} \pm t S\bar{x}$
- Το απόλυτο σφάλμα επί της εκατό: $\frac{|\text{θεωρητική} - \text{πειραματική}|}{\text{θεωρητική}} \times 100\%$

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 I:



<https://www.chemistry.uoc.gr/eclass/modules/document/?course=CHEM-UNDER114>

Youtube:



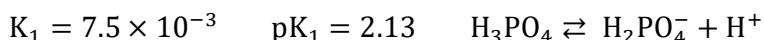
<https://www.youtube.com/channel/UCrrDdUXUiTxyhezA140Rlew>

Άσκηση – Ποτενσιομετρική μέτρηση του pH

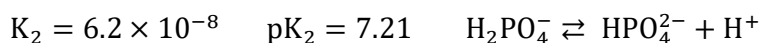
Σκοπός της άσκησης είναι:

Ο προσδιορισμός ενός άγνωστου δείγματος φωσφορικών οξέων με ποτενσιομετρική τιτλοδότηση και εξοικείωση των φοιτητών με το ηλεκτρόδιο υάλου.

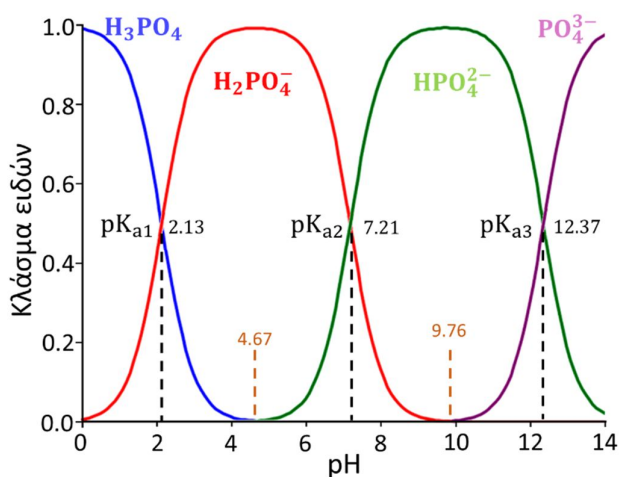
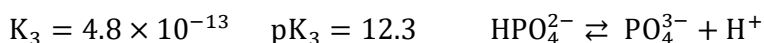
Το φωσφορικό οξύ (H_3PO_4) είναι ένα τριβασικό οξύ, περιέχει τρία ιονιζόμενα πρωτόνια σε κάθε μόριο. Σε χαμηλές τιμές pH κυριαρχεί η όξινη μορφή του οξέος, καθώς πηγαίνει σε μεγαλύτερες τιμές pH, η συμμετοχή του μειώνεται και αυξάνει η διπρωτική μορφή του. Στο σημείο τομής των δύο καμπυλών, δύο μορφές του οξέος είναι ίσες τότε το pH του διαλύματος αντιστοιχεί με το pK_{a1} της πρώτης ισορροπίας που είναι 2.13. Σε pH 4.67 μεγιστοποιείται η διπρωτική μορφή του οξέος και μηδενίζεται η μορφή H_3PO_4 .



Σε μεγαλύτερες τιμές pH αρχίζει να μειώνεται η διπρωτική μορφή και εμφανίζεται η μονοπρωτική του μορφή. Πάλι στο σημείο τομής των δύο καμπυλών, οι δύο μορφές του φωσφορικού οξέος είναι ίσες και τότε το pH του διαλύματος αντιστοιχεί το pK_{a2} της δεύτερης ισορροπίας που είναι 7.21. Σε pH 9.76 μεγιστοποιείται η μονοπρωτική μορφή του οξέος και μηδενίζεται η διπρωτική του μορφή.

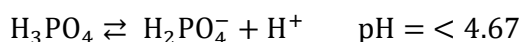


Σε μεγαλύτερες τιμές pH αρχίζει να μειώνεται η μονοπρωτική μορφή και εμφανίζεται η μορφή του φωσφορικού άλατος. Στο σημείο τομής των δύο καμπυλών, οι δύο μορφές είναι ίσες και τότε η τιμή του pH του διαλύματος αντιστοιχεί το pK_{a3} της τρίτης ισορροπίας που είναι 12.37

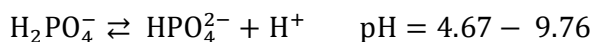


Από τις τέσσερις μορφές (H_3PO_4 , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}) μόνο γειτονικά ζευγάρια μπορεί να υπάρξουν ανά πάσα στιγμή, λόγω αυτής της ιδιότητας, ζεύγη του φωσφορικού μπορεί να χρησιμοποιηθούν σαν ρυθμιστικά διαλύματα.

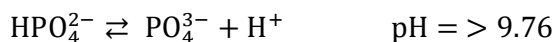
Για τιμές pH μέχρι 4.67 μπορούν να υπάρχουν οι δύο πρώτες μορφές (H_3PO_4 , H_2PO_4^-) (πλατό Α)



Για τιμές pH μεταξύ 4.7 και 9.76 μπορούν να υπάρχουν οι δύο επόμενες μορφές H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} (πλατό Β).

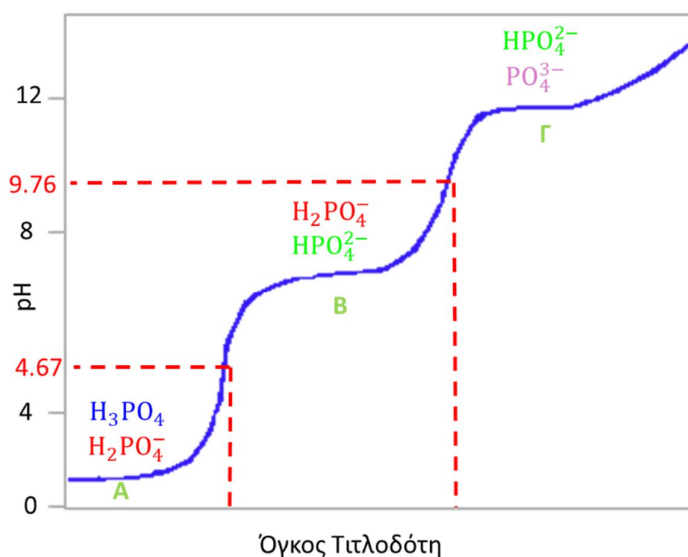


Τέλος για τιμές pH μεγαλύτερες από 9.76 οι μορφές που μπορεί να υπάρχουν είναι HPO_4^{2-} και PO_4^{3-} (πλατό Γ).



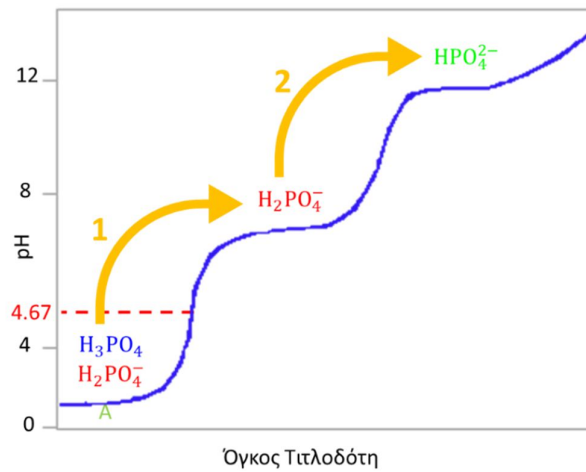
Αν το pH του άγνωστου διαλύματος είναι μικρότερη από 4.67 τότε είναι στη πρώτη ισορροπία και μπορούν να υπάρχουν οι μορφές του **φωσφορικού οξέος** και της **διπρωτική** του μορφής. Αν το pH διαλύματος είναι μεταξύ 4.67 και 9.76 θα είναι στη δεύτερη ισορροπία και θα υπάρχουν οι **διπρωτική** και **μονοπρωτική** μορφή του οξέος. Ενώ αν το pH του διαλύματος είναι μεγαλύτερο από 9.76 τότε θα είναι στη τρίτη ισορροπία με **μονοπρωτική** μορφής του καθώς και αυτή του **φωσφορικού** άλατος.

Αρχικά γίνεται μέτρηση το pH του διαλύματος
ώστε να διαπιστωθεί ποιο μίγμα είναι και ανάλογα της τιμής του pH μπορεί να είναι:



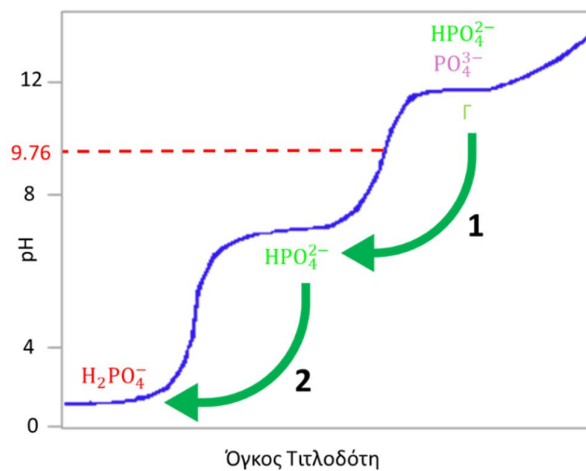
1. Αν το pH είναι μικρότερο από 4.67 τότε είναι το μίγμα Α (δηλ. H_3PO_4 και H_2PO_4^-). Στη περίπτωση αυτή γίνεται τιτλοδότηση με διάλυμα NaOH 0.1 N. Αρχικά θα γίνει εξουδετέρωση του H_3PO_4 προς H_2PO_4^- , μόλις εξουδετερωθεί τελείως θα περάσει το πρώτο ισοδύναμο σημείο ($\text{pH}=4.67$) και θα υπάρξει μόνο H_2PO_4^- . Από τη κατανάλωση του NaOH μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα του H_3PO_4 στο αρχικό διάλυμα. Στη συνέχεια συνεχίζετε η τιτλοδότηση κατά την οποία τώρα εξουδετερώνεται το H_2PO_4^- προς HPO_4^{2-} . Στο δεύτερο ισοδύναμο σημείο θα έχει εξουδετερωθεί όλη η ποσότητα H_2PO_4^- , από τον όγκο κατανάλωσης του NaOH της δεύτερης τιτλοδότησης υπολογίζεται η συνολική ποσότητα του H_2PO_4^- , όπου είναι η αρχική ποσότητα του H_2PO_4^- που υπήρχε στο διάλυμα και η ποσότητα που δημιουργήθηκε από την εξουδετέρωση του H_3PO_4 . Η ποσότητα του H_3PO_4 έχει ήδη υπολογιστεί από τη πρώτη τιτλοδότηση έτσι η διαφορά τους είναι η αρχική ποσότητα του H_2PO_4^- .

Στη περίπτωση αυτή, χρειάζονται δύο τιτλοδοτήσεις με μια βάση για να υπολογιστούν οι δύο μορφές τους οξέος στο άγνωστο διάλυμα.



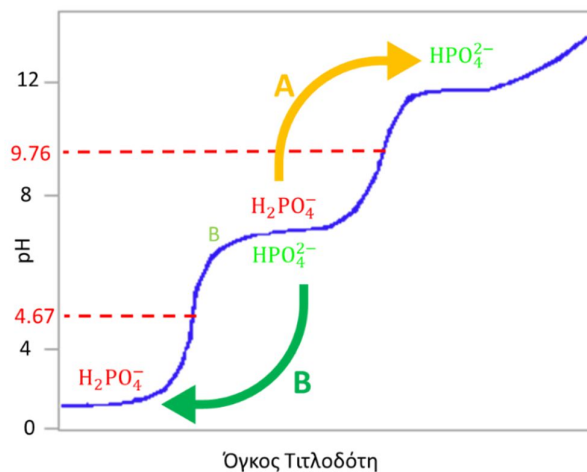
2. Αν το pH είναι μεγαλύτερο από 9.76 τότε είναι το μίγμα Γ (δηλ. HPO_4^{2-} και PO_4^{3-}). Στη περίπτωση αυτή γίνεται τιτλοδότηση με διάλυμα HCl 0.1 N. Αρχικά θα γίνει εξουδετέρωση του PO_4^{3-} προς HPO_4^{2-} , μόλις εξουδετερωθεί τελείως θα περάσει το πρώτο ισοδύναμο σημείο ($\text{pH} < 9.76$) και θα υπάρχει μόνο το HPO_4^{2-} . Από τον όγκο κατανάλωσης του HCl μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα του PO_4^{3-} . Συνεχίζοντας τη τιτλοδότηση όταν περάσει το δεύτερο ισοδύναμο σημείο ($\text{pH} < 4.67$) εξουδετερώνεται όλη η ποσότητα του HPO_4^{2-} , η αρχική καθώς και αυτή που δημιουργήθηκε από την εξουδετέρωση του PO_4^{3-} . Από τον όγκο κατανάλωσης του HCl υπολογίζεται η συνολική ποσότητα του HPO_4^{2-} και έχοντας υπολογίσει το PO_4^{3-} από τη πρώτη τιτλοδότηση, υπολογίζεται η αρχική ποσότητα του HPO_4^{2-} .

Στη περίπτωση αυτή, χρειάζονται δύο τιτλοδοτήσεις με ένα οξύ για να υπολογιστούν οι δύο μορφές τους οξέος στο άγνωστο διάλυμα.



3. Αν το pH είναι μεταξύ 4.67 και 9.76 τότε είναι μίγμα Β (δηλ. H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}). Στη περίπτωση αυτή γίνεται αρχικά τιτλοδότηση με διάλυμα NaOH 0.1 N όπου εξουδετερώνεται το H_2PO_4^- προς HPO_4^{2-} . Περνώντας το ισοδύναμο σημείο των 9.76 θα έχει εξουδετερωθεί πλήρως το H_2PO_4^- και από τον όγκο κατανάλωσης του NaOH μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα του H_2PO_4^- . Στη συνέχεια σε νέο δείγμα από το μίγμα Β και γίνεται τιτλοδότηση με διάλυμα HCl 0.1 N. Στη περίπτωση αυτή θα εξουδετερωθεί HPO_4^{2-} προς H_2PO_4^- , μόλις περάσετε το ισοδύναμο σημείο των 4.67 θα έχει εξουδετερωθεί πλήρως το HPO_4^{2-} , από τον όγκο κατανάλωσης του HCl μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα του HPO_4^{2-} .

Στην περίπτωση αυτή χρειάζονται δύο τιτλοδοτήσεις για να υπολογιστούν οι δύο μορφές του φωσφορικού οξέος, όμως η μια τιτλοδότηση γίνεται με μια βάση και η άλλη με ένα οξύ.



Έτσι ανάλογα το pH του αρχικού διαλύματος επιλέγεται τη πορεία των τιτλοδοτήσεων. Από τη στιγμή που είναι μίγμα δύο μορφών θα χρειάζονται δύο τιτλοδοτήσεις, αν το διάλυμα είναι το Α γίνονται δύο τιτλοδοτήσεις με το NaOH, αν το διάλυμα είναι το Β γίνονται δύο τιτλοδοτήσεις με το HCl και αν το διάλυμα είναι το Γ, γίνεται μία τιτλοδότηση με NaOH και μία με HCl.

Όμως επειδή δύο τιτλοδοτήσεις απαιτούν μεγάλο εργαστηριακό χρόνο, στην συγκεκριμένη άσκηση το άγνωστο δείγμα που θα σας δοθεί, θα έχει μόνο μία μορφή έτσι θα χρειαστεί να γίνει μόνο μία τιτλοδότηση. Με τη τιτλοδότηση αυτή θα υπολογίσετε τη ποσότητα της μορφής του φωσφορικού οξέος που υπήρχε στο άγνωστο διάλυμα.

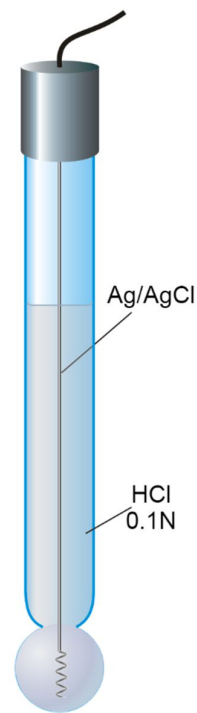
Οργανολογία

Για τη ποτενσιομετρική τιτλοδότηση θα χρησιμοποιήσετε ένα ηλεκτρόδιο υάλου.

Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια – Όργανα:

- NaOH (0.100 N, 250 ml)
- Potassium Hydrogen Phthalate (KHP)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Δείκτης φαινολοφθαλεΐνη (Phenolphthalein)
- Ποτήρια ζέσεως
- Κωνικές φιάλες
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Ογκομετρικές φιάλες
- Προχοΐδα: 50 ml
- Σιφώνια πλήρωσης
- Πιπέτες μεταβλητού όγκου
- pH-μετρο
- Ζυγός 2 και 4 δεκαδικών



A. Υπολογισμός της συγκέντρωσης διαλύματος NaOH με τιτλοδότηση

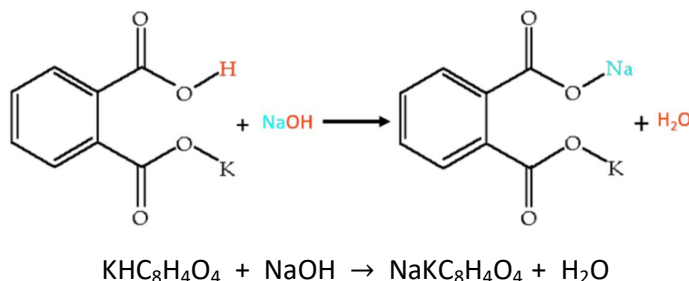
Στο πρώτο μέρος της άσκησης αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα 0.100 M NaOH, ζυγίζοντας την επιθυμητή ποσότητα NaOH με ακρίβεια 2 δεκαδικών και διαλύοντας το σε απιονισμένο νερό σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml (MW NaOH 40.00), αφού το διάλυμα κρυώσει (λόγω της εξώθερμης διάλυσης) μεταφέρετε σε πλαστικό δοχείο των 250 ml. Καθώς η συγκέντρωση του NaOH μειώνεται με το χρόνο, λόγω της επίδρασης του CO₂ της ατμόσφαιρας στο διάλυμα, πριν τη χρήση του πρέπει η συγκέντρωση του να μετρηθεί με ακρίβεια, αυτό γίνεται με την τιτλοδότηση του με σταθερά διαλύματα KHP (KHC₈H₄O₄).

Η τιτλοδότηση πραγματοποιείται βάζοντας το διάλυμα του NaOH στη προχοΐδα και τις γνωστές ποσότητες του KHP στις κωνικές. Ζυγίζετε τρεις ποσότητες KHP με ακρίβεια 4 δεκαδικών μεταξύ 0.7000 και 0.8000 g με διασπορά, η πρώτη ζύγιση κοντά στα 0.7 η δεύτερη κάπου ενδιάμεσα και η τρίτη κοντά στα 0.8 g. Στη συνέχεια τις μεταφέρετε σε κωνικές φιάλες των 250 ml, αραιώνετε με 75 ml νερό (με ακρίβεια ογκομετρικού κυλίνδρου) και προσθέτετε λίγες σταγόνες διαλύματος φαινολοφθαλεΐνη (phenolphthalein). Η ακρίβεια των διαλυμάτων καθορίζεται από την ακρίβεια της ζύγισης του KHP.

Στη συνέχεια ογκομετρείται με το διάλυμα του NaOH μέχρι το ροζ χρώμα να παραμείνει για 30 δευτερόλεπτα τουλάχιστον. Από τον όγκο κατανάλωσης υπολογίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος NaOH. Η τιτλοδότηση γίνεται τρεις φορές ώστε να υπολογιστεί η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της συγκέντρωσης του διαλύματος NaOH.



Η αντίδραση που συμβαίνει κατά την τιτλοδότηση καυστικού νατρίου με σταθερό διάλυμα KHP είναι η εξής:

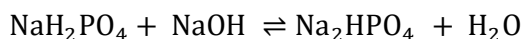


B. Προσδιορισμός άγνωστου διαλύματος φωσφορικών με ποτενσιομετρική τιτλοδότηση

Στο δεύτερο μέρος της άσκησης, αφού έχει μετρηθεί με ακρίβεια η συγκέντρωση του διαλύματος του NaOH, πραγματοποιείται ποτενσιομετρική τιτλοδότηση του άγνωστου δείγματος φωσφορικών. Για τη ποτενσιομετρική τιτλοδότηση γίνεται χρήση ενός ηλεκτροδίου, στη συγκεκριμένη άσκηση θα χρησιμοποιηθεί το ηλεκτρόδιο υάλου καταγράφοντας της μεταβολές στις τιμές του pH του διαλύματος.

Αρχικά πραγματοποιείται βαθμονόμηση του pH-μέτρου με πρότυπα διαλύματα με pH 7 και 10.

Στη συνέχεια δίνεται το άγνωστο δείγμα που περιέχει μόνο την μορφή NaH_2PO_4 το οποίο διαλύετε σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml με απιονισμένο νερό. Από το διάλυμα αυτό παίρνετε 10 ml και κάνετε δεύτερη αραιώση σε τελικό όγκο των 50 ml σε ογκομετρική φιάλη, το αραιωμένο διάλυμα τιτλοδοτείται με το διάλυμα NaOH. Η τιτλοδότηση αυτή γίνεται με τη χρήση πιπέτας ακριβείας μεταβλητού όγκου, με ταυτόχρονη καταγραφή του pH του διαλύματος με τη χρήση ενός ηλεκτροδίου υάλου. Η αντίδραση που συμβαίνει κατά τη τιτλοδότηση αγνώστου διαλύματος με πρότυπο διάλυμα καυστικού νατρίου είναι:



Ο όγκος του προτύπου διαλύματος του NaOH που προστίθεται διαφοροποιείται ανάλογα με τη τιμή του pH του διαλύματος, ώστε κοντά στο ισοδύναμο σημείο να υπάρχουν πιο μικρά βήματα και έτσι οι μεταβολές στη τιμή του pH να είναι μικρότερες.

Η προσθήκη γίνεται σύμφωνα με το πίνακα:

Όγκος (μl)	pH
300	7.3
200	7.8
100	8.3
50	9.2
20	10.0
50	10.5
100	11.0
200	11.5
300	12.0

- Προστίθενται 300 μl NaOH μέχρι το pH του διαλύματος να φτάσει ή να περάσει τη τιμή των 7.3
- στη συνέχεια 200 μl μέχρι τη τιμή 7.8
- 100 μl μέχρι τη τιμή 8.3, 50 μl μέχρι τη τιμή 9.2
- και στη συνέχεια 20 μl μέχρι τη τιμή pH 10.
- Αφού περάσει το ισοδύναμο σημείο συνεχίζετε αυξάνοντας τη ποσότητα του NaOH με αντίστοιχα βήματα μέχρι να φτάσετε τη τιμή 12 όπου τότε ολοκληρώνεται η τιτλοδότηση.



Αποτελέσματα και ανάλυση:

Κατά το πρώτο μέρος της άσκησης πραγματοποιούνται τρεις τιτλοδοτήσεις για το προσδιορισμό της συγκέντρωσης του διαλύματος του NaOH. Σε κάθε τιτλοδότηση υπάρχει η τιμή της μάζας του KHP που ζυγίστηκε σε ζυγό 4^{ων} δεκαδικών και ο όγκος του NaOH που καταναλώθηκε με ακρίβεια 2 δεκαδικών (λόγω τη προχοϊδας).

Παράδειγμα:

Τιτλοδότηση	KHP (gr)	NaOH (ml)
1	0.7073	35.65
2	0.7340	36.85
3	0.7737	38.80

Στο ισοδύναμο σημείο τα mole του NaOH και του KHP είναι ίσα:

$$n_{\text{NaOH}} = n_{\text{KHP}}$$

Καθώς το μοριακό βάρος του KHP είναι 204.23 υπολογίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος του NaOH για κάθε τιτλοδότηση με ακρίβεια 4 σημαντικών ψηφίων.

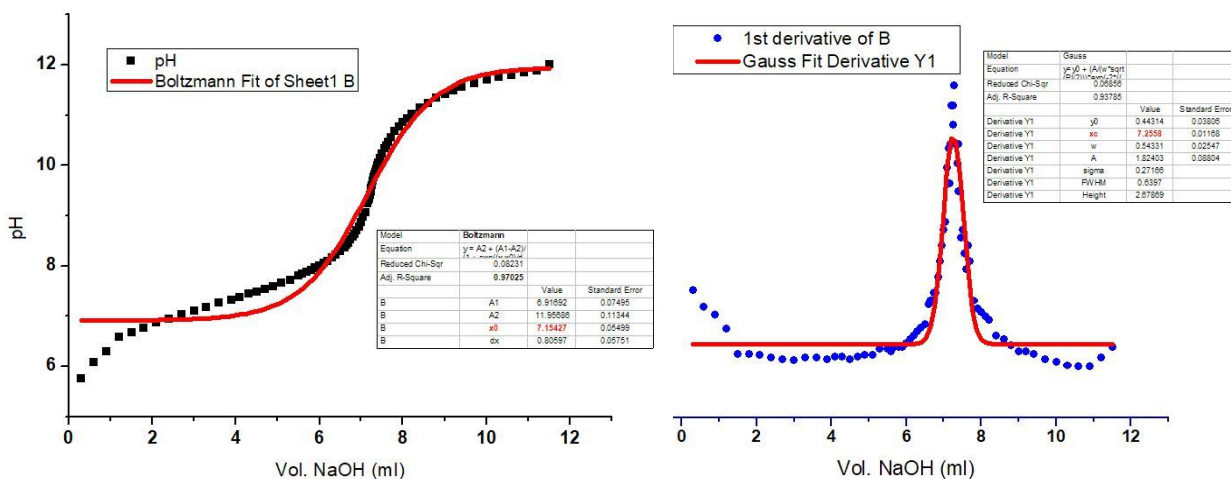
Τιτλοδότηση	C _{NaOH} (N)
1	0.09715
2	0.09753
3	0.09764

Από τις τιμές αυτές υπολογίζεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της συγκέντρωσης του NaOH:

$$C_{\text{NaOH}} = 0.09744 \pm 0.00026 \text{ N}$$

Ισχύει ο κανόνας: **Η τυπική απόκλιση έχει τα ίδια δεκαδικά με τη μέση τιμή**

Στο δεύτερο μέρος της άσκησης καταγράφονται ένα πλήθος δεδομένων (συνήθως 80 με 100 τιμές) με τις τιμές από το συνολικό όγκο του τιτλοδοτή σε κάθε βήμα της τιτλοδότησης καθώς και τις τιμές του pH του διαλύματος που καταγράφηκαν. Τα δεδομένα μεταφέρονται σε ένα υπολογιστικό πρόγραμμα όπως για παράδειγμα το origin και δημιουργείται ένα σιγμοειδές διάγραμμα από το οποίο υπολογίζεται η πρώτη παράγωγος. Η πρώτη παράγωγος είναι το ισοδύναμο σημείο και έτσι δίνεται ο όγκος του NaOH με μεγαλύτερη ακρίβεια από τον οποίο υπολογίζεται η ποσότητα του αγνώστου NaH₂PO₄.



Στο ισοδύναμο σημείο ισχύει ότι:

$$n_{\text{αγν.}} = n_{\text{NaOH}}$$

$$\text{Οπότε } n_{\text{NaOH}} = C_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} = 0.7070 \times 10^{-3} \text{ mol}$$

Όμως στη τιτλοδότησης χρησιμοποιήθηκαν 10 ml από τα 100 ml του αγνώστου δείγματος, οπότε τα συνολικά moles του άγνωστου θα είναι από 10:

$$n_{\text{αρχ.}} = n_{\text{αγν.}} \times 10 = 7.070 \times 10^{-3} \text{ mol}$$

Η μάζα του αρχικού δείγματος προσδιορίζεται από το μοριακό βάρος του οξέος που διαλύθηκε $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MW 156.01) και δίνει τελικό αποτέλεσμα:

$$m_{\text{αγνώστου}} = 1.1030 \text{ gr.}$$

Το τελικό αποτέλεσμα δίνεται με ακρίβεια 4 δεκαδικών, όσο και η ακρίβεια της ζύγισης του άγνωστου δείγματος.

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 Ι:



<https://www.chemistry.uoc.gr/eclass/modules/document/?course=CHEM-UNDER114>

Youtube:



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

Άσκηση – Ανάλυση Κρασιών

Σκοπός της άσκησης είναι:

Η ανάλυση ενός δείγματος από κρασί στους βασικούς παραμέτρους που χαρακτηρίζουν τη ποιότητα του και εξοικείωση των φοιτητών με τα ηλεκτρόδια υάλου, οξειδωαναγωγής, επιλεκτικό ηλεκτρόδιο φθορίου καθώς με σύστημα αυτόματης τιτλοδότησης.

Τα βασικά χαρακτηριστικά που καθορίζουν το είδος ενός κρασιού είναι:

- **Το Χρώμα** με βάση του χρώματος, τα κρασιά *κατατάσσονται σε Λευκά, Ροζέ και Ερυθρά*. Το χρώμα του κρασιού, προέρχεται τόσο από το χρώμα των σταφυλιών, όσο και από τις μεθόδους οινοποίησης. Είναι όμως δυνατόν, να παρασκευαστούν λευκά κρασιά, κι από κόκκινα σταφύλια.
- **Τη περιεκτικότητα σε Σάκχαρα**. Ανάλογα με τη περιεκτικότητά τους σε σάκχαρα, τα κρασιά διακρίνονται σε *ξηρά, ημίξηρα, ημίγλυκα και γλυκά*
- **Τη περιεκτικότητα σε Οινόπνευμα**. Τα κρασιά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν και από τα επίπεδο του αλκοόλ που περιέχουν, στα φυσικά επιτραπέζια κρασιά και στα ενδυναμωμένα. Στα επιτραπέζια κρασιά ο αλκοολικός τους τίτλος είναι χαμηλότερος του 15% vol, ενώ στα ενδυναμωμένα κρασιά κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης έχει προσθέσει φυσικό οινόπνευμα αμπελικής προέλευσης, με σκοπό να διακοπεί η αλκοολική ζύμωση και να παραμείνει στο κρασί μεγάλη ποσότητα αζύμωτων σακχάρων έτσι ώστε να γίνει γλυκό. Ο αλκοολικός βαθμός των επιτραπέζιων κρασιών κυμαίνεται από 16-21% Vol.
- **Τη περιεκτικότητα σε Διοξείδιο του Άνθρακα**. Ανάλογα με τη περιεκτικότητά τους σε διοξείδιο του άνθρακα, τα κρασιά χαρακτηρίζονται *ήρεμα, ημιαφρώδη και αφρώδη*. Ανάλογα με τη προέλευση του διοξειδίου του άνθρακα διακρίνονται στα **Φυσικά** αφρώδη κρασιά, στα οποία το διοξείδιο του άνθρακα προέρχεται από την αλκοολική ζύμωση και έχει διατηρηθεί στο κρασί και στα **Ανθρακούχα**, στα οποία έχει προστεθεί εκ των υστέρων.

Η ελληνική νομοθεσία προβλέπει τέσσερις ποιοτικές κατηγορίες κρασιών:

1. **Επιτραπέζιοι Οίνοι:** Δεν υπάρχουν περιορισμοί στις ποικιλίες και περιοχές προέλευσης των σταφυλιών
2. **Τοπικοί Οίνοι:** Τα σταφύλια προέρχονται από μία συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή
3. **Οίνοι Ονομασίας Προέλευσης Ανωτέρας Ποιότητας:** Πρόκειται για οίνους ανωτέρας ποιότητας, που προέρχονται από συγκεκριμένες τοποθεσίες, συγκεκριμένες ποικιλίες σταφυλιών και συγκεκριμένο τρόπο παραγωγής. Τα κρασιά αυτά φέρουν στο στόμιο κρατική, αριθμημένη, **κόκκινη ταινία**.
4. **Οίνοι Ελεγχόμενης Ονομασίας Προελεύσεως:** Πρόκειται για φυσικούς γλυκείς οίνους συγκεκριμένων ποικιλιών σταφυλιών και περιοχών. Τα κρασιά αυτά φέρουν στο στόμιο κρατική, αριθμημένη, **μπλε ταινία**.
5. **Λοιποί Τύποι / Είδη Κρασιών:** Στα οποία περιλαμβάνεται και η ρετσίνα



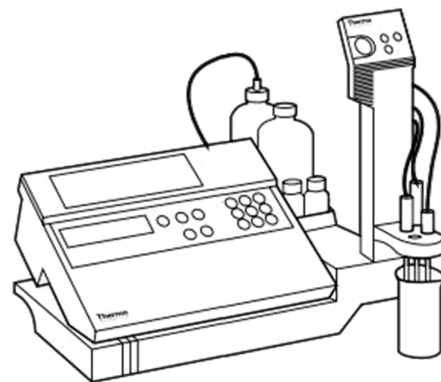
Η **γευσιγνωσία** είναι μια απλή διαδικασία που αποτελείται από 4 βήματα και ουσιαστικά βοηθάει στην αξιολόγηση του:

1. **Την εμφάνιση και το χρώμα του:** Το πρώτο στοιχείο που αξιολογείται στην όψη του κρασιού είναι η καθαρότητά του ή αλλιώς η διαύγειά του και στη συνέχεια εξετάζεται το χρώμα του.
2. **Το άρωμα:** Όπου διακρίνονται τα πρωτογενή αρώματα που είναι ενδεικτικά των διαφόρων ποικιλιών, κάθε ποικιλία έχει δικά της χαρακτηριστικά αρώματα. Τα δευτερογενή αρώματα, αρώματα που αναπτύσσονται κατά την αλκοολική ζύμωση και μπορεί να σχετίζονται με τη χρήση βαρελιού. Τέλος τα τριτογενή αρώματα που έχουν να κάνουν με την εξέλιξη και την ωρίμαση ενός κρασιού από τη παραμονή του στο βαρέλι και στη φιάλη
3. **Τη Γεύση:** Όπου διακρίνεται :
 - α. η γλυκύτητα, μια αίσθηση που γίνεται κυρίως αντιληπτή στο μπροστινό άκρο της γλώσσας.
 - β. η οξύτητα, η οποία είναι πολλές φορές απαραίτητη για την επίτευξη ισορροπίας στο κρασί και η οποία γίνεται αντιληπτή από την έκκριση σάλιου στο στόμα (κυρίως στα πλαϊνά του στόματος) και προσφέρει μια απαραίτητη αίσθηση δροσιάς.
 - γ. Οι τανίνες οι οποίες ταυτίζονται με την αίσθηση της στυφάδας στο στόμα.
 - δ. Το αλκοόλ, η αίσθηση που αφήνει το αλκοόλ στο στόμα μπορεί να είναι απαλή, θερμή ή ακόμα και επιθετική ανάλογα με τα επίπεδα του στο κρασί και σε συνδυασμό με τους υπόλοιπους γευστικούς παράγοντες.
 - ε. Το σώμα του κρασιού που είναι η γενικότερη εντύπωση που αφήνει ένα κρασί στο στόμα.
 - στ. Η επίγευση, η οποία έχει να κάνει με το χρόνο που διαρκεί το γευστικό αποτύπωμα ενός κρασιού στο στόμα.

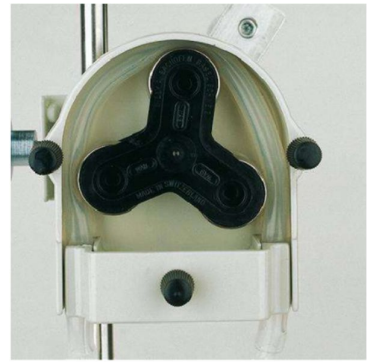


Οργανολογία:

Για το προσδιορισμό των επιθυμητών παράμετρων θα χρησιμοποιηθεί ένα σύστημα Αυτόματης τιτλοδότησης orion 950w της Thermo. Στα συστήματα αυτά οι τιτλοδοτήσεις γίνονται αυτόματα και το ισοδύναμο σημείο προσδιορίζεται ποτεσιομετρικά με τη χρήση ενός κατάλληλου ηλεκτροδίου και όχι με τη χρήση ενός δείκτη που γίνεται στις κλασικές τιτλοδοτήσεις, θα είναι δηλ. ποτεσιομετρικές τιτλοδοτήσεις.



Η κίνηση του τιτλοδότη γίνεται με μια περιστατική αντλία. Η λειτουργία της στηρίζεται στην κίνηση ενός εμβόλου που πιέζει ένα ελαστικό σωλήνα δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό υποπίεση δίνοντας έτσι την απαραίτητη κίνηση στον τιτλοδότη. Η μία άκρη του σωλήνα βρίσκεται μέσα στο δοχείο του τιτλοδότη και η άλλη στην έξοδο του συστήματος, μεταβάλλοντας την κίνηση του εμβόλου, μεταβάλλεται η ροή του τιτλοδότη. Η συσκευή εκτός το σωληνάκι εξόδου του τιτλοδότη, περιλαμβάνει ένα σύστημα αναδεύσεις καθώς και μία θέση για να τοποθετηθεί το αντίστοιχο ηλεκτρόδιο. Επίσης περιλαμβάνει και μια κονσόλα όπου καθορίζονται όλοι οι παράμετροι.



Θα χρησιμοποιηθούν τρία ηλεκτρόδια:

1. Ένα ηλεκτρόδιο υάλου για τις μετρήσεις τις οξύτητας
2. Ένα ηλεκτρόδιο οξειδοαναγωγής για τις μετρήσεις των θειωδών
3. Ένα επιλεκτικό ηλεκτρόδιο φθορίου για τη μέτρηση της αλκοόλης



Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια - Όργανα:

A. Σάκχαρα:

- Ταμπλέτα $\text{CuSO}_4/\text{NaOH}$ (Fermentest)

B. Ολική Οξύτητα:

- NaOH , 0.1 N

Γ. Ελεύθερα θειώδη:

- 0.1 gr NaHCO_3
- 1 ml H_2SO_4 , 10 N
- διάλυμα I_2 , 0.005 M

Δ. Ολικά θειώδη:

- 0.5 ml NaOH , 10 N
- 0.1 gr NaHCO_3
- 2 ml H_2SO_4 , 10 N
- διάλυμα I_2 , 0.005 M

E. Αλκοόλη:

- Πρότυπα διαλύματα αιθανόλης 6%, 10% ,14%
- 5 ml διαλύματος (EDTA 0.01 M / NaF 0.1 M, CH_3COOH 0.3M / CH_3COONa 1.7M)

- Δοκιμαστικός σωλήνας
- Ποτήρια ζέσεως
- Πλαστικό ποτήρι για το κρασί
- Πλαστικά φιαλίδια
- Σιφώνιο πληρώσεων των 25 ml
- Πιπέτες ακριβείας μεταβλητού όγκου
- Ηλεκτρόδιο υάλου
- Ηλεκτρόδιο οξειδοαναγωγής
- Επιλεκτικό ηλεκτρόδιο Ιόντων Φθορίου
- Ζυγός ακριβείας των 3 δεκαδικών
- Σύστημα αυτόματης τιτλοδότησης (Dispenser)

Η άσκηση χωρίζεται σε τέσσερα μέρη όπου στο κάθε ένα θα προσδιορίσετε και μία παράμετρο στο δείγμα από κρασί που θα αναλύσετε:

1. Τα Σάκχαρα
2. Την Οξύτητα
 - 2.1. Ελεύθερη Οξύτητα
 - 2.2. Ολική Οξύτητα
3. Τα Θειώδη
 - 3.1. Ελεύθερα Θειώδη
 - 3.2. Ολικά Θειώδη
4. Το ποσοστό της Αλκοόλης

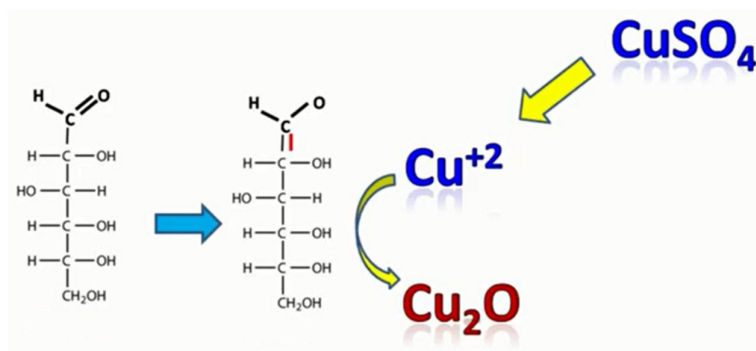
1^η Ανάλυση: Σάκχαρα

Η ξηρότητα ενός κρασιού αναφέρεται στη περιεκτικότητά του σε αναγωγικά σάκχαρα, τα περισσότερα από τα σάκχαρα αυτά δε ζυμώνονται όπως οι πεντόζες. Η έννοια της «ξηρότητας» είναι ένας σχετικός χαρακτηρισμός και ποικίλει ανάλογα με το είδος του κρασιού, τα κρασιά με βάση τη περιεκτικότητά τους σε αναγωγικά σάκχαρα διακρίνονται σε ξηρά, ημίξηρα, ημίγλυκα και γλυκά.

Τα όρια σε αναγωγικά σάκχαρα σε gr/l είναι σύμφωνα με τη νομοθεσία είναι:

Κατηγορία	Ελληνική νομοθεσία	Διεθνή νομοθεσία
Ξηρά	0 – 4	0 - 2
Ημίξηρα	4 - 12	2 - 18
Ημίγλυκα	12 - 45	18 - 40
Γλυκά	> 45	> 40

Τα Αναγωγικά σάκχαρα περιέχουν αλδεΐδη ή κετόνη στο μόριο τους και έτσι μπορούν να προκαλέσουν αναγωγή. Οι πιο πολλές μέθοδοι προσδιορισμού, στηρίζονται στην αναγωγή του Cu από +2 σε +1 που το οξείδιο του έχει πορφυρό χρώμα.



Στην άσκηση θα χρησιμοποιηθεί ταμπλέτα η οποία περιέχει το CuSO₄. Ο θειικός χαλκός (II) αντιδρά με τα αναγωγικά σάκχαρα του κρασιού και μετατρέπεται σε οξείδιο του χαλκού (I). Το χρώμα που παράγεται το οποίο εξαρτάται από τη ποσότητα αναγωγικών σακχάρων στο δείγμα ποικίλλει από μπλε σε πορτοκαλί.

Η παρουσία καυστικού νατρίου είναι απαραίτητη για να εξασφαλιστεί το αλκαλικό περιβάλλον που είναι κατάλληλο για τη πραγματοποίηση της αντίδρασης.

Διαδικασία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 25 σταγόνες κρασί και 15 σταγόνες νερό. Στη συνέχεια τοποθετείτε η ταμπλέτα και βοηθάτε την αντίδραση τοποθετώντας το δοκιμαστικό σωλήνα σε ζεστό νερό για 2 λεπτά. Περιμένετε να σταματήσει ο βρασμός, στη συνέχεια ανακινείται ο σωλήνας και συγκρίνεται το χρώμα του υγρού με τη κλίμακα χρωμάτων, το ίζημα που παράγεται δεν λαμβάνεται υπό όψη. Το χρώμα του υγρού εξαρτάται από ποσοστό των σακχάρων στο δείγμα και ποικίλει από μπλε (κρασί με μικρή περιεκτικότητα σε **αναγωγικά σάκχαρα**) σε **πορτοκαλί (κρασί με μεγάλη περιεκτικότητα σε αναγωγικά σάκχαρα)**.



2^η Ανάλυση: Οξύτητα

α. Ελεύθερη

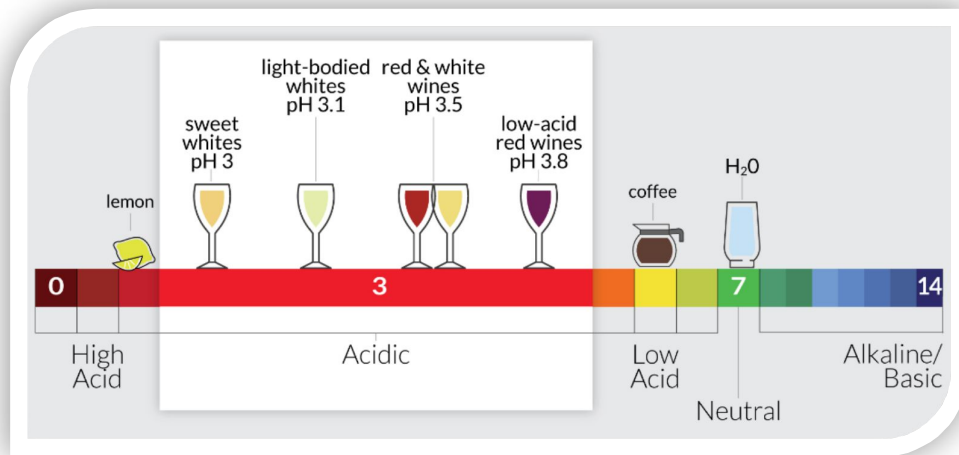
Στο κρασί περιέχονται σημαντική ποσότητα οργανικών οξέων καθώς και μικρή ποσότητα ανόργανων οξέων.

Τα οργανικά οξέα του οίνου προέρχονται:

- Σε αυτά που ήδη υπήρχαν στο γλεύκος από το οποίο προήλθε ο οίνος, δηλαδή τα οξέα του σταφυλιού, όπως είναι το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό.
- Σε οξέα που σχηματίζονται κατά την αλκοολική ζύμωση σαν προϊόντα της βιολογικής αποικοδόμησης των σακχάρων (από τους σακχαρομύκητες).
- Σε οξέα που σχηματίζονται από επιθυμητές ή ανεπιθύμητες δράσεις βακτηρίων, κυρίως στα σάκχαρα, αλλά και σε μερικά οργανικά οξέα του οίνου.

Το pH του μπορεί να καθορίσει τη γεύση του κρασιού:

pH	Γεύση
2.90 – 3.10	Ξηρή/στυφή
3.10 - 3.30	Φρουτώδη
3.30 - 3.50	Βαριά έντονα σε γεύση



Τα ελεύθερα οξέα είναι στην ουσία τα ελεύθερα πρωτόνια στο διάλυμα δηλ. το pH του διαλύματος, οπότε για την μέτρηση τους θα γίνει απλά μια μέτρηση του pH με ένα ηλεκτρόδιο υάλου. Αρχικά γίνεται βαθμονόμηση του ηλεκτροδίου υάλου με βοήθεια τριών ρυθμιστικών διαλυμάτων με pH 4, 7 και 10. Στη συνέχεια τοποθετούνται 25 ml κρασί σε πλαστικό ποτηράκι ανάλυσης με τη χρήση ενός σιφωνίου πλήρωσης των 25 ml και βυθίζεται το ηλεκτρόδιο υάλου μέσα σ' αυτό και καταγράφεται η τιμή του pH. Ο όγκος του διαλύματος (25 ml) δεν παίζει ρόλο στην μέτρηση, χρειάζεται όμως να είναι 25 ml ακριβώς επειδή το ίδιο δείγμα θα χρησιμοποιηθεί στην μέτρηση των ολικών οξέων.

Διαδικασία:

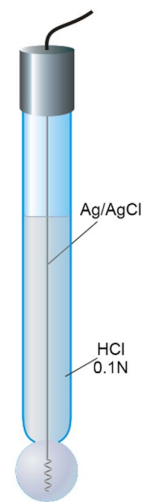
Ελεύθερη οξύτητα (Free Acidity ή pH)		
Επιλογή	Εντολή	Σχόλια
PERCENT ALCOHOL	NO	Από το μενού του οργάνου επιλέγετε τη λειτουργία ελεύθερη / ολική οξύτητα (Free/Total Acid)
FREE/TOTAL SULF	NO	
FREE/TOTAL ACID	YES	
CH1 ROSS ELEC	YES	Συνδέετε το ηλεκτρόδιο στη θέση 1 (δεξιά υποδοχή) και πατάτε YES
1-FREE 2-TOTAL	Press 1	Πατάτε το 1 για να επιλεγεί το μενού της ελεύθερης οξύτητας
CAL ELECTRODE?	YES	Πατάτε την επιλογή YES. Τη πρώτη φορά που χρησιμοποιείται το ηλεκτρόδιο πρέπει να το βαθμονομηθεί.

ELECT IN BFR4 ?	YES, when RDY press YES again	Βάζετε το ηλεκτρόδιο στο buffer 4, πατάτε YES. Περιμένετε μέχρι το όργανο να γράψει RDY (Ready) και στη συνέχεια πατάτε πάλι YES (για να σωθεί η τιμή στη μνήμη του οργάνου)
ELECT IN BFR7 ?	YES, when RDY press YES again	Βάζετε το ηλεκτρόδιο στο buffer 7, πατάτε YES. Περιμένετε μέχρι το όργανο να γράψει RDY (Ready) και στη συνέχεια πατάτε πάλι YES
ELECT IN BFR10 ?	YES, when RDY press YES again	Βάζετε το ηλεκτρόδιο στο buffer 10, πατάτε YES. Περιμένετε μέχρι το όργανο να γράψει RDY (Ready) και στη συνέχεια πατάτε πάλι YES
25ML WINE IN BTL		Τοποθετείτε 25 ml κρασί στο πλαστικό ποτηράκι ανάλυσης
ELECT IN WINE		Τοποθετείτε το ηλεκτρόδιο μέσα στο κρασί και γίνεται η μέτρηση. Μόλις εμφανίσει την επιλογή «ANOTHER SAMPLE?» έχει τελειώσει η μέτρηση
ANOTHER SAMPLE?	NO	Πατάτε την επιλογή NO (αν είχατε και άλλα δείγματα για μέτρηση τότε θα επιλέγατε YES)
		Προσοχή: Δεν πετάτε το δείγμα με το κρασί, το κρατάτε για την επόμενη μέτρηση

2^η Ανάλυση: Οξύτητα

1. Ολική

Η ολική οξύτητα του κρασιού οφείλεται στο σύνολο των όξινων υδρογόνων των αδιάστατων και των εν διαστάσει μορίων των οξέων ενώ η ελεύθερη οξύτητα (pH) οφείλεται μόνο στα κατιόντα υδρογόνου που προέρχονται από τα εν διαστάσει μόρια. Η ολική οξύτητα είναι αδιάφορη από το βαθμό διάστασης των οξέων, δεν εξαρτάται από το είδος αυτών αλλά μόνο από τη συγκέντρωσή τους. Αντίθετα, το pH εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση των οξέων όσο και από το είδος αυτών, επειδή κάθε ένα από τα οξέα έχει διαφορετική ικανότητα διάστασης. Οποιαδήποτε επέμβαση για διόρθωση της οξύτητας ενός κρασιού πρέπει να συνοδεύεται με μέτρηση, τόσο της ολικής όσο και της ελεύθερης οξύτητας. Το σύνολο των οξέων που περιέχεται στο κρασί προσδιορίζεται από την ολική οξύτητα.



Ο προσδιορισμός γίνεται με αυτόματη τιτλοδότηση με βάση το NaOH συγκέντρωσης 0.1 M, μέχρι την πλήρη εξουδετέρωση του δείγματος ($\text{pH} > 7$). Οι τιμές του pH καταγράφονται συνεχώς με την χρήση ενός ηλεκτροδίου υάλου, μόλις φτάσει στο τελικό σημείο σταματάει η τιτλοδότηση και από την ποσότητα του τιτλοδότη που καταναλώθηκε, την συγκέντρωση του (0.1 N) και την ποσότητα του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε (25 ml) υπολογίζεται αυτόματα η ποσότητα των ολικών οξέων η οποία εκφράζεται σε μονάδες γραμμάρια τρυγικού οξέος ανά λίτρο κρασιού.



Για την σωστή συντήρηση και καλή ποιότητα του κρασιού, η ολική οξύτητα πρέπει να είναι στο παρακάτω εύρος:

- για τα λευκά κρασιά: 5-8 gr/lit
- για τα κόκκινα κρασιά: 4-7 gr/lit

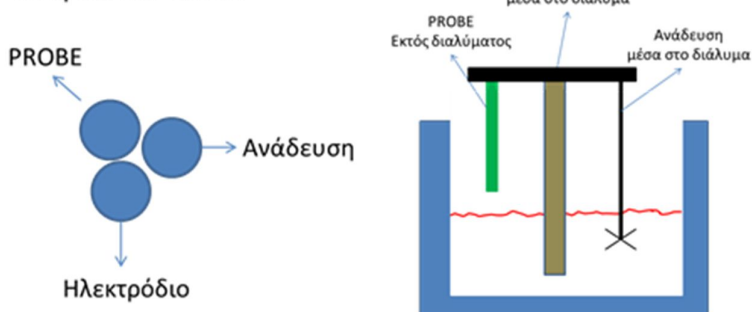
Αν η τιμή της οξύτητας δεν είναι η επιθυμητή, η ρύθμιση της γίνεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας τρυγικού οξέος.

Διαδικασία:

Αρχικά, γίνεται βαθμονόμηση του αυτόματου συστήματος τιτλοδότησης:

1. Ζυγίζονται 5 πλαστικά φιαλίδια στον αναλυτικό ζυγό των 3 δεκαδικών ψηφίων και οι τιμές της μάζας καταγράφονται στο όργανο. Στη συνέχεια γεμίζονται από το όργανο τα φιαλίδια με 5.2ml απιονισμένο νερό, ζυγίζονται ξανά μαζί με το νερό και καταγράφονται οι νέες τιμές. Από την διαφορά της μάζας κάνει μια βαθμονόμηση πέντε σημείων και δίνει την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης.
Για την βαθμονόμηση του χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό επειδή έχει πυκνότητα 1 Kg/l (ή g/ml) και έτσι η μάζα του νερού που μετράτε με ακρίβεια, μέσω των ζυγών ακριβείας, μετατρέπεται σε μέτρηση όγκου με ακρίβεια.
2. Στη συνέχεια αλλάζεται ο τιτλοδότης από νερό σε NaOH 0.1 M.
3. Σε πλαστικό ποτήρι ανάλυσης μεταφέρονται 25 ml κρασί με τη χρήση σιφωνίου πλήρωσης και βυθίζονται μέσα σε αυτό το ηλεκτρόδιο υάλου και ο αναδευτήρα του οργάνου ενώ το probe του τιτλοδότη μένει έξω από το διάλυμα.
4. Η τιτλοδότηση γίνεται αυτόματα κατά τη διάρκεια της το διάλυμα αναδεύεται και μετριέται το pH του. Όταν ολοκληρωθεί η τιτλοδότηση αφού δηλ. γίνει πλήρης εξουδετέρωση των οξέων από το NaOH ($\text{pH} > 7.0$) το όργανο υπολογίζει αυτόματα τη τιμή της ολικής οξύτητας η οποία καταγράφεται σε gr/lit.

Θέση στο DISPENSER



Ολική οξύτητα (Total Acidity)		
Επιλογή	Εντολή	Σχόλια
PERCENT ALCOHOL	NO	Από το μενού του οργάνου επιλέγετε τη λειτουργία ελεύθερη / ολική οξύτητα (Free/Total Acid)
FREE/TOTAL SULF	NO	
FREE/TOTAL ACID	YES	
CH1 ROSS ELEC	YES	Συνδέετε το ηλεκτρόδιο στη θέση 1 (δεξιά υποδοχή) και πατάτε YES
1-FREE 2-TOTAL	Press 2	Πατάτε το 2 για να επιλεγεί το μενού της ολικής οξύτητας
1-US 2-EUROPE	Press 2	Επιλογή 1 για αποτέλεσμα σε μονάδες μέτρησης Ηνωμένων Πολιτειών. Επιλογή 2 για αποτέλεσμα είναι σε μονάδες Ευρώπης (Μετρικό Σύστημα) Επιλέγετε το 2 (αποτέλεσμα δίνεται σε gr/lit).
CAL/FLUSH DISPEN	YES	Τη πρώτη φορά που χρησιμοποιείται το σύστημα «DISPENSER» (αυτόματο σύστημα τιτλοδότησης) πρέπει να το βαθμονομηθεί. Επιλέγετε την εντολή «YES»
CAL DISPENSER?	YES	Επιλέγετε την εντολή «YES» για να ξεκινήσει η διαδικασία βαθμονόμησης του «DISPENSER»
DISTILLED WATER	YES	Συνδέετε στο σύστημα «DISPENSER» απιονισμένο νερό και επιλέγετε την εντολή «YES» Αφήνετε να τρέξει λίγο ώστε να απομακρυνθούν οι φυσαλίδες από το σωληνάκι του «DISPENSER».
		Ζυγίζετε τα 5 VIALS με τα καπάκια τους σε ζυγό ακριβείας «3 δεκαδικών» και σημειώνετε τα απόβαρα τους
X.XXXX G EMPTY VIAL 1?	Γράφετε το απόβαρο του κάθε vial και πατάτε διαδοχικά «YES». Με το τρόπο αυτό αποθηκεύονται στη μνήμη του «DISPENSER» τα απόβαρα και των 5 VIALS
DISP PROBE IN 1?	YES	Τοποθετείτε το πρώτο VIAL στο PROBE του «DISPENSER» και πατάτε «YES». Θα προστεθούν περίπου 5.2 ml νερού μέσα στο VIAL. Στη

		συνέχεια τοποθετείτε το επόμενο VIAL και πατάτε πάλι «YES». Το κάνετε διαδοχικά μέχρι να γεμίσουν και τα 5 VIALS.
DISPENSE X.XX ML VIALS WEIGHED	YES	Ζυγίζετε ξανά τα 5 VIALS με το νερό σε ζυγό ακριβείας «3 δεκαδικών» και σημειώνετε το βάρος τους
X.XXXX G FILLED VIAL 1?	Γράφετε το τελικό βάρος του κάθε VIAL και πατάτε «YES» διαδοχικά
X.XXXX CONST/CV X.XX%		Δεν κάντε κάποια ενέργεια, το όργανο δείχνει το αποτέλεσμα της βαθμονόμησης που μόλις πραγματοποιήθηκε.
DISPENSE/FLUSH	YES	Προσοχή: Αρχικά αλλάζετε τη φιάλη στο «DISPENSER» και από H ₂ O βάζετε το τιτλοδότη (NaOH 0.1 M) Σας ρωτάει αν θέλετε να ξεπλυθεί το «DISPENSER» ώστε από το σωληνάκι του να φύγει το νερό και να τοποθετηθεί το NaOH. Επιλέγετε «YES»
ENTER VOLUME	10 ml YES	Επιλέγετε τον όγκο ξεπλύματος, 10 ml είναι μια ασφαλής ποσότητα για καλό ξέπλυμα. Πατάτε «YES»
CAL ELECTRODE?	NO	Έχει ήδη βαθμονομήσει το ηλεκτρόδιο υάλου (pH) από τη προηγούμενη διαδικασία (της ελεύθερης οξύτητας) οπότε δεν χρειάζεται να γίνει ξανά. Πατάτε την επιλογή NO
25ML WINE IN BTL	YES	Υπάρχει ήδη έτοιμο το πλαστικό ποτηράκι με τα 25 ml κρασί από τη προηγούμενη διαδικασία (της ελεύθερης οξύτητας) οπότε δεν χρειάζεται να γίνει ξανά. Πατάτε την επιλογή YES.
ELECT IN WINE	YES	Ετοιμάζεται η διάταξη στο «DISPENSER» και τοποθετείται μέσα στο διάλυμα το ηλεκτρόδιο καθώς και το σύστημα ανάδευσης ενώ έξω από το διάλυμα βρίσκεται το PROBE του «DISPENSER» από το οποίο θα γίνεται η σταδιακή εισαγωγή του τιτλοδότη. Πατάτε YES για να αρχίσει η διαδικασία. Αρχικά μετράει το pH του διαλύματος,

		προσθέτει σταδιακά ποσότητα τιτλοδότη, αναδεύει, μετράει ξανά το pH και όσο αυτό είναι μικρότερο από 7 συνεχίζει. Μόλις περάσει την τιμή pH 7 σταματάει η διαδικασία και δίνει τελικό αποτέλεσμα σε g/l
ANOTHER SAMPLE?	NO	Πατάτε την επιλογή NO
		Κλείσιμο διαδικασίας: <ul style="list-style-type: none"> • Ξεπλένετε με τον υδροβολέα το σύστημα • Ξεπλένετε το ηλεκτρόδιο pH • Αλλάζετε τη φιάλη του τιτλοδότη από NaOH σε H₂O και πατάτε το dispenser για ξέπλυμα

3^η Ανάλυση: Θειώδη

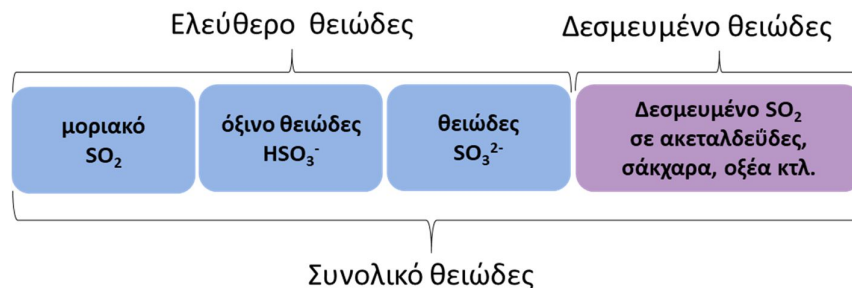
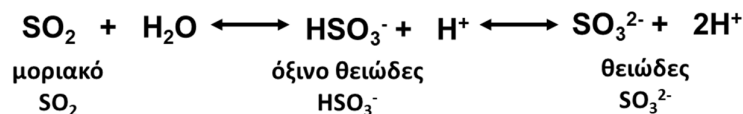
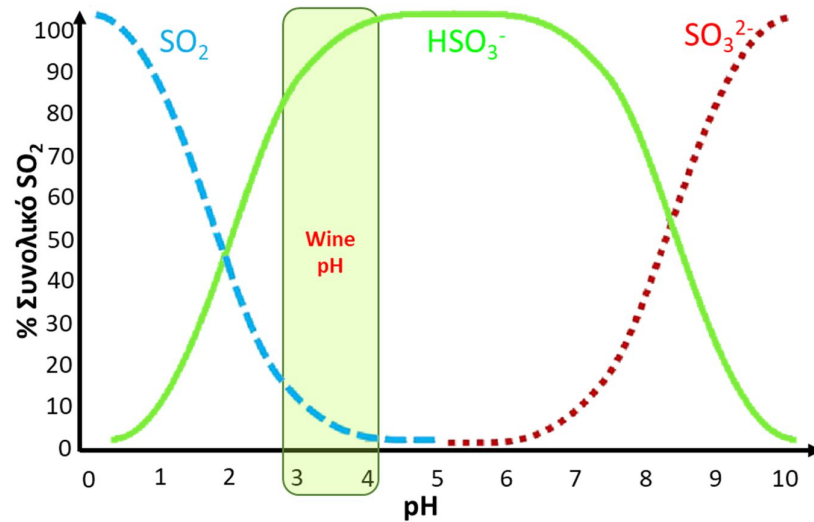
α. Ελεύθερα

Το θειώδη αποτελεί το πιο χρήσιμο και ευρέως αποδεκτό πρόσθετο που χρησιμοποιείται στη σύγχρονη οινολογία γιατί έχει τρεις ιδιότητες:

- 1. Αντιοξειδωτική δράση:** Ο κυριότερος λόγος της χρήσης του θειώδους στο κρασί είναι οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες. Για να διατηρηθεί ο φρουτώδης χαρακτήρας στο κρασί θα πρέπει να κρατηθεί μακριά τις οξειδώσεις. Αυτό επιτυγχάνεται με τη προσθήκη θειώδους το οποίο ενώνεται με το οξυγόνο και προστατεύει το κρασί από τις οξειδώσεις.
- 2. Αντισηπτική δράση** Ο σπουδαιότερος αντισηπτικός ρόλος του θειώδους (SO₂) είναι η καταστροφή των οξικών βακτηρίων, που μετατρέπουν το κρασί σε ξύδι. Τα οξικά βακτήρια είναι αερόβια και χρειάζονται οξυγόνο για να αναπαραχθούν και να επιβιώσουν. Η προσθήκη θειώδους ακολουθούμενη από φιλτράρισμα, προσφέρει άμεση θεραπεία σε όποιο κρασί παρουσιάζει μια τέτοια προσβολή. Ο ρόλος του θειώδους στη περίπτωση αυτή είναι διπλός. Από τη μια σκοτώνει άμεσα τα βακτήρια και από την άλλη αφαιρεί το οξυγόνο που χρειάζονται για επιβίωση.
- 3. Κατά των ενζύμων:** Αν κόψετε ή δαγκώσετε ένα μήλο, αχλάδι ή άλλο λευκόσαρκο φρούτο και το αφήσετε εκτεθειμένο στον αέρα, σύντομα θα «μαυρίσει». Αυτό είναι αποτέλεσμα της επίδρασης των ενζύμων που ενεργούν σαν καταλύτες. Στη περίπτωση των φρούτων και του μούστου ή κρασιού η κατηγορία των ενζύμων που είναι υπεύθυνη για το σκούρο χρώμα είναι οι οξειδάσες. Το διοξείδιο του θείου ενεργεί σαν δηλητήριο κατά των οξειδασών μειώνοντας το βαθμό οξείδωσης των οίνων, προστατεύοντας ταυτόχρονα το χρώμα των λευκών οίνων.



Σε ένα διάλυμα το SO₂ ανάλογα με το pH του μπορεί να είναι με τη μορφή του μοριακού SO₂, τη μορφή του όξινου θειώδες ή με τη μορφή του θειώδες άλατος. Στις τιμές pH που έχουν τα κρασιά μπορεί να βρίσκεται με τη μορφή του μοριακού SO₂ ή του όξινου θειώδους και οι τρεις αυτές μορφές του, αποτελούν το ελεύθερο θειώδες. Υπάρχει όμως ένα μέρος που είναι δεσμευμένο σε άλατα προσκολλημένα σε σάκχαρα, ακεταλδεΐδες, οξέα κ.α. που αποτελεί το δεσμευμένο θειώδες. Το σύνολο των ελεύθερων και δεσμευμένων μορφών είναι το συνολικό θειώδες.



Οι επιθυμητές τιμές για το συνολικό θειώδες είναι:

- για τα κόκκινα κρασιά περίπου 150 mg/l
- ενώ για τα λευκά που χρειάζονται περισσότερη προστασία περίπου 230 mg/l

Δεν θα πρέπει να γίνεται υπέρβαση των τιμών αυτών διότι θα έχει δυσάρεστες παρενέργειες στη γεύση και στην οσμή του κρασιού. Σε περίπτωση που προκύψει μικρότερη περιεκτικότητα προστίθεται κατάλληλη ποσότητα άλατος θείου ώστε να εξασφαλιστεί η καλή συντήρηση του κρασιού.

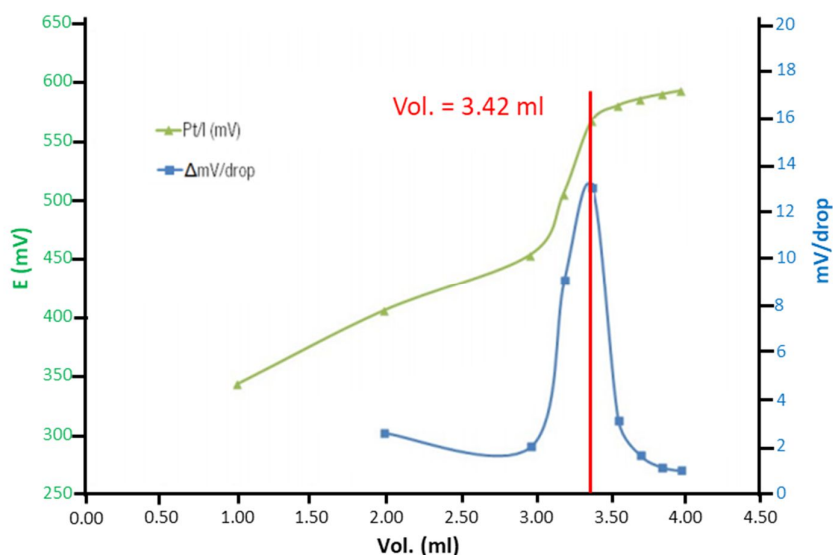
Ο προσδιορισμός του SO₂ βασίζεται στη οξειδωαναγωγική αντίδραση:



Όλη η διαδικασία καταγράφεται με ένα ηλεκτρόδιο οξειδωαναγωγής (redox) .με επίστρωση από Pt. Ένα ηλεκτρόδιο οξειδωαναγωγής βασίζεται στην ικανότητα του να παρέχει και να δέχεται ηλεκτρόνια, η

πλατίνα είναι ένα αδρανές οξειδοαναγωγικό υλικό, το οποίο δεν λαμβάνει μέρος στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, λειτουργεί μόνο ως αγωγός των ηλεκτρονίων. Έτσι το μόνο που κάνει ένα ηλεκτρόδιο οξειδοαναγωγής είναι να μεταφέρει αυτήν την πληροφορία στο υπόλοιπο σύστημα ποτενσιομετρικής μέτρησης.

Κατά την οξειδοαναγωγική αντίδραση του μοριακού SO_2 με το I_2 τα ηλεκτρόνια που παράγονται μεταβάλλουν το δυναμικό του ηλεκτροδίου, όταν σταματήσει η μεταβολή του δυναμικού είναι ένδειξη ότι τελείωσε η οξειδοαναγωγική αντίδραση καθώς δεν θα παράγονται ηλεκτρόνια και έτσι δεν θα μεταβάλετε το δυναμικό.



Το όργανο υπολογίζει τον όγκο κατανάλωσης και ξέροντας τη συγκέντρωση του τιτλοδότη (διάλυμα του ιωδίου 0.005N) και τον αρχικό όγκο του δείγματος από το κρασί (25 ml) κάνει τους υπολογισμούς και δίνει σε τελικό αποτέλεσμα τη συγκέντρωση των ελευθέρων θειωδών στο κρασί σε mg/l.

Διαδικασία:

Τοποθετούνται 25ml δείγματος κρασιού σε πλαστικό δοχείο με τη χρήση σιφωνίου πλήρωσης, στη συνέχεια προστίθεται 0.1 gr NaHCO_3 και 1 ml διαλύματος H_2SO_4 10 N. Το NaHCO_3 προστίθεται για να δημιουργηθεί ένα στρώμα από CO_2 στην επιφάνεια του κρασιού και να παρεμποδίσει έτσι να φύγει το SO_2 κατά τη διαδικασία της τιτλοδότησης, πρέπει να προστίθεται πριν την προσθήκη του θειικού οξέος.

Η προσθήκη του θειικού οξέος έχει διπλό ρόλο, αφενός να κατεβάζει τη τιμή του pH του κρασιού και όλες οι ελεύθερες μορφές να οδηγηθούν στη μορφή του μοριακού SO_2 και αφετέρου περιορίζει την οξείδωση των πολυφαινόλων από το ιώδιο. Το ιώδιο εκτός από το SO_2 αντιδρά και με τις πολυφαινόλες που υπάρχουν στο κρασί καταλήγοντας σε λανθασμένο αποτέλεσμα, σε όξινο περιβάλλον αυτή η αντίδραση αναστέλλεται.

Στη συνέχεια τοποθετείτε το ηλεκτρόδιο οξειδοαναγωγής στο διάλυμα και γίνεται η τιτλοδότηση με διάλυμα ιωδίου 0.005 M.

Ελεύθερα θειώδη (Free Sulfite)		
Επιλογή	Εντολή	Σχόλια
PERCENT ALCOHOL	NO	Από το μενού του οργάνου επιλέγετε τη λειτουργία ελεύθερα / ολικά θειώδη (Free/Total Sulf)
FREE/TOTAL SULF	YES	
CAL/FLUSH DISPEN	NO	Έχει ήδη γίνει από τη προηγούμενη διαδικασία (της συνολικής οξύτητας) οπότε δεν χρειάζεται ξανά Πατάτε την επιλογή NO
CAL/FLUSH DISPEN	NO	Έχει ήδη γίνει από τη προηγούμενη διαδικασία (της συνολικής οξύτητας) οπότε δεν χρειάζεται ξανά Πατάτε την επιλογή NO
CH2 REDOX ELEC	YES	Συνδέετε το ηλεκτρόδιο στη θέση 2 (αριστερή υποδοχή). Πατάτε την επιλογή YES
1-FREE 2-TOTAL	Press 1	Πατάτε το 1 για να επιλεγεί το μενού των ελεύθερων θειωδών
25ML WINE IN BTL	YES	Τοποθετείτε 25 ml κρασί στο πλαστικό ποτηράκι ανάλυσης
ADD POUCH	YES	Προσθέτετε 0.1 gr NaHCO ₃ στο διάλυμα και πατάτε την επιλογή YES
RED BTL A ADDED?	YES	Προσθέτετε 1 ml πυκνού H ₂ SO ₄ (10 N) στο διάλυμα και πατάτε την επιλογή YES
		Προσοχή: Βάζετε το τιτλοδότη στο «DISPENSER» Αντικαθιστάτε το διάλυμα H ₂ O με το διάλυμα του I ₂ . Ξεπλένετε τον «DISPENSER» πατώντας dispenser ώστε το διάλυμα να φτάσει στο PROBE του «DISPENSER»
ELECT IN WINE	YES	Ετοιμάζετε τη διάταξη στο «DISPENSER» τοποθετείτε μέσα στο διάλυμα το ηλεκτρόδιο το σύστημα ανάδευσης ενώ έξω από το διάλυμα βρίσκεται το PROBE του «DISPENSER» από το οποίο θα γίνεται η σταδιακή εισαγωγή του τιτλοδότη. Πατάτε YES για να αρχίσει η διαδικασία. Αρχικά μετράει το δυναμικό του διαλύματος, προσθέτει σταδιακά ποσότητα τιτλοδότη, αναδεύει, μετράει ξανά το δυναμικό. Μόλις σταματήσει να βλέπει διαφορές στο δυναμικό

		σταματάει η διαδικασία και δίνει τελικό αποτέλεσμα σε mg/lit.
ANOTHER SAMPLE?	NO	Πατάτε την επιλογή NO
		Κλείσιμο διαδικασίας: <ul style="list-style-type: none"> • Ξεπλένετε με τον υδροβολέα το σύστημα τιτλοδότησης • Ξεπλένετε το ηλεκτρόδιο redox



3^η Ανάλυση: Θειώδη

β. Ολικά

Ο προσδιορισμός του ολικού διοξειδίου του θείου σε ένα κρασί βασίζεται στην ίδια οξειδοαναγωγική αντίδραση με το προσδιορισμό του ελεύθερου διοξειδίου του θείου, αρχικά όμως είναι απαραίτητη η υδρόλυση των δισουλφιδικών συμπλοκών που πραγματοποιείται σε ισχυρό αλκαλικό περιβάλλον. Με τον τρόπο αυτό τα δεσμευμένα θειώδη ελευθερώνονται και μετρούνται με την προηγούμενη διαδικασία ως ελεύθερα μαζί με τα αρχικά, δίνοντας ως αποτέλεσμα τα συνολικά θειώδη.

Διαδικασία:

Αρχικά επιλέγεται στο όργανο η υψηλή ή χαμηλή κλίμακα, αυτό μπορεί να εκτιμηθεί από τη προηγούμενη μέτρηση του ελεύθερου διοξειδίου του θείου και από το είδος του κρασιού. Υψηλές τιμές των ελευθέρων θειώδων μας κατευθύνει να επιλεγεί η υψηλή κλίμακα όπως και κρασί που αναμένονται υψηλές τιμές θειωδών πχ λευκό κρασί ή κρασί που αναμένεται να καταναλωθεί σε μεγάλο χρονικό διάστημα οπότε χρειάζονται μεγαλύτερες ποσότητες θειωδών για την προστασία του.

Τοποθετούνται 25 ml κρασιού με τη χρήση σιφωνίου πλήρωσης σε πλαστικό ποτήρι, προστίθενται 0.5 ml NaOH 10 N με πιπέτα ακριβείας μεταβλητού όγκου και περιμένετε δέκα λεπτά για να ολοκληρωθεί η υδρόλυση των δισουλφιδικών συμπλόκων. Με το τέλος της αναμονής, προστίθεται αρχικά 0.1 gr NaHCO₃ και στη συνέχεια 2 ml H₂SO₄. Η ποσότητα H₂SO₄ που προστίθεται είναι μεγαλύτερη από αυτήν στη διαδικασία του ελεύθερου διοξειδίου του θείου διότι απαιτείται επιπλέον ποσότητα για την εξουδετέρωση του NaOH ώστε να επιτευχθεί η οξίνιση του κρασιού. Το NaHCO₃ προστίθεται για τον ίδιο λόγο όπως και στη μέτρηση του ελεύθερου θειώδους, τη δημιουργία του στρώματος του CO₂ και θα πρέπει να προστίθεται πριν την προσθήκη του θειικού οξέος. Στη συνέχεια ετοιμάζετε η διάταξη, τοποθετείτε μέσα στο διάλυμα το ηλεκτρόδιο καθώς και το σύστημα ανάδευσης ενώ έξω από το διάλυμα βρίσκεται το PROBE του «DISPENSER» από το οποίο θα γίνεται η σταδιακή εισαγωγή του τιτλοδότη.

Ξεκινάει η τιτλοδότηση, αρχικά μετράει το δυναμικό του διαλύματος, προσθέτει σταδιακά ποσότητα τιτλοδοτή, αναδεύει, μετράει ξανά το δυναμικό. Μόλις σταματήσει να βλέπει διαφορές στο δυναμικό σταματάει η διαδικασία και δίνει τελικό αποτέλεσμα των ολικών θειωδών σε mg/l.

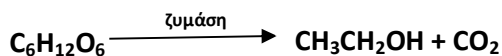
Ολικά θειώδη (Total Sulfite)		
Επιλογή	Εντολή	Σχόλια
PERCENT ALCOHOL	NO	Από το μενού του οργάνου επιλέγετε τη λειτουργία ελεύθερα / ολικά θειώδη (Free/Total Sulf)
FREE/TOTAL SULF	YES	
CAL/FLUSH DISPEN	NO	Έχει ήδη γίνει από τη προηγούμενη διαδικασία (της ολικής οξύτητας) οπότε δεν χρειάζεται ξανά Πατάτε την επιλογή NO
CH2 REDOX ELEC	YES	Είναι ήδη από τη προηγούμενη διαδικασία. Πατάτε την επιλογή YES
1-FREE 2-TOTAL	Press 2	Πατάτε το 2 για να επιλέξετε το μενού των ολικών θειωδών
1-LO 2-HIGH		Δύο κλίμακες μέτρησης η χαμηλή (LO) για τιμές μεταξύ 30 – 70 mg/L και η υψηλή (HIGH) για τιμές μεταξύ 50 – 150 mg/L. Επιλέγετε την αντίστοιχη κλίμακα ανάλογα με το αποτέλεσμα που αναμένετε στο δείγμα.
25ML WINE IN BTL	YES	Τοποθετείτε 25 ml κρασί στο πλαστικό ποτηράκι ανάλυσης
RED BTL B ADDED?	YES	Προστίθενται στο διάλυμα 0.5 ml NaOH (10 N) και πατάτε την επιλογή YES
IS 10 MINUTES UP?	YES	Περιμένετε να περάσουν 10 λεπτά και πατάτε την επιλογή YES
ADD POUCH	YES	Προστίθενται 0.1 gr NaHCO ₃ στο διάλυμα και πατάτε την επιλογή YES
RED BTL C ADDED?	YES	Προστίθενται 2 ml H ₂ SO ₄ (10 N) στο διάλυμα και πατάτε την επιλογή YES
ELECT IN WINE	YES	Ετοιμάζετε τη διάταξη στο «DISPENSER» τοποθετείτε μέσα στο διάλυμα το ηλεκτρόδιο το σύστημα ανάδευσης ενώ έξω από το διάλυμα βρίσκεται το

		<p>PROBE του «DISPENSER» από το οποίο θα γίνεται η σταδιακή εισαγωγή του τιτλοδότη.</p> <p>Πατάτε YES για να αρχίσει η διαδικασία.</p> <p>Αρχικά μετράει το δυναμικό του διαλύματος, προσθέτει σταδιακά ποσότητα τιτλοδότη, αναδεύει, μετράει ξανά το δυναμικό. Μόλις σταματήσει να βλέπει διαφορές στο δυναμικό σταματάει η διαδικασία και δίνει τελικό αποτέλεσμα σε mg/lit</p>
ANOTHER SAMPLE?	NO	Πατάτε την επιλογή NO
		<p>Κλείσιμο διαδικασίας:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ξεπλένετε με τον υδροβολέα το σύστημα τιτλοδότησης • Ξεπλένετε το ηλεκτρόδιο redox • Αλλάζετε τη φιάλη του τιτλοδότη από το διάλυμα I₂ σε H₂O και πατάτε dispenser για ξέπλυμα



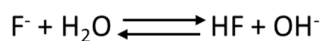
4^η Ανάλυση: Ποσοστό Αλκοόλης

Η αιθανόλη είναι το κύριο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης κατά την οποία πραγματοποιείται αναερόβια διάσπαση γλυκόζης και φρουκτόζης σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα.

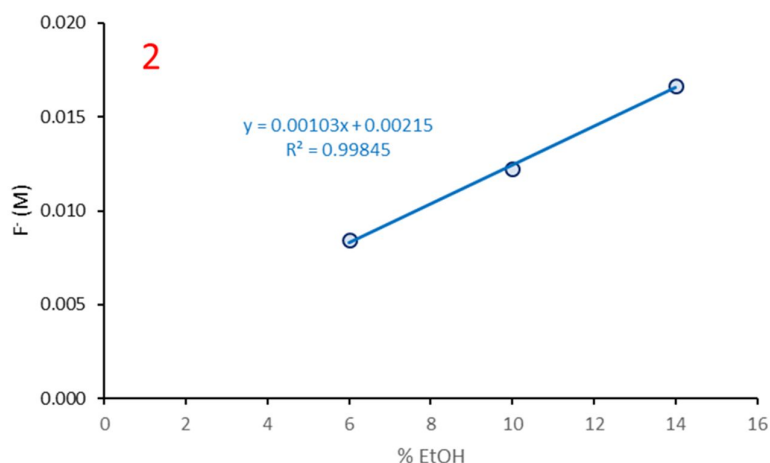
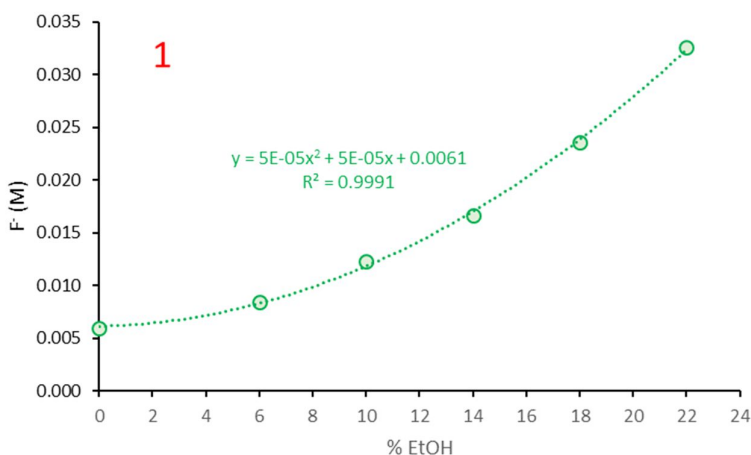
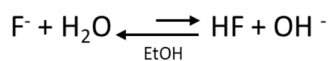


Η ποσότητα της αιθανόλης που παράγεται εξαρτάται από πολλούς παράγοντες: τη ποσότητα των σακχάρων που ζυμώνονται, τους μύκητες, τη θερμοκρασία και τις άλλες συνθήκες ζύμωσης. Το ποσό της αιθανόλης είναι πολύ σημαντικό για τη γεύση του κρασιού, η αιθανόλη δεν έχει έντονη οσμή αλλά προσθέτει “bouquet” στα επιτραπέζια κρασιά ιδίως στα κόκκινα. Αν η αιθανόλη περιέχεται σε ποσοστό μικρότερο από 10% το κρασί έχει πικρή γεύση και είναι εύκολο να αλλοιωθεί αν δεν προσεχθεί η συντήρησή του, τα διάφορα αλκοολούχα ποτά έχουν διαφορετικό ποσοστό αλκοόλης στα κρασιά συνήθως κυμαίνεται μεταξύ **12 με 15 %**.

Η μέτρηση γίνεται με ένα έμμεσο τρόπο με τη χρήση ενός επιλεκτικού ηλεκτροδίου ιόντων φθορίου (F^-). Ένα υδατικό διάλυμα που περιέχει ιόντα φθορίου θα βρίσκεται πάντα σε ισορροπία με τη μορφή του οξέος του.



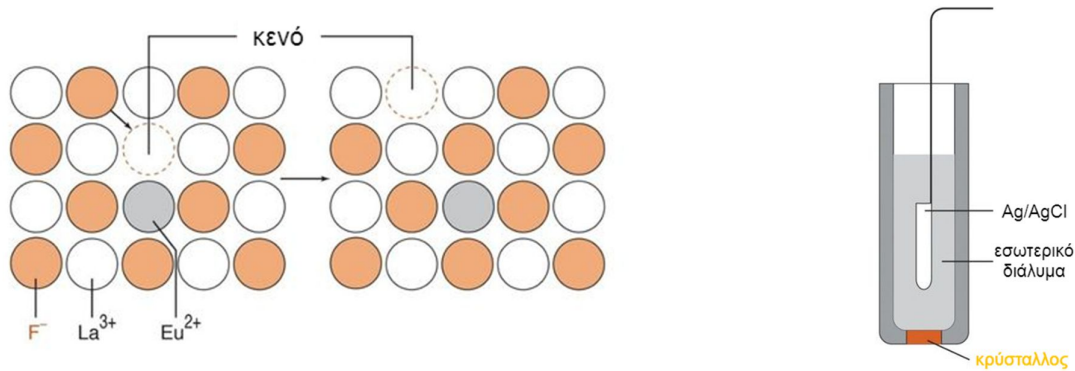
Όταν στο διάλυμα περιέχεται ποσότητα αιθανόλης σύμφωνα με την αρχή Le Chatelier η χημική ισορροπία της μετατοπίζεται προς τη μορφή του ιόντων φθορίου με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων. Έτσι όση περισσότερη ποσότητα φθορίου καταγράφεται στο διάλυμα τόσο περισσότερη θα είναι και η περιεκτικότητα του σε αλκοόλη.



Στο παραπάνω διάγραμμα (1) φαίνεται πως αυξάνει η ποσότητα του ελεύθερου φθορίου με την αύξηση του ποσοστού αιθανόλη στο διάλυμα καθώς μειώνεται η διαλυτότητα του HF μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την μεριά των ιόντων. Στην περιοχή 6 – 14% EtOH που είναι η συνήθης περιοχή της περιεκτικότητας σε αλκοόλη στα κρασιά είναι γραμμική (διάγραμμα 2).

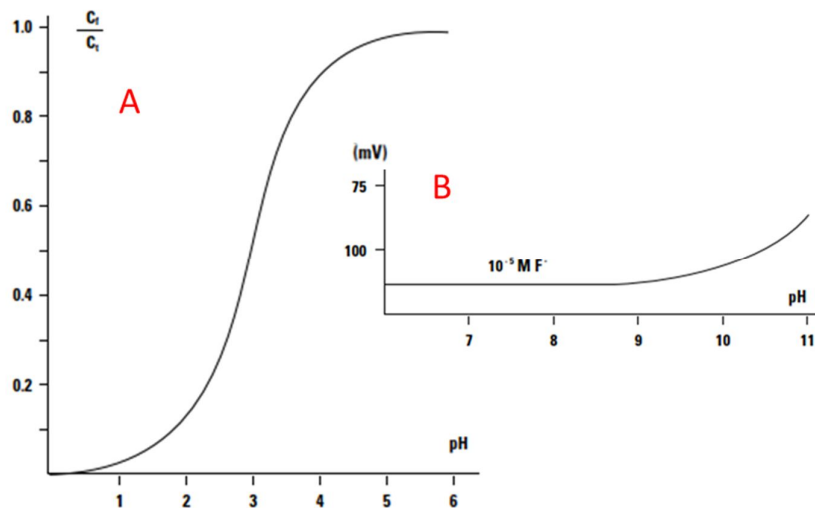
Για την ανίχνευση των ελεύθερων ιόντων φθορίου θα χρησιμοποιηθεί ένα επιλεκτικό ηλεκτρόδιο ιόντων (EHI) φθορίου. Είναι ένα επιλεκτικό ηλεκτρόδιο στερεάς κατάστασης, περιέχει ένα ανόργανο κρύσταλλο κατασκευασμένο από LaF_3 με προσμίξεις EuF_2 . Οι προσμίξεις EuF_2 έχουν δημιουργήσει κενές θέσεις στον κρύσταλλο από LaF_3 , με αποτέλεσμα ένα ιόν F^- να μπορεί να μετακινείται στο κενό αφήνοντας

μια άλλη κενή θέση πίσω του. Με τον τρόπο αυτό το F⁻ μετακινείται μέσα στον κρύσταλλο από την μια μεριά στην άλλη. Το ηλεκτρόδιο ανταποκρίνεται καλύτερα στο ιόν του φθορίου από οποιαδήποτε άλλο ιόν, η μόνη παρεμπόδιση που μπορεί να έχει είναι από τον ιόν του υδροξυλίου που ο συντελεστής επιλεκτικότητας είναι 0.1.



Το EHI F⁻ επηρεάζεται από την τιμή του pH του διαλύματος, τόσο σε όξινα όσο και σε βασικά διαλύματα. Σε διαλύματα με pH μικρότερο του 5 τα ιόντα υδρογόνου συμπλέκονται με ένα μέρος των ιόντων φθορίου σχηματίζοντας HF ή HF₂⁻ τα οποία δεν μπορούν να ανιχνευθούν από το ηλεκτρόδιο. Για να απελευθερωθεί το σύμπλοκο φθόριο, το pH του διαλύματος πρέπει να ρυθμιστεί στη περιοχή από ασθενώς όξινη έως ασθενώς βασική (διάγραμμα A).

Σε βασικά διαλύματα που περιέχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε φθόριο (λιγότερο από 10⁻⁴ M) και σε pH 9.5 ή παραπάνω το ηλεκτρόδιο ανταποκρίνεται εκτός από το ιόν φθορίου και ιόν υδροξειδίου (διάγραμμα B). Ρύθμιση του pH μεταξύ 5 και 6 με τη χρήση ενός ρυθμιστικού διαλύματος εξαλείφει κάθε σφάλμα υδροξειδίου και συμβαίνει μικρή μετατροπή του F⁻ σε HF και HF₂⁻.



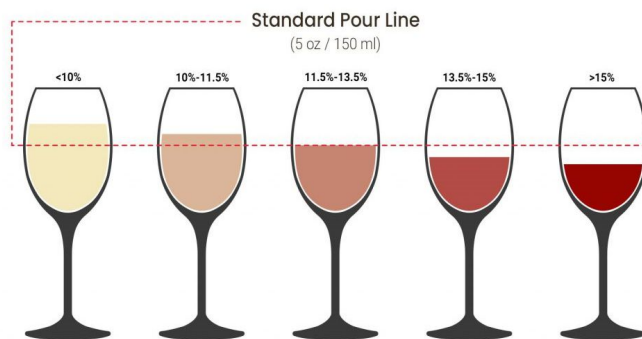
Αρχικά γίνεται βαθμονόμηση του ηλεκτροδίου με διαδοχική βύθιση του σε πρότυπα διαλύματα που περιέχουν 14 %, 10 % και 6 % αιθανόλη (από το πιο πυκνό στο πιο αραιό). Κατά την βαθμονόμηση καταγράφεται το δυναμικό του ηλεκτροδίου το οποίο αντιστοιχεί σε συγκέντρωση ιόντων φθορίου και αυτό αντιστοιχίζεται σε ποσοστό αλκοόλης και το όργανο δημιουργεί μια καμπύλη βαθμονόμησης του δυναμικού ως προς τη ποσότητα αλκοόλης του διαλύματος. Κατά την μέτρηση του δείγματος καταγράφεται το δυναμικό των ιόντων φθορίου και με βάση τη καμπύλη βαθμονόμησης υπολογίζεται αυτόματα το ποσοστό αλκοόλης στο δείγμα.

Διαδικασία:

Τοποθετείτε σε πλαστικό δοχείο 25ml δείγματος κρασιού με τη χρήση σιφωνίου πλήρωσεως και προστίθενται 5ml διαλύματος EDTA/NaF (0.01M/0.1M) που περιέχει και το ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COOH/CH₃COONa (0.3M/1.7M) με τη χρήση πιπέτας ακριβείας μεταβλητού όγκου. Η προσθήκη του EDTA γίνεται επειδή στο κρασί υπάρχουν πολλά μεταλλικά κατιόντα τα οποία επηρεάζουν την ισορροπία της αντίδραση με τα ιόντα φθορίου, το EDTA τα δεσμεύει αυτά. Η προσθήκη του NaF είναι απαραίτητη μιας και το δείγμα από κρασί δεν περιέχει ιόντα φθορίου, θα πρέπει να προσθέτουν στην ανάλογη ποσότητα ώστε να έχει την ίδια αρχική συγκέντρωση με τα πρότυπα διαλύματα. Το ρυθμιστικό διάλυμα είναι απαραίτητο για την ρύθμιση του pH κοντά στο 5.5 ώστε να αποφευχθούν οι παρεμποδίσεις από τα υδροξύλια και να αποφευχθεί ο σχηματισμός HF και HF₂⁻. Αφού γίνουν οι απαραίτητες αυτές ρυθμίσεις, τοποθετείτε το ηλεκτρόδιο στο δείγμα αρχικά καταγράφεται το δυναμικό του, με τη χρήση της καμπύλης βαθμονόμησης το όργανο θα δώσει τελική τιμή σε ποσοστό % αλκοόλης.

Ποσοστό Αλκοόλης (Percent Alcohol)		
Επιλογή	Εντολή	Σχόλια
PERCENT ALCOHOL	YES	Από το μενού του οργάνου επιλέγετε τη λειτουργία ποσοστό αλκοόλης (PERCENT ALCOHOL)
CH2 FL ELEC ON	YES	Συνδέετε το ηλεκτρόδιο στη θέση 2 (αριστερή υποδοχή). Πατάτε την επιλογή YES
CALIBRATE ELEC?	YES	Επιλέγετε την βαθμονόμηση του επιλεκτικού ηλεκτροδίου φθορίου. Πατάτε την επιλογή YES
ELEC IN GRN BTL A	YES	Τοποθετείτε το ηλεκτρόδιο μέσα στο πρότυπο διάλυμα με συγκέντρωση αλκοόλης 14 % (διάλυμα Α). Πατάτε την εντολή YES, περιμένετε να σταθεροποιηθεί και να γράψει RDY Προσοχή: δεν πατάτε YES, γράφετε πρώτα τη τιμή του πρότυπου διαλύματος (δηλ. 14) και στη συνέχεια πατάτε YES
ELEC IN GRN BTL B	YES	Τοποθετείτε το ηλεκτρόδιο μέσα στο πρότυπο διάλυμα με συγκέντρωση αλκοόλης 10 %(διάλυμα Β). Πατάτε την εντολή YES, περιμένετε να σταθεροποιηθεί και να γράψει RDY Προσοχή: δεν πατάτε YES, γράφετε πρώτα τη τιμή του πρότυπου διαλύματος (δηλ. 10) και στη συνέχεια πατάτε YES
ELEC IN GRN BTL C	YES	Τοποθετείτε το ηλεκτρόδιο μέσα στο πρότυπο διάλυμα με συγκέντρωση αλκοόλης 6%(διάλυμα C). Πατάτε την εντολή YES, περιμένετε να σταθεροποιηθεί και να γράψει RDY Προσοχή: δεν πατάτε YES, γράφετε πρώτα τη τιμή του πρότυπου διαλύματος (δηλ. 6) και στη συνέχεια πατάτε YES

25ML WINE IN BTL	YES	Τοποθετείτε 25 ml κρασί στο πλαστικό ποτηράκι ανάλυσης
GRN BTL D ADDED?	YES	Προστίθενται 5 ml διαλύματος EDTA/NaF / CH ₃ COOH/CH ₃ COONa (διάλυμα D). Πατάτε την εντολή YES
ELECT IN WINE	YES	Τοποθετείτε το ηλεκτρόδιο του φθορίου στο διάλυμα, το όργανο δίνει το ποσοστό της αλκοόλης στο διάλυμα (PCT, επί τις εκατό)
ANOTHER SAMPLE?	NO	Πατάτε την επιλογή NO
		Κλείσιμο διαδικασίας: <ul style="list-style-type: none"> Ξεπλένετε το ηλεκτρόδιο φθορίου



Αποτελέσματα και ανάλυση:

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα σε ένα δείγμα από κρασί θα είναι:

Παράδειγμα:

Παράμετρος	Τιμή
Σάκχαρα (gr/l)	1.0
Ελεύθερη οξύτητα (pH)	3.254
Ολική οξύτητα (gr/l)	5.079
Ελεύθερα θειώδη (mgr/l)	19.8
Συνολικά θειώδη (mgr/l)	92.2
Αλκοόλη %	11.7

- Τα **σάκχαρα** έχουν τιμή 1.0 g/l που χαρακτηρίζει το κρασί ξηρό.
- Το **pH** είναι 3.254 οπότε το κρασί θα έχει μια φρουτώδη γεύση.
- Η **ολική οξύτητα** είναι 5.079 g/l που είναι μέσα στα θεσμοθετημένα όρια.
- Τα **ελεύθερα θειώδη** είναι 19.8 mg/l και τα **συνολικά θειώδη** 92.2 mg/l που δίνει στο κρασί μια ικανοποιητική προστασία.
- Το **ποσοστό της αλκοόλης** είναι 11.7 % κατατάσσοντας το στα ελαφριά κρασιά.

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 Ι:



<https://www.chemistry.uoc.gr/eclass/modules/document/?course=CHEM-UNDER114>

Youtube:



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

Ερωτήσεις:

1. Σάκχαρα:

- Ποια είναι τα επικρατέστερα σάκχαρα στο μούστο;
- Τι εκφράζει η ξηρότητα του κρασιού;
- Τι περιέχει η ταμπλέτα για την ανάλυση των σακχάρων;

2. Οξύτητα:

- Ποια είναι τα κύρια οξέα που περιέχονται στο κρασί;
- Τι είναι η ελεύθερη οξύτητα;
- Σε τι τιμές pH κυμαίνεται το κρασί;
- Ποια είναι η διαφορά μεταξύ ελεύθερης και ολικής οξύτητας;
- Ποιος είναι ο τιτλοδότης κατά τη μέτρηση της ολικής οξύτητας;
- Σε τι εκφράζεται η ολική οξύτητα;
- Τι διαλύτης χρησιμοποιείται για την βαθμονόμηση του dispenser;

3. Θειώδη:

- Γιατί γίνεται οξίνιση στο κρασί;
- Ποιος είναι ο τιτλοδότης;
- Γιατί προστίθεται NaHCO_3 στο κρασί;
- Γιατί προστίθενται NaOH ;
- Γιατί προστίθενται 2ml H_2SO_4 και όχι 1 ml κατά τη μέτρηση των ολικών θειώδων;
- Γιατί δεν θα πρέπει να γίνεται υπέρβαση των τιμών σε SO_2 στο κρασί;
- Τι διασφαλίζουν τα θειώδη στο κρασί;

4. Αλκοόλη:

- Πως δημιουργείται η αιθανόλη στο κρασί;
- Πως επηρεάζει το ποσοστό αλκοόλης τη ποιότητα ενός κρασιού;
- Γιατί προστίθεται EDTA στο κρασί πριν τη μέτρηση;
- Ποιες αντιδράσεις πραγματοποιούνται στη διαδικασία;
- Σε τι τιμές pH πρέπει να είναι το δείγμα πριν τη μέτρηση;
- Βαθμονόμηση ηλεκτροδίου με τι διαλύματα αιθανόλης γίνεται για το ποσοστό αλκοόλης;
- Για ποιο λόγο προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα;

Άσκηση – Ανάλυση Λιπαρών Υλών - Ελαιόλαδο

Σκοπός της άσκησης είναι:

Η ανάλυση λιπαρών υλών και ειδικότερα ελαιόλαδου ως προς τους φυσικοχημικούς παραμέτρους που χαρακτηρίζουν τη ποιότητά του και εξοικείωση των φοιτητών με φασματοφωτόμετρο UV-Vis.

Η οξείδωση των λιπαρών υλών και κυρίως του λαδιού, προέρχεται από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο και έχει ως αποτέλεσμα το ταγγισμό αλλά και τη παραγωγή διάφορων ανεπιθύμητων οσμών. Επίσης, οξείδωση των λιπαρών υλών προκαλείται και από την έκθεση τους στη θερμοκρασία καθώς όσο μεγαλύτερη είναι η θερμοκρασία τόσο επιταχύνεται αλλοίωση και αύξηση της οξείδωσης τους. Τα μέταλλα και κυρίως ο σίδηρος και ο χαλκός ενεργούν σαν καταλύτες στην οξείδωση των λιπαρών υλών. Τέλος ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά και προκαλεί αλλοίωση είναι η ήδη ύπαρξη των ελεύθερων λιπαρών οξέων ακόμα και σε συγκέντρωση μικρότερη από 0.5%.



Η οξείδωση των λιπαρών υλών από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο (αυτοοξείδωση) έχει σημασία για:

- την ανάπτυξη του ταγγισμού (αλλοίωση της γεύσης του λαδιού)
- τη παραγωγή διαφόρων οσμών ανεπιθύμητων και μη
- το πολυμερισμό των πολυακόρεστων λαδιών
- τη παραγωγή ενώσεων με σημαντική φυσιολογική δράση

Οι μεταβολές που συμβαίνουν κατά την οξείδωση των λιπαρών υλών γίνονται από πολύπλοκες αντιδράσεις μεταξύ πολυσύνθετων ουσιών. Έτσι, για τη κατανόηση των παραπάνω διαδικασιών, μελετήθηκαν οι αντιδράσεις απλούστερων ουσιών όπως οι μεθυλεστέρες των οξέων ελαϊκού, λιγνελικού, και λινολενικού.

Γενικά τα πρώτα προϊόντα οξείδωσης είναι διάφορα ακόρεστα υδροϋπεροξειδία τα οποία υφίστανται περαιτέρω αλλοίωση προς ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους ή προς ενώσεις παραπλήσιου μοριακού βάρους και τέλος ενώσεις μεγαλύτερου μοριακού βάρους.

- μικρότερου μοριακού βάρους (μετά από σχάση της αλυσίδας)
- ή παρόμοιου μοριακού βάρους (προϊόντα οξειδοαναγωγής)
- ή μεγαλύτερου μοριακού βάρους (μετά από διμερισμό ή πολυμερισμό)

Το φαινόμενο της αυτοοξείδωσης των λιπαρών υλών καθώς και των παραγόντων που το επηρεάζουν, διακρίνεται σε τρεις χρονικές περιόδους μέσω της μελέτης της ταχύτητας με την οποία αυτό εξελίσσεται. Οι τρεις αυτοί περίοδοι είναι οι εξής:

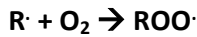
1. Περίοδος έναρξης:

κατά την οποία γίνεται η έναρξη της αλυσιδωτής αντίδρασης.



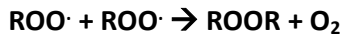
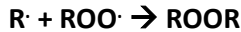
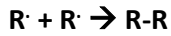
2. Περίοδος διάδοσης:

κατά την οποία γίνεται διάδοση της αλυσιδωτής αντίδρασης. Στη περίοδο αυτή, γίνεται απορρόφηση του οξυγόνου και σχηματίζεται ελεύθερη ρίζα υπεροξειδίου ($ROO\cdot$) στη συνέχεια το υπεροξειδίο καθώς και η ρίζα του αλκυλίου.

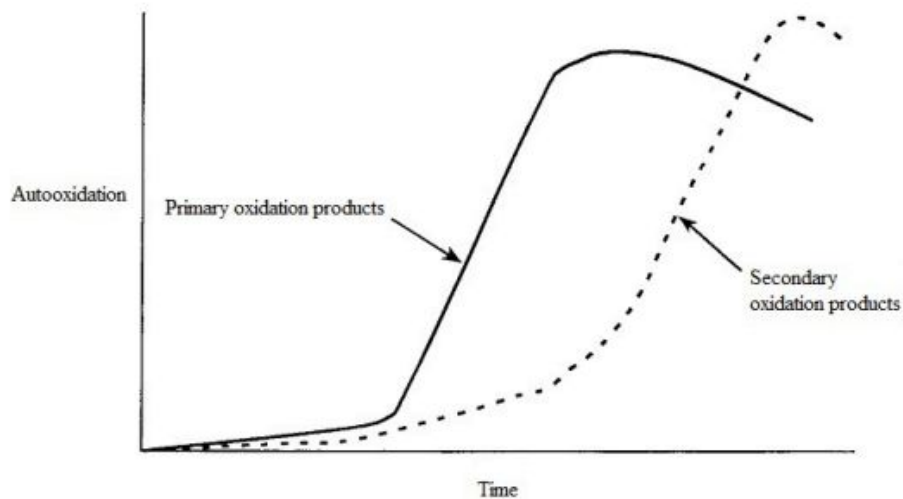


3. Περίοδος τερματισμού:

κατά την οποία γίνεται ο τερματισμός της αλυσιδωτής αντίδρασης (καθώς γίνονται αντιδράσεις μεταξύ ριζών).



Η αξιολόγηση του βαθμού οξείδωσης του ελαιόλαδου βασίζεται σε προσδιορισμούς τόσο των πρωτογενών προϊόντων όσο και των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης. Στο πρωτογενές στάδιο της οξείδωσης σχηματίζονται υδροϋπεροξειδία από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μέσω ενός μηχανισμού ελεύθερων λιπαρών ριζών. Ο αριθμός υπεροξειδίων είναι μία παράμετρος η οποία αυξάνει ανάλογα με τις συνθήκες αποθήκευσης και συντήρησης του ελαιόλαδου (ύπαρξη οξυγόνου, φως, θερμοκρασία και χρόνος συντήρησης). Μετά την επίτευξη μιας μέγιστης τιμής, ο αριθμός υπεροξειδίων μειώνεται, λόγω σχηματισμού δευτερογενών προϊόντων τάγγισης.



Τα βασικά κριτήρια που χρησιμοποιούνται για χαρακτηρίσουν τη ποιότητα ενός ελαιόλαδου είναι:

- **Η Οξύτητα:**

Δείχνει τη περιεκτικότητα των οξέων στο ελαιόλαδο. Υψηλές οξύτητες παράγονται όταν το ελαιόλαδο προέρχεται από καρπό είναι πολύ ώριμος, ή προσβεβλημένος από ασθένειες ή από το κακό τρόπο συλλογής, καθώς επίσης όταν οι ελιές παραμείνουν για μεγάλο διάστημα στις αποθήκες. Στις περιπτώσεις αυτές αναπτύσσονται πολλοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι προκαλούν υδρόλυση των τριγλυκεριδίων, αποτέλεσμα αυτής της δράσης είναι η δημιουργία ελεύθερων λιπαρών οξέων αλλά και οξέων αλυσίδας μικρού μήκους (οξικού, προπιονικού, κ.λπ.) δίνοντας έτσι στο ελαιόλαδο μειονεκτικά χαρακτηριστικά, όπως δυσάρεστη οσμή.

- **Ο Αριθμός των Υπεροξειδίων (AY):**

Δείχνει το βαθμό οξείδωσης του ελαιόλαδου σε πρωταρχικό στάδιο. Τα υπεροξειδία είναι χημικές ενώσεις που δημιουργούνται από την αντίδραση του οξυγόνου με το ελαιόλαδο. Ο αριθμός τους προσδιορίζει, πόσο προχωρημένη είναι η οξείδωση του και επιτρέπει να εκτιμηθεί η ηλικία του καθώς και

για το είδος της αποθήκευσής του (καλής ή κακής). Υψηλά υπεροξειδία σημαίνει ότι το ελαιόλαδο έχει υποστεί οξειδωτικές αλλοιώσεις και έτσι θα έχει μικρή αντοχή στο χρόνο, η μέγιστη επιτρεπόμενη τιμή για το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο είναι τα 20 meqO₂/Kg.

Η οξείδωση μπορεί να είναι ενζυματική ή χημική:

- Η ενζυματική οξείδωση οφείλεται στη δράση των λιποξειδασών, ενζύμων που υπάρχουν στον ελαιόκαρπο.
- Η χημική οξείδωση γίνεται κατά τη διάρκεια της συντήρησης του ελαιόλαδου μέσω ενός μηχανισμού σχηματισμού ελεύθερων ριζών

- **Η σταθερά K₂₃₂:**

Υπολογίζεται από την απορρόφηση στα 232 nm που οφείλεται στα υδροϋπεροξειδία τα οποία είναι συζυγή διένια και παράγονται σε ένα πρωταρχικό στάδιο οξείδωσης. Ακόμη και το παρθένο ελαιόλαδο που έχει ληφθεί από υγιή ελαιόκαρπο, εμφανίζει κορυφή στα 232 nm. Ένα λάδι που είναι φρέσκο έχει μεγάλη τιμή σε αυτό το μήκος κύματος λόγω των διενίων. Η απορρόφηση σημειώνει μια μέγιστη τιμή και μετά παρατηρείται σταδιακή μείωση που οφείλεται στη διάσπαση των υπεροξειδωμένων λιπαρών οξέων προς δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης.

Αποτελεί ένα δείκτη για το ενδιάμεσο ποσοστό οξείδωσης του ελαιόλαδου.

- **Η σταθερά K₂₇₀:**

Υπολογίζεται από την απορρόφηση στα 270 nm λόγω το σχηματισμό δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης όπως καρβονυλικές ενώσεις (κετόνες και αλδεΐδες), οι οποίες είναι δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης ή **συζυγή** τριένια τα οποία παράγονται όταν το ελαιόλαδο υποβάλλεται σε βιομηχανική επεξεργασία.

Η τιμή του συντελεστή απορρόφησης K₂₇₀ εξαρτάται από το πόσο **φρέσκο είναι το ελαιόλαδο**, όσο πιο παλιό είναι το λάδι τόσο πιο μεγάλη απορρόφηση έχει στα 270 nm. Η τιμή αυτής της σταθερά είναι πολύ χαμηλή αμέσως μετά τη παραγωγή του και αυξάνεται με τη πάροδο της ηλικίας του ελαιόλαδου. Η έκθεσή στην ηλιακή ακτινοβολία ή σε υψηλές θερμοκρασίες επιταχύνουν τη πρόοδο της γήρανσης

Αποτελεί ένα δείκτη της ανθεκτικότητας του ελαιόλαδου στην οξείδωση

Η τιμή των σταθερών K υπολογίζεται από το τύπο $K=A/C$ και αντιστοιχεί στην απορρόφηση σε πάχος κυψελίδας 1cm με βάρος ελαίου 1g σε 100ml διαλύτη.

Όπου: A είναι η απορρόφηση στο επιθυμητό μήκος κύματος και C η συγκέντρωση του διαλύματος σε g στα 100 ml διαλύματος.

- **Ο δείκτης R:**

Είναι ένας επιπλέον δείκτης για τον έλεγχο της οξειδωτική κατάσταση του ελαιόλαδου, για το προσδιορισμό του, χρησιμοποιούνται οι τιμές των K₂₃₂ και K₂₇₀. Δίνεται από τον τύπο

$$R = \frac{K_{232}}{K_{270}}$$

Τα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα έχουν τιμές μεταξύ 10 με 15.

- **Ο δείκτης ΔΚ:**

Είναι ένας δείκτης της ποιότητας και καθαρότητας των ελαιόλαδων. Χρησιμοποιείται ως δείκτης νοθείας δηλ. για πιθανή ανάμιξη με **σπορέλαια**

Η απόκλιση αυτή προσδιορίζεται από το τύπο:

$$\Delta K = K_{\max} - \frac{K_{(\max+4)} + K_{(\max-4)}}{2}$$

Όπου υπολογίζεται αρχικά η μέγιστης τιμής (Κμ) εξασθένησης του φωτός στη περιοχή 260-280nm, όπου αφού βρεθεί γίνεται ακόμα μέτρηση και σε μήκη κύματος κατά 4 nm μεγαλύτερα και 4 nm μικρότερα αυτών της μέγιστης (πχ αν η Κμ είναι στα 260 nm, γίνεται μια επιπλέον μέτρηση στα 256 και μία στα 264 nm).



Ανάλογα με τις τιμές των παραμέτρων, το ελαιόλαδο κατατάσσεται σε μία από τις παρακάτω κατηγορίες:

	Έξτρα παρθένο	Παρθένο	Κοινό παρθένο	Μειονεκτικό παρθένο	Εξευγενισμένο (ραφιναρισμένο)
Οξύτητα (%)	< 0.8	< 2.0	< 3.3	> 3.3	< 0.5
Αριθμός Υπεροξειδίων (meqO ₂ /Kg)	< 20	< 20	< 20	> 20	< 5
συντελεστής K ₂₃₂	< 2.50	< 2.60	< 2.60	< 3.70	< 3.40
συντελεστής K ₂₇₀	< 0.20	< 0.25	< 0.25	> 0.25	< 1.20
Δείκτης ΔΚ	< 0.01	< 0.01	< 0.01	-	< 0.16

Στη άσκηση μετρούνται όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά σε ένα ελαιόλαδο με εξαίρεση την οξύτητα του και κατατάσσεται στην αντίστοιχη κατηγορία.

Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια – Όργανα:

- Χλωροφόρμιο (CH₃Cl)
- Οξικό οξύ (CH₃COOH)
- Ιωδιούχο Κάλιο (KI)
- Διάλυμα θειοθειικού νατρίου 0.1 N (Na₂S₂O₃)
- Άμυλο
- Ισοοκτάνιο
- Κωνικές φιάλες των 250 ml

- Πιπέτες ακριβείας μεταβλητού όγκου
- Σιφώνια
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Ογκομετρικές φιάλες
- Ποτήρια ζέσεως
- Προχοΐδα των 50 ml
- Ζυγός των 3 δεκαδικών
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού (UV-Vis) διπλής δέσμης
- Κυψελίδες από χαλαζία (quartz) των 1 cm

Παράμετροι:

- **Μήκη κύματος φασματοφωτόμετρου:** 232, 256, 260, 264, 270, 280 nm

Ο έλεγχος της οξειδωτικής κατάστασης των λιπαρών υλών πραγματοποιείται:

1. Μέτρηση του Αριθμού Υπεροξειδίων με ιωδομετρική τιτλοδότηση.
2. Μέτρηση φασματοφωτομετρικών παραμέτρων με φασματοφωτόμετρο UV/VIS.

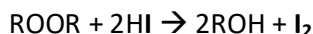
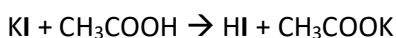
1. Μέτρηση του Αριθμού Υπεροξειδίων με τιτλοδότηση.

Ο προσδιορισμός του αριθμού των υπεροξειδίων βασίζεται στην οξείδωση του ιωδιούχου καλίου (KI) σε θερμοκρασία δωματίου και σε όξινο περιβάλλον από το ενεργό οξυγόνο των υπεροξειδίων. Το ιώδιο που απελευθερώνεται ογκομετρείται με διάλυμα θειοθειικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Η συνήθης έκφραση του αριθμού αυτού είναι σε χιλιοστοϊσοδύναμα υπεροξειδικού οξυγόνου ανά κιλά λιπαρής ύλης (meqO_2/Kg). Άλλες εκφράσεις του ΑΥ είναι σε $\text{mmoleO}_2/\text{Kg}$ και mgO_2/g . Υπάρχει η εξής αντιστοιχία μεταξύ τους :

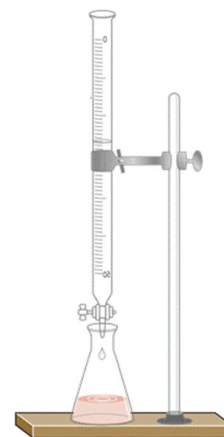
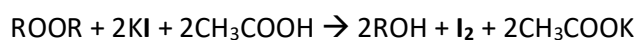
$$1 \text{ mmoleO}_2/\text{Kg} = 2 \text{ meqO}_2/\text{Kg} = 32 \text{ mgO}_2/\text{g}$$

Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται με αυτή τη μέθοδο είναι οι εξής:

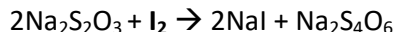
Στο δείγμα από ελαιόλαδο προστίθεται διαλύτης χλωροφόρμιο (CHCl_3), ποσότητα οξικού οξέος (CH_3COOH) και κορεσμένο διάλυμα KI και τοποθετείτε σε **σκοτεινό** μέρος όπου πραγματοποιείται η παρακάτω αντίδραση κατά τη οποία τα ιόντα του ιωδίου (I^-) **οξειδώνονται** σε ιώδιο (I_2) μέσω των υπεροξειδίων:



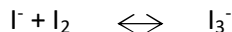
ή



Όσα περισσότερα υπεροξειδία υπάρχουν, τόσο περισσότερο I_2 παράγεται, στη συνέχεια γίνεται τιτλοδότηση με το θειοθειικό νάτριο ($Na_2S_2O_3$). Κατά τη διάρκεια της τιτλοδότησης το I_2 αντιδρά με το $Na_2S_2O_3$, η αντίδραση συμβαίνει στην υδατική φάση και για το λόγο αυτό χρειάζεται ισχυρή ανάδευση:



Η ανίχνευση γίνεται με διάλυμα αμύλου, καθώς στο διάλυμα υπάρχει περίσσεια KI, αντιδράει με το I_2 σύμφωνα με τη παρακάτω αμφίδρομη αντίδραση:



Έτσι όσο υπάρχει I_2 στο διάλυμα θα υπάρχει σε ισορροπία και το I_3^- , αυτό είναι που ανιχνεύεται με το δείκτη του αμύλου. Το άμυλο μαζί με το I_3^- δίνει ένα σύμπλοκο που έχει ένα μωβ χρώμα, το χρώμα αυτό σταματήσει να δημιουργείται όταν όλο το I_2 καταναλωθεί από το θειοθειικό νάτριο και έτσι θα σταματήσει να δημιουργείται το I_3^- , δίνοντας ένα άχρωμο διάλυμα.

Διαλύματα:

Αρχικά πλένονται πολύ καλά όλα τα σκεύη που θα χρησιμοποιηθούν και τοποθετούνται σε φούρνο για να φύγει όλη η υγρασία **μόνο** οι κωνικές φιάλες των 250 ml και οι ογκομετρικές φιάλες των 25 ml. Μόλις στεγνώσουν αφαιρούνται από το φούρνο ώστε όταν χρησιμοποιηθούν να είναι σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια δημιουργούνται τα παρακάτω διαλύματα:

A. Δείκτης αμύλου (1% w/v σε 50 ml H_2O):

Σε διάλυμα 1% w/v στα 100 ml θα είναι 1 gr αμύλου, οπότε στα 50 ml θα αντιστοιχούν 0.5 gr αμύλου, ζυγίζετε την ποσότητα του αμύλου σε ζυγό 3, δεκαδικών δεν χρειάζεται μεγάλη ακρίβεια για τη παρασκευή αυτή. **Η διάλυση γίνεται σε απιονισμένο νερό σε βρασμό, το τελικό διάλυμα θα πρέπει να είναι διαυγές και σε θερμοκρασία δωματίου.**

B. Κορεσμένο διάλυμα KI:

Ζυγίζετε 4 gr **ιωδιούχου καλίου** σε ζυγό 3 δεκαδικών και το διαλύετε σε 3 ml απιονισμένο νερό σε μικρό ποτήρι βρασμού, δεν χρειάζεται μεγάλη ακρίβεια για τη παρασκευή αυτή.

Μόλις παρασκευαστεί το διάλυμα KI φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος.

Γ. Διάλυμα $Na_2S_2O_3$ (0.002 N $Na_2S_2O_3$ σε 100 ml H_2O)

Γίνεται αραιώση από πυκνό διάλυμα που $Na_2S_2O_3$ 0.1 N που σας δίνεται από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου. Με βάση το νόμο της αραιώσης θα είναι:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \rightarrow V_1 = C_2V_2/C_1 \rightarrow V_1 = 0.002N \cdot 100ml / 0.1N \rightarrow V_1 = 2 \text{ ml}$$

Οπότε θα πάρετε 2 ml με την χρήση πιπέτα ακριβείας, από το αρχικό διάλυμα και θα τα αραιώσετε σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml με απιονισμένο νερό.

Το διάλυμα θα πρέπει να παρασκευαστεί με ακρίβεια καθώς θα χρησιμοποιηθεί ως τιτλοδότης.

Στη συνέχεια ετοιμάζονται τα δείγματα από ελαιόλαδο

Με τη χρήση πιπέτα paster, ζυγίζετε ποσότητα λαδιού σε κωνικές φιάλες των 250 ml απαλλαγμένες από υγρασίας. Αρχικά έχουν τοποθετηθεί στο φούρνο για να απομακρυνθεί η υγρασία και έχουν έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, **κατά τη ζύγιση η κωνική πρέπει να είναι σε θερμοκρασία δωματίου, διαφορετικά δεν θα μπορέσει να σταθεροποιηθεί ο ζυγός καθώς θα μεταβάλλεται διαρκώς η υγρασία της κωνικής.**

Όλα τα δείγματα λαδιού ζυγίζονται αυστηρά μόνο στο ζυγό ακριβείας 3 δεκαδικών.

Το εύρος της κάθε ζύγισης πρέπει να είναι μεταξύ 1.2 και 2.0 g, ανά φιάλη δηλ. με διασπορά, δηλ. το πρώτο δείγμα να είναι κοντά στα 1.2 gr, το επόμενο κάπου στη μέση και το τρίτο κοντά στα 2.0 gr. Οι ποσότητες του ελαιόλαδου που χρησιμοποιείται είναι σχετικά μεγάλες επειδή τα περισσότερα ελαιόλαδα που κυκλοφορούν στη περιοχή της Κρήτης είναι στη κατηγορία του έξτρα παρθένου και έτσι αναμένονται χαμηλές τιμές υπεροξειδίων.

Η προετοιμασία των δειγμάτων δεν γίνεται ταυτόχρονα, ολοκληρώνεται πρώτα η κάθε τιτλοδότηση και στη συνέχεια γίνεται η προετοιμασία του επόμενου δείγματος για την επόμενη τιτλοδότηση (πραγματοποιούνται συνολικά τρεις ογκομετρήσεις).



Διαδικασία:

Στη κωνική που περιέχει το δείγμα από το λάδι, στον απαγωγό προστίθενται 10 ml Χλωροφόρμιο (CHCl_3), 15 ml Οξικό οξύ (CH_3COOH) και 1 ml από το κορεσμένο διάλυμα KI. Αναδεύονται καλά για ένα λεπτό και στη συνέχεια τοποθετούνται σε σκοτεινό μέρος για 5 λεπτά.

Ακριβώς μετά το τέλος των 5 λεπτών προστίθενται 75 ml νερού (με την ακρίβεια ογκομετρικού κυλίνδρου), προστίθεται 1 ml από το διάλυμα του αμύλου και το δείγμα αποκτά ένα μωβ χρώμα. Στη συνέχεια τιτλοδοτείται με το διάλυμα του $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.002 N μέχρι τον αποχρωματισμό του. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία άλλες δύο φορές ώστε τελικά να έχουν γίνει τρεις τιτλοδοτήσεις.

Στη συνέχεια υπολογίζετε ο αριθμός των υπεροξειδίων σε χλιοστοϊσοδύναμα υπεροξειδικού οξυγόνου (meqO_2/Kg) σύμφωνα με το παρακάτω τύπο:

$$\text{A.Y.} = \frac{1000 \cdot (\alpha) \cdot N}{\beta}$$

Όπου: **α:** ο όγκος του $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ σε ml

N: Η κανονικότητα του τιτλοδότη $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ που είναι 0.002 N

β: Το βάρος του δείγματος σε gr

Με το τρόπο αυτό υπολογίζεται ο αριθμός των υπεροξειδίων σε meqO_2/Kg για τις 3 τιτλοδοτήσεις:

2. Μέτρηση φασματοφωτομετρικών παραμέτρων με φασματοφωτόμετρο UV/VIS Διαδικασία

Με τη χρήση πιπέτα paster, ζυγίζετε ποσότητα λαδιού κοντά 0.25 gr σε ζυγό τριών δεκαδικών σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml που είναι απαλλαγμένη από την υγρασία και διαλύετε με 25 ml ισοοκτανίου. Το διάλυμα τοποθετείτε σε κυψελίδα από χαλαζία και σε μια δεύτερη κυψελίδα τοποθετείτε ποσότητα ισοοκτανίου η οποία θα χρησιμοποιηθεί ως τυφλό δείγμα (blank).



Στη συνέχεια γίνονται μετρήσεις απορρόφησης στα 232, 270 nm για να υπολογιστούν οι σταθερές K_{232} και K_{270} , καθώς επίσης μετρήσεις και στα 260 και 280 nm για να υπολογιστεί η μέγιστη απορρόφηση στη περιοχή 260 με 280 nm

Τέλος γίνονται δύο ακόμα μετρήσεις απορρόφησης σε μήκη κύματος +4 και -4 nm από το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης. Αν για παράδειγμα η μέγιστη απορρόφηση είναι στα 260 nm θα γίνουν δύο επιπλέον μετρήσεις στα 256 και 264 nm.

**Ιδιαίτερη προσοχή στη χρήση και στο πλύσιμο
των κυψελίδων από χαλαζία**

Υπολογίζονται όλοι οι παράμετροι:

- K_{232}
- K_{270}
- R
- ΔK



Μαζί με τον αριθμό υπεροξειδίων (AY) που υπολογίστηκε στο πρώτο μέρος γίνεται κατηγοριοποίηση για την οξειδωτική κατάσταση του δείγματος λαδιού.

Αποτελέσματα και ανάλυση:

Στο πρώτο μέρος της άσκησης πραγματοποιήσατε τρεις ογκομετρήσεις με διάλυμα $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.002 N. Σε κάθε τιτλοδότηση έχει καταγραφεί η μάζα του ελαιόλαδου που ζυγίστηκε καθώς και ο όγκος κατανάλωσης του $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ σε ml.

Παράδειγμα:

Τιτλοδότηση	Μάζα (gr)	όγκος $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (ml)
1	1.252	8.10
2	1.515	9.50
3	1.952	12.4

Σε κάθε τιτλοδότηση υπολογίζετε ο αριθμός των υπεροξειδίων σύμφωνα με το παρακάτω τύπο:

$$A.Y. = \frac{1000 * (\alpha) * N}{\beta}$$

Όπου: α : ο όγκος του $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ σε ml

N : Η κανονικότητα του τιτλοδότη $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ που είναι 0.002 N

β : Το βάρος του δείγματος σε gr

Με το τρόπο αυτό υπολογίζεται ο αριθμός των υπεροξειδίων σε meqO_2/Kg για τις 3 τιτλοδοτήσεις:

Τιτλοδότηση	ΑΥ (meqO ₂ /Kg)
1	12.9
2	12.5
3	12.7

Από τις τιμές των Α.Υ. θα υπολογιστεί η μέση τιμή τους ($\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N}$)

καθώς και η τυπική τους απόκλιση ($s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$) δίνοντας τελικό αποτέλεσμα:

$$A.Y. = 12.7 \pm 0.2$$

Στο δεύτερο μέρος της άσκησης υπολογίζονται οι σταθερές K₂₃₂, K₂₇₀ καθώς και οι παράμετροι R και ΔΚ. Οι τιμές που καταγράφηκαν είναι:

Παράδειγμα:

Παράμετρος	Τιμή
Μάζα ελαιόλαδου (gr)	0.258
Απορρόφηση 232 nm	1.619
Απορρόφηση 270 nm	0.127
Απορρόφηση 260 nm	0.182
Απορρόφηση 280 nm	0.103
Απορρόφηση 256 nm	0.259
Απορρόφηση 264 nm	0.209

- **Υπολογισμός σταθερών K₂₃₂ και K₂₇₀ :**

Οι σταθερές K υπολογίζονται διαρρέοντας τη απορρόφηση στο αντίστοιχο μήκος κύματος με τη συγκέντρωση του διαλύματος εκφραζόμενη σε % w/v

$$K = \frac{A}{C}$$

Αρχικά υπολογίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος εκφραζόμενη σε % w/v. Τα 0.258 g ελαιόλαδου έχουν διαλυθεί σε 25 ml ισοοκτάνιο, έτσι με τη μέθοδο των τριών, στα 25 ml αντιστοιχούν 0.258 άρα στα 100 ml θα αντιστοιχούν 1.032

Οπότε η σταθερά K₂₃₂ θα είναι:

$$K_{232} = \frac{A}{C} = \frac{1.619}{1.032} = 1.569$$

αντίστοιχα η σταθερά K₂₇₀ θα είναι:

$$K_{270} = \frac{A}{C} = \frac{0.127}{1.032} = 0.123$$

- **Υπολογισμός δείκτη R :**

Υπολογίζεται από το λόγο των δύο σταθερών

$$R = \frac{K_{232}}{K_{270}} = 12.8$$

- **Υπολογισμός δείκτη ΔΚ :**

Υπολογίζεται από το τύπο:

$$\Delta K = K_{\max} - \frac{K_{(\max+4)} + K_{(\max-4)}}{2}$$

Αρχικά υπολογίζονται οι σταθερές K_{256} και K_{264} από τις απορροφήσεις στα 256 και 264 nm αντίστοιχα, δίνοντας $K_{256} = 0.251$ και $K_{264} = 0.203$ οπότε το $\Delta K = -0.051$.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα για ένα δείγμα ελαιόλαδο θα είναι:

Παράμετρος	Τιμή
A.Y.	12.7
K_{232}	1.569
K_{270}	0.123
R	12.8
ΔK	-0.051

Με τις παραμέτρους αυτούς το αναλυόμενο ελαιόλαδο τοποθετείτε στη κατηγορία του έξτρα παρθένου.

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 I:



<https://www.chemistry.uoc.gr/eclass/modules/document/?course=CHEM-UNDER114>

Youtube:



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

Ερωτήσεις:

1. Για ποιο λόγο χρησιμοποιούνται κυψελίδες από χαλαζία;
2. Ποιο είναι το όριο του ΑΥ για το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο;
3. Η τιτλοδότηση για το προσδιορισμό των ΑΥ με τι διάλυμα γίνεται;
4. Γιατί χρησιμοποιήσατε ΚΙ στην τιτλοδότηση;
5. Ποια προϊόντα οξείδωσης απορροφούν στη περιοχή των 270 nm;

Ασκήσεις:

- 1) Υπολογίστε τον ΑΥ για τις παρακάτω πειραματικές μετρήσεις και δώστε τη μέση τιμή τους και τη τυπική απόκλιση ακολουθώντας τους κανόνες των σημαντικών και δεκαδικών ψηφίων:

	Γραμμάρια Λαδιού	Όγκος $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ σε ml
1 ^η	1.216	10.1
2 ^η	1.410	12.0
3 ^η	1.615	13.2

- 2) Με τις παρακάτω πειραματικές μετρήσεις υπολογίστε τα K_{232} , K_{270} , ΔK , R, θεωρώντας ότι η συγκέντρωση του δείγματος προς ανάλυση ήταν $C=0.985$ (g/100ml) :

Μήκος κύματος (nm)	Απορρόφηση
232	1.927
260	0.170
270	0.136
280	0.124
264	0.153
256	0.213

Άσκηση – Αγωγιμομετρία

Σκοπός της άσκησης είναι:

Η χρήση τεχνικών αγωγιμομετρίας για την εύρεση της συγκέντρωσης αγνώστων διαλυμάτων

Η αγωγιμομετρία είναι μια μέθοδος ανάλυσης που βασίζεται στη μέτρηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας διαλυμάτων. Είναι μια από τις αρχαιότερες μεθόδους ανάλυσης η οποία συνεχίζει να χρησιμοποιείται για ορισμένες αναλύσεις και ειδικότερα στα εργαστήρια φυτολογίας και εδαφολογίας. Η αγωγιμομετρία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν άμεση αλλά και σαν έμμεση μέθοδος ανάλυσης.



Τα διάφορα είδη νερού έχουν διαφορετικές τιμές αγωγιμότητάς λόγω του διαφορετικού φορτίου ιόντων που περιέχουν. Για παράδειγμα το υπερκάρθαρo νερό έχει σχεδόν μηδενικές τιμές αγωγιμότητας, όπως και το απιονισμένο νερό, φτάνοντάς σε τιμές 20 με 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ για το νερό της βροχής και 500 με 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ για το πόσιμο νερό. Μία από της χρήσης της αγωγιμότητας είναι για τον έλεγχο της ποιότητας των νερών, η αγωγιμότητα τους τους οφείλεται στα άλατα που περιέχουν και κυρίως στα ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου. Ανάλογα με τη τιμή της αγωγιμότητάς του νερού μπορεί να κατηγοριοποιηθεί από πολύ μαλακό έως πολύ σκληρό όπου οι συγκεντρώσεις των ιόντων είναι πολύ μεγάλες.

Χαρακτηρισμός νερού	Αγωγιμότητα ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Πολύ μαλακό	0 - 140
Μαλακό (πόσιμο)	140 - 300
Μέτρια μαλακό	300 - 500
Σχετικά σκληρό	500 - 640
Σκληρό	640 - 840
Πολύ σκληρό	> 840

Η **Ηλεκτρική Αγωγιμότητα** είναι το αντίστροφο της αντίστασης και εκφράζει την ευκολία με την οποία περνάει από κάποιο υλικό σώμα το ηλεκτρικό ρεύμα μέσα από κάποιο υλικό. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της αγωγιμότητας του υλικού, τόσο ευκολότερα διέρχεται το ηλεκτρικό ρεύμα απ' αυτό. Η αγωγιμότητα δίνεται σε μονάδες S (siemens) ή mho (ohm^{-1}). $G = \frac{1}{R}$

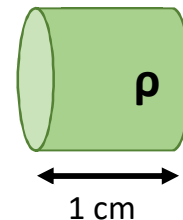
Η **Αντίσταση** εκφράζει τη δυσκολία με την οποία οι φορείς του ρεύματος (ηλεκτρόνια, ιόντα) μπορούν να περάσουν μέσα από αγωγούς, δίνεται σε ohm. $R = \rho \frac{L}{S}$

Όπου: $\rho \rightarrow$ ειδική αντίσταση ($\text{ohm} \cdot \text{cm}$)

$L \rightarrow$ μήκος αγωγού (cm)

$S \rightarrow$ επιφάνεια αγωγού (cm^2)

Ειδική αντίσταση (ρ): Είναι η αντίσταση ενός κυλίνδρου της ουσίας 1cm σε μήκος και 1cm² σε κάθετη επιφάνεια.

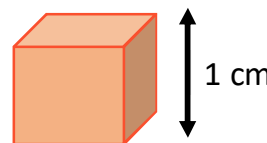


Συνδυάζοντας τις παραπάνω εξισώσεις, η **αγωγιμότητα** γίνεται:

ειδική αγωγιμότητα προς τη σταθερά αγωγιμότητας

$$G = \frac{1}{R} \Rightarrow G = \frac{S}{\rho L} \Rightarrow G = \frac{1}{\rho} \frac{S}{L} \Rightarrow G = G_{\text{ειδ}} \frac{S}{L} \Rightarrow G = G_{\text{ειδ}} \cdot 1/C$$

- Η σχέση L/S δίνει τη **σταθερά αγωγιμότητας** του ηλεκτροδίου και συμβολίζεται με **c** σε μονάδες cm⁻¹.
- Χαρακτηριστική ιδιότητα κάθε αγωγού είναι η **ειδική αγωγιμότητά** του η οποία εξαρτάται από τη φύση του υλικού από το οποίο είναι κατασκευασμένος. Αυτή είναι ίση με την αγωγιμότητα που εμφανίζεται ανάμεσα σε δύο έδρες ενός κύβου κατασκευασμένος από το ίδιο υλικό του αγωγού με ακμή 1cm. Η **ειδική αγωγιμότητα** είναι το αντίστροφο της **ειδικής αντίστασης** $G_{\text{ειδ}} = \frac{1}{\rho}$ σε μονάδες ohm⁻¹ * cm⁻¹ ή S*cm⁻¹



Η αγωγιμότητα μιας ουσίας εξαρτάται από:

- **Το μέγεθος των ιόντων**

Όσο μικρότερα και πιο γρήγορα είναι τα ιόντα, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η ηλεκτρική αγωγιμότητα.

- **Το φορτίο των ιόντων**

μεγαλύτερο φορτίο θα αντιστοιχεί σε μεγαλύτερη αγωγιμότητα

- **Τη ποσότητα των ιόντων.**

Όσο περισσότερα ιόντα υπάρχουν στο διάλυμα, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η αγωγιμότητα.

- **Τη θερμοκρασία.**

Ιονική κινητικότητα αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας.

- **Το διαλύτη.**

Όσο πιο πολικός είναι ο διαλύτης τόσο καλύτερος είναι ο ιονισμός των ουσιών

Αγωγιμομετρικές τιτλοδοτήσεις:

Κάθε ουσία μπορεί να αναλυθεί όταν βρίσκεται σε καθαρή μορφή. Αντιθέτως όταν το διάλυμα περιέχει ακαθαρσίες η ανάλυση πολλές φορές είναι σχεδόν αδύνατη. Σε αυτή τη περίπτωση η αγωγιμομετρική τιτλοδότηση είναι πιο χρήσιμη διότι μπορούν να αναλυθούν διαφορετικά ιόντα στο ίδιο διάλυμα. Η μέθοδος βασίζεται στο ότι ένας τιτλοδότης προστίθεται στο διάλυμα, και η αγωγιμότητα μειώνεται μέχρι το ισοδύναμο σημείο. Μετά το ισοδύναμο σημείο η αγωγιμότητα αυξάνει. Με αυτόν το τρόπο δημιουργείται ένα διάγραμμα με σχήμα V, με το ισοδύναμο σημείο να είναι στο σημείο αλλαγής.

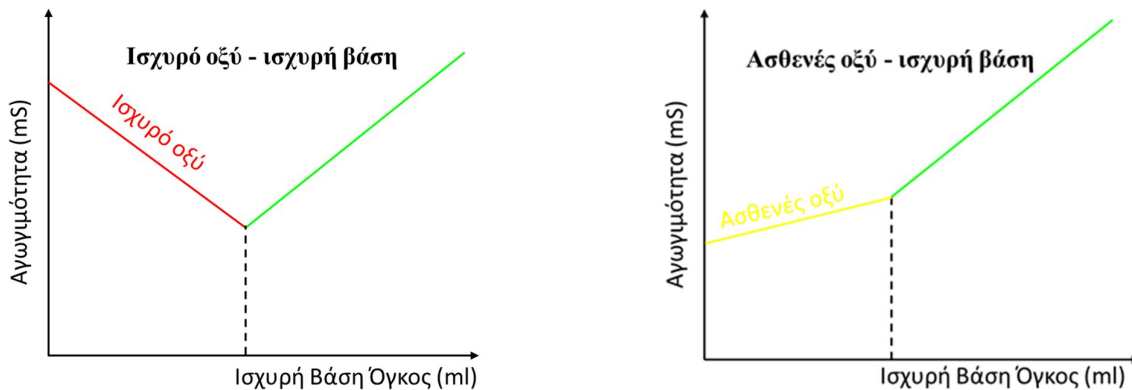
Το ακριβές σχήμα της καμπύλης που δίνεται από τη γραφική παράσταση της αγωγιμότητας του διαλύματος ως προς τον όγκο του τιτλοδότη, εξαρτάται από το τιτλοδότη, το τιτλοδοτούμενο διάλυμα και την αντίδραση τιτλοδότησης

Η βασική διαφορά μεταξύ ποτενσιομετρικών και αγωγιμομετρικών τιτλοδοτήσεων είναι ότι οι ποτενσιομετρικές τιτλοδοτήσεις μετρούν το δυναμικό της αναλυόμενης ουσίας, ενώ οι αγωγιμομετρικές τιτλοδοτήσεις μετρούν την ηλεκτρολυτική αγωγιμότητα του αναλύτη.

Αγωγιμομετρικές τιτλοδοτήσεις μπορεί να είναι:

1. Ισχυρό οξύ- με ισχυρή βάση.

Κατά τη τιτλοδότηση ενός ισχυρού οξέος από μια ισχυρή βάση, αρχικά η αγωγιμότητα μειώνεται λόγω της αντίδρασης του πρωτονίου του οξέος με το υδροξύλιο της βάσης δίνοντας νερό, το αλάτι που δημιουργείται έχει μικρότερη αγωγιμότητα από το αρχικό οξύ. Όταν καταναλωθεί τελείως το οξύ, η επιπλέον προσθήκη βάσης θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της αγωγιμότητας. Το ισοδύναμο σημείο είναι στη αλλαγή της καμπύλης.

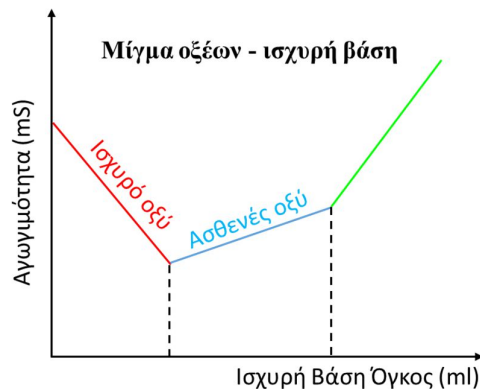


2. Ασθενές οξύ με ισχυρή βάση.

Στη περίπτωση ασθενούς οξέος, αρχικά η αγωγιμότητά του διαλύματος αυξάνεται ελαφρώς, αυτό οφείλεται στο ότι το αλάτι που δημιουργείται από τη εξουδετέρωση του ασθενούς οξέος, δίσταται πλήρως, ενώ το αρχικό οξύ επειδή ήταν ασθενές είχε μερική διάσταση. Μετά την εξουδετέρωση του οξέος η επιπλέον προσθήκη βάσης θα αυξάνει έντονα την αγωγιμότητα του διαλύματος. Δηλ. η αγωγιμότητα συνεχίζει να αυξάνεται και μετά το ισοδύναμο σημείο αλλά με μεγαλύτερο ρυθμό, το ισοδύναμο σημείο είναι στη αλλαγή της κλίσης της καμπύλης.

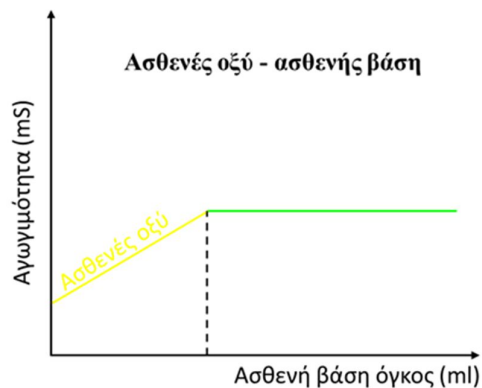
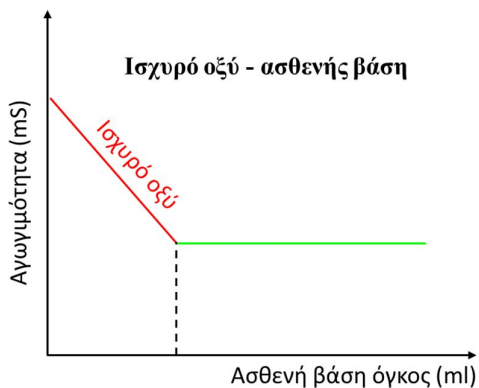
3. Μίγμα οξέων-ισχυρή βάση.

Αν ένα μίγμα ασθενούς και ισχυρού οξέος τιτλοδοτηθεί από ισχυρή βάση, η πρώτη αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η αντικατάσταση των **πρωτονίων** που προέρχονται από το ισχυρό οξύ από τα κατιόντα της βάσεως. Η αγωγιμότητα στο στάδιο αυτό μεταβάλλεται όπως στην απλή περίπτωση της τιτλοδοτήσεως ισχυρού οξέος από ισχυρή βάση (δηλ. μειώνεται), Στη συνέχεια τα μη ιονιζόμενα μόρια του ασθενούς οξέος αντιδρούν με την βάση και αντικαθίστανται από τα ιόντα του σχηματιζόμενου άλατος με αποτέλεσμα την αύξηση της αγωγιμότητας όπως στη περίπτωση τιτλοδοτήσεως ασθενούς οξέος από ισχυρή βάση. Μετά ακολουθεί αύξηση της αγωγιμότητας με μεγαλύτερο ρυθμό. Στη περίπτωση αυτή υπάρχουν δύο ισοδύναμο σημεία, το πρώτο αντιστοιχεί στην εξουδετέρωση του ισχυρού οξέος και το δεύτερο στην εξουδετέρωση του ασθενούς οξέος.



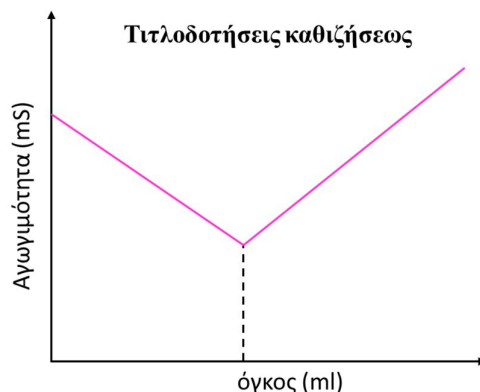
4. Ισχυρό ή ασθενές οξύ με ασθενής βάση.

Όταν οξέα τιτλοδοτούνται με ασθενείς βάσεις, η γραφική παράσταση πριν το ισοδύναμο σημείο είναι όμοια με αυτή που λαμβάνεται κατά την αντίστοιχη τιτλοδότηση με ισχυρή βάση, δηλ. στο ισχυρό οξύ μια έντονη μείωση και στο ασθενές οξύ μια μικρή αύξηση. Μετά το ισοδύναμο σημείο, η αγωγιμότητα παραμένει σταθερή παρά τη συνεχή προσθήκη της ασθενής βάσης λόγω του ότι η περίσσεια της βάσης θα βρίσκεται στο διάλυμα υπό μορφή αδιάστατων μορίων.



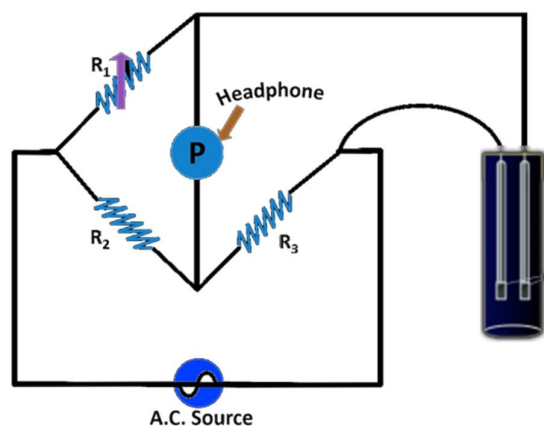
5. Τιτλοδοτήσεις καθιζήσεως.

Καθώς προστίθεται ο τιτλοδότης δημιουργείται ίζημα και έτσι η αγωγιμότητα του διαλύματος μειώνεται, μέχρι το ισοδύναμο σημείο. Στο ισοδύναμο σημείο έχει καταναλωθεί ο αναλύτης και έτσι με τη προσθήκη του τιτλοδότη η αγωγιμότητα θα αρχίσει να μεγαλώνει, δημιουργώντας ένα σχήμα V στο διάγραμμα αγωγιμότητας προς τον όγκο του τιτλοδότη.

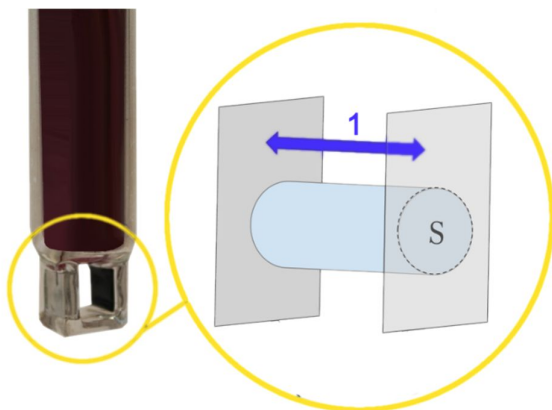


Οργανολογία:

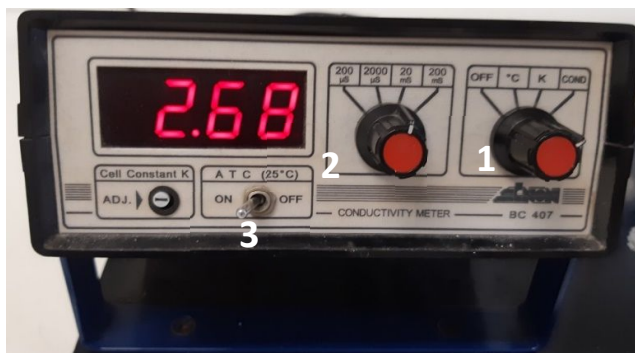
Για τη μέτρηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας χρησιμοποιείται ένα αγωγιμόμετρο, που περιλαμβάνει το ηλεκτρόδιο και ένα αισθητήρα θερμοκρασίας καθώς η θερμοκρασία παίζει σημαντικό ρόλο στη τιμή της αγωγιμότητας η αρχή λειτουργία του οποίου βασίζεται σε μια τροποποιημένη διάταξη της γέφυρας Wheatstone. Σε αντίθεση με τη τυπική γέφυρα Wheatstone, η μία αντίσταση έχει αντικατασταθεί με μια αγωγιμομετρική κυψέλη που περιέχει το ηλεκτρολυτικό διάλυμα. Στην αγωγιμομετρία αυτό που μετράτε είναι η ηλεκτρική αντίσταση του διαλύματος που παρεμβάλλεται μεταξύ των ηλεκτροδίων.



Για τη μέτρηση της αγωγιμότητας των διαλυμάτων συνήθως χρησιμοποιείται ένα αγωγιμόμετρο με ηλεκτρόδια πλατίνας. Αυτό περιλαμβάνει δύο ηλεκτρόδια από μεταλλικά φύλλα πλατίνας (λευκόχρυσος) είναι τοποθετημένα αντιδιαμετρικά, σε συγκεκριμένη απόσταση μεταξύ τους, εντός μιας γυάλινης κυψέλης (κύλινδρος) ικανής να βυθίζεται στο διάλυμα προς ανάλυση. Για την αποφυγή αλλοίωσης τους, είναι κατασκευασμένα από το υλικό αυτό που είναι ένα υλικό πολύ ανθεκτικό και έχει και πολύ καλή ηλεκτρικής αγωγιμότητα. Επίσης είναι επικαλυμμένα με μαύρο λευκόχρυσο (δηλ. μαύρη πλατίνα) με σκοπό αφενός την αύξηση της ενεργούς επιφάνειας τους και αφετέρου τη προστασία τους από φθορές. Για τη μέτρηση της αντίστασης χρησιμοποιείται εναλλασσόμενο ρεύμα επειδή η χρήση συνεχούς ρεύματος θα είχε σαν αποτέλεσμα τη πόλωση του ηλεκτροδίου δημιουργώντας ηλεκτρόλυση του διαλύματος. Η συχνότητα του ρεύματος κυμαίνεται στα 80-20.000 Hz και η τιμή της καθορίζεται αναλόγως το επιθυμητό εύρος μέτρησης. Η ποσότητα του ρεύματος σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση των ιόντων στο διάλυμα.



Το ηλεκτρονικό μέρος του οργάνου αποτελείται από τρεις διακόπτες:



- **Διακόπτης 1:** Ρυθμίζει τη παράμετρο που εμφανίζεται στην οθόνη του οργάνου. Διαθέτει 4 διαφορετικές επιλογές:
 - I. το όργανο να είναι κλειστό (**off**)
 - II. τη θερμοκρασία του διαλύματος (**°C**)
 - III. τη σταθερά κυψέλης του ηλεκτροδίου (**K ή C**)
 - IV. την αγωγιμότητα του διαλύματος (**COND**)
- **Διακόπτης 2:** Ρυθμίζει τη κλίμακα, γενικά όσο χαμηλότερη η κλίμακα τόσο καλύτερη ακρίβεια. Διαθέτει 4 διαφορετικές κλίμακες:
 - I. Μέχρι τα 200 μS
 - II. Μέχρι τα 2000 μS
 - III. Μέχρι τα 20 mS
 - IV. Μέχρι τα 200 mS
- **Διακόπτης 3:** Η αγωγιμότητα μετριέται στη θερμοκρασία του διαλύματος, όταν ο διακόπτης είναι κλειστός δίνει τη τιμή της αγωγιμότητας σε αυτή τη θερμοκρασία, ενώ όταν είναι ανοικτός δίνει τη τιμή της αγωγιμότητας με αναγωγή στους 25°C .

Η εργαστηριακή άσκηση περιλαμβάνει τρία μέρη:

- A. Στο πρώτο μέρος προσδιορίζεται η σταθερά της κυψέλης (C) του ηλεκτροδίου.
- B. Στο δεύτερο μέρος προσδιορίζεται η συγκέντρωση ενός διαλύματος BaCl_2 με τη μέθοδο της αγωγιμομετρικής τιτλοδότησης.
- Γ. Στο τρίτο μέρος προσδιορίζεται η μάζα μιας άγνωστης ποσότητας CaSO_4 μέσω μια καμπύλης αναφοράς με μετρήσεις αγωγιμότητας.

Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια – Όργανα:

- KCl
- Na_2SO_4
- BaCl_2
- CaSO_4
- Ογκομετρικές φιάλες
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Κωνική φιάλη των 250 ml
- Ποτήρια ζέσεως
- Προχοΐδα των 25 ml
- Σιφώνια
- Πιπέτα ακριβείας μεταβλητού όγκου
- Ζυγός ακριβείας των 4 δεκαδικών
- Αγωγιμόμετρο με ηλεκτρόδια πλατίνας
- Σύστημα υπερήχων

Παράμετροι αγωγιμόμετρου:

- **1^ο μέρος:** χωρίς αναγωγή στους 25 °C (διακόπτης 3 κλειστός),
επιλογή κλίμακα στη χαμηλότερη δυνατή (διακόπτης 2)
- **2^ο μέρος:** με αναγωγή στους 25 °C (διακόπτης 3 ανοικτός)
επιλογή κλίμακα στη χαμηλότερη δυνατή (διακόπτης 2)
- **3^ο μέρος:** με αναγωγή στους 25 °C (διακόπτης 3 ανοικτός)
επιλογή κλίμακα στη χαμηλότερη δυνατή (διακόπτης 2)

A. Εύρεση της Σταθερά της Κυψέλης (C):

Θα υπολογιστεί πειραματικά τη σταθερά του ηλεκτροδίου K (ή C). Για τον υπολογισμό θα χρησιμοποιηθεί την εξίσωση:

$$G_{\text{ειδ}} = G \cdot c.$$

Η τιμή του G είναι η τιμή που υπολογίζεται κατά τη διάρκεια του πειράματος από το όργανο, ενώ η τιμή του $G_{\text{ειδ}}$ υπολογίζεται από τη καμπύλη βαθμονόμησης που είναι χαρακτηριστική για κάθε ηλεκτρόδιο και δίνεται από το κατασκευαστή του.

Αρχικά παρασκευάζονται διαλύματα KCl η συγκέντρωση των οποίων εξαρτάται από τη τιμή της σταθερά της κυψελίδας. Στο παρακάτω πίνακα δίνονται οι συγκεντρώσεις του διαλύματος KCl που χρειάζεται να παρασκευαστούν σε σχέση με τις αναμενόμενες τιμές της σταθερά c. Στο συγκεκριμένο ηλεκτρόδιο η θεωρητική τιμή της σταθερά c είναι 1 cm^{-1} , οπότε θα πρέπει να παρασκευαστούν διαλύματα KCl συγκέντρωσης 0.01 M.

Αναμενόμενη σταθερά K (cm^{-1})	Συγκέντρωση Διαλύματος KCl (M)
0.01	0.001
0.1	0.01
1	0.01
10	0.1
50	0.1



Διαδικασία:

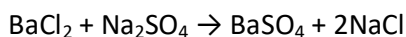
Υπολογίστε τη ποσότητα KCl που πρέπει να ζυγιστεί ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 0.01 M στα 100 ml διαλύματος. Αρχικά θα παρασκευάσετε να διάλυμα 10 φορές πιο πυκνό ώστε να μειωθεί το σφάλμα στην ζύγιση. Ζυγίζετε σε ζυγό των 4 δεκαδικών με ακρίβεια και παρασκευάζεται το αρχικό διάλυμα με συγκέντρωση 0.1 M. Από αυτό θα κάνετε αραιώση ώστε να καταλήγετε στην τελική συγκέντρωση των 0.01 M. Θα κάνετε την αραιώση τρεις φορές και παρασκευάζονται τρία διαφορετικά διαλύματα ίδιας όμως συγκέντρωσης. Με κλειστό το διακόπτη 3 (χωρίς αναγωγή στους 25 °C) μετράτε την αγωγιμότητά των τριών διαλυμάτων καθώς και τη θερμοκρασία τους.



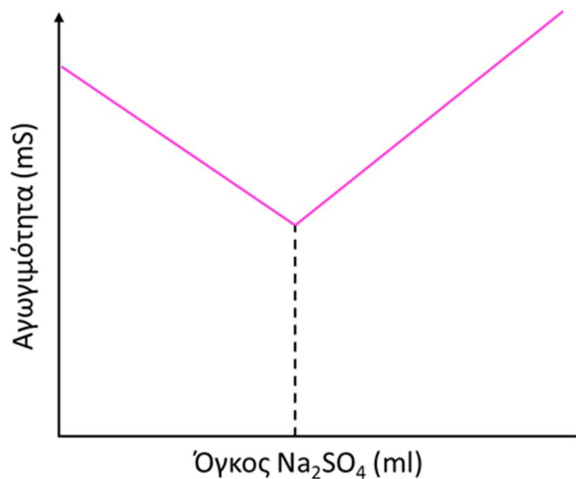
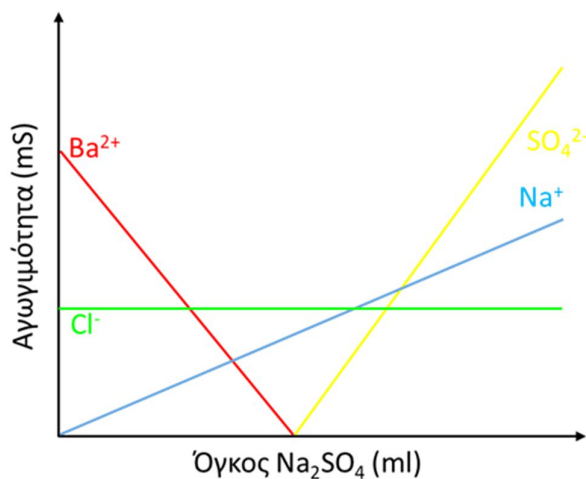
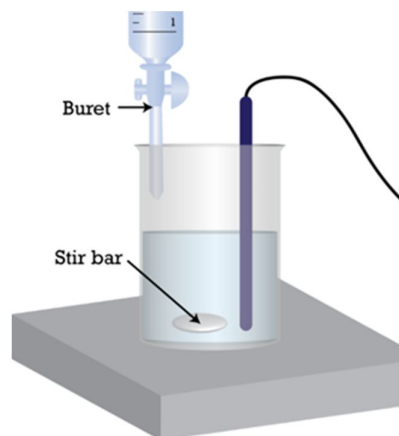
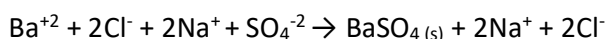
B. Εύρεση της συγκέντρωσης BaCl₂ με Αγωγιμομετρική Τιτλοδότηση:

Είναι μια αγωγιμομετρική τιτλοδότηση καθίζησης. Η μέθοδος βασίζεται στο ότι ένας τιτλοδότης προστίθεται στο διάλυμα και η αγωγιμότητα μειώνεται μέχρι το ισοδύναμο σημείο και μετά το ισοδύναμο σημείο αυτή αυξάνει. Με αυτόν το τρόπο προκύπτει ένα διάγραμμα με σχήμα V στο οποίο το ισοδύναμο σημείο είναι στο σημείο αλλαγής, στο σημείο τομής δηλ. των δύο ευθειών. Το άγνωστο διάλυμα περιέχει BaCl₂ και τιτλοδοτείται με Na₂SO₄ μετρώντας συνεχώς την αγωγιμότητα του διαλύματος.

Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται είναι οι εξής:



ή



Στο διάγραμμα φαίνεται πως θα ήταν η αγωγιμότητα του κάθε ιόντος χωριστά αν ήταν δυνατή η παρακολούθηση της πορείας του. Η τιτλοδότηση ξεκινά με μια αρχική ποσότητα BaCl₂ στην οποία προστίθεται σταδιακά ποσότητα Na₂SO₄ μέσω μιας προχοϊδας. Η μέτρηση της αγωγιμότητας γίνεται στο διάλυμα με το BaCl₂ ανά 0.5 ml προσθήκης προτύπου τιτλοδότη. Ξεκινώντας τη τιτλοδότηση τα ιόντα SO₄²⁻ του τιτλοδότη αντιδρούν με τα ιόντα Ba⁺² που βρίσκονται στο διάλυμα BaCl₂ προς σχηματισμό του άλατος BaSO₄ (s) το οποίο φαίνεται σαν ένα λευκό ίζημα. Όσο προστίθεται Na₂SO₄ η αγωγιμότητα που οφείλεται στα ιόντα Ba⁺² μειώνεται συνεχώς έως ότου αυτά καταναλωθούν πλήρως (ισοδύναμο σημείο). Συνεχίζοντας τη προσθήκη Na₂SO₄ μετά το ισοδύναμο σημείο παρατηρείται αύξηση της αγωγιμότητας λόγω των ιόντων SO₄²⁻ καθώς πλέον δεν υπάρχουν ιόντα Ba⁺² για να αντιδράσουν και άρα παραμένουν ελεύθερα στο διάλυμα. Στα υπόλοιπα ιόντα, η αγωγιμότητα λόγω των ιόντων του Na⁺ ξεκινάει από το 0 καθώς αρχικά δεν υπήρχε ποσότητα ιόντων Na⁺ στο τιτλοδοτούμενο διάλυμα και αφού αυτά δεν συμμετέχουν σε καμία

αντίδραση θα συσσωρεύονται στο διάλυμα και έτσι θα έχουν μια συνεχή αύξηση στην αγωγιμότητα τους (παρατηρείται η συνεχής αύξηση). Τέλος, η αγωγιμότητα των ιόντων Cl^- παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της τιτλοδότησης αφού υπάρχουν από την αρχή στο διάλυμα και δεν αντιδρούν με κάποιο από τα υπόλοιπα ιόντα με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή τους να παραμένει σταθερή.

Το αγωγιμόμετρο δεν διακρίνει τις επιμέρους αγωγιμότητες, μετράει τη συνολική αγωγιμότητα του διαλύματος, η αγωγιμότητα του διαλύματος είναι το άθροισμα των επιμέρους αγωγιμοτήτων του κάθε ιόντος. Το αποτέλεσμα όλων δίνεται στο παρακάτω διάγραμμα. Ο όγκος του Na_2SO_4 που αντιστοιχεί στο σημείο τομής των ευθειών δίνει το ισοδύναμο σημείο.

Διαδικασία:

- Αρχικά παρασκευάζονται 100 ml διαλύματος Na_2SO_4 ακριβούς συγκέντρωσης 0.1 M. Υπολογίζεται η ποσότητα Na_2SO_4 και ζυγίζεται σε ζυγό των 4 δεκαδικών με ακρίβεια ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0.1 M.
- Στη συνέχεια παρασκευάζονται 200 ml διαλύματος BaCl_2 συγκέντρωσης περίπου 0.01 M. Υπολογίζεται η ποσότητα BaCl_2 και ζυγίζεται σε ζυγό των 4 δεκαδικών χωρίς όμως εδώ να είναι απαραίτητη η ακρίβεια στη συγκέντρωση του BaCl_2 λόγω του ότι αυτή θα προσδιοριστεί από τη τιτλοδότηση.

Μεταφέρονται 50 ml από το διάλυμα του BaCl_2 (ακρίβεια ογκομετρικής φιάλης των 50 ml) συγκέντρωσης 0.01 M και τιτλοδοτούνται με το διάλυμα Na_2SO_4 ακριβούς συγκέντρωσης 0.1 M. Κάθε φορά προστίθενται 0.5 ml διαλύματος Na_2SO_4 με τη χρήση της προχοϊδας και καταγράφεται η τιμή της αγωγιμότητας, όλες οι μετρήσεις της αγωγιμότητας γίνονται με αναγωγή της θερμοκρασίας στους 25°C (διακόπτης 3 ανοικτός). Πραγματοποιούνται τόσες μετρήσεις ώστε ο αριθμός των μετρήσεων που γίνεται κατά τη μείωση της αγωγιμότητας να είναι ο ίδιος με αυτόν της αύξησης, ώστε να δημιουργηθούν δύο ευθείες με τον ίδιο αριθμό σημείων.



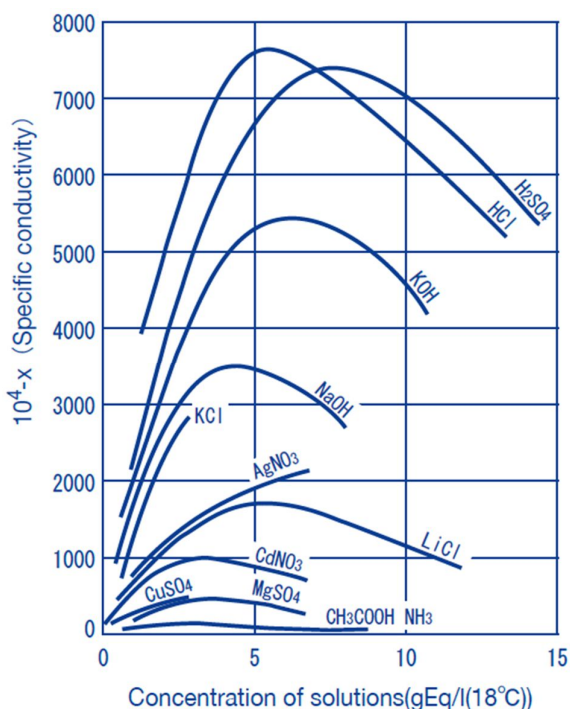
Γ. Εύρεση της συγκέντρωσης αγνώστου CaSO_4 από μετρήσεις αγωγιμότητας μέσω καμπύλη αναφοράς:

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται σωστά σε διαλύματα που περιέχουν μόνο μια διαλυμένη ουσία, (οξύ, βάση, ή άλας). Στη περίπτωση διαλύματος πολλών ουσιών μπορούν να γίνουν μόνο σχετικές μετρήσεις και τα αποτελέσματα να δοθούν σε ισοδύναμη ποσότητα NaCl . Δημιουργείται μια καμπύλη αναφοράς της αγωγιμότητας ως προς τη μάζα της ουσίας και στη συνέχεια η μάζα του αγνώστου δείγματος υπολογίζεται από την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς.

Γενικά οι καμπύλες αυτές δεν είναι γραμμικές για μεγάλο εύρος συγκέντρωσης του άλατος. Καθώς αυξάνει η συγκέντρωση του άλατος, ο βαθμός διάστασης ελαττώνεται και έτσι χάνεται η γραμμικότητα. Πάνω από μια ορισμένη συγκέντρωση επέρχεται κορεσμός της αγωγιμότητας και αυτή η συγκεκριμένη συγκέντρωση δίνει τη τιμή διαλυτότητας του συγκεκριμένου άλατος. Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η μεταβολή της ειδικής αγωγιμότητας διαφόρων αλάτων κατά την αύξηση της συγκέντρωσής τους.

Διαδικασία:

- Παρασκευάζονται 4 διαφορετικά διαλύματα CaSO_4 των 100 ml γνωστής συγκέντρωσης μεταξύ 0.1 έως 2.0 g/l ώστε να είναι μέσα στο γραμμικό εύρος του. Τα 4 αυτά διαλύματα θα πρέπει να έχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις που θα καλύπτουν όλο το παραπάνω εύρος (πχ. Ένα διάλυμα με συγκέντρωση κοντά στο 0.2 g/l, ένα κοντά στο 0.8 g/l, ένα κοντά στο 1.2 g/l και ένα κοντά στο 1.8 g/l).
- Σας δίνεται από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου διάλυμα CaSO_4 άγνωστης συγκέντρωσης, που όμως είναι μέσα όμως στο ίδιο εύρος των πρότυπων διαλυμάτων
- Στη συνέχεια πραγματοποιούνται οι μετρήσεις της αγωγιμότητας σε κάθε διάλυμα (πρότυπα και άγνωστο) με αναγωγή στους 25°C (ο διακόπτης 3 είναι ανοικτός)



Όλες οι ζυγίσεις γίνονται σε ζυγό $4^{\text{ων}}$ δεκαδικών με ακρίβεια δηλ. 0.0000 gr

Αποτελέσματα και ανάλυση:

A. Στο πρώτο μέρος της άσκησης θα έχετε 3 μετρήσεις της αγωγιμότητας και 3 τις θερμοκρασίες των διαλυμάτων.

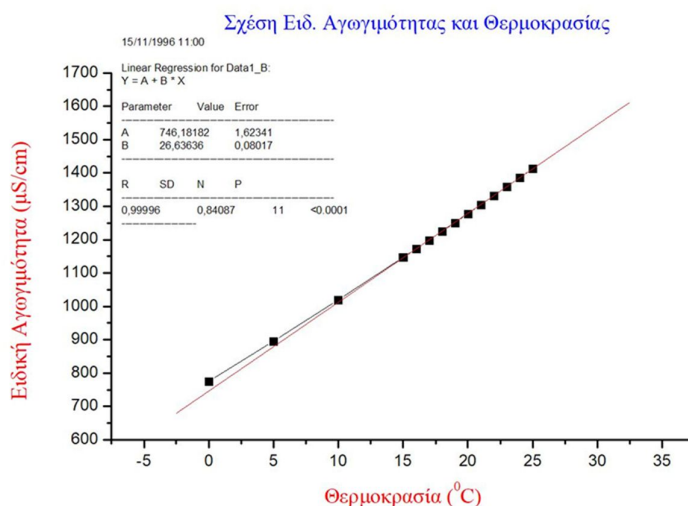
Παράδειγμα:

	Αγωγιμότητα (μS)	Θερμοκρασία ($^{\circ}\text{C}$)
1	1395	23.7
2	1382	23.1
3	1387	23.2

Η σχέση της ειδικής αγωγιμότητάς με τη θερμοκρασία δίνεται από το κατασκευαστή του ηλεκτροδίου και είναι:

$$Y = 26.63636 * X + 746.18182$$

Από αυτήν υπολογίζεται η ειδική αγωγιμότητα για κάθε μέτρηση.



Από το τύπο της αγωγιμότητας η σταθερά της κυψέλης είναι η ειδική αγωγιμότητα προς την αγωγιμότητα του διαλύματος. Με το τύπο αυτό υπολογίζεται η σταθερά της κυψέλης για κάθε μέτρηση

$$G = G_{\text{ειδ}} \frac{1}{C} \rightarrow C = \frac{G_{\text{ειδ}}}{G}$$

	Ειδική αγωγιμότητα $G_{\text{ειδ}}$. ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$)	Σταθερά κυψέλης C (cm^{-1})
1	1373.8309	0.9848
2	1358.4985	0.9830
3	1361.0539	0.9813

Στα αποτελέσματα γίνεται πλήρης στατιστική ανάλυση ακολουθώντας τους κανόνες των σημαντικών και δεκαδικών ψηφίων. Τέλος η μέση τιμή συγκρίνεται με τη θεωρητική τιμή της σταθερά της κυψέλης, υπολογίζοντας το απόλυτο σφάλμα %. Στο αγωγιμόμετρο που χρησιμοποιήθηκε η θεωρητική τιμή της σταθερά κυψέλης είναι 0.950

Θα υπολογίσετε:

- τη μέση τιμή (\bar{x}): $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N} = 0.9830 \text{ cm}^{-1}$
- τη τυπική απόκλιση (Sx): $Sx = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} = 0.0018 \text{ cm}^{-1}$
- τη τυπική απόκλιση της μέσης τιμής ($S\bar{x}$): $S\bar{x} = \frac{Sx}{\sqrt{N}} = 0.0010 \text{ cm}^{-1}$
- το όριο του πληθυσμού (μ): $\mu = \bar{x} \pm t S\bar{x} = 0.9830 \pm 0.0044 \text{ cm}^{-1}$
- το απόλυτο σφάλμα επί τοις εκατό: $\frac{|\text{θεωρητική} - \text{πειραματική}|}{\text{θεωρητική}} \times 100\% = 3.477\% \sim 3.5\%$

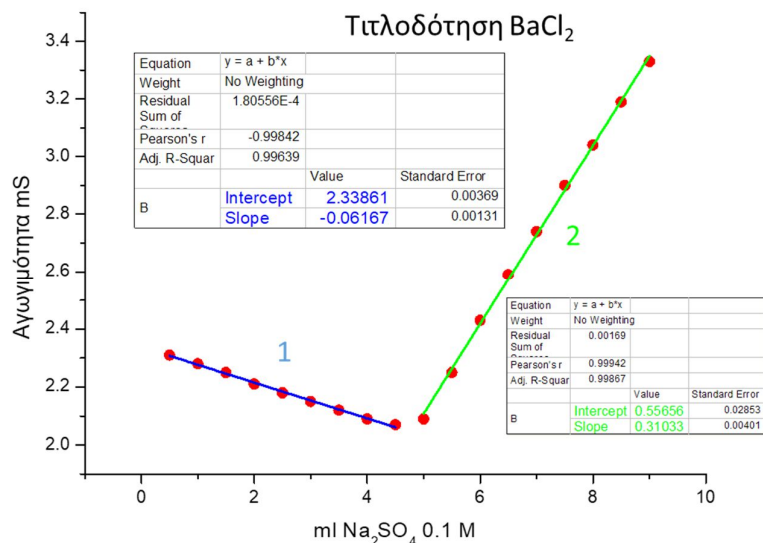
B. Στο δεύτερο μέρος θα υπάρχουν μετρήσεις της αγωγιμότητας ως προς το συνολικό όγκο του τιτλοδότη.

Παράδειγμα:

Βήμα	Όγκος Na ₂ SO ₄ (ml)	Αγωγιμότητα (μS)
1	0.5	2.31
2	1.0	2.28
3	1.5	2.25
4	2.0	2.21
5	2.5	2.18
6	3.0	2.15
7	3.5	2.12
8	4.0	2.09
9	4.5	2.07

Βήμα	Όγκος Na ₂ SO ₄ (ml)	Αγωγιμότητα (μS)
10	5.0	2.09
11	5.5	2.25
12	6.0	2.43
13	6.5	2.59
14	7.0	2.74
15	7.5	2.9
16	8.0	3.04
17	8.5	3.19
18	9.0	3.33

Με τις τιμές αυτές κατασκευάζονται δύο ευθείες (με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων) μία κατά τη μείωση της αγωγιμότητας (ευθεία 1 στο παρακάτω διάγραμμα, $Y = -0.06167 \cdot X + 2.33861$) και μία κατά την αύξηση της αγωγιμότητας (ευθεία 2, $Y = 0.31033 \cdot X + 0.55656$). Οι ευθείες αυτές μπορεί να έχουν μια κοινή τιμή μπορεί και όχι, δεν είναι απαραίτητο.



Το σημείο τομής των δύο ευθειών είναι το ισοδύναμο σημείο ισχύει ότι $Y_1 = Y_2$

οπότε:

$$Y_1 = Y_2 \rightarrow -0.06167 * X + 2.33861 = 0.31033 * X + 0.55656$$

Λύνεται ως προς το X και υπολογίζεται ο όγκος σε ml του Na₂SO₄ με ακρίβεια ενός δεκαδικού όσο ήταν και η ακρίβεια της προχοϊδας που χρησιμοποιήθηκε στη τιτλοδότηση

$$X = 4.7905 = 4.8 \text{ ml}$$

Στο ισοδύναμο σημείο τα mole του BaCl₂ είναι ίσα με τα mole του Na₂SO₄, και υπολογίζεται τη συγκέντρωση του διαλύματος BaCl₂

$$n_{\text{BaCl}_2} = n_{\text{Na}_2\text{SO}_4} \rightarrow$$

$$C_{\text{BaCl}_2} * V_{\text{BaCl}_2} = C_{\text{Na}_2\text{SO}_4} * V_{\text{Na}_2\text{SO}_4} \rightarrow$$

$$C_{\text{BaCl}_2} = 0.009581 = 0.0096 \text{ M}$$

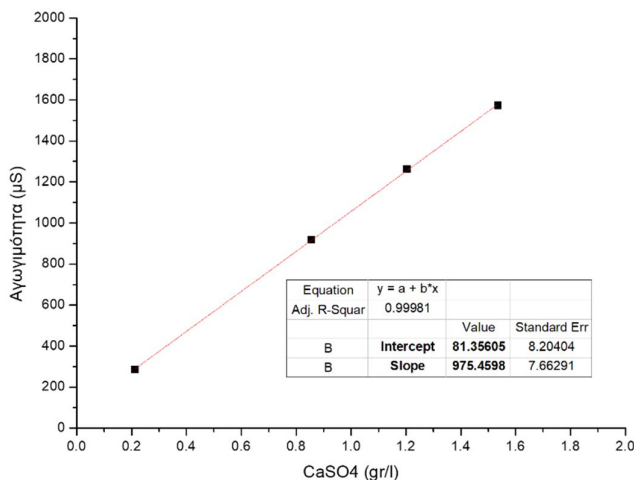
Η στρογγυλοποίηση δεν γίνεται στα ενδιάμεσα στάδια αλλά μόνο στο τελικό αποτέλεσμα ακολουθώντας τους κανόνες και τους περιορισμούς του κάθε σταδίου

Γ. Στο τρίτο μέρος έχουν γίνει μετρήσεις πρότυπων διαλυμάτων CaSO₄ καθώς και ενός αγνώστου δείγματος.

Παράδειγμα:

Διαλύματα CaSO ₄	Συγκέντρωση CaSO ₄ (gr/100ml)	Αγωγιμότητα G (μS)
Δ1	0.0212	285
Δ2	0.0855	918
Δ3	0.1204	1263
Δ4	0.1536	1573
άγνωστο	X	740

Από τις μετρήσεις των γνωστών διαλυμάτων CaSO_4 δημιουργείται μια καμπύλη αναφοράς όπου στον άξονα των Y είναι η αγωγιμότητα σε μS και στον άξονα των X η συγκέντρωση του CaSO_4 σε gr/l και υπολογίζεται η ευθεία με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων .



Υπολογίζεται τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης:

- το όριο ανίχνευσης είναι: $\text{LOD} = \frac{3 \cdot S}{m} = \frac{3 \cdot 7.66291}{975.4598} = 0.023597 = 0.024 \text{ gr/l}$
- και το όριο ποσοτικοποίησης είναι: $\text{LOQ} = \frac{10 \cdot S}{m} = \frac{10 \cdot 7.66291}{975.4598} = 0.078557 = 0.079 \text{ gr/l}$

Υπολογισμός Αγνώστου Δείγματος:

Από τη τιμή της αγωγιμότητας του αγνώστου διαλύματος, υπολογίζεται η συγκέντρωση του CaSO_4 στο άγνωστο διάλυμα σε gr/l και ελέγχεται αν είναι μέσα στα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Στο παραπάνω παράδειγμα η αγωγιμότητα του αγνώστου δείγματος είναι $740 \mu\text{S}$ με την χρήση της καμπύλης βαθμονόμησης η συγκέντρωση του υπολογίζεται σε 0.6752 gr/l . Στη συνέχεια υπολογίζεται η ποσότητα του CaSO_4 σε gr στα 100 ml του διαλύματος που σας δόθηκε, το αποτέλεσμα δίνεται σε 4 δεκαδικά, όσο και η ακρίβεια του ζυγού που χρησιμοποιήθηκε για τη παρασκευή του αγνώστου διαλύματος.

Στο παράδειγμα θα είναι: **μάζα $\text{CaSO}_4 = 0.0675 \text{ g}$**

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 I:



<https://www.chemistry.uoc.gr/eclass/modules/document/?course=CHEM-UNDER114>

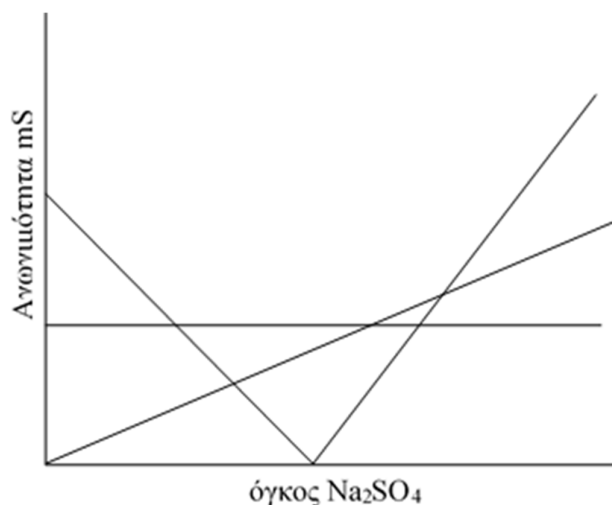
Youtube:



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

Ερωτήσεις:

1. Για ποιο λόγο χρησιμοποιούνται ηλεκτρόδια με επικάλυψη μαύρης πλατίνας στη μέτρηση της αγωγιμότητας;
2. Ποιος είναι ο τύπος της αγωγιμότητας (G), ποιος της ειδικής αγωγιμότητας ($G_{\text{ειδ}}$) και ποιος τις συνδέει μεταξύ τους;
3. Σε διάλυμα KCl η αγωγιμότητά που μετράτε είναι $1200 \mu\text{S}$ και η σταθερά κυψέλης είναι 0.94 cm^{-1} . Υπολογίστε την ειδική αγωγιμότητα.
4. Πάνω σε κάθε γραμμή τοποθετήστε το σωστό ιόν και εξηγήστε γιατί παρουσιάζει την εικόνα αυτή.



5. Για τις παρακάτω μετρήσεις αγωγιμότητας και θερμοκρασίας, βρείτε τις αντίστοιχες σταθερές κυψελίδας και υπολογίστε τη μέση τιμή και τυπική απόκλιση ακολουθώντας τους κανόνες των σημαντικών και δεκαδικών ψηφίων.

Αγωγιμότητα G (μS)	Θερμοκρασία T ($^{\circ}\text{C}$)
1395	23.7
1382	23.1
1387	23.2

6. Κατά την ανάλυση του BaCl_2 , οι εξισώσεις που προέκυψαν ήταν :
 $Y = -0.06167 \cdot X + 2.33861$ κατά τη μείωση της αγωγιμότητας
και $Y = 0.2975 \cdot X + 0.6543$ κατά την αύξηση αυτής.
Υπολογίστε τη συγκέντρωση του άγνωστου διαλύματος σε M . Δίνεται η συγκέντρωση του τιτλοδότη (Na_2SO_4) 0.1 M και ο όγκος του άγνωστου διαλύματος 50 ml .

Άσκηση – Ανάλυση ιόντων K^+ στο νερό με επιλεκτικό Ηλεκτρόδιο

Σκοπός της άσκησης είναι:

Η χρήση επιλεκτικού ηλεκτροδίου ιόντων K για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων του σε πόσιμα νερά.

Το κάλιο αποτελεί ένα πολύ σημαντικό μεταλλικό στοιχείο για τη σωστή λειτουργία ιστών και οργάνων του ανθρώπινου σώματος καθώς πρόκειται για έναν σημαντικό ηλεκτρολύτη. Όπως και το νάτριο, ρυθμίζει το ισοζύγιο υγρών στον οργανισμό, έχει βασικό ρόλο στην επικοινωνία των κυττάρων και τη λειτουργία του μυϊκού συστήματος.



Το εμφιαλωμένο νερό διακρίνεται στις κατηγορίες:

- **Επιτραπέζιο νερό**

Το επιτραπέζιο νερό μπορεί να προέρχεται από γεώτρηση, από λίμνη, από ποτάμι, ακόμη και αφαλατωμένο νερό θάλασσας. Στο επιτραπέζιο νερό επιτρέπεται να γίνει οποιαδήποτε διαδικασία απολύμανσης κρίνεται απαραίτητη, προκειμένου η σύστασή του να είναι σύμφωνη με τη σχετική νομοθεσία για το πόσιμο νερό. Συνήθως τα επιτραπέζια νερά υφίστανται τη διαδικασία της μικρό διήθησης και του οζονισμού (απολύμανση με όζον) ή και χλωρίωση.

- **Φυσικό Μεταλλικό νερό**

Το φυσικό μεταλλικό νερό έχει αποκλειστικά υπόγεια προέλευση και εμφιαλώνεται άμεσα στη πηγή προέλευσής του ώστε να μην επιμολυνθεί με κάποιο τρόπο. Η διεθνής νομοθεσία απαγορεύει την οποιαδήποτε κατεργασία ή απολύμανση του. Η υπόγεια προέλευση του καθώς και η απαγόρευση οποιασδήποτε άλλης δραστηριότητας εξασφαλίζουν τη προστασία του από τυχόν μικροβιακό φορτίο και πιθανές επιμολύνσεις. Επιπλέον, περιέχει μια συγκεκριμένη σταθερή **περιεκτικότητα** σε ανόργανα άλατα και ιχνοστοιχεία, που ορίζεται από το νόμο.



- **Νερό πηγής**

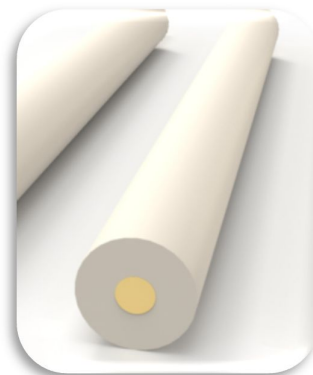
Προέρχεται υποχρεωτικά από υπόγεια πηγή, έχει συγκεκριμένη, σταθερή σύσταση, εμφιαλώνεται άμεσα και δεν επιτρέπεται να υποστεί οποιαδήποτε επεξεργασία απολύμανσης. Σε αντίθεση με το φυσικό μεταλλικό νερό, δεν πρέπει να περιέχει σημαντικές ποσότητες σε μέταλλα και ιχνοστοιχεία, τόσο τα φυσικά όσο και τα χημικά χαρακτηριστικά του είναι παρόμοια με τα χαρακτηριστικά του κοινού πόσιμου νερού.

- **Ανθρακούχο νερό**

Είναι φυσικό μεταλλικό νερό στο οποίο έχει γίνει προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα με τεχνητό ή φυσικό τρόπο

Χημικοί αισθητήρες:

Είναι όργανα που παρακολουθούν την ενεργότητα φορτισμένων ή μη ουσιών σε υγρή ή αέρια φάση. Τα Βασικά χαρακτηριστικά τους είναι η επιλεκτικότητα, η σταθερότητα, η επαναληπτικότητα, ο χρόνος απόκρισης, το όριο ανίχνευσης και ο χρόνος ζωής.



Διακρίνονται στις Κατηγορίες:

- **Στους ηλεκτροχημικούς** που είναι αισθητήρες που μετρούν τις αλλαγές από μεταφορές ηλεκτρονίων που προέρχονται από αντιδράσεις. Συνήθως χρησιμοποιούνται για το καθορισμό συγκεντρώσεων διάφορων ηλεκτρολυτών όπως K^+ , Na^+ , Li^+ , Cl^+ .
- **Στους οπτικούς** που είναι αισθητήρες που ανιχνεύουν αλλαγές στις οπτικές ιδιότητες του περιβάλλοντος, τις οποίες μετατρέπουν σε ηλεκτρικό σήμα.
- **Στους θερμικούς** που βασίζονται στο μετασχηματισμό της θερμικής ενέργειας ή των αποτελεσμάτων της σε αντίστοιχη ηλεκτρική ποσότητα.
- **Στους Μάζας** που είναι αισθητήρες που λειτουργούν στηριζόμενοι στις αλληλεπιδράσεις ειδικών στρωμάτων που περιέχονται στο δείγμα.

Επιλεκτικά Ηλεκτρόδια Ιόντων (ΕΗΙ):

Είναι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες που προσδιορίζουν την ενεργότητα φορτισμένων στοιχείων (ιόντων) με συγκεκριμένη επιλεκτικότητα και τη παρουσία άλλων ιόντων στο διάλυμα.

Διακρίνονται στις Κατηγορίες:

A. ως προς το είδος του ιονομεταφορέα:

- 1) σε Επιλεκτικά Ηλεκτρόδια Ιόντων για **κατιόντα** (κατιονανταλλάκτες, ουδέτεροι ιονομεταφορείς κατιόντων)
- 2) σε Επιλεκτικά Ηλεκτρόδια Ιόντων για **ανιόντα** (κλασικοί ανιονανταλλάκτες, ουδέτεροι ιονομεταφορείς, ενώσεις υποκατάστασης)

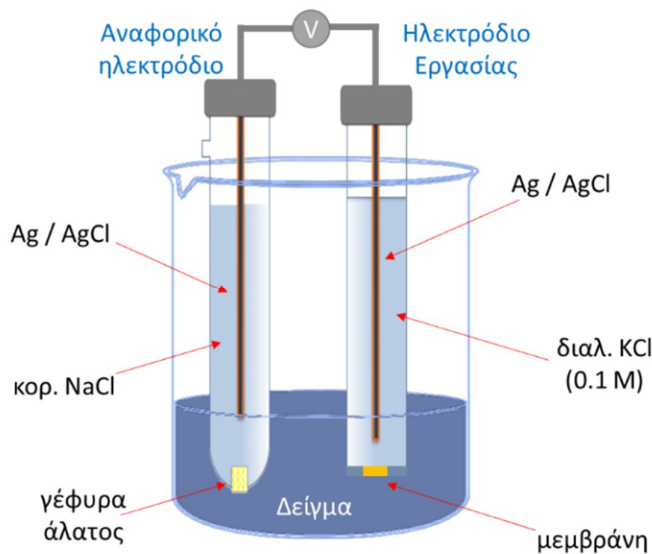
B. ως προς το υπόστρωμα:

- 1) σε Επιλεκτικά Ηλεκτρόδια Ιόντων **στερεής κατάστασης** (πχ άνθρακα)
- 2) σε Επιλεκτικά Ηλεκτρόδια Ιόντων **υγρής μεμβράνης** (πχ πολυμερική μεμβράνη)

Στη συγκεκριμένη άσκηση θα χρησιμοποιηθεί:

Ηλεκτροχημικός Αισθητήρας – Κατιόντων - Υγρής Μεμβράνης

Η διάταξη του πειράματος αποτελείται ένα γαλβανικό στοιχείο το οποίο αποτελείται από 2 ημιστοιχεία: το ένα είναι ηλεκτρόδιο αναφοράς και το άλλο το ηλεκτρόδιο εργασίας καθώς και ένα βολτόμετρο που καταγράφει τη διαφορά δυναμικού μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων. Το ηλεκτρόδιο αναφοράς αποτελείται από Ag με επικάλυψη από AgCl, περιέχει εσωτερικό διάλυμα NaCl και συνδέεται μέσω της γέφυρας άλατος με το δείγμα μέσα στο οποίο είναι το ηλεκτρόδιο εργασίας που είναι ένα **επιλεκτικό ηλεκτρόδιο ιόντων**. Αρχικά είναι η επιλεκτική προς το ιόν μεμβράνη, μετά το εσωτερικό διάλυμα KCl 0.1M και στη συνέχεια η επικάλυψη AgCl και ο Ag.



Οι μετρήσεις δυναμικού γίνονται με ελάχιστη ποσότητα ρεύματος για να μην διαταραχθεί η χημική ισορροπία του γαλβανικού στοιχείου. Μετράτε η συνολική διαφορά δυναμικού μεταξύ των δύο άκρων που περιλαμβάνει όλες τις τοπικές διαφορές δυναμικού.

$$E = E_o + E_J + E_M$$

όπου:

E : η διαφορά δυναμικού του στοιχείου

E_o : το δυναμικό αναφοράς που περιλαμβάνει όλα τα δυναμικά του συστήματος των αναφορικών ηλεκτροδίων.

E_J : το δυναμικό γέφυρας

E_M : και το δυναμικό μεμβράνης

Από τη μια μέτρηση στην άλλη το μόνο που μεταβάλλεται είναι το δυναμικό της μεμβράνης επειδή εξαρτάται από τη παρουσία ιόντων K^+ στο διάλυμα. Στο όργανο εμφανίζεται η διαφορά δυναμικού των δύο στοιχείων, εργασίας μείον της αναφοράς. Για παράδειγμα αν το εργασίας δίνει τιμή 50 mV και το αναφοράς 230 mV το αποτέλεσμα θα είναι -180 mV, δίνοντας αρνητικές τιμές. Ο λόγος που καταγράφονται αρνητικές τιμές είναι ότι το δυναμικό μεμβράνης (E_M) είναι πολύ αρνητικό.

Αναγραφή EHI κατά IUPAC:

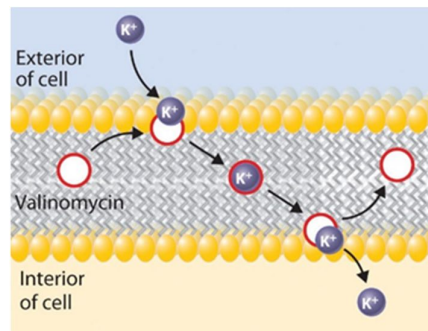
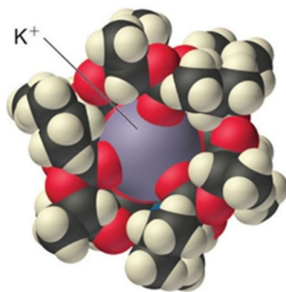
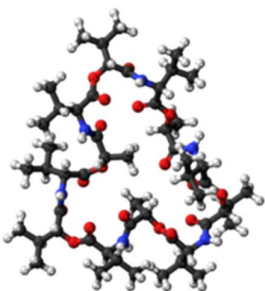
Ag/AgCl/(κορ. NaCl) || δείγμα / μεμβράνη /εσωτερικό διάλυμα (0.1 KCl)/AgCl/Ag

Η δομή του κατά IUPAC γράφεται ξεκινώντας πάντα από το αναφορικό ηλεκτρόδιο προς το ενδεικτικό, «από μέσα προς τα έξω». Αρχικά είναι ο Ag με επικάλυψη AgCl σε **κορεσμένο** διάλυμα NaCl, στη συνέχεια είναι η γέφυρα άλατος, το δείγμα, η μεμβράνη του ενδεικτικού ηλεκτροδίου, Στη συνέχεια είναι το εσωτερικό διάλυμα KCl 0.1M, και το εσωτερικό αναφορικό ηλεκτρόδιο που αποτελείται από την επικάλυψη AgCl και τον Ag.

Μεμβράνη

Η λειτουργία του επιλεκτικού ηλεκτροδίου γίνεται μέσω μιας λεπτής μεμβράνης που μπορεί να δεσμεύει μόνο το επιθυμητό ιόν. Η μεμβράνη αποτελείται από ένα ιονοφόρο στοιχείο που συμπλέκεται με το κύριο ιόν. Για την ανάλυση ιόντων καλίου το στοιχείο αυτό είναι το αντιβιοτικό **βαλινομυκίνη** (Valinomycin) που έχει μεγάλη ιονική επιλεκτικότητα στο ιόν του K. Η χημική δομή της αφήνει ένα μεγάλο

κενό χώρο στο κέντρο του μορίου όπου χωράει επιλεκτικά το ιόν του καλίου και όχι κάποιο μεγαλύτερο ή μικρότερο ιόν. Τα ιόντα καλίου μεταφέρονται από τη μία επιφάνεια την άλλη, αλλάζοντας έτσι τη συγκέντρωση του KCl στο εσωτερικό διάλυμα του επιλεκτικού ηλεκτροδίου και μεταβάλλοντας έτσι το δυναμικό του.



Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια – Όργανα:

- NaCl
- KCl
- Potassium Ionophore I (Valinomycin)
- Potassium tetrakis (4-chlorophenyl) borate
- Bis(2-ethylhexyl) sebacate (DOS)
- Tetrahydrofuran (THF)
- Ογκομετρικές φιάλες
- Ποτήρια ζέσεως
- Σιφώνια
- Πιπέτα ακριβείας μεταβλητού όγκου
- Ζυγός ακριβείας των 4 δεκαδικών
- Αναφορικό Ηλεκτρόδιο Ag/AgCl
- Επιλεκτικό Ηλεκτρόδιο Ιόντων K
- Μιλιβολτόμετρο

Διαδικασία:

A. Παρασκευή μεμβράνης:

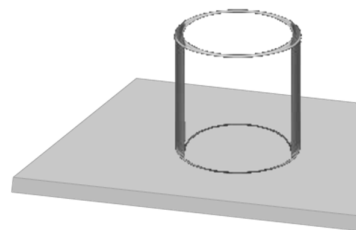
Οι μεμβράνες παρασκευάζονται από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.

Τα συστατικά που περιέχει η μεμβράνη είναι:

Συστατικά	% w/w	Μάζα (gr)
1) Potassium Ionophore I (Valinomycin)	2.00	0.00200
2) Potassium tetrakis (4-chlorophenyl) borate	0.50	0.00050
3) Bis(2-ethylhexyl) sebacate (DOS)	64.70	0.06470
4) Poly Vinyl Chloride (PVC)	32.80	0.03280
Σύνολο	100 %	0.10000 gr (100 mg)

Ζυγίζονται σε ζυγό των 5 δεκαδικών με ιδιαίτερη προσοχή

Στη συνέχεια μεταφέρονται σε μικρό φιαλίδιο όπου διαλύονται με 2ml THF (το PVC χρησιμοποιείται για το πολυμερισμό). Το όλο μίγμα τοποθετείτε σε γυάλινο δακτύλιο που είναι τοποθετημένος σε γυάλινη πλάκα και αφήνεται να εξατμιστεί αργά ο διαλύτης σε μέρος μακριά από ρεύματα και σκόνης. Οι μεμβράνες σχηματίζονται μετά από τη πλήρη εξάτμιση του διαλύτη και έχουν πάχος περίπου 200 μm. Στη συνέχεια κόβονται σε κυκλικά μέρη και τοποθετούνται στο σώμα του επιλεκτικού ηλεκτροδίου.



B. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων:

Αρχικά Παρασκευάζεται 1 λίτρο διαλύματος NaCl 10^{-3} M που θα χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης για όλα τα πρότυπα διαλύματα. Για τα πρότυπα διαλύματα χρησιμοποιείται διάλυμα NaCl και όχι καθαρό νερό, με σκοπό τη μείωση της αντίστασης και των ηλεκτρικών θορύβων στις μετρήσεις, λόγω της παρουσίας σταθερής ποσότητας ιόντων.

Τα 0.001M αντιστοιχούν σε 0.0584 gr στο 1 λίτρο. Ζυγίζονται σε ζυγό 4 δεκαδικών και αραιώνονται σε ογκομετρική φιάλη του ενός λίτρου με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετείτε σε υδροβολέα και θα χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης για τη παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων KCl.

Παρασκευάζεται διάλυμα KCl συγκέντρωσης 10^{-3} M (Δ_0), το διάλυμα πρέπει να παρασκευαστεί με μεγάλη ακρίβεια επειδή από αυτό θα παρασκευάζουν τα 5 πρότυπα διαλύματα που θα χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς.

Τα 0.001 M αντιστοιχούν σε 0.0075 gr KCl στα 100 ml διαλύματος KCl. Το διάλυμα θα πρέπει να έχει ακριβώς τη συγκέντρωση 0.001 M. Επειδή η ποσότητα που θα πρέπει να ζυγιστεί είναι αρκετά μικρή θα παρασκευαστεί αρχικά ένα πιο πυκνό διάλυμα. Θα παρασκευάζετε 100 ml διαλύματος συγκέντρωσης 0.1 M, ζυγίζοντας την απαιτούμενη ποσότητα σε ζυγό των 4^{ων} δεκαδικών και διαλύοντας στα 100 ml διαλύτη (με το διάλυμα NaCl και όχι με απιονισμένο νερό) με την χρήση ογκομετρικής φιάλης. Στη συνέχεια με αραιώση παρασκευάζετε το τελικό διάλυμα Δ_0 .

Από το διάλυμα Δ_0 παρασκευάζονται τα 5 πρότυπα διαλύματα KCl διαφορετικών συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης. Οι συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων είναι:

Για το πρώτο $\Delta_1 = 10^{-4}$ M, το δεύτερο $\Delta_2 = 3 \cdot 10^{-5}$ M, το τρίτο $\Delta_3 = 10^{-5}$ M,
το τέταρτο $\Delta_4 = 3 \cdot 10^{-6}$ M και το πέμπτο $\Delta_5 = 10^{-6}$ M

Για τη παρασκευή του πρώτου (Δ_1) και του δευτέρου (Δ_2) πρότυπου διαλύματος θα γίνει αραιώση από το αρχικό πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 10^{-3} M (Δ_0). Η παρασκευή του τρίτου (Δ_3) πρότυπου θα γίνει με αραιώση από το πρώτο πρότυπο (Δ_1), του τέταρτου (Δ_4) πρότυπου θα γίνει με αραιώση από το δεύτερο (Δ_2) πρότυπο και του πέμπτου (Δ_5) πρότυπου θα γίνει με αραιώση από το τρίτο πρότυπο (Δ_3). Οι διαδοχικές αραιώσεις γίνονται ώστε οι όγκοι που θα χρησιμοποιηθούν να είναι εύκολοι στη συλλογή τους με τη χρήση κατάλληλων σιφωνιών. Χρησιμοποιώντας το νόμο της αραιώσεως υπολογίζεται τους όγκους που θα πρέπει να πάρετε για κάθε μία, όλες οι αραιώσεις γίνονται σε ογκομετρικές φιάλες των 100 ml, συμπληρώνοντας μέχρι τη χαραγή με το διάλυμα του NaCl (όχι με απιονισμένο νερό).

Πρότυπο	Συγκέντρωση (M)	Διάλυμα αραιώσεως	Αρχικός όγκος (ml)
Δ_1	1.00×10^{-4}	Δ_0	10
Δ_2	3.00×10^{-5}	Δ_0	3
Δ_3	1.00×10^{-5}	Δ_1	10
Δ_4	3.00×10^{-6}	Δ_2	10
Δ_5	1.00×10^{-6}	Δ_3	10

Όλα τα πρότυπα δείγματα μεταφέρονται σε ποτήρια ζέσεως των 100 ml, καθώς επίσης και όλα τα άγνωστα δείγματα. Ως άγνωστα δείγματα θα έχετε, δύο από εμφιαλωμένα νερά ετικέτας, δύο από νερά δικτύων ύδρευσης ή πηγών και ένα από το δίκτυο του Πανεπιστημίου. Στη συνέχεια γίνονται οι μετρήσεις του δυναμικού με τη χρήση του επιλεκτικού ηλεκτροδίου ιόντων K. Αρχικά γίνεται καλή ανάδευση των διαλυμάτων και καλό ξέπλυμα των ηλεκτροδίων με απιονισμένο νερό. Πρώτα γίνονται οι μετρήσεις των πρότυπων διαλυμάτων, μετρώντας από το πιο αραιό στο πιο πυκνό (δηλ. αρχίζοντας από το πρότυπο Δ_5 που είναι το πιο αραιό πρότυπο και τελειώνοντας στο Δ_1 που είναι το πιο πυκνό) και στη συνέχεια γίνονται οι μετρήσεις των υπολοίπων διαλυμάτων.

Παρατηρήσεις:

- Το EHI σε κατάσταση ηρεμίας παραμένει εμβραπτισμένο σε ηλεκτρολυτικό διάλυμα
- Παρασκευάζεται διάλυμα NaCl 10^{-3} M και χρησιμοποιείται ως διαλύτης για όλα τα πρότυπα διαλύματα με σκοπό τη μείωση της αντίστασης και των ηλεκτρικών θορύβων στις μετρήσεις, λόγω της εξασφαλισμένης παρουσίας σταθερής ποσότητας ιόντων.
- Γνωρίζετε περίπου το εύρος της συγκέντρωσης των ιόντων καλίου στα δείγματα που θα αναλυθούν και αναλόγως έχουν επιλεγεί οι συγκεντρώσεις των πρότυπων δειγμάτων. Πρέπει οι τιμές των αγνώστων δειγμάτων να βρίσκονται εντός των ορίων της καμπύλης.
- Η καμπύλη που προκύπτει είναι 2^{ου} βαθμού επειδή έτσι συμπεριφέρεται το ηλεκτρόδιο και είναι πιθανό τα δύο αραιότερα πρότυπα να δώσουν παραπλήσια ένδειξη δυναμικού. Στα πολύ αραιά διαλύματα ως προς τα ιόντα K^+ φτάνει στο όριο ανίχνευσης της επιλεκτικής μεμβράνης.

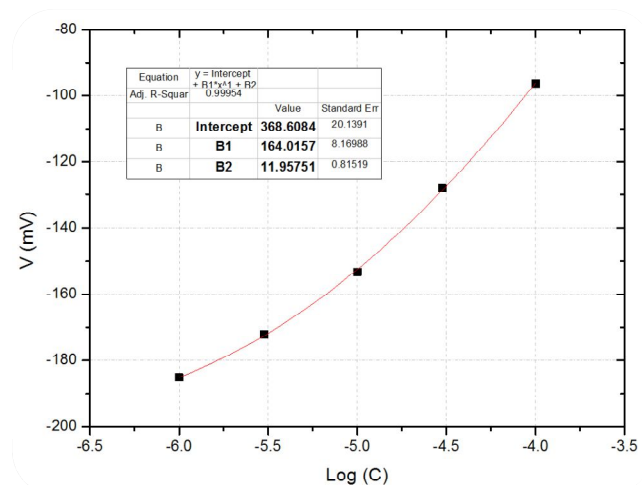
- Το αρχικό διάλυμα KCl πρέπει να παρασκευαστεί με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια επειδή χρησιμοποιείται και για τα 5 πρότυπα διαλύματα που θα δώσουν τη καμπύλη και κατά συνέπεια το όποιο σφάλμα σε αυτό θα συνεχιστεί σε όλη τη διαδικασία. Επειδή η απαιτούμενη ποσότητα στερεού είναι πολύ μικρή γίνεται αναγωγή στον όγκο για να εξασφαλιστεί η ακρίβεια στη συγκέντρωση.
- Οι τιμές δυναμικού που προκύπτουν είναι αρνητικές, στο όργανο εμφανίζεται η διαφορά δυναμικού των δύο στοιχείων, εργασίας μείον της αναφοράς. Για παράδειγμα αν το εργασίας δίνει τιμή 50 mV και το αναφοράς 230 mV το αποτέλεσμα θα είναι -180 mV, δίνοντας έτσι αρνητικές τιμές.

Αποτελέσματα και ανάλυση:

Για κάθε πρότυπο δείγμα καθώς και για όλα τα άγνωστα δείγματα θα καταγραφούν τιμές δυναμικού:

Διάλυμα	Δυναμικό (mV)
Δ1	-96.3
Δ2	-128.0
Δ3	-153.3
Δ4	-172.1
Δ5	-185.1
Εμφιαλωμένο 1	-158.7
Εμφιαλωμένο 2	-153.5
Νερό δικτύου 1	-125.6
Νερό δικτύου 2	-148.2
Δίκτυο Πανεπιστημίου	-155.3
Άγνωστο	-171.7

Πρότυπο Διάλυμα	Log (C)	Δυναμικό (mV)
Δ ₁	-4.000	-96.3
Δ ₂	-4.523	-128.0
Δ ₃	-5.000	-153.3
Δ ₄	-5.523	-172.1
Δ ₅	-6.000	-185.1



Για τη καμπύλη αναφοράς θα κάνετε ένα διάγραμμα που στο άξονα των X θα έχετε το λογάριθμο της συγκέντρωσης και στον άξονα των Y θα το μετρούμενο δυναμικό. Αρχικά υπολογίζεται ο λογάριθμος της συγκέντρωσης και στη συνέχεια δημιουργείται το διάγραμμα με τη χρήση ενός υπολογιστικού προγράμματος.

Η καμπύλη αναφοράς είναι δευτέρου βαθμού, δίνοντας μια εξίσωση της μορφής:

$$Y = a \cdot X^2 + b \cdot X + c$$

Η εξίσωση που προκύπτει από το παράδειγμα είναι:

$$Y = 11.95751 \cdot X^2 + 164.0157 \cdot X + 368.6084$$

Χρησιμοποιώντας τις μετρούμενες τιμές για κάθε δείγμα, λύνεται ως προς το X την εξίσωση με τη χρήση της διακρίνουσας, λόγω ότι είναι δευτέρου βαθμού. Θα βρείτε δύο λύσεις, θα κρατήσετε τη τιμή που είναι μέσα στο εύρος της καμπύλης, δηλ. από -6 έως -4. η άλλη τιμή απορρίπτεται.

Με το τρόπο αυτό υπολογίζεται ο λογάριθμος τη συγκέντρωση για κάθε άγνωστο δείγμα, συνέχεια μετατρέπεται τη συγκέντρωση σε (M) και τέλος υπολογίζεται τη συγκέντρωση των ιόντων K σε ppm με τη χρήση του ατομική μάζας του K.

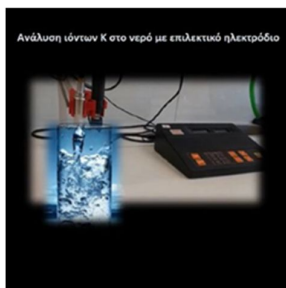
Ανεξάρτητα με κανόνες το αποτέλεσμα να δοθεί με 3 δεκαδικά

Δείγμα νερού	Δυναμικό (mV)	Log (C)	Συγκέντρωση (M)	Συγκέντρωση (ppm)
Εμφιαλωμένο 1	-158.7	-5.144	7.171×10^{-6}	0.280
Εμφιαλωμένο 2	-153.5	-5.022	9.508×10^{-6}	0.372
Νερό δικτύου 1	-125.6	-4.470	3.391×10^{-5}	1.326
Νερό δικτύου 2	-148.2	-4.905	1.650×10^{-5}	0.487
Δίκτυο Πανεπιστημίου	-155.3	-5.063	8.643×10^{-6}	0.338
Άγνωστο	-171.7	-5.499	3.176×10^{-6}	0.124

Οι τιμές των ιόντων K που προκύπτουν για τα εμφιαλωμένα νερά ετικέτας καθώς και για τα νερά δικτύου ή πηγών να συγκριθούν με τιμές από την βιβλιογραφίας με αντίστοιχα νερά.

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 I:



<https://www.chemistry.uoc.gr/eclass/modules/document/?course=CHEM-UNDER114>

Youtube:



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

Άσκηση – Πολαρογραφικός προσδιορισμός ιόντων Cd^{2+} και Pb^{2+}

Σκοπός της άσκησης είναι:

Η χρήση πολαρογραφικών τεχνικών για το προσδιορισμό ιόντων Cd^{2+} και Pb^{2+} σε άγνωστο δείγμα με τη χρήση καμπύλων αναφοράς και εξοικείωση των φοιτητών με πολαρογραφικές τεχνικές.

Ο όρος βολταμετρία αναφέρεται σ' ένα σύνολο αναλυτικών τεχνικών οι οποίες έχουν κύριο σκοπό τη μέτρηση ρεύματος και του δυναμικού κατά τη διάρκεια ηλεκτροχημικών διεργασιών. Η μέθοδος της πολαρογραφίας αποτελεί κατηγορία της βολταμετρίας γίνεται με ένα σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου και είναι μια ευαίσθητη τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και το προσδιορισμό ηλεκτρενεργών ουσιών, δηλαδή ουσιών που μπορούν να ανάγονται και να οξειδώνονται. Το ρεύμα που μετράτε είναι αυτό που δημιουργείται κατά τη πραγματοποίηση οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων και ονομάζεται φαρανταϊκό ρεύμα. Στο γράφημα καταγράφεται η ένταση του παραγόμενου ρεύματος συναρτήσει του δυναμικού που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας.

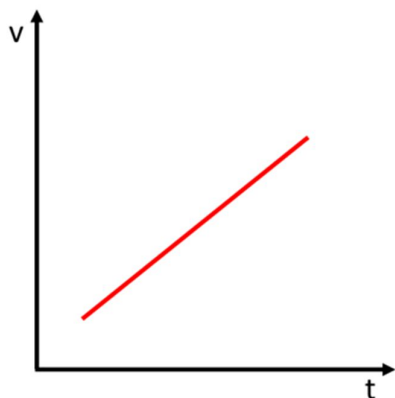


Οι κυριότεροι τύποι βολταμετρίας είναι:

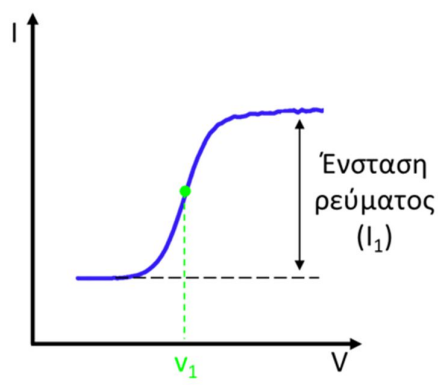
A. Κλασσική βολταμετρία.

V

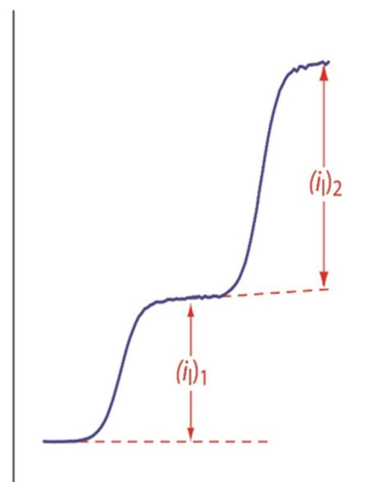
Στη κλασσική βολταμετρία χρησιμοποιείται ένα σταθερά αυξανόμενο δυναμικό συναρτήσει του χρόνου (σχήμα 1α). Καταγράφεται η ένταση του ρεύματος που δημιουργείται από τις ηλεκτροχημικές διεργασίες ως προς το δυναμικό που εφαρμόζεται (σχήμα 1β).



Σχήμα 1α:
Εφαρμοζόμενο δυναμικό
συναρτήσει του χρόνου



Σχήμα 1β:
Προκύπτουν ρεύμα συνάρτηση του
δυναμικού

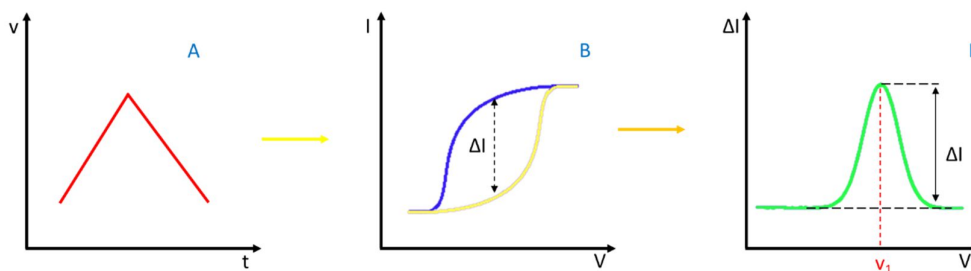


Σχήμα 2

Από το γράφημα που προκύπτει έχει τη μορφή S μπορεί να εξαχθεί μια ποιοτική και μια ποσοτική πληροφορία. Το δυναμικό που αντιστοιχεί στο μισό της έντασης του ρεύματος, είναι χαρακτηριστικό για το είδος του αναλυτή (πχ Cd , Pb κτλ.). Ενώ η ένταση του παραγόμενου ρεύματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλυτή (σχήμα 1β). Όταν αναλύονται δύο ιόντα στο γράφημα θα εμφανίζονται δύο σήματα, ένα για κάθε ιόν με τα χαρακτηριστικά του καθενός ως προς το δυναμικό και το ποσότητα του. (σχήμα 2).

Β. Κυκλική βολταμετρία:

Στη κυκλική, όπως και στη κλασσική βολταμετρία εφαρμόζεται ένα σταθερά αυξανόμενο δυναμικό ως προς το χρόνο, όμως στη συνέχεια το δυναμικό αλλάζει πολικότητα και ελαττώνεται με τον ίδιο ρυθμό μέχρι την αρχική του τιμή (σχήμα 3Α). Αρχικά εφαρμόζεται δυναμικό αναγωγής και στη συνέχεια δυναμικό οξειδωσης. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη λήψη ενός πολυπλοκότερου γραφήματος, όπου αρχικά καταγράφεται το παραγόμενο ρεύμα κατά τη διαδικασία της αναγωγής ως προς το εφαρμοζόμενο δυναμικό, το οποίο μοιάζει με αυτό της κλασσικής βολταμετρίας (σχήμα 1β) και πάνω σε αυτό καταγράφεται και ρεύμα που παράγεται κατά το δεύτερο μέρος κατά την οξείδωση (σχήμα 3Β). Η διαφορά των δύο ρευμάτων απεικονίζεται συναρτήσει του εφαρμοζόμενου δυναμικού (σχήμα 3Γ) και έτσι προκύπτει ένα νέο γράφημα όπου στο χαρακτηριστικό δυναμικό της αντίδρασης του αναλύτη εμφανίζεται μια κορυφή (ποιοτικός προσδιορισμός). Το ύψος της κορυφής (ή το ολοκλήρωμα της) είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα (ποσοτικός προσδιορισμός).



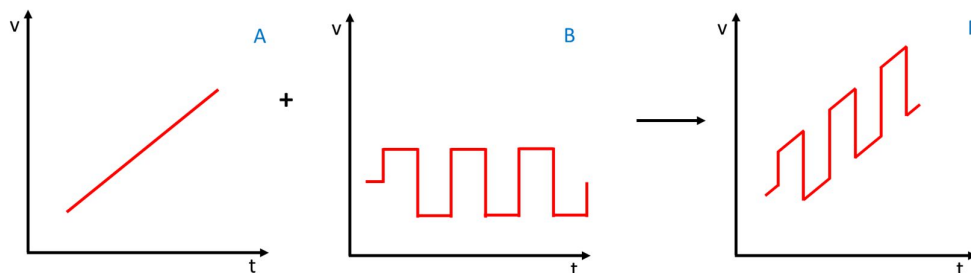
Σχήμα 3

Προσοχή :

Το ύψος της κορυφής μετράτε από την baseline του γραφήματος και όχι από την αρχή των αξόνων.

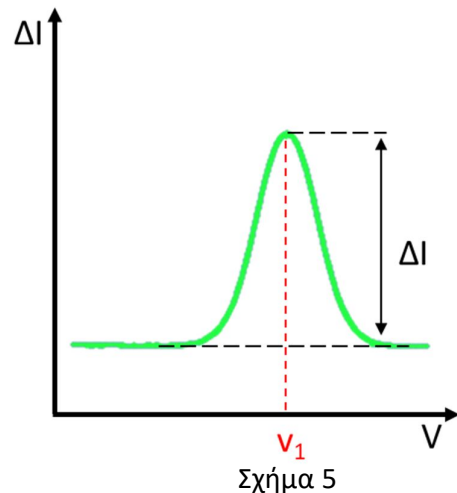
Γ. Βολταμετρία τετραγωνικού κύματος

Στη τεχνική αυτή πάνω σε σταθερά αυξανόμενο δυναμικό (σχήμα 4Α) εφαρμόζεται διπλός παλμός, με έναν καθοδικό παλμό που έχει δυναμικό αναγωγής και ο αναλύτης ανάγεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και αμέσως μετά με ένα ανοδικό παλμό δημιουργώντας οξείδωση και ο αναλύτης που μόλις είχε αναχθεί, οξειδώνεται (σχήμα 4Β). Αυτό δίνει μια μεταβλητότητα του εφαρμοζόμενου δυναμικού όπως φαίνεται στο σχήμα 4Γ.



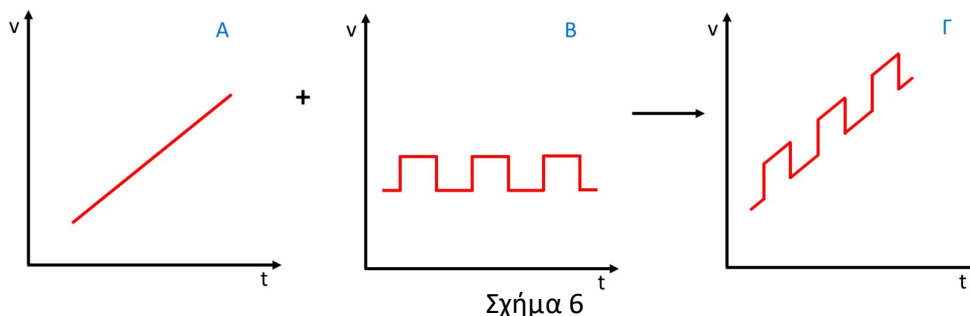
Σχήμα 4

Το ρεύμα καταγράφεται λίγο πριν τελειώσει ο καθοδικός παλμός και λίγο πριν τελειώσει ο ανοδικός παλμός και παίρνεται η διαφορά τους. Απεικονίζεται η διαφορά του ρεύματος ως προς το δυναμικό δίνοντας μια κορυφή (σχήμα 5). Με τη τεχνική αυτή το μετρούμενο σήμα αυξάνεται επειδή τα αναγμένα προϊόντα από κάθε καθοδικό παλμό βρίσκονται ακριβώς στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, περιμένοντας να οξειδωθούν από τον επόμενο ανοδικό παλμό. Το όριο ανίχνευσης είναι μικρότερο από τις κλασικές τεχνικές και μπορεί να διαχωρίσει ουσίες των οποίων τα δυναμικά μισού κύματος διαφέρουν κατά περίπου 0.05 V, επειδή είναι ευκολότερο να αναλυθούν γειτονικές κορυφές από ότι γειτονικά κύματα. Τέλος, η βολταμετρία τετραγωνικού κύματος είναι πολύ γρηγορότερη από τις άλλες βολταμετρικές τεχνικές.



Δ. Διαφορική παλμική πολαρογραφία με αναδιαλυτική τεχνική

Η τεχνική αυτή έχει το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης και πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο το δείγμα “προ συγκεντρώνεται” πάνω στη σταγόνα και στο δεύτερο στάδιο επαναδιαλύεται με τη τεχνική της διαφορικής πολαρογραφίας. Στη διαφορική παλμική πολαρογραφία πάνω σε σταθερά αυξανόμενο δυναμικό (σχήμα 6Α) εφαρμόζεται σταθερός παλμός (ανοδικός, σχήμα 6Β) δίνοντας μια μεταβλητότητα στο εφαρμοζόμενο δυναμικό όπως φαίνεται στο σχήμα 6Γ.

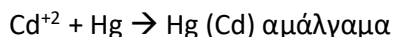
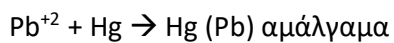


Το ρεύμα καταγράφεται λίγο πριν ξεκινήσει ο παλμός και λίγο πριν τελειώσει και παίρνεται η διαφορά τους. Απεικονίζεται η διαφορά του ρεύματος ως προς το δυναμικό δίνοντας μια κορυφή όπως και στη τεχνική του τετραγωνικού κύματος.

Κατά το πρώτο στάδιο πραγματοποιείται εναπόθεση των επιθυμητών στοιχείων (πχ καδμίου και μολύβδου) πάνω στη σταγόνα του υδραργύρου μέσω αναγωγής των στοιχείων αυτών στην βασική τους μορφή (αντιδράσεις 1) δημιουργώντας αμαγάλματα. Κατά το δεύτερο στάδιο της τεχνικής γίνεται επαναδιάλυση των στοιχείων στο διάλυμα μέσω της οξείδωσης τους (αντιδράσεις 2). Στη τεχνική αυτή είναι δυνατό να καταγραφούν τα πολαρογραφικά κύματα τόσο στο στάδιο της αναγωγής (εναπόθεση πάνω στη σταγόνα) όσο και στο στάδιο της οξείδωσης (επαναδιάλυση των στοιχείων). Επειδή τα διαλύματα που αναλύονται είναι πολύ αραιά (μερικά ppb) κατά το στάδιο της αναγωγής, πολύ μικρή ποσότητα μεταφέρετε μέσω της εναπόθεσης τους και δημιουργεί πολύ ασθενές ρεύμα, σχεδόν μη ανιχνεύσιμο. Ενώ το ρεύμα που καταγράφεται κατά το δεύτερο στάδιο της οξείδωσης είναι αρκετά μεγάλο, που οφείλεται στο ότι κατά το στάδιο της επαναδιάλυσης όλη η ποσότητα των στοιχείων που είχε εναποτεθεί, επαναδιαλύεται ταυτόχρονα, δίνοντας ένα ισχυρό σήμα. Για το λόγο αυτό καταγράφεται το σήμα μόνο κατά το δεύτερο στάδιο όπου είναι και ανιχνεύσιμο. Με τη τεχνική αυτή στη πραγματικότητα πραγματοποιείται μια “προ

συγκέντρωση” του δείγματος πάνω στη σταγόνα του Hg, έτσι είναι δυνατή η ανάλυση πολύ αραιών δειγμάτων της τάξης των ppb ακόμα και ppt, είναι η τεχνική με το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης.

Στάδιο 1 (αναγωγή), εναπόθεση “προ συγκέντρωσης” πάνω στη σταγόνα του Hg:



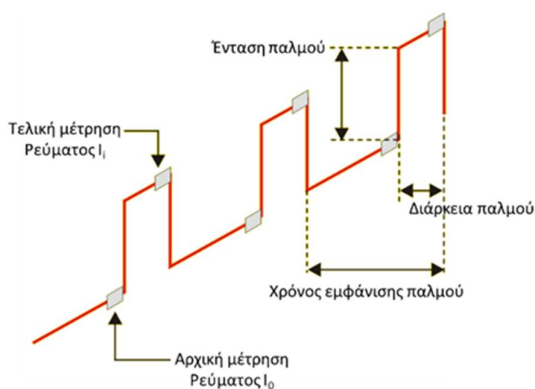
Στάδιο 2 (οξειδωση αμαλαμάτων), επαναδιάλυση των στοιχείων στο διάλυμα:



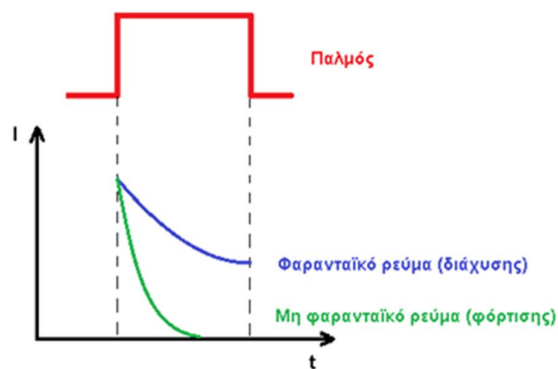
*Κατά τη διάρκεια της οξειδωσης, οξειδώνεται και ο υδράργυρος και για το λόγο αυτό στο τέλος της μέτρησης απορρίπτεται η σταγόνα οπότε στην επόμενη μέτρηση δημιουργείται νέα καθαρή σταγόνα υδραργύρου.

*Η σταγόνα δεν πρέπει να απορρίπτεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της αναδιαλυτικής τεχνικής γιατί στη περίπτωση αυτή μαζί με τη σταγόνα θα χαθεί και το δείγμα που έχει γίνει “προ συγκέντρωση” .

Το ρεύμα καταγράφεται λίγο πριν ξεκινήσει ο παλμός και λίγο πριν τελειώσει (σχήμα 7). Στο γράφημα που στη περίπτωση της διαφορικής πολαρογραφίας ονομάζεται πολαρογράφημα καταγράφεται η διαφορά του ρεύματος ως προς το εφαρμοζόμενο δυναμικό δίνοντας μια κορυφή, όπως αυτή με τη τεχνική του τετραγωνικού κύματος (σχήμα 5).



Σχήμα 7



Σχήμα 8

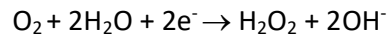
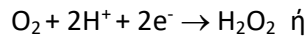
*Το ρεύμα μετριέται λίγο πριν τελειώσει ο παλμός και όχι κατά τη διάρκεια του.

Αυτό γίνεται επειδή στο διάλυμα εκτός από τα ιόντα που είναι για ανάλυση υπάρχουν και διαφορετικά ιόντα, πολλές φορές έχει προστεθεί πχ ηλεκτρολύτης για τη σταθεροποίηση του σήματος. Με βάση το δυναμικό των ηλεκτροδίων τα ιόντα αυτά είναι σε μια ισορροπία. Όταν εφαρμόζεται ο παλμός στιγμιαία αλλάζει το δυναμικό αυτό και έχει ως αποτέλεσμα τα ιόντα να θέλουν να πάνε στη νέα θέση ισορροπίας. Αυτή η κίνηση δίνει ένα ρεύμα (ρεύμα φόρτισης) το οποίο θα καταγραφεί μαζί με το επιθυμητό ρεύμα, που παράγεται από την οξείδωση του αναλυτή (φαρανταϊκό ρεύμα). Το ρεύμα φόρτισης φθίνει πιο γρήγορα σε σχέση με το φαρανταϊκό έτσι η μέτρηση στο τέλος του παλμού παρέχει στο σύστημα το χρόνο που απαιτείται προκειμένου να επέλθει ισορροπία των ιόντων που περιέχονται στο διάλυμα με αποτέλεσμα το μετρούμενο ρεύμα θα είναι μόνο το φαρανταϊκό ρεύμα (σχήμα 8).

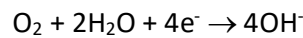
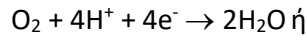
Πριν από κάθε πολαρογραφική ανάλυση πρέπει να γίνει απαέρωση του διαλύματος για να απομακρυνθεί το διαλυμένο οξυγόνο. Αυτή η διαδικασία είναι απαραίτητη γιατί το οξυγόνο μπορεί να

δημιουργήσει προβλήματα τα οποία οφείλονται στην βολταμετρική του συμπεριφορά καθώς και στις χημικές αντιδράσεις που σχετίζονται μ' αυτή.

Το οξυγόνο ανάγεται στη σταγόνα Hg σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο ανάγεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ή σε υπεροξείδιο και υδροξείδιο,

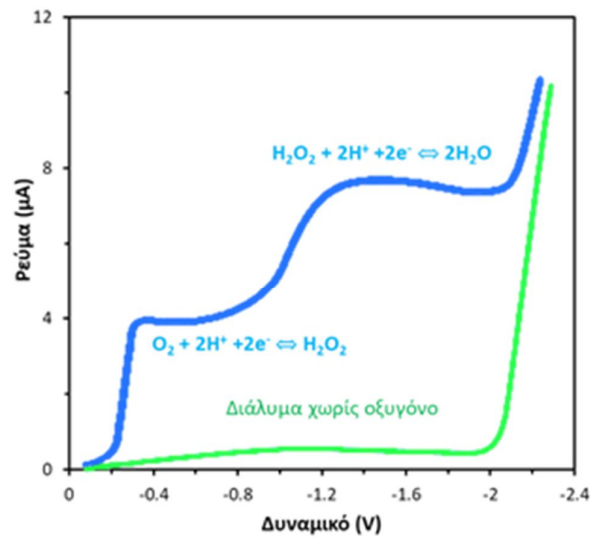


και κατά το δεύτερο στάδιο το οξυγόνο ανάγεται σε νερό ή υδροξείδιο,



Αν δεν απομακρυνθεί το οξυγόνο από το διάλυμα θα υπάρξουν διάφορα προβλήματα:

- θα καταγραφούν αναγωγικά σήματα τα οποία θα παρεμποδίσουν το κύριο σήμα.
- το υπεροξείδιο που παράγεται κατά το πρώτο στάδιο δρα σαν οξειδωτικό και σαν αναγωγικό μέσο με αποτέλεσμα να επηρεάζει τις άλλες ηλεκτρενεργές ουσίες που βρίσκονται στο διάλυμα
- μπορεί να υπάρξουν αλλαγές του pH γύρω από τη σταγόνα του Hg λόγω της αναγωγής του οξυγόνου και να δημιουργηθούν ιζήματα βαρέων μετάλλων με αποτέλεσμα να μικραίνει το ρεύμα διάχυσης αυτών.
- Επίσης λόγω αύξησης του pH γύρω από τη σταγόνα του Hg θα επηρεαστούν και οι ουσίες που για να αναχθούν χρειάζονται ιόντα υδρογόνου (πχ οργανικές).



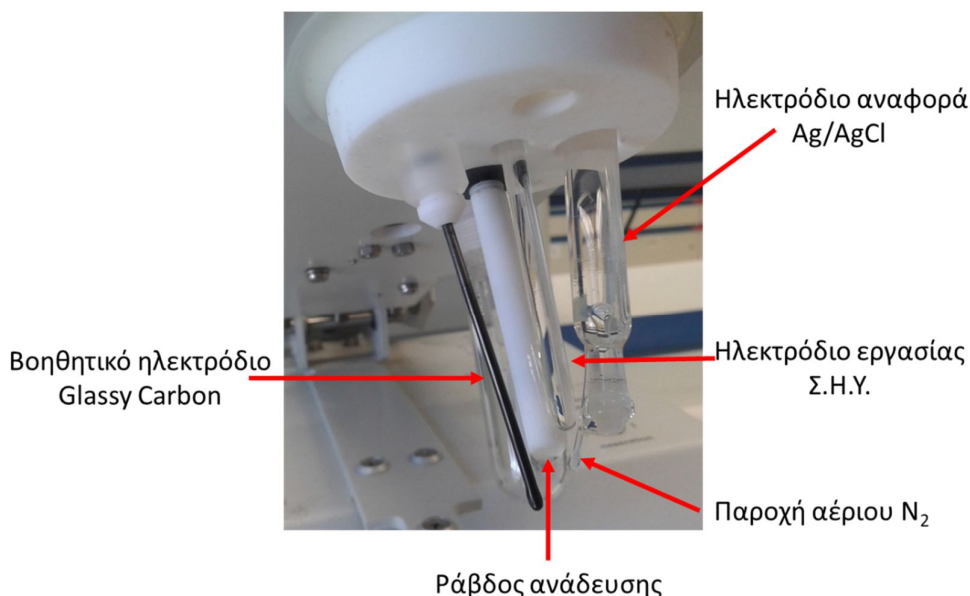
Σχήμα 9

Πολαρογράφος:

Αποτελείται από ένα σύστημα τριών ηλεκτροδίων. Από ένα **ηλεκτρόδιο εργασίας**, στο οποίο πραγματοποιούνται οι οξειδωαναγωγικές αντιδράσεις από ένα **ηλεκτρόδιο αναφοράς**, ώστε να είναι δυνατός ο έλεγχος-ρύθμιση του δυναμικού, είναι ένα ηλεκτρόδιο που το δυναμικό του παραμένει σταθερό και από ένα τρίτο **βοηθητικό ηλεκτρόδιο**. Η χρήση του τρίτου είναι απαραίτητη επειδή η διέλευση του ρεύματος από το αναφορικό ηλεκτρόδιο θα είχε ως αποτέλεσμα τη διαταραχή του δυναμικού του, χρησιμοποιώντας όμως ένα βοηθητικό ηλεκτρόδιο περισσότερο πολώσιμο από το αναφορικό, τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν από τις αντιδράσεις θα κινούνται προς αυτό και όχι προς το αναφορικό και έτσι το δυναμικό του θα παραμένει πλέον σταθερό. Το δυναμικό εφαρμόζεται μεταξύ του ηλεκτροδίου αναφοράς και εργασίας, ενώ το ρεύμα που δημιουργείται περνάει μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του βοηθητικού.



Τα ηλεκτρόδια αναφοράς είναι μη πολώσιμα, ηλεκτρόδια στα οποία τα δυναμικά τους παραμένουν σταθερά, δεν μεταβάλλονται εύκολα. Ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιείται το ηλεκτρόδιο Ag/AgCl σε διάλ. KCl. Το βοηθητικό ηλεκτρόδιο πρέπει να είναι ένα πολώσιμο ηλεκτρόδιο ώστε να μπορεί να προσελκύει τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν από τις αντιδράσεις οξειδωαναγωγής που γίνονται πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο χρησιμοποιείται ένα ηλεκτρόδιο από Glassy Carbon (άνθρακας). Το ηλεκτρόδιο εργασίας είναι σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου (Σ.Η.Υ.)



Στη πολαρογραφία χρησιμοποιείται το Σ.Η.Υ. για τους λόγους:

- Η δυνατότητα να παράγει επαναλήψιμα αποτελέσματα, καθώς κάθε μέτρηση πραγματοποιείται σε καινούργια σταγόνα υδραργύρου σταθερού μεγέθους. Σε οποιοδήποτε άλλο ηλεκτρόδιο (όπως του Pt) το δυναμικό εξαρτάται από τη κατάσταση της ενεργούς επιφάνειας, και επομένως από τη χρήση αυτού.
- Η πλειοψηφία των αντιδράσεων που μελετιούνται με Σ.Η.Υ. είναι αναγωγές. Σε αντιδράσεις αναγωγής το κατιόν που ανάγεται ευκολότερα είναι το μικρότερο και αυτό είναι το H^+ . Επειδή τα διαλύματα συνήθως είναι υδατικά η ποσότητα H^+ είναι μεγάλη, αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα μεγάλο σήμα, κατά την αναγωγή του, το οποίο καλύπτει το σήμα αναγωγής άλλων κατιόντων. Στο ηλεκτρόδιο υδραργύρου αναπτύσσεται ένα μεγάλο υπερδυναμικό για την αναγωγή του H^+ με αποτέλεσμα μέχρι να

φτάσει στη τιμή αυτή μπορούν να γίνουν αναγωγές άλλων κατιόντων που σε άλλα ηλεκτρόδια αυτό δεν θα ήταν δυνατό.

- Επίσης, ο υδράργυρος σχηματίζει αμαγάλματα με πολλά μέταλλα τα οποία αυτά ανάγονται ευκολότερα απ' ότι σε στερεή μορφή, γιατί το δυναμικό αναγωγής του μετάλλου σε αμάλαμα είναι θετικότερο.

Τα κυριότερα μειονεκτήματα του Σ.Η.Υ. είναι:

- Κατά το στάδιο της οξείδωσης, πραγματοποιείται οξείδωση και του Hg, γεγονός που καθιστά απαραίτητη την απόρριψη του μετά το πέρας της μέτρησης.

- Ο τριχοειδής σωλήνας που συνδέεται με τη παροχή του υδραργύρου και σχηματίζει τη σταγόνα, διαθέτει σημαντικά μικρή διάμετρο με αποτέλεσμα να λαμβάνει χώρα συχνά απόφραξη αυτού.

- Ο Hg είναι τοξικός.

Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια – Όργανα:

- Διάλυμα Pb^{2+} των 20 ppm
- Διάλυμα Cd^{2+} των 20 ppm
- NaOH
- CH_3COOH
- $HClO_4$
- Ογκομετρική φιάλη των 1 lit
- Ποτήρι ζέσεως
- Σιφώνια μέτρησης
- Πιπέτες ακριβείας μεταβλητού όγκου
- Ζυγός ακριβείας των 3 δεκαδικών
- Πολαρογράφος

Παράμετροι Πολαρογράφου:

- **Μέθοδος:** HDME
- **Drop size:** 2
- **Ένταση παλμού:** DP50
- **U_{start} :** -0.8 Volt
- **U_{end} :** -0.2 Volt
- **dV/dt :** 10 mV/s
- **$\Delta I/\Delta L$:** 0.5 nA/mm
- **Ταχύτητα χαρτιού:** 100 mV/cm
- **tdrop:** 0.5 sec
- **d amp:** 2
- **I comp:** χειροκίνητα
- **Πίεση αερίου (N_2):** 1 +/- 0.2 bar

Διαδικασία:

Αρχικά, πλένονται όλα τα γυαλικά, με σαπουνάδα, νερό βρύσης και τέλος με απιονισμένο νερό. Επίσης, πλένονται καλά και τα ηλεκτρόδια, μόνο με απιονισμένο νερό με την βοήθεια υδροβολέα και με ιδιαίτερη προσοχή.

Σε ειδικό δοχείο τοποθετούνται 19 ml απιονισμένου νερού με την βοήθεια του σιφωνίου και 1 ml **ηλεκτρολύτη*** με τη πιπέτα ακριβείας μεταβλητού όγκου, το διάλυμα του ηλεκτρολύτη δίνεται από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.



1. Ρυθμίζεται ο πολαρογράφος στις σωστές παραμέτρους και το διάλυμα απαρώνεται με αέριο άζωτο για 10 λεπτά.

2. Μετά το πέρας των 10 λεπτών, αφήνετε να πέσουν πέντε (5) σταγόνες υδραργύρου από το Σ.Η.Υ. και στη τελευταία μετράτε ακριβώς ένα λεπτό με τη χρήση χρονομέτρου. Στο λεπτό αυτό ο πολαρογράφος είναι ήδη στο δυναμικό αναγωγής (**Hold**) και τα ιόντα ανάγονται δημιουργώντας αμαγάλματα πάνω στην επιφάνεια της σταγόνας του υδραργύρου “προ συγκεντρώνοντας” έτσι το δείγμα πάνω σε αυτήν.

3. Μετά το πέρας του ενός λεπτού αλλάζετε το δυναμικό και γίνεται δυναμικό οξείδωσης (**Sweep**) και ταυτόχρονα αρχίζει η καταγραφή του πολαραογραφήματος. Κατά τη διαδικασία οξείδωσης τα ιόντα που ήταν σε μορφή αμαγάλματος πάνω στη σταγόνα επαναδιαλύονται (αναδιαλυτική τεχνική) και καταγράφεται το ρεύμα που παράγεται δίνοντας το πολαρογράφημα.

Με τον τρόπο αυτό λαμβάνεται το πρώτο πολαρογράφημα που αποτελεί το τυφλό (blank).

4. Στη συνέχεια στο ίδιο διάλυμα προστίθενται η κατάλληλη ποσότητα από τα πρότυπα διαλύματα των 20 ppb των Cd^{2+} και Pb^{2+} ώστε η τελική τους συγκέντρωση να είναι η επιθυμητή (**υπολογίσετε τη ποσότητα που χρειάζεται**). Προστίθεται με τη χρήση πιπέτας ακριβείας μεταβλητού όγκου από ειδική οπή μέσα στο διάλυμα, με ιδιαίτερη προσοχή στα ηλεκτρόδια και ιδιαίτερα στο ηλεκτρόδιο του Glassy Carbon που είναι εύθραυστο. Το ακροφύσιο της πιπέτας πρέπει να είναι μέσα στο διάλυμα και να ξεπλυθεί με αυτό. Στη συνέχεια απομακρύνεται χωρίς να περιέχει καθόλου διάλυμα (πατημένη η δεύτερη σκάλα στην πιπέτα μεταβλητού όγκου) και απορρίπτετε σε ειδικό δοχείο.

5. Πάνω στο προηγούμενο πολαρογράφημα (blank) παίρνεται ένα νέο πολαρογράφημα με τη διαδικασία που περιεγράφηκε πριν δηλ. αρχικά απορρίπτονται 5 σταγόνες και στη τελευταία μετράτε με ακρίβεια 1 λεπτό και στη συνέχεια πηγαίνετε σε λειτουργία οξείδωσης και καταγραφής του πολαραογραφήματος. Αυτό το πολαρογράφημα αντιστοιχεί στο διάλυμα του 1^{ου} προτύπου για το Cd^{2+} και το Pb^{2+} με αποτέλεσμα να εμφανιστούν δύο κορφές στα -0.57 V για το Cd^{2+} και στα -0.38 V για το Pb^{2+} .

6. Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία προσθέτοντας κάθε φορά τις κατάλληλες ποσότητες των ιόντων, παίρνοντας το αντίστοιχο πολαρογράφημα για όλες τις επιθυμητές συγκεντρώσεις των ιόντων Cd^{2+} και Pb^{2+} .

Θα πάρετε συνολικά έξι πολαρογραφήματα

1. Blank
2. 20 ppb Cd^{2+} + 30 ppb Pb^{2+}
3. 30 ppb Cd^{2+} + 45 ppb Pb^{2+}
4. 40 ppb Cd^{2+} + 60 ppb Pb^{2+}
5. 50 ppb Cd^{2+} + 75 ppb Pb^{2+}
6. 60 ppb Cd^{2+} + 90 ppb Pb^{2+}

7. Απορρίπτεται το όλο διάλυμα σε ειδικό δοχείο αποβλήτων αφού πρώτα απομακρυνθεί ο Hg με τον ειδικό συλλέκτη.

8. Πλένεται πολύ καλά το ειδικό γυάλινο δοχείο και γίνεται η ίδια διαδικασία για να πάρετε ένα καινούργιο τυφλό (blank)

9. Από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου τοποθετούνται στο διάλυμα ποσότητες των ιόντων Cd^{2+} και Pb^{2+} που θα αποτελέσουν το άγνωστο σας.

10. Παίρνεται το πολαρογράφημα με της άγνωστες ποσότητες των Cd^{2+} και Pb^{2+} .

11. Απορρίπτεται το όλο διάλυμα σε ειδικό δοχείο αποβλήτων αφού πρώτα απομακρυνθεί ο Hg με τον ειδικό συλλέκτη.

*Ρυθμιστικό διάλυμα (ηλεκτρολύτη) :

Για τη παρασκευή του: 4.0 gr NaOH διαλύονται σε 500 ml απιονισμένου νερού, προστίθενται 11.46 ml CH_3COOH και ρυθμίζεται το pH στο 4.64 με $HClO_4$, συμπληρώνετε με απιονισμένο μέχρι τελικού όγκου 1000 ml. Το διάλυμα αυτό σας δίνεται έτοιμο από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.

Οργανολογία:

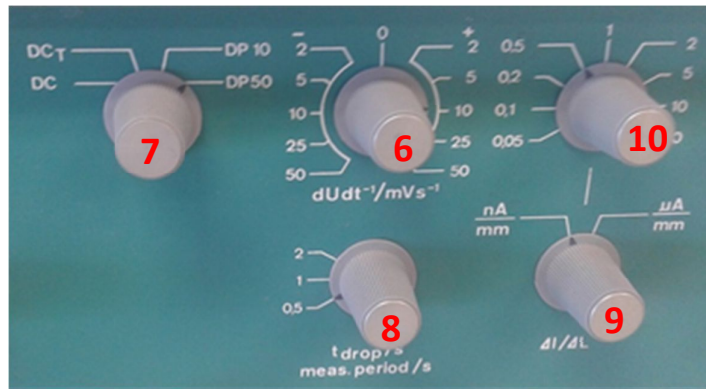
A. 626 Polarecord:

1. Διακόπτης λειτουργίας (on/off)
2. Διακόπτης επιλογή θέσης αναμονής ή μέτρησης (stand-by / measure)
3. Διακόπτης επιλογής δυναμικού αναγωγής (hold) ή οξειδωσης (sweep).
4. Διακόπτης επιλογής ταχύτητας χαρτιού στον plotter (100 mv/cm)
5. Διακόπτης επιλογής ορίων δυναμικού (από -0.80 έως -0.20 V)



6. Διακόπτης επιλογής ρυθμού μεταβολής του δυναμικού (10 mV/s)
7. Διακόπτης επιλογής έντασης παλμού (50 mV)
8. Διακόπτης επιλογής ταχύτητας εμφάνισης παλμού που είναι και η περίοδος μέτρησης, σε κάθε παλμό έχετε και μια μέτρηση του ρεύματος (0.5 sec)
9. Διακόπτης επιλογής αντιστοίχισης της έντασης του ρεύματος ως προς τη κλίμακα του χαρτιού του plotter (nA/mm)
10. Διακόπτης επιλογής της τιμής της αντιστοίχισης του ρεύματος με τη κλίμακα του χαρτιού του plotter (0.5 nA/mm)

Οι επιλογές 9 και 10 αποτελούν την ευαισθησία του οργάνου, 1 mm ύψους κορυφής αντιστοιχεί σε 0.5 nA ρεύματος.

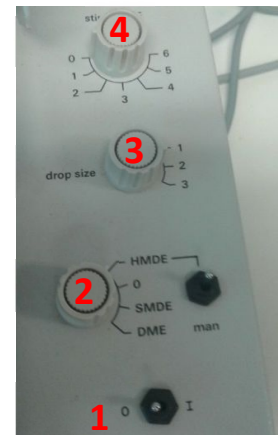


B. 663 stand :

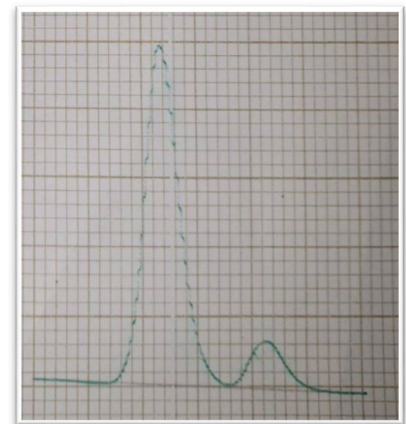
1. Διακόπτης λειτουργίας αερίου N₂ για την απαέρωση
2. Επιλογή μεθόδου, Παλμική Διαφορική Πολαρογραφία με αναδιαλυτική μέθοδο (HMDE)
3. Επιλογή μεγέθους σταγόνας υδραργύρου στο Σ.Η.Υ. (επιλογή 2)
4. Ένταση στροφών ράβδου ανάδευσης

Προσοχή:

Ρύθμιση του εξωτερικού μανόμετρου του μειωτήρα του αερίου N₂ στο 1 ± 0.2 bar



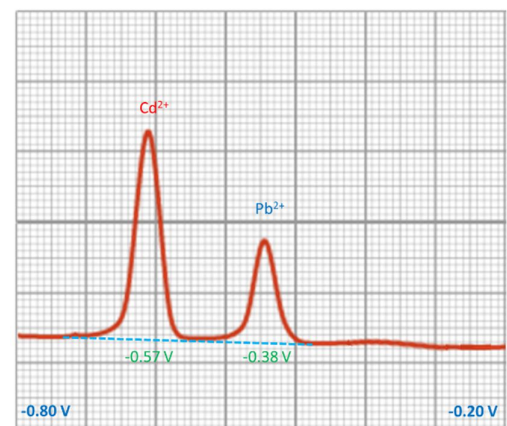
Πολαρογράφημα : Το πολαρογράφημα έχει τη μορφή του παρακάτω διαγράμματος. Από τη τιμή του δυναμικού όπου εμφανίζεται η κάθε κορυφή προσδιορίζεται το είδος του ιόντος, η πρώτη κορυφή είναι στα -0.57 V και αντιστοιχεί στο Cd²⁺ και η δεύτερη είναι στα -0.38 V και αντιστοιχεί στο Pb²⁺. Το εμβαδόν ή το ύψος της κορυφής είναι ανάλογο της ποσότητας του ιόντος, λόγω δυσκολίας υπολογισμού του εμβαδού ο προσδιορισμός της ποσότητας θα γίνει με τη χρήση του ύψους της κορυφής. Το ύψος αυτό θα πρέπει να μετατραπεί σε ένταση ρεύματος σύμφωνα με τις παραμέτρους του οργάνου (1 mm αντιστοιχεί σε 0.5 nA ρεύματος).



Αποτελέσματα και ανάλυση:

Στο πολαρογράφημα καθώς η σάρωση του δυναμικού γίνεται από τα -0.80 V προς τα -0.20 V αρχικά θα εμφανιστεί η κορυφή που οφείλεται στη ποσότητα των ιόντων του Cd στο δυναμικό οξειδωση του στα -0.57 V και στη συνέχεια η κορυφή που οφείλεται στη ποσότητα των ιόντων του Pb στο δυναμικό οξειδωση του στα -0.38 V. Καθώς η απεικόνιση είναι σε χαρτί, δεν μπορεί να γίνει ολοκλήρωση της επιφάνειας της κορυφής οπότε θα μετρηθεί το ύψος της κάθε κορυφής ώστε να προσδιοριστεί η ποσότητα του κάθε ιόντος.

Αρχικά με ένα **μολύβι** τραβάτε τη γραμμή υποβάθρου (την baseline), παρατηρείτε ότι δεν είναι οριζόντια αλλά έχει μια μικρή κλίση προς τα κάτω καθώς το σήμα δεν παραμένει



σταθερό αλλά έχει μια μικρή μείωση. Στη συνέχεια παίρνεται ένα **χάρακα** και το τοποθετείτε κάθετα στην baseline, αδιαφορώντας για τις γραμμές πλέγματος του χαρτιού. Το μηδέν του χάρακα πρέπει να είναι ακριβώς πάνω στην baseline που τραβήξατε προηγούμενος και να είναι κάθετα σε αυτή. Μετράτε με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια το ύψος της **κορυφής** των ιόντων Cd. Στη **συνέχεια** μετράτε με τον ίδιο τρόπο το ύψος της **κορυφή** των ιόντων του Pb. Με την ίδια διαδικασία μετράτε τα ύψη των κορυφών σε όλα τα πολαρογραφήματα και καταγράφετε τις τιμές τους σε mm.

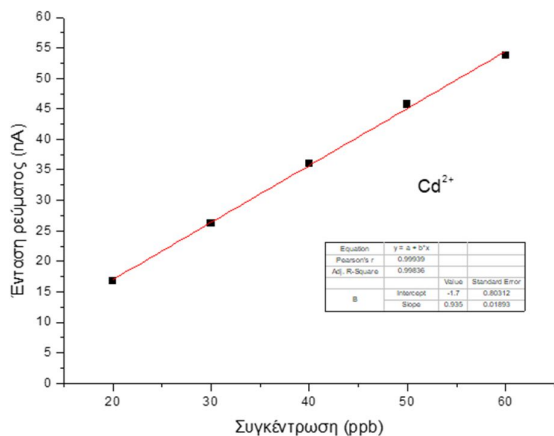
Στο τυφλό δείγμα δεν αναμένονται κορυφές στα δυναμικά των ιόντων του Cd και του Pb. Αν όμως εμφανιστεί κορυφή σε κάποιο ιόν, τότε το τυφλό δείγμα δεν ήταν καθαρό, είχε κάποια επιμόλυνση. Η κορυφή αυτή θα πρέπει να μετρηθεί και να αφαιρεθεί από τις τιμές των κορυφών των υπόλοιπων δειγμάτων. Έχουν πραγματοποιηθεί δύο ανεξάρτητα τυφλά δείγματα, ένα που αφορά τα πρότυπα και ένα που αφορά το άγνωστο δείγμα. Το τυφλό δείγμα των πρότυπων διαλυμάτων επηρεάζει μόνο αυτά, όπως αντίστοιχα και το τυφλό δείγμα του αγνώστου, επηρεάζει μόνο αυτό.

Για κάθε πρότυπο δείγμα καταγράφεται το ύψος της κορυφής για το Cd και για τον Pb αντίστοιχα σε mm, αν στο τυφλό δείγμα έχει εμφανιστεί κάποια κορυφή, το ύψος της αφαιρείται από τα ύψη των κορυφών του αντίστοιχου ιόντος.

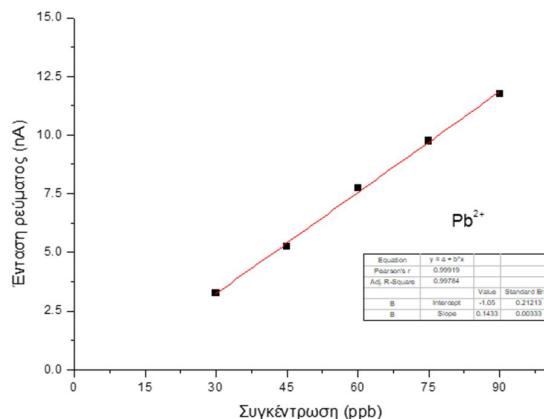
Παράδειγμα:

	Συγκέντρωση (ppb)	Ύψος κορυφών (mm)	Ένταση ρεύματος (nA)
Cd ²⁺	20	33.5	16.75
	30	52.5	26.25
	40	72.0	36.00
	50	91.5	45.75
	60	107.5	53.75
Pb ²⁺	30	6.5	3.25
	45	10.5	5.25
	60	15.5	7.75
	75	19.5	9.75
	90	23.5	11.75

Θα μετατρέπεται το ύψος της κάθε κορυφής σε ένταση ρεύματος με χρήση της ευαισθησίας που έχει επιλεγεί (0.5 nA / mm). Χρησιμοποιώντας τις τιμές της συγκέντρωσης και τις τιμές της έντασης του ρεύματος θα δημιουργήσετε δύο καμπύλες αναφοράς, μία για το ιόν του Cd και μία για το ιόν του Pb με τη χρήση ενός λογισμικού προγράμματος.



Καμπύλη αναφοράς για το Cd²⁺



Καμπύλη αναφοράς για το Pb²⁺

Υπολογισμός ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης:

Για κάθε ιόν υπολογίζεται τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ξεχωριστά, έτσι:

Για το ιόν του το Cd²⁺ θα είναι:

$$\text{το όριο ανίχνευσης: } LOD = \frac{3 \cdot S}{m} = \frac{3 \cdot 0.01893}{0.935} = 0.060738 \sim 0.061 \text{ ppb}$$

$$\text{και το όριο ποσοτικοποίησης: } LOQ = \frac{10 \cdot S}{m} = \frac{10 \cdot 0.01893}{0.935} = 0.20246 \sim 0.202 \text{ ppb}$$

Για το ιόν του το Pb²⁺ θα είναι:

$$\text{το όριο ανίχνευσης: } LOD = \frac{3 \cdot S}{m} = \frac{3 \cdot 0.00333}{0.1433} = 0.069714 \sim 0.070 \text{ ppb}$$

$$\text{και το όριο ποσοτικοποίησης: } LOQ = \frac{10 \cdot S}{m} = \frac{10 \cdot 0.00333}{0.1433} = 0.232331 \sim 0.232 \text{ ppb}$$

Άγνωστο δείγμα:

Στο άγνωστο δείγμα μετράτε το ύψος της κορυφής του Cd και του Pb από τα οποία έχετε αφαιρέσει πιθανή κορυφή που έχει εμφανιστεί στο τυφλό δείγμα του αγνώστους (δηλ. στο δεύτερο τυφλό δείγμα που πραγματοποιήσατε). Μετατρέπεται το ύψος της κάθε κορυφής σε ένταση ρεύματος και στη συνέχεια με τη χρήση των καμπυλών αναφοράς υπολογίζεται τις συγκεντρώσεις των ιόντων στο άγνωστο διάλυμα.

	Ύψος κορυφών (mm)	Ένταση ρεύματος (nA)	Συγκέντρωση (ppb)
Cd ²⁺	68.0	34.0	38.2
Pb ²⁺	17.5	8.75	68.4

Τα τελικά αποτελέσματα δίνονται με ένα δεκαδικό και ελέγχονται αν είναι μέσα στα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου.

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 Ι:



<https://www.chemistry.uoc.gr/eclass/modules/document/?course=CHEM-UNDER114>

Youtube:



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

Ερωτήσεις

- 1) Περιγράψετε τη τεχνική της διαφορικής παλμικής πολαρογραφίας με αναδιαλυτική τεχνική.
- 2) Για ποιο λόγο η μέτρηση του ρεύματος γίνεται λίγο πριν το τέλος του κάθε παλμού και όχι κατά τη διάρκεια του?
- 3) Για ποιο λόγο γίνεται απαέρωση του δείγματος αρχικά και πως ακριβώς γίνεται αυτή?
- 4) Ποια στοιχεία αναλύονται και σε ποια δυναμικά εμφανίζονται?
- 5) Ποιο είναι το ηλεκτρόδιο εργασίας, αναφοράς και βοηθητικό? Ποιος ο λόγος ύπαρξης του κάθε ενός από αυτά?
- 6) Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα του ηλεκτροδίου εργασίας.
- 7) Η μέτρηση της έντασης του ρεύματος πραγματοποιείται κατά το στάδιο της αναγωγής ή της οξειδωσης και γιατί;
- 8) Γιατί πρέπει να διατηρείται σταθερός ο χρόνος που πραγματοποιείται η αναγωγή (πρώτο στάδιο της αναδιαλυτικής τεχνικής);
- 9) Αν το μέγεθος της σταγόνας από 2 που χρησιμοποιείται γίνει 3, θα αλλάξει το μέγεθος της κορυφής; και αν ναι θα είναι μεγαλύτερη ή μικρότερη;
- 10) Αν η αρχική ευαισθησία του οργάνου από (1 mm αντιστοιχεί σε 0.5 nA) γίνει 1 mm για 1.0 nA, θα αλλάξει το μέγεθος της κορυφής; και αν ναι θα είναι μεγαλύτερη ή μικρότερη;
- 11) Το αρχικό διάλυμα των ιόντων Cd^{2+} και Pb^{2+} έχει συγκέντρωσης 20 ppm για το κάθε ιόν. Να υπολογιστούν τα ml που απαιτούνται από το καθένα stock διάλυμα, για τη παρασκευή διαλύματος συγκέντρωσης 20 ppb για τα ιόντα Cd^{2+} και Pb^{2+} αντίστοιχα σε τελικό όγκο 20 ml.
- 12) Χρησιμοποιώντας τη καμπύλη αναφοράς του ιόντος Cd^{2+} και γνωρίζοντας το ύψος της κορυφής του άγνωστου δείγματος να είναι 60.0 mm, υπολογίσετε τη συγκέντρωση του αγνώστου δείγματος σε ιόντα Cd^{2+} (για ευαισθησία 0.5 nA/mm).
- 13) Χρησιμοποιώντας τη καμπύλη αναφοράς του ιόντος Pb^{2+} και γνωρίζοντας το ύψος της κορυφής του άγνωστου δείγματος να είναι 16.5 mm, υπολογίσετε τη συγκέντρωση του αγνώστου δείγματος σε ιόντα Pb^{2+} (για ευαισθησία 0.5 nA/mm).

Ασκήσεις Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας II:

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

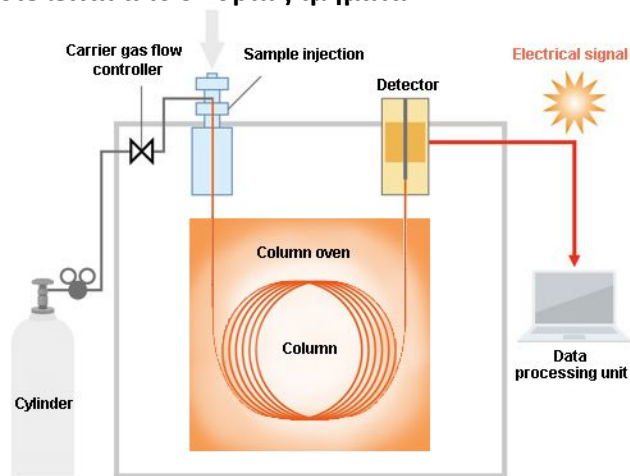
Σκοπός της άσκησης είναι:

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
στην 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 10 µl 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 εισαγωγέας: 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)
 - Θερμοκρασία: θερμοκρασιακό πρόγραμμα (αρχικά 50 °C για 2 λεπτά, στη συνέχεια αυξάνει κατά 10 °C μέχρι στους 120 °C, όπου παραμένει για 1 λεπτό, συνολικός χρόνος προγράμματος 10 λεπτά)
- **Ανιχνευτής:**
 - Τύπος: Ιονισμού φλόγας (FID)
 - θερμοκρασία: 250 °C
 - ευαισθησία: 100
 - αέριο makeur: He
 - αέρια φλόγας: H₂ + Air
- Διαλύτης: tert-Butyl methyl ether (MTBE)
- Εσωτερικό πρότυπο: acetonitrile (ACN)

Το λειτουργικό του οργάνου αναλύεται στο παράρτημα 'Λειτουργικό Chrom Card GC-FID'

Το πειραματικό μέρος χωρίζεται σε τρία μέρη:

- A. Δημιουργία ενός διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης αλκοολών
- B. Την ανάλυση ενός άγνωστου διαλύματος
- Γ. Την ανάλυση ενός αλκοολούχου ποτού προερχόμενο από απόσταξη (πχ ρακή)

Άνοιγμα οργάνου:

1. Ανοίγετε το χρωματογράφο.
2. Ανοίγετε τον ηλεκτρονικό υπολογιστή.
3. Ανοίγετε τα αέρια (He, Air, H₂) ανοίγοντας τη κάθε φιάλης. Αν στα μανόμετρα των αερίων, η πίεση εξόδου είναι κάτω από 5 bar, την αυξάνετε στα 5 bar.
4. Από το λογισμό του οργάνου, επιλέγεται το επιθυμητό πρόγραμμα 'Alcohols', το φορτώνεται στο χρωματογράφο και περιμένετε να επιτευχθούν οι επιθυμητές θερμοκρασίες και να σταθεροποιηθεί το σήμα του.

Διαδικασία:


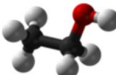
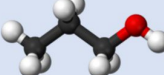
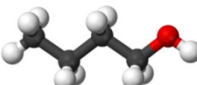

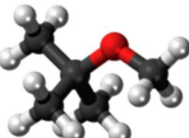
1. Δημιουργία ενός πρότυπου διαλύματος.
2. Τρία injections από το πρότυπο διάλυμα.
3. Ένα injection από άγνωστο διάλυμα που θα σας δοθεί.
4. Ένα injection από ένα αλκοολούχο ποτό προερχόμενο από απόσταξη.

A. Δημιουργία πρότυπου 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, βγαίνει μέσα στους επιθυμητούς χρόνους, χωρίς να επικαλύπτει κάποια κορυφή των αλκοολών και το σήμα που δίνει είναι κοντά σε αυτά των ενώσεων (οι αλκοόλες έχουν από ένα έως τέσσερα άτομα άνθρακα και το ακετονιτρίλιο έχει δύο). Ως διαλύτης χρησιμοποιείται ο τετρα-βουτυλομεθυλαιθέρας (Tert-ButylMethylEther, MTBE) με σημείο ζέσεως 55 °C, μικρότερο και από αυτό της μεθανόλης.

Ένωση	Χημικός τύπος	3-D	Σημείο Ζέσεως (°C)	Πυκνότητα (Kg/lit)
Μεθανόλη	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$		64.7	0.79
Αιθανόλη	$\begin{array}{c} \text{H} \ \text{H} \\ \ \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \ \\ \text{H} \ \text{H} \end{array}$		78.2	0.79
1-Προπανόλη	$\begin{array}{c} \text{H} \ \text{H} \ \text{H} \\ \ \ \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \ \ \\ \text{H} \ \text{H} \ \text{H} \end{array}$		97.0 – 98.0	0.80
1-Βουτανόλη	$\begin{array}{c} \text{H} \ \text{H} \ \text{H} \ \text{H} \\ \ \ \ \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \ \ \ \\ \text{H} \ \text{H} \ \text{H} \ \text{H} \end{array}$		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

Το χαμηλότερο σημείο ζέσεως είναι 55.2 °C που είναι του διαλύτη (MTBE) και το υψηλότερο είναι 117.7 °C της Βουτανόλης. Λόγω του ότι οι ενώσεις είναι πτητικές, για τη δημιουργία των διαλυμάτων χρησιμοποιούνται ειδικές πιπέτες μεταβαλλόμενου όγκου. Σε αυτές τα tip τους περιέχουν εσωτερικά ένα έμβολο το οποίο εμποδίζει την εξάτμιση των πτητικών ενώσεων.

Δημιουργία προτύπου δείγματος:

Μεταφέρετε με προσοχή (λόγο πτητικότητας) 50 μl από κάθε αλκοόλη (MeOH, EtOH, ProOH, ButOH) και από το εσωτερικό πρότυπο (ACN) σε ειδικό (βιδωτό) νιάι και συμπληρώνετε σε τελικό όγκο με το 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 να είναι στα 2 ml.

Ερώτηση:

Πόση είναι η συγκέντρωση του διαλύματος που παρασκευάσατε ως προς κάθε αλκοόλη σε μg/μl;

Απάντηση: πχ 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 (σχέση 1). Η πυκνότητα της MeOH είναι 0.79 Kg/lit → 0.79 * 10³gr/lit → 0.79 * 10³μg/μl. Έτσι η σχέση 1 γίνεται:

$$50 \mu\text{l}/2000 \mu\text{l} \rightarrow 50 * 0.79 * 10^3 \mu\text{g} / 2000 \mu\text{l} \rightarrow 19.75 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Υπολογίστε τις συγκεντρώσεις των υπόλοιπων αλκοολών καθώς και του εσωτερικού προτύπου.



Injections δείγματος

Αφού έχει σταθεροποιηθεί το σήμα, ετοιμάζεται ο χρωματογράφος ώστε να είναι έτοιμος για το πρώτο injection.

- Από το λογισμικό του, από το κεντρικό παράθυρο επιλέγετε:

edit sample και γράφεται στο Act, ανοίγει ένας πίνακας όπου:

1. στη πρώτη στήλη (**sample name**) γράφετε το έτος, το όνομα της ομάδας και ποιο injection κάνετε πχ **2020 omada A1 standard 1**
2. στη δεύτερη στήλη (**file name**) γράφετε ακριβώς το ίδιο (πχ **2020 omada A1 standard 1**) και αφού βγείτε από το κελί πατάτε **OK**

Στη πρώτη στήλη θα είναι το όνομα που θα βλέπετε στην οθόνη και στη δεύτερη το όνομα με το οποίο θα σωθεί το χρωματογράφημα.

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

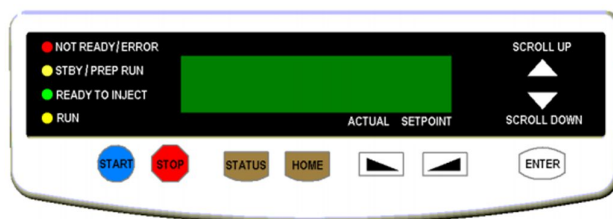
View → view sample being acquired

Ανοίγει ένα παράθυρο όπου θα φαίνεται το χρωματογράφημα καθώς θα τρέχει. Στη συνέχεια με μια σύριγγα υγρών (Hamilton):

1. ξεπλένετε 3 φορές με το διαλύτη (MTBE),
2. ξεπλένετε 3 φορές με το δείγμα
3. παίρνετε ακριβώς 1 μl δείγματος **χωρίς φυσαλίδες**.



Ο χρωματογράφος είναι σε κατάσταση **stand by**, θα πρέπει να πάει αρχικά σε κατάσταση **ready**. Πατώντας μια φορά το κουμπί **start** από τη κονσόλα του οργάνου, πηγαίνει από τη κατάσταση **stand by** σε **ready**. Στη κατάσταση **ready** ενεργοποιείται η ροή διαμοιρασμού (300 ml/min) καθώς το όργανο είναι σε λειτουργία split. Η ροή διαμοιρασμού κατά την διάρκεια που το όργανο είναι σε κατάσταση αναμονής (stand by) είναι κλειστή, ενεργοποιείται μόνο λίγο πριν την εισαγωγή του δείγματος ώστε να μπορέσει να γίνει ο διαμοιρασμός και στη συνέχεια κλείνει ξανά.

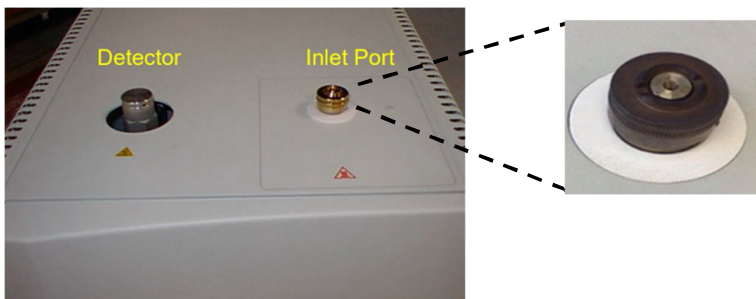


Τώρα το όργανο είναι έτοιμο για να γίνει το injection

Στο **inlet port** γίνεται το injection:

1. Τοποθετείτε η βελόνα στις σύριγγας ακριβώς στο κέντρο του inlet, μέσα σε αυτό υπάρχει το septum οπότε θα πρέπει να ασκηθεί μια μικρή πίεση ώστε η βελόνα να το τρυπήσει,
2. Βάζετε όλη την βελόνα μέσα,
3. Την αδειάζετε με γρήγορη κίνηση
4. Την αφαιρείτε γρήγορα.

5. Καθώς ο χειριστής πατάει το έμβολο της σύριγγας για να αδειάσει το περιεχόμενο της μέσα στον εισαγωγέα, ένα άλλο άτομο από την ομάδα πατάει το κουμπί **start** από τη κονσόλα του οργάνου για να ξεκινήσει η ανάλυση. Μόλις γίνει αυτό θα ανάψει το λαμπάκι **run** στη κονσόλα του οργάνου
6. Μετά το injection ξεπλένεται τη σύριγγα 3 φορές με το διαλύτη ώστε να καθαρίσει.



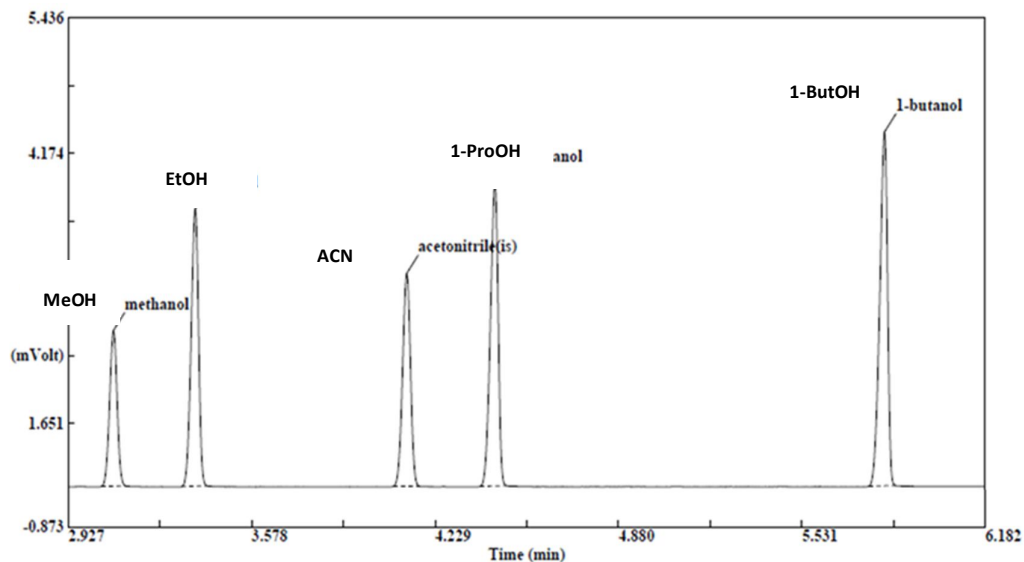
**Η διαδικασία του injection πρέπει να είναι γρήγορη και απότομη
όχι όμως με δύναμη για να μην προκληθεί κάποια ζημιά.**

Λάθη που μπορεί να γίνουν στο χειρισμό:

- Η αργή εισαγωγή του δείγματος θα έχει σαν αποτέλεσμα να μπει αργά μέσα στη στήλη και αυτό να δημιουργήσει δια πλάτυνση των κορυφών.
- Το 1 μl του δείγματος δεν περιλαμβάνει τη ποσότητα που έχει η βελόνα της σύριγγας(περίπου 0,3μl) , έτσι η αργή εισαγωγή ή εξαγωγή της σύριγγας θα έχει ως αποτέλεσμα μια ποσότητα από το δείγμα που βρίσκεται στην βελόνα να εξατμιστεί και στη πράξη να μπει μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος.
- Η σταδιακή εισαγωγή του δείγματος θα έχει ως αποτέλεσμα το σπάσιμο των κορυφών.
- Αν η βελόνα δεν τερματίσει τότε το δείγμα δεν θα μπει στο σωστό σημείο του εισαγωγέα και θα χαθεί. Το μήκος της βελόνας είναι συγκεκριμένο ώστε το δείγμα να μπαίνει στο σωστό σημείο.
- Αν δεν υπάρχει συγχρονισμός στο **injection** και στο πάτημα του κουμπιού **start**, θα υπάρχουν διαφορετικοί χρόνοι έκλουσης των ενώσεων στο χρωματογράφο.

Μόλις ολοκληρωθούν τα 10 λεπτά που χρειάζονται για να γίνει η ανάλυση βάση του θερμοκρασιακού προγράμματος, το χρωματογράφημα θα σωθεί αυτόματα και το παράθυρο που εμφανιζόταν θα κλείσει. Στη κονσόλα του οργάνου θα έχει ανάψει το λαμπάκι **not ready** επειδή το όργανο θα βρίσκεται στη διαδικασία επαναφοράς στις αρχικές θερμοκρασίες για να είναι έτοιμο για το επόμενο injection. Ταυτόχρονα θα ακούγετε ο ανεμιστήρας του φούρνου που θα ψύχει και θα κατεβάζει τη θερμοκρασία του. Μόλις φτάσει στην αρχική θερμοκρασία (50°C) θα ανάψει το λαμπάκι **stand by** και θα είναι έτοιμος για το επόμενο injection.

Τα χρωματογραφήματα θα έχουν τη παρακάτω μορφή, βγαίνει πρώτα η ουσία με το μικρότερο σημείο ζέσεως και τέλος 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 αντιστοιχεί στη ποσότητα άνθρακα της κάθε ουσίας. Έτσι οι MeOH, EtOH και ACN έχουν την ίδια συγκέντρωση (19.75μg/μl), όμως η αιθανόλη έχει δύο άνθρακες, ενώ η μεθανόλη ένα, οπότε η επιφάνεια ολοκλήρωσης της αιθανόλης αναμένεται διπλάσια από της μεθανόλης. Το ACN έχει δύο άνθρακες και ίδια συγκέντρωση με αιθανόλη οπότε η επιφάνεια ολοκλήρωσης του αναμένεται ίδια με της αιθανόλης, όμως δεν ισχύει αυτό διότι έχουν διαφορετική οξειδωτική κατάσταση δηλ. η αιθανόλη δίνει 5e⁻ ενώ το ακετονιτρίλιο 1e⁻ οπότε το σήμα της αιθανόλης είναι μεγαλύτερο από του ακετονιτρίλιου και άρα η επιφάνεια ολοκλήρωσης της. Η προπανόλη έχει τρεις άνθρακες αλλά και η συγκέντρωσή της είναι λίγο μεγαλύτερη (20.00 μg/μl) από αυτή της αιθανόλης, οπότε η επιφάνεια ολοκλήρωσης της αναμένεται να είναι μεγαλύτερη καθώς επίσης και της βουτανόλης που έχει τέσσερα άτομα άνθρακα και ακόμα μεγαλύτερη συγκέντρωση (20.25 μg/μl).

**Με τον ίδιο τρόπο γίνεται και το 2^ο και το 3^ο injection
από το ίδιο πρότυπο (standard).**

B. Άγνωστο Δείγμα

Σας δίνεται άγνωστο δείγμα αλκοολών, στο οποίο θα κάνετε μόνο ένα injection με την ίδια ακριβώς διαδικασία όπως του πρότυπου δείγματος. Το όνομα που θα δώσετε στο αρχείο θα είναι πχ **2020 omada A1 agnwsto**. Η μόνη πληροφορία που έχετε για τη σύσταση του αγνώστου είναι ότι είναι ένα μίγμα από κάποιες από τις 4 αλκοόλες που όμως είναι διαλυμένες στον ίδιο διαλύτη με το πρότυπο και ότι το εσωτερικό πρότυπο είναι ίδιο και ίδιας συγκέντρωσης με το πρότυπο διάλυμα.

Πλύσιμο της σύριγγας πριν τη λήψη του αγνώστου όπως έγινε στα πρότυπα.

Γ. Αλκοολούχο ποτό προερχόμενο από απόσταξη (ρακή)

Ως αλκοολούχο ποτό θα χρησιμοποιήσετε ένα 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 πχ **2020 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 φύγει όλος ο διαλύτης (MTBE) από τη σύριγγα, διαφορετικά θα φανεί η κορυφή του διαλύτη στο χρωματογράφημα
- ξεπλένετε 3 φορές με το δείγμα (δηλ. τη ρακή με το εσωτερικό πρότυπο)
- παίρνετε ακριβώς 1 μl χωρίς φυσαλίδες
- Κάνετε το injection αφού ρυθμίσετε το GC πρώτα
- ξεπλένετε 3 φορές με καθαρό νερό
- ξεπλένετε 3 φορές με διαλύτη (MTBE) ώστε να μην μείνει νερό στη σύριγγα

Ολοκληρώσεις

Στο Lab book σας ετοιμάζετε πίνακες που για κάθε injection και κάθε ένωση θα σημειώνετε το χρόνο έκλουσης της (με ακρίβεια 2 δεκαδικών ψηφίων) και την επιφάνεια ολοκλήρωσης της.

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 χρόνους έκλουσης της κάθε αλκοόλης καθώς και του εσωτερικού πρότυπου. Έχετε τρεις χρόνους, ένα από κάθε injection του πρότυπου, σε αυτούς θα υπολογίσετε τη μέση τιμή τους και τη τυπική απόκλιση, με τα σωστά σημαντικά ψηφία.

Πχ για την MeOH από το πρώτο injection έχετε χρόνο έκλουσης 3.13 min, από το δεύτερο 3.15 min και από το τρίτο 3.15 min, δίνει μια μέση τιμή 3.14 min με μια τυπική απόκλιση 0.01 (3.14 ± 0.01). Αυτός θα είναι και ο χρόνος έκλουσης για την 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. Αρχικά θα πρέπει να υπολογίσετε τις συγκεντρώσεις της κάθε αλκοόλης καθώς και του εσωτερικού προτύπου (is) στο πρότυπο διάλυμα. Πχ στη MeOH είναι 19.75 μg/μl, **πρέπει να υπολογίσετε για την EtOH, ProOH, ButOH και ACN (is)**

Ο υπολογισμός του σχετικού συντελεστή απόκρισης (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 σε μg/μl
- area το εμβαδόν κορυφής.

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

θα δοθεί με τη μορφή: $\overline{RRF} \pm Sx$.

1. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του αγνώστου δείγματος

- Για τη ποιοτική ανάλυση του δείγματος, θα γίνει ταυτοποίηση της κάθε κορυφής, με τη σύγκριση των χρόνων έκλουσης των κορυφών του αγνώστου δείγματος με τη μέση τιμή των χρόνων έκλουσης κάθε ένωσης από το πρότυπο δείγμα, με το εύρος που του δίνει η τυπική απόκλιση.
- Για το ποσοτικό προσδιορισμό του δείγματος θα πρέπει να υπολογιστεί η συγκέντρωση της κάθε ουσίας στο άγνωστο διάλυμα σύμφωνα με το τύπο:

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

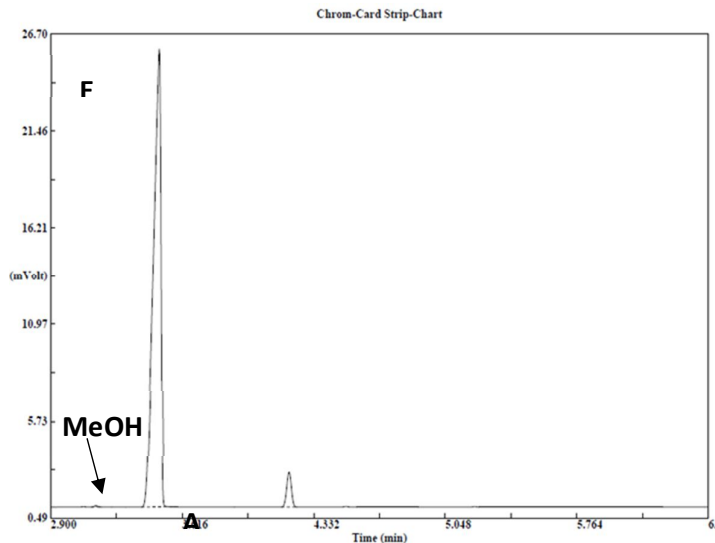
Όπου:

- A η ουσία,
- is το εσωτερικό πρότυπο,
- c η συγκέντρωση σε μg/μl
- area το εμβαδόν κορυφής.

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

2. Ανάλυση του δείγματος Ρακή:

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 κάθε ένωσης στο πρότυπο. Παρατηρείτε ότι εκτός από τη κορυφή του εσωτερικού προτύπου (ACN) που έχει προστεθεί, εμφανίζεται μια μεγάλη κορυφή στο χρόνο έκλουσης της αιθανόλης και μερικές φορές μια πολύ μικρή στο χρόνο έκλουσης της μεθανόλης. Στους χρόνους έκλουσης της προπανόλης και της βουτανόλης δεν εμφανίζονται κορυφές, όπως και αναμενόταν.



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

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

Τέλος από τη συγκέντρωση της αιθανόλης υπολογίζονται οι αλκοολικοί βαθμοί της ρακής (% v/v).

Παράδειγμα: έστω ότι η συγκέντρωση της αιθανόλης σε ένα δείγμα ρακής ήταν $395.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, πόσοι είναι οι αλκοολικοί βαθμοί; Η πυκνότητα της αιθανόλης είναι $0.79 \text{ kg}/\text{lt}$ οπότε είναι $0.79 \cdot 10^3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, οπότε η συγκέντρωση γίνεται: $395.1 \mu\text{g}/\mu\text{l} \rightarrow 395.1 / (0.79 \cdot 10^3) \mu\text{l}/\mu\text{l} \rightarrow 0.50001 \text{ v/v} \rightarrow 50.01 \% \text{ v/v}$

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 – Ασκήσεις:

1. Η συγκέντρωση της MeOH της EtOH και του εσωτερικού πρότυπου είναι $19.75 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ και οι επιφάνειες ολοκλήρωσης της MeOH είναι 18983 της EtOH 30664 και του εσωτερικού προτύπου 29437. Υπολογίστε το RRF της MeOH και της EtOH.
2. Στο άγνωστο δείγμα η επιφάνεια ολοκλήρωσης της EtOH είναι 50450 και του εσωτερικού προτύπου 25400. Με βάση το RRF της EtOH που βρήκατε προηγούμενος, υπολογίστε 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 η πυκνότητα 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 στην βέλτιστη ταχύτητας ροής της κινητής φάσης.

Η άσκηση χωρίζεται σε δύο μέρη:

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

Βέλτιστη ταχύτητα ροής:

Σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας, μεταβάλλεται η ροή της κινητής φάσης ώστε να βρεθεί η βέλτιστη ταχύτητα ροής για να υπάρχει ο μέγιστος αριθμός θεωρητικών πλακών με βάση την εξίσωση Van Deemter. Το ύψος ισοδύναμο θεωρητικής πλάκας (ΙΥΘΠ) μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι το ελάχιστο μέρος της κολώνας που μπορεί να γίνει διαχωρισμός:

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

Όπου:

- L το μήκος της στήλης
- N ο αριθμός των θεωρητικών πλακών

Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών που δίνεται από τον τύπο:

$$N = 16 t_r^2 / t_w^2 = 16 (t_r / t_w)^2$$

Όπου:

- t_r ο χρόνος έκλουσης της ουσίας
- t_w το πλάτος κορυφής της ουσίας.

Η εξίσωση **Van Deemter** δείχνει με ποιον τρόπο η στήλη και η ταχύτητα ροής επηρεάζουν το ύψος πλάκας. Η σχέση είναι:

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

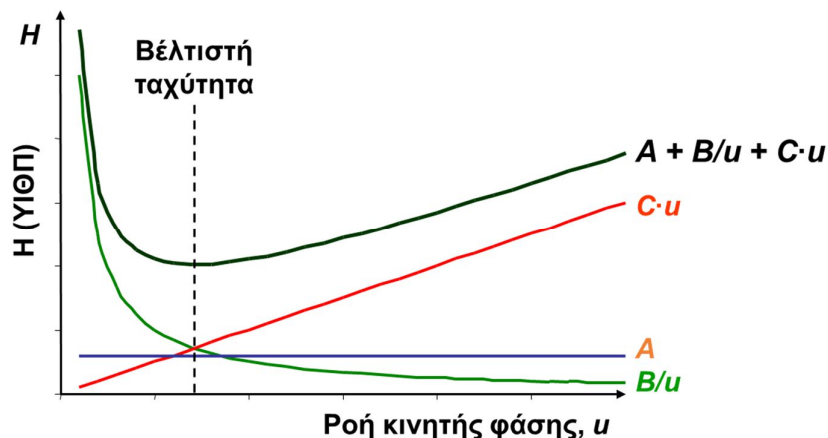
Όπου:

- U είναι η ταχύτητα ροής,
- A ο συντελεστής στροβιλώδους διάχυσης
- B ο συντελεστής επιμήκης διάχυσης
- C ο συντελεστής αντίστασης στη μεταφοράς μάζας

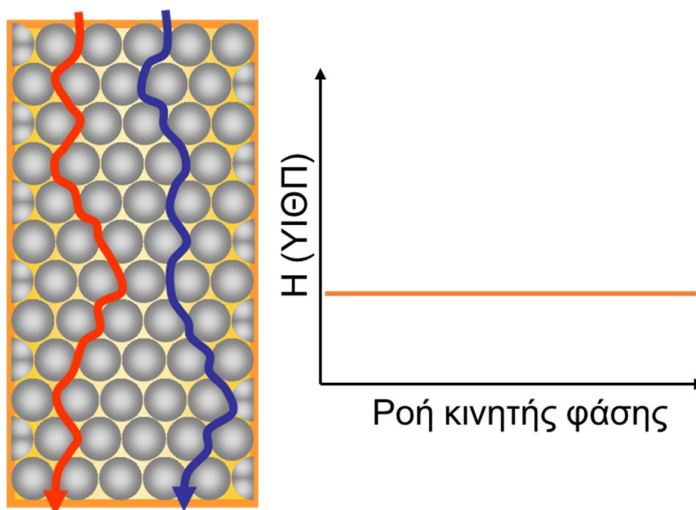
Η εξίσωση δείχνει ότι υπάρχουν τρεις διαφορετικοί μηχανισμοί που επηρεάζονται διαφορετικά από την ταχύτητα ροής. Είναι ανάλογοι, αντιστρόφως ανάλογοι ή ανεξάρτητοι της ταχύτητας ροής. Η συνολική συμπεριφορά της ταχύτητας της κινητής φάσης ως προς το ύψος της ισοδύναμης θεωρητικής πλάκας,



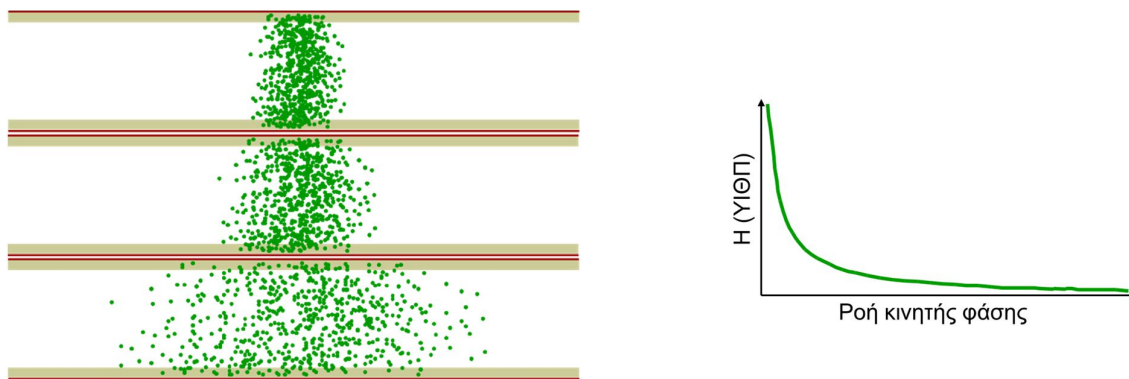
αρχικά δίνει μια μείωση, φτάνει σε ένα ελάχιστο και στη συνέχεια αυξάνει. Η ταχύτητα της κινητής φάσης που αντιστοιχεί στο ελάχιστο ΥΙΘΠ είναι το ζητούμενο της σημερινής άσκησης.



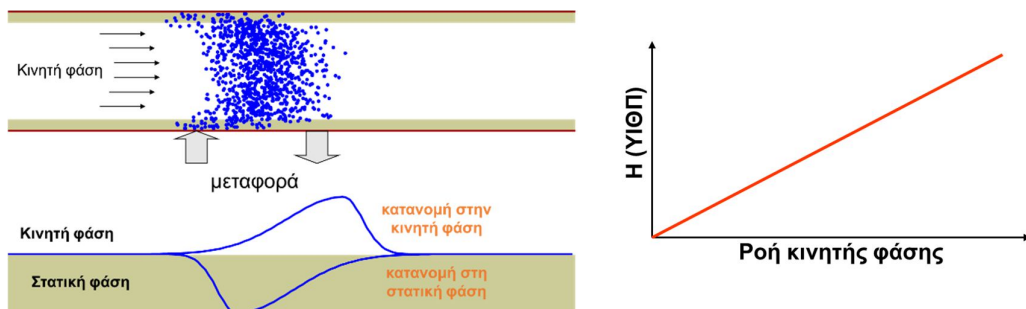
1. Ο συντελεστής στροβιλώδους διάχυσης (A) εξαρτάται από τις πολλαπλές διαδρομές, λόγω ανομοιομορφίας μεγέθους και σχήματος σωματιδίων πληρωτικού υλικού, διαφορετικές διαδρομές έχουν διαφορετικές αποστάσεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργείται διεύρυνση των κορυφών, επηρεάζονται το ίδιο όλες οι ενώσεις, ανεξάρτητα από την κατάσταση τους και δεν επηρεάζεται από τη ταχύτητα της κινητής φάσης.



2. Ο συντελεστής B εξαρτάται από την επιμήκη διάχυση της ουσίας στην κινητή φάση. Η διάχυση απαιτεί χρόνο, έτσι όσο πιο γρήγορα γίνει η ανάλυση τόσο λιγότερη θα είναι η διεύρυνση της κορυφής λόγω διάχυσης. Ο μηχανισμός της διάχυσης είναι αντιστρόφως ανάλογος με την ταχύτητα της κινητής φάσης.



3. **Ο C σχετίζεται με αντίσταση μεταφοράς μάζας στη στήλη.** Η αύξηση της ταχύτητας της κινητής φάσης αυξάνει την αντίσταση της μεταφοράς μάζας. Μόλις τα μόρια έχουν εισέλθει σε μία από τις φάσεις, είναι «δύσκολο» να βγουν ξανά. Ο μηχανισμός της μεταφοράς μάζας είναι ανάλογος της ταχύτητας ροής

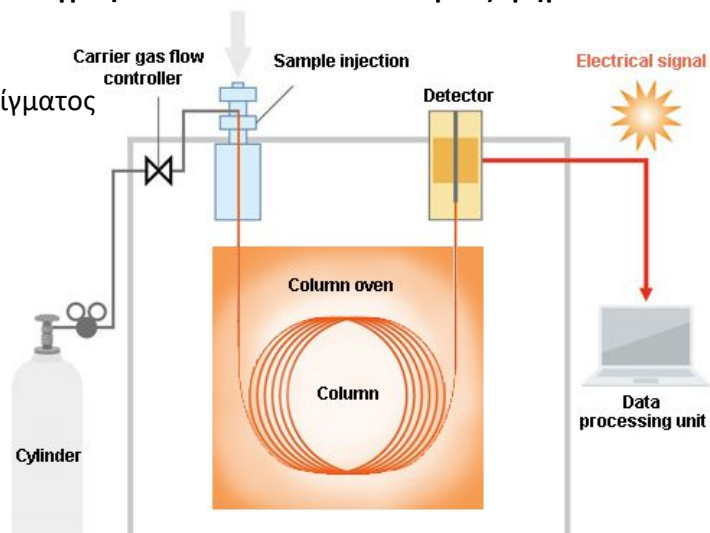


Σε πληρωμένες στήλες και οι τρεις όροι συνεισφέρουν στη διεύρυνση των κορυφών. Τα μικρότερα σωματίδια θα δώσουν παρόμοιες διαδρομές, περιορίζοντας τη μέγιστη διεύρυνση από το φαινόμενο πολλαπλής διαδρομής, όπως επίσης αν έχουν ομοιόμορφο μέγεθος και σχήμα. Τα μικρότερα σωματίδια οδηγούν σε μεγαλύτερη ανταλλαγή μεταξύ των φάσεων και συνεπώς μειώνουν την αντίσταση μεταφοράς μάζας. Στην υγρή χρωματογραφία επειδή οι συντελεστές διάχυσης στα υγρά είναι μικροί σε σύγκριση με το αέριο, ο όρος B συνήθως δεν έχει σημασία, μόνο όταν χρησιμοποιούνται πολύ χαμηλές ταχύτητες ροής.

Στις ανοιχτές σωληνοειδείς στήλες (τριχοειδείς), ο όρος των πολλαπλών διαδρομών (A) είναι μηδέν, οπότε το πλάτος της ζώνης μειώνεται και η διαχωριστική ικανότητα αυξάνεται.

Ένα σύστημα ενός αέριου Χρωματογράφου αποτελείται από 5 κυρίως τμήματα :

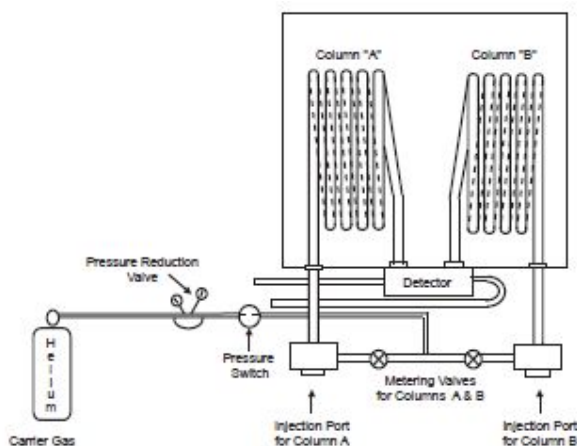
- 1) Την κινητή φάση
- 2) Το σύστημα εισαγωγής δείγματος
- 3) Την αναλυτική στήλη
- 4) Τον ανιχνευτή
- 5) Το καταγραφικό



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

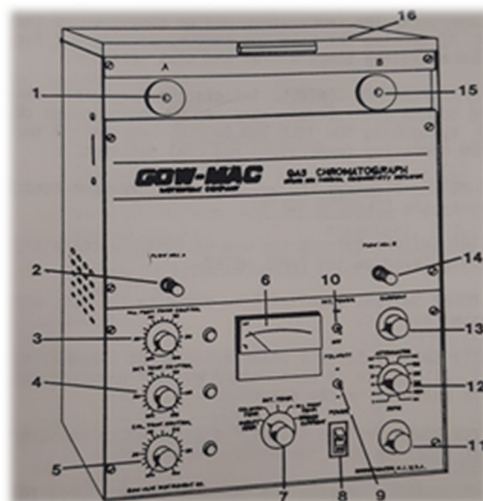
Οργανολογία

Το όργανο αποτελείται από δύο κολώνες πλήρωσεως την Α και την Β. Η κολώνα Α είναι αυτή που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των ουσιών και η κολώνα Β χρησιμοποιείται ως κολώνα αναφοράς. Για τη λειτουργία του ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας χρειάζεται η 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 κολώνα Α.
2. Flow ADJ. Ρυθμίζει τη ταχύτητα ροής της κολώνας Α.
3. Injection.port.temp. Ρυθμίζει τη θερμοκρασία του injector επί της %.
4. Det.Temp.Control. Ρυθμίζει τη θερμοκρασία του ανιχνευτή επί της %.
5. Col.temp.control Ρυθμίζει τη θερμοκρασία της στήλης επί της %.
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 τη 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 κολώνας Β.
15. Το inlet (injector) για την κολώνα Β.
16. Πόρτα του φούρνου. Μέσα σε αυτόν βρίσκονται οι δύο στήλες.



Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια – Όργανα:

- Τολουόλιο υψηλής καθαρότητας
- Αλκοόλες: MeOH, EtOH, 1-PrOH, 1-ButOH
- Μικροσύριγγα: σύριγγα υγρών: 5 μ l Hamilton
- Προχοΐδα ροής
- Χρονόμετρο
- Αέριος Χρωματογράφος Gow Mac series 350



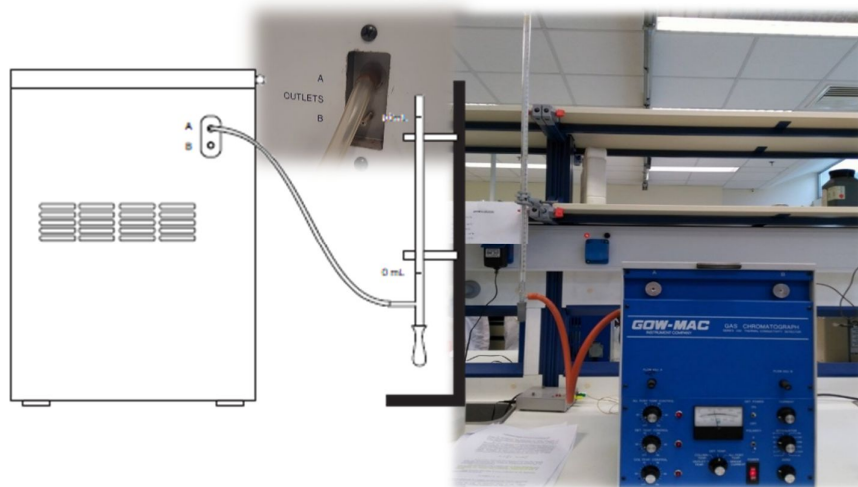
Παράμετροι Χρωματογράφου:

- **Κινητή φάση:**
 - **Αέριο:** Ag
 - **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:** σταθερό ~ 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:


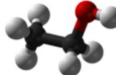
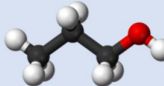
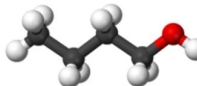
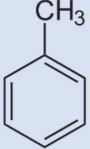
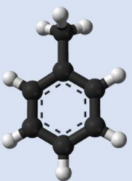
Ρυθμίζετε τη ροή της κινητής φάσης της στήλης A με το διακόπτη ροής (διακόπτης 2). Ο έλεγχος της ροής γίνεται με τη χρήση ενός ροόμετρου προχοΐδας, όπου στην είσοδο του συνδέεται με την έξοδο του χρωματογράφου. Πιέζοντας το πουάρ στο κάτω μέρος της προχοΐδας δημιουργείται μια φυσαλίδα η οποία μετακινείται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

Με ένα χρονόμετρο μετράτε το χρόνο που χρειάζεται για να μετακινηθεί η φυσαλίδα μέσα στην προχοΐδα κατά 10 ml και υπολογίζετε την ταχύτητά της σε ml/min. Αυτή είναι η ταχύτητα της κινητής φάσης. Αν η ταχύτητα ροής δεν είναι η επιθυμητή, την αλλάζετε από το διακόπτη 3 και αφού σταθεροποιηθεί τη μετράτε ξανά.

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

Όλες οι παράμετροι του χρωματογράφου παραμένουν σταθερές και το μόνο που θα αλλάζει είναι η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης. Η θερμοκρασία της στήλης παραμένει σταθερή και για το λόγο αυτό δεν είναι απαραίτητη η χρήση κάποιου κύκλου θερμοκρασιακού προγράμματος. Οι θερμοκρασίες που επιλέγονται πρέπει 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	$\begin{array}{c} \text{H} \ \text{H} \\ \ \ \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \ \ \\ \text{H} \ \ \text{H} \end{array}$		78.2
Προπανόλη	$\begin{array}{c} \text{H} \ \text{H} \ \text{H} \\ \ \ \ \ \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \ \ \ \ \\ \text{H} \ \ \text{H} \ \ \text{H} \end{array}$		97.0 – 98.0
Βουτανόλη	$\begin{array}{c} \text{H} \ \text{H} \ \text{H} \ \text{H} \\ \ \ \ \ \ \ \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \ \ \ \ \ \ \\ \text{H} \ \ \text{H} \ \ \text{H} \ \ \text{H} \end{array}$		117.7
τολουόλιο			110.6

Η στήλη που χρησιμοποιείται είναι πληρώσεως, πολική.

Θα κάνετε τρία (3) injection από 1 μl τολουολίου σε κάθε ταχύτητα ροής

- 30 ml/min
- 60 ml/min
- 90 ml/min

Injection

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

1. Προετοιμασία λογισμικού επικοινωνίας:

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

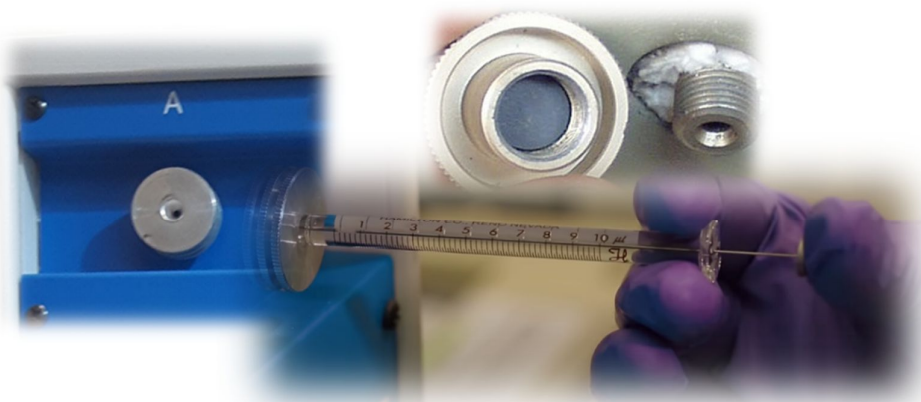
Από το παράθυρο “DataRead”

- 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
- Στα νέα παράθυρα γράφετε:
 - τη ταυτότητα του δείγματος
δηλ. έτος, ομάδα, δείγμα (πχ 2020 A5 tol 1inj.)
 - Ρυθμίζεται ο επιθυμητός χρόνος: πχ 8 min.
 - Πατάτε **ok** για να κατοχυρωθούν οι αλλαγές

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

2. Εισαγωγή του δείγματος (Injection):

1. Χρησιμοποιείτε μια σύριγγα υγρών των 5 μl (Hamilton).
2. Ξεπλένετε 3 φορές με το τολουόλιο.
3. Παίρνετε **ακριβώς 1 μl** δείγματος χωρίς φυσαλίδα.
4. Τοποθετείτε τη βελόνα της σύριγγας σε οριζόντια θέση, ακριβώς στο κέντρο του inlet. Μέσα στο inlet υπάρχει το septum, θα πρέπει να ασκηθεί μια μικρή πίεση ώστε η βελόνα να το τρυπήσει.
5. Βάζετε όλη την βελόνα μέσα
6. Την αδειάζετε με γρήγορη κίνηση
7. Την αφαιρείτε γρήγορα.
8. Καθώς ο χειριστής πατάει το έμβολο της σύριγγας για το injection στον εισαγωγέα, ένα άλλο άτομο από την ομάδα πατάει το κουμπί start από το λογισμικό του υπολογιστή για να ξεκινήσει η καταγραφή της ανάλυσης.



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

Λάθη που μπορεί να γίνουν στο χειρισμό:

- Η αργή εισαγωγή του δείγματος θα έχει σαν αποτέλεσμα να μπει αργά μέσα στη στήλη και αυτό να δημιουργήσει δια πλάτυνση των κορυφών.
- Το 1 μl δεν περιλαμβάνει την ποσότητα που έχει η βελόνα της σύριγγας (~0,3 μl), έτσι η αργή εισαγωγή θα έχει ως αποτέλεσμα μια ποσότητα από το δείγμα που βρίσκεται στην βελόνα να εξατμιστεί και να μπει μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος για ανάλυση.
- Η σταδιακή εισαγωγή του δείγματος θα έχει ως αποτέλεσμα το σπάσιμο των κορυφών.

- Αν η βελόνα δεν τερματίσει τότε το δείγμα δεν θα μπει στο σωστό σημείο του εισαγωγέα και θα χαθεί. Το μήκος της βελόνας είναι συγκεκριμένο ώστε το δείγμα να μπαίνει στο σωστό σημείο.
- Αν η σύριγγα δεν έχει ακριβώς 1 μl, η ποσότητα του δείγματος θα είναι διαφορετική με αποτέλεσμα το μέγεθος της κορυφή να είναι διαφορετικό. Μεγαλύτερη ποσότητα, μεγαλύτερη κορυφή. Δεν χρησιμοποιείται εσωτερικό πρότυπο (όπως στην άσκηση GC-FID) ώστε να μπορεί να γίνει διόρθωση.
- Κακός συγχρονισμός στο injection και το πάτημα του κουμπιού start, θα έχει ως αποτέλεσμα λάθος στο χρόνο έκλουσης (t_r). Διαφορετική ποσότητα δείγματος θα έχει σαν αποτέλεσμα να αλλάξει το πλάτος της κορυφής και έτσι το t_w . Αυτά θα οδηγήσουν σε λάθος 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 το χρωματογράφο στην ταχύτητα αυτή για το δεύτερο μέρος της άσκησης.

Για οικονομία χρόνου η στατιστικά επικρατούσα βέλτιστη ταχύτητα ροής σας δίνεται από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.

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

Αφού έχει σταθεροποιηθεί ο χρωματογράφος στην βέλτιστη ταχύτητας ροής, με την ίδια διαδικασία με το πρώτο μέρος κάνετε ένα injection από 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 injection η σύριγγα καθαρίζεται ξεπλένοντας τη με απιονισμένο νερό αρκετές φορές, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν ποσότητες των αλκοολών και μετά ξανά ξέπλυμα με την ίδια προς ανάλυση ουσία .

Το άγνωστο δείγμα δίνεται από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.

3. Ολοκλήρωση χρωματογραφημάτων:

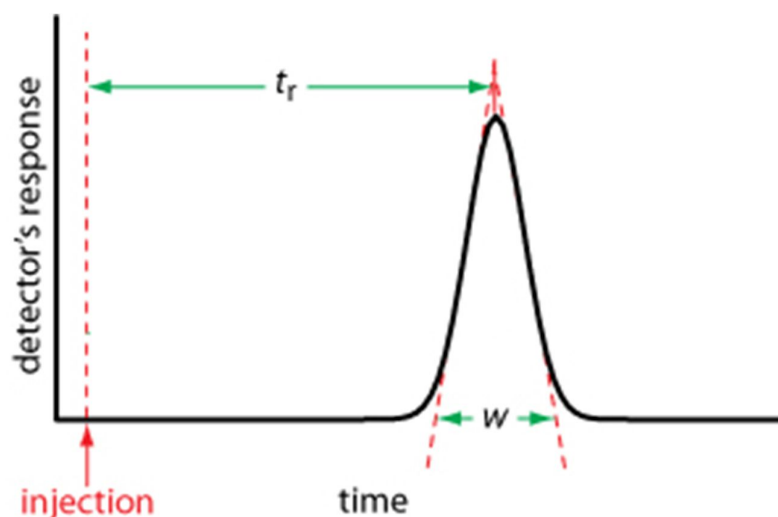
- Από το πρόγραμμα του μενού «**chromato**» επιλέγετε το **load**, βρίσκετε το επιθυμητό χρωματογράφημα (με το όνομα που του έχετε δώσει) και το φορτώνετε.
- Με το κουμπί «**zoom**» μεγαλώνετε τις κορυφές όσο χρειάζεται ώστε να είναι ευδιάκριτες.
- Πατώντας **αριστερό κλικ** στο ποντίκι ξεκινάει η ολοκλήρωση της κορυφής και πατώντας ξανά το **αριστερό κλικ** ολοκληρώνεται η διαδικασία.

- Καταγράψτε 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 μπορείτε να τα μεταφέρετε ως εικόνα σε ένα αρχείο **word** και στη συνέχεια στην αναφοράς σας. Αφού έχετε επιλέξει το επιθυμητό χρωματογράφημα και στο επιθυμητό μέγεθος των κορυφών, επιλέγετε από το μενού «**chromato**» το **copy image** και στη συνέχεια πηγαίνετε στο αρχείο word και πατάτε επικόλληση.

Αποτελέσματα και ανάλυση

1. Για βέλτιστη ταχύτητα ροής:

Σε κάθε ταχύτητα για κάθε ένα injection υπολογίζεται το t_r και το t_w . Το t_r σας το δίνει το λογισμικό κατά την ολοκλήρωση της κορυφής. Για τον υπολογισμό του t_w τραβάτε εφαπτόμενες από τη κορυφή προς τις πλευρές της κορυφής οι οποίες τέμνουν την Base line σε δύο σημεία το t_1 και το t_2 . Η απόσταση αυτών των σημείων είναι το t_w , (το w στη παρακάτω εικόνα).



Καταγράψτε 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 των t_w θα υπολογίσετε τον αριθμό των θεωρητικών πλακών (N) και στη συνέχεια το ύψος ισοδύναμο με θεωρητική πλάκα $H(\text{ΥΙΘΠ}) = L / N$ (σας δίνεται το μήκος της στήλης $L=1.22\text{m}$). Για κάθε injection θα υπολογίσετε ένα H , έτσι θα έχετε τρεις τιμές H από τις οποίες θα υπολογίσετε τη μέση τιμή και τη τυπική απόκλιση του για τη συγκεκριμένη ταχύτητα.

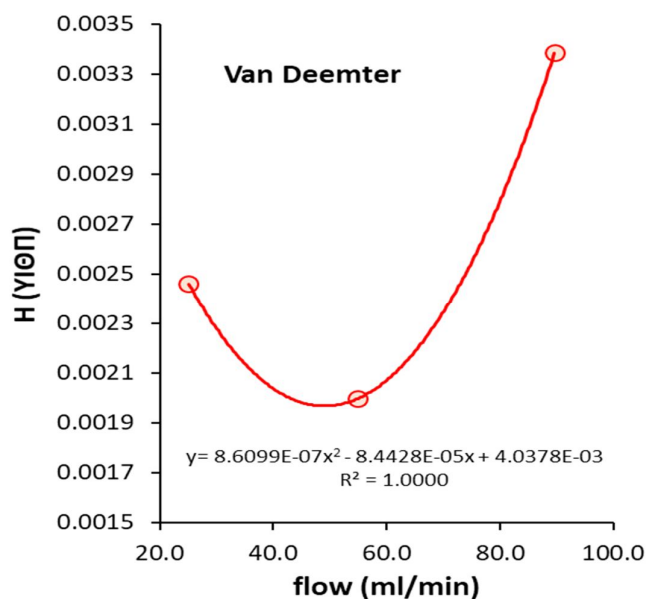
Το ίδιο θα υπολογίσετε για τις ταχύτητες ροής στα 60 και 90 ml/min

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

Η τελική έκφραση μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης να δίνεται με τη μορφή:

Για 30 ml/min H:
 0.00246 ± 0.00005 m

Στη συνέχεια κάνετε το διάγραμμα ΥΙΘΠ ως προς τη ταχύτητα που δίνει μια εξίσωση 2^{ου} 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

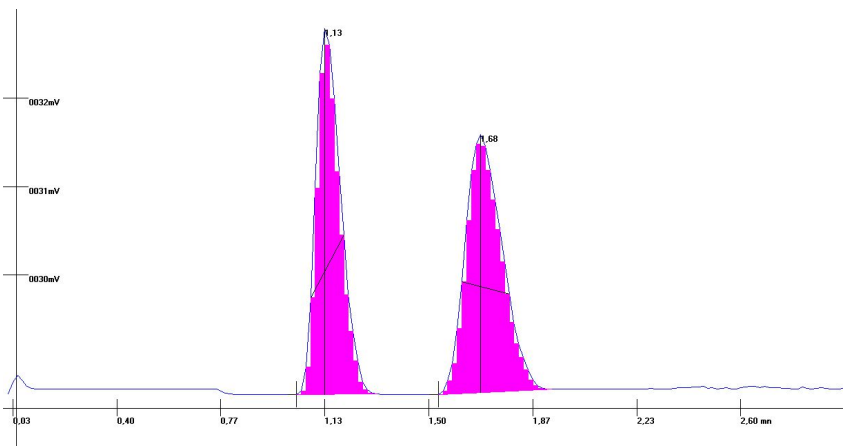
Υπολογίζονται οι χρόνοι έκλουσης t_r των αλκοολών καθώς και των κορυφών που εμφανίζονται στο άγνωστο δείγμα. Από τη σύγκριση των χρόνων έκλουσης γίνεται ο ποιοτικός προσδιορισμός των αλκοολών στο άγνωστο δείγμα

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 αλκοόλες αυτές.



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/UCrrDdUXUiTxyhezA140R1ew>

Ερωτήσεις – Ασκήσεις

1. Ο χρόνος έκλουσης 1 μl τολουόλιο είναι 2.30 min. Αν η ευαισθησία του ανιχνευτή από 2 γίνει 4 ο χρόνος έκλουσης θα αλλάξει; Αν ναι θα είναι μεγαλύτερος ή μικρότερος;
2. Ποια είναι η εξίσωση Van Deemter; από ποιους μηχανισμούς εξαρτάται;
3. Έχοντας ένα μίγμα που περιέχει τις αλκοόλες MeOH, EtOH, PrOH και ButOH με ποια σειρά θα γίνει η έκλουση τους 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 κάνατε εισαγωγή διαφορετικής ποσότητας του, τι θα επηρέαζε αυτό;
6. Γιατί το injection πρέπει να γίνεται α) γρήγορα, β) με σωστό συγχρονισμό με το ξεκίνημα της καταγραφής του χρωματογραφήματος;
7. Ποια είναι τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα μιας στήλης πληρώσεως;
8. Ποια είναι τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα ενός ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας (TCD).

Άσκηση – Υγρή Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (RPLC)

Σκοπός της άσκησης είναι:

Η κατανόηση των παραμέτρων της υγρής χρωματογραφίας και την εφαρμογή των σταθερών Hansch .

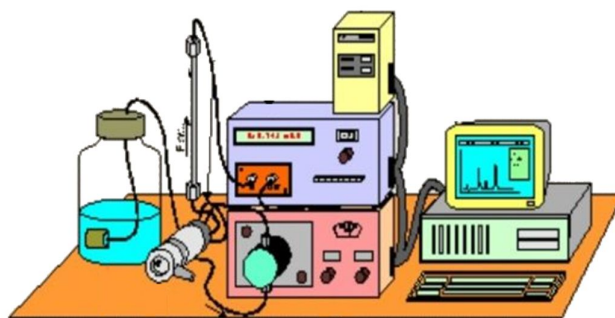
Η άσκηση της υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης χωρίζεται σε δύο μέρη:

- A. Στο πρώτο μέρος της άσκησης θα υπολογιστούν οι σταθερές Hansch (παράμετροι "π") για ουσίες που θα αναλυθούν και θα συγκριθούν με τις θεωρητικές τιμές ενός συστήματος οκτανόλης - νερού.
- B. Στο δεύτερο μέρος θα γίνει ένα ποιοτικός προσδιορισμός ενός άγνωστου δείγματος με τη χρήση πρότυπων δειγμάτων.



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 στην γενική εισήγηση της υγρής χρωματογραφίας.

Θεωρία Hansch

Ως αρχική μέθοδος υπολογισμού του συντελεστή κατανομής ($\log P$) θεωρείται το σύστημα της υδρόφοβης σταθερά “ π ” του Hansch, που είναι ιστορικά η πρώτη προσέγγιση υπολογισμού του συντελεστή κατανομής. Η εξαγωγή της σταθερά “ π ” στηρίχθηκε σε γραμμικές σχέσεις ελεύθερης ενέργειας κατά το πρότυπο της ανάπτυξης των ηλεκτρονιακών σταθερών σ του Hammett.

Δηλαδή: $\log (P_X/P_H)=\rho \cdot \pi_X$ όπου P_H και P_X οι συντελεστές κατανομής της μητρικής και της υποκαταστημένης ένωσης, ρ σταθερά που εξαρτάται από το σύστημα διαλυτών και π_X η υδρόφοβη σταθερά χαρακτηριστική του υποκατάστατη X , για το σύστημα οκτανόλης–νερού τέθηκε $\rho=1$. Το σύστημα που συνήθως αναφέρεται σε σχετικούς πίνακες δεδομένων είναι αυτό που προκύπτει από μητρική ένωση το βενζόλιο, εξ ορισμού η σταθερά π του υδρογόνου $\pi_H=0$.

Η παράμετρος “ π ” μπορεί να υπολογιστεί από το δείκτη χωρητικότητας της κάθε ουσίας, ο οποίος δίνεται από τη σχέση

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

Όπου:

- t_r είναι ο χρόνος κατακράτησης της ουσίας
- t_0 ο χρόνος έκλουσης για τις μη κατακρατούμενες ουσίες (νεκρός χρόνος).

Η τιμή αυτή του K' χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της παραμέτρου “ π ”:

$$\pi = \log K'_{\text{υποκατεστημένης ουσίας}} - \log K'_{\text{μητρική ουσία}}$$

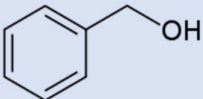
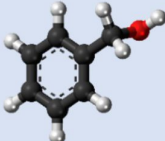


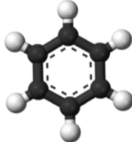

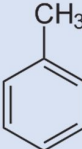
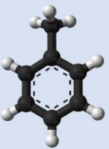




Αναλύτες	Θεωρ. Hansch “ π ” τιμές (οκτανόλης – νερού)
Βενζυλική αλκοόλη	-1.03
Νιτροβενζόλιο	-0.28
Νιτροτολουόλιο	0.28
Τολουόλιο	0.61
Βρωμοβενζόλιο	0.86
π - Ξυλόλιο	1.12

Οργανολογία:

Η στήλη που χρησιμοποιείται είναι μη πολική (C_{18}) και ο διαλύτης είναι πολικός, είναι μίγμα αιθανόλης – νερό σε αναλογία 70:30. Οπότε το σύστημα είναι αντίστροφης φάσης (**RLPC**) καθώς έχει μη πολική στατική φάση και πολικό διαλύτη (κινητή φάση).

Στο πρώτο μέρος της άσκησης οι ενώσεις που θα μελετηθούν είναι:

- **Βενζόλιο,**
- **Τολουόλιο**
- **παρα-ξυλόλιο**
- **Βενζυλική αλκοόλη**

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

Σήμανση επικινδυνότητας κατά NFPA (National Fire Protection Association). Οι αριθμοί από το 0 (κανένας κίνδυνος, κανονική ουσία) έως το 4 (σοβαρός κίνδυνος) τοποθετούνται στις τέσσερις περιοχές του "διαμαντιού" που είναι έγχρωμες :



- **το μπλε χρώμα:** αναφέρεται στους κινδύνους της υγείας,
- **το κόκκινο χρώμα:** αναφέρεται στην ευκολία ανάφλεξης του υλικού,
- **το κίτρινο χρώμα:** στη χημική του δραστηριότητα
- **στη λευκή περιοχή:** αναγράφονται κωδικοί για ειδικούς κινδύνους

Παράδειγμα:

- **OX** Οξειδωτικός παράγοντας
- **W** Αντιδρά με το νερό με ασυνήθιστο ή επικίνδυνο τρόπο

Λόγο της επικινδυνότητας των ουσιών (αρωματικοί υδρογονάνθρακες), οι ουσίες παραμένουν στον απαγωγό και όλες οι αραιώσεις γίνονται στον απαγωγό.

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

Ο διαχωρισμός γίνεται πρώτα λόγο πολικότητας, περισσότερες πολικές ενώσεις εκλούνται πιο γρηγορά καθώς η στήλη είναι άπολη και στη συνέχεια λόγο μεγέθους της ένωσης, το πιο μικρό μέγεθος είναι πιο ευκίνητο και εκλύεται πιο γρήγορα.

Οι ενώσεις που αναλύονται έχουν παραπλήσια χημική δομή, η πιο πολική ένωση είναι η Βενζυλική αλκοόλη που περιέχει ένα υδροξύλιο, οπότε θα βγει πρώτη.

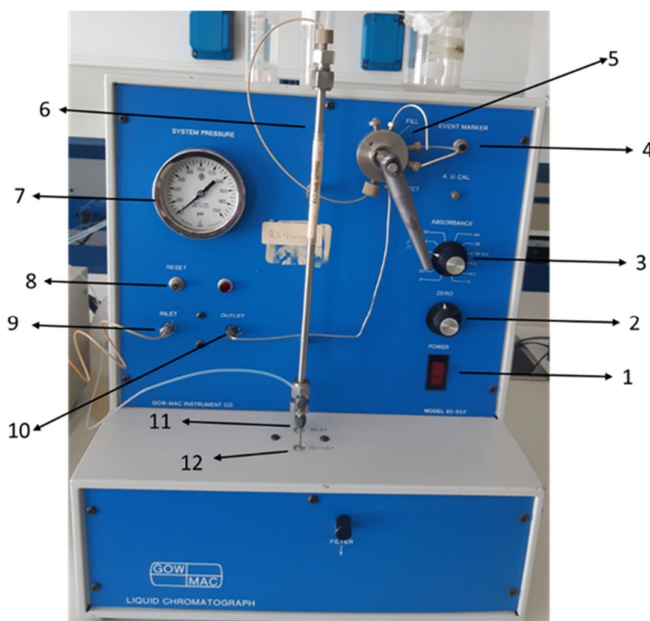
Οι υπόλοιπες έχουν παραπλήσια πολικότητα οπότε ο διαχωρισμός τους θα γίνει βάση του μεγέθους τους. Έτσι από αυτές θα βγει πρώτα το βενζόλιο, στη συνέχεια το τολουόλιο (έχει ένα επιπλέον μεθύλιο) και τέλος το παρα-ξυλόλιο (π-ξυλόλιο) που έχει δύο επιπλέον μεθύλια.

Οι ουσίες θα εκλουστούν με την εξής σειρά:

Βενζυλική αλκοόλη → Βενζόλιο → Τολουόλιο → Παρα-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 αυτο-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 0.08 και για κάποιες ενώσεις το 0.04.
4. Διακόπτης event marker. Μαρκάρει το ξεκίνημα του χρωματογραφήματος, αυτό ήταν χρήσιμο σε παλιά καταγραφικά με χαρτί που καταγράφανε συνεχώς. Δεν χρησιμοποιείται με το λογισμικό του υπολογιστή.
5. Το σύστημα εισαγωγής, περιέχει βρόγχο (loop) των 20 μλ.
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 θα 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 σπινάλ 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
- Βενζυλική αλκοόλη (Benzyl alcohol)
- Βενζόλιο (Benzene)
- Τολουόλιο (toluene)
- παρα-Ξυλόλιο (p-Xylene)
- Νιτρικό νάτριο (NaNO₃) 0.1 % w/v
- Υπερκάθαρο νερό (nanopure)
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Ποτήρια ζέσεως
- Σύριγγα υγρών 100 μl Hamilton
- Πιπέτες ακριβείας μεταβλητού όγκου
- Φίλτρα σωματιδίων των pore size 0.45 μm, filter diameter 15 mm
- Συσκευή υπερήχων
- Υργή Χρωματογραφία

Παράμετροι Χρωματογράφου:

- **Στήλη:** C₁₈
- **Loop:** 20 μl
- **Ανιχνευτής:** UV με λάμπα Hg στα 254 nm
- **Ευαισθησία ανιχνευτή:** 0.08 (ή 0.04 ανάλογα το δείγμα)
- **Διαλύτης:** EtOH /H₂O σε αναλογία 70/30
- **Ταχύτητα κινητής φάσης:** 1.0 ml/min
- **Πίεση:** 1200 – 1400 psi

1. Παρασκευή κινητής φάσης:

Παρασκευάζονται 200 ml από ένα διάλυμα EtOH (κατάλληλη για HPLC) / H₂O (υπερκάθαρο) σε αναλογία 70/30. Η παρασκευή γίνεται με απλό ογκομετρικό κύλινδρο, δεν χρειάζεται περισσότερη ακρίβεια.

Γίνεται απαέρωση του διαλύματος στους υπέρηχους για 15 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν οι φυσαλίδες. Αφού απαερωθεί μεταφέρετε σε κατάλληλο δοχείο για την RPLC.

2. Προετοιμασία διαλυμάτων:

Παρασκευάζονται διάλυμα 5 ml από ένα μίγμα των 4 ενώσεων διαλυμένες σε αιθανόλη κατάλληλης για HPLC

Οι αραιώσεις θα είναι:

- βενζυλική αλκοόλη αραιώση: **1/200**
- βενζόλιο αραιώση: **1/100**
- τολουόλιο αραιώση: **1/100**
- π-ξυλόλιο αραιώση: **1/100**

Αρχικά υπολογίζετε τη ποσότητα που πρέπει να πάρετε από κάθε ένωση ώστε να επιτευχθεί η σωστή αραιώση.

Παράδειγμα:

Για την βενζόλιο γίνεται αραιώση 1/100 σε τελικό όγκο 5 ml, οπότε :

$\chi = 1 \cdot 5 / 100 \text{ ml} = 0.05 \text{ ml} = 50 \mu\text{l}$, οπότε χρειάζονται **50 μl βενζολίου**.

Όλες οι αραιώσεις γίνονται στον απαγωγό, λόγω της επικινδυνότητάς τους.

Στη συνέχεια στον **απαγωγό**, πρώτα μεταφέρετε τη ποσότητα της αιθανόλης (υπολογίστε πόση ακριβώς σε ml) με μια πιπέτα ακριβείας μεταβλητού όγκου των 1000μL και τη τοποθετείτε στο δοχείο που θα πραγματοποιηθεί η αραιώση. Έπειτα με τη πιπέτα ακριβείας των 100μL μεταφέρονται οι υπόλοιπες ενώσεις στο ίδιο δοχείο.

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:

Πατάτε αρχικά το διακόπτη **power**(1) ώστε να ξεκινήσει ο χρωματογράφος και το διακόπτη **reset** (8), με το reset ξεκινάει η αντλία.

Από την αντλία ρυθμίζεται η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης στα 1.0 ml/min. Η πίεση σταθεροποιείται στα 1200 – 1400 psi (δεν θα πρέπει να ανέβει πάνω από 1600 psi για να μην προκληθεί ζημιά στο όργανο). Προσέχετε για την εμφάνιση φυσαλίδων και αν χρειαστεί κάνετε τη διαδικασία αφαίρεσης τους. Περιμένετε να σταθεροποιηθεί το σήμα και στη συνέχεια μετράτε τη ροή της κινητής φάσης. 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:

Έστω ότι 3 ml συλλέγονται σε 2.5 min, τότε η πραγματική ταχύτητα ροής θα είναι 1.2 ml/min.

Επαναλαμβάνεται τη μέτρηση της ταχύτητας ροής για τουλάχιστον 3 φορές και παίρνεται τη μέση τιμή της.

Ρυθμίζεται η ευαισθησία του ανιχνευτή στην επιθυμητή τιμή (0.08 ή 0.04 ανάλογα το είδος του δείγματος) και είσαστε έτοιμοι για το πρώτο injection.

4. Προετοιμασία λογισμικού επικοινωνίας:

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

Από το παράθυρο “**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:
 - τη ταυτότητα του δείγματος
δηλ. έτος, ομάδα, δείγμα (πχ 2020 A5 1inj.)
 - Ρυθμίζεται ο επιθυμητός χρόνος: πχ 8 min.
 - Πατάτε **ok** για να κατοχυρωθούν οι αλλαγές

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

5. Εισαγωγή του δείγματος (Injection):

- Βάζετε τον εισαγωγέα (injector) στη θέση **load** (εδώ **Fill**)
- Ξεπλένεται 3 φορές τη σύριγγα με αιθανόλη.
- Παίρνετε με τη σύριγγα ~200 μl δείγματος (χωρίς φυσαλίδες) και την εισάγετε στο βρόχο (loop). Η ποσότητα των 200 μl είναι πολλαπλάσια του όγκου του βρόχου (20 μl) ώστε να ξεπλυθεί καλά ο βρόχος και να μείνει στο τέλος η απαραίτητη ποσότητα των 20 μl.
- **Με τη σύριγγα να βρίσκεται μέσα στο σύστημα εισαγωγής**, γυρνάτε γρήγορα και απότομα (όχι δυνατά) το μοχλό του injector από τη θέση **fill** στη θέση **inject** (ώστε να γίνει η εισαγωγή του δείγματος στο χρωματογράφο) και ταυτόχρονα ένα δεύτερο άτομο από την ομάδα σας, πατάει το κουμπί «**start**» στο πρόγραμμα του υπολογιστή για να αρχίσει η καταγραφή του χρωματογραφήματος.
- Μόλις τελειώσει ο χρόνος καταγραφής, το χρωματογράφημα σώζετε αυτόματα.
- Από το μενού από το **dataRead** πατάτε το **stop** και στη συνέχεια κλείνετε τα παράθυρα του προγράμματος
- Κλείνετε τα παράθυρα του προγράμματος
- Αφαιρείτε τη σύριγγα από το σύστημα εισαγωγής και ξεπλένετε 3 φορές με αιθανόλη.

Επαναλάβετε την ίδια διαδικασία για τα επόμενα 2 injections.

6. Άγνωστο δείγμα:

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

Κάνετε ένα μόνο injection από το άγνωστο δείγμα με την ίδια ακριβώς διαδικασία που κάνατε και για το πρότυπο δείγμα.

Το άγνωστο δείγμα σας δίνεται από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου.

7. Διάλυμα NaNO_3 0.1% w/v σε υπερκάθαρο νερό:

Αρχικά φιλτράρετε τη ποσότητα του διαλύματος NaNO_3 που θα εισάγετε στο χρωματογράφο με ένα φίλτρο whatman (0.45 μm) ώστε να απομακρυνθούν όλα τα τυχόν σωματίδια και ακαθαρσίες

- Αλλάζετε την ευαισθησία του ανιχνευτή σε 0.04.
- Κάνετε μόνο ένα injection με διάλυμα NaNO_3
- Για τη διάρκεια του χρωματογραφήματος χρησιμοποιήστε 5 λεπτά.

Το NaNO_3 είναι μια πολύ πολική ένωση που δεν κατακρατείται καθόλου στη στατική φάση, οπότε ο χρόνος έκλουσης του θα είναι ο νεκρός χρόνος (t_0).

8. Ολοκλήρωση χρωματογραφήματων:

- Από το πρόγραμμα το μενού «**chromato**» επιλέγετε το **load**, βρίσκετε 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 **αριστερό κλικ** στο ποντίκι ξεκινάει η ολοκλήρωση της κορυφής και πατώντας ξανά το **αριστερό κλικ** ολοκληρώνεται η διαδικασία.
- Καταγράφετε το χρόνο έκλουσης t_r της κάθε κορυφής με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων, η επιφάνια της δεν χρειάζεται για τη συγκεκριμένη άσκηση.
- **Μεταφορά γραφημάτων:** Τα χρωματογραφήματα μπορείτε να τα μεταφέρετε ως εικόνα σε ένα αρχείο **word** και στη συνέχεια στην αναφοράς σας. Αφού έχετε επιλέξει το επιθυμητό χρωματογράφημα και στο επιθυμητό μέγεθος των κορυφών, επιλέγετε από το μενού «**chromato**» το **copy image** και στη συνέχεια πηγαίνετε στο αρχείο word και πατάτε επικύρωση.

9. Κλείσιμο χρωματογράφου:

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

Αποτελέσματα και ανάλυση

1. Μέτρηση τιμών “π”:

Υπολογίζονται οι χρόνοι κατακράτησης (t_r) για κάθε ένωση σε κάθε injection με ακρίβεια 2 δεκαδικών ψηφίων.

Παράδειγμα:

Ένωση	t_r (min)	t_r (min)	t_r (min)
	1° injection	2° injection	3° injection
Βενζυλική αλκοόλη	3.50	3.50	3.53
Βενζόλιο	5.00	5.00	5.00
Τολουόλιο	6.07	6.07	6.07
π-Ξυλόλιο	7.83	7.80	7.80

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

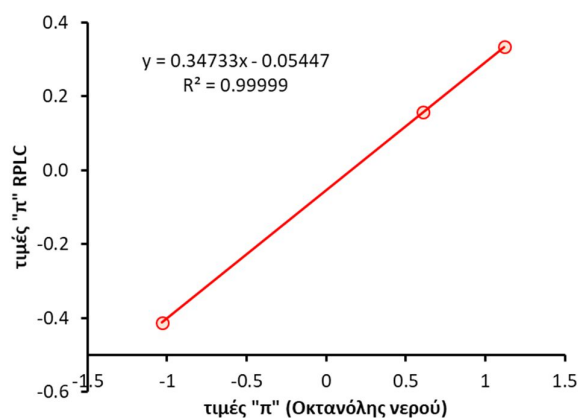
Ένωση	t_r (min) average	t_r (min) Stdev
Βενζυλική αλκοόλη	3.51	0.02
Βενζόλιο	5.00	0.00
Τολουόλιο	6.07	0.00
π-Ξυλόλιο	7.81	0.02

Τελική έκφραση p_k για t_r Βενζολίου : 5.00 ± 0.00 min

Με τη χρήση του νεκρού χρόνου (t_0) που είναι ο χρόνος έκλουσης του NaNO_3 , υπολογίζονται τα K' και οι παράμετροι " π " στο σύστημα RPLC .

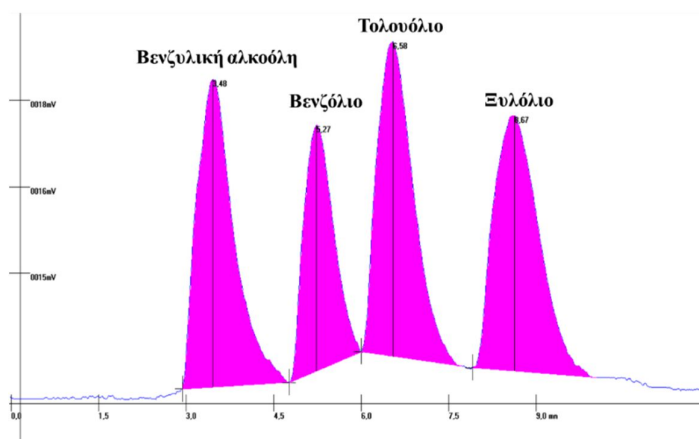
Ένωση	K'	Παράμετροι " π " RPLC
Βενζυλική αλκοόλη	0.366	-0.412
Βενζόλιο	0.946	-
Τολουόλιο	1.36	0.158
π-Ξυλόλιο	2.04	0.334

Συγκρίνετε τους συντελεστές " π " κατά Hansch που υπολογίστηκαν στο σύστημα σας RPLC, με τους συντελεστές " π " κατά Hansch με το πρότυπο σύστημα Οκτανόλης - νερού, δημιουργώντας ένα διάγραμμα XY scattering με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Στον άξονα των Y θα βάλετε τις τιμές του συστήματός σας και στον άξονα του X του συστήματος Οκτανόλης - νερού. Από την ευθεία που προκύπτει μπορείτε να συμπεράνετε εάν το σύστημα σας είναι περισσότερο ή λιγότερο ευαίσθητο από αυτό της οκτανόλης- νερού του συστήματος Hansch. Η κλίση της ευθείας δείχνει πιο σύστημα είναι πιο αποτελεσματικό, εφόσον η κλίση είναι μικρότερη της μονάδας τότε το σύστημα αιθανόλη/νερό (70/30) με μέθοδο RPLC που ακολουθήσατε στο εργαστήριο είναι λιγότερο ευαίσθητο από το σύστημα Hansch σε οκτανόλη- νερό. Στο πείραμα, χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη -νερό (70-30) που είναι πιο πολική, σε αντίθεση με το σύστημα Hansch που χρησιμοποιήθηκε οκτανόλη -νερό δηλαδή πιο άπολος διαλύτης. Επιπλέον, η στήλη στην RPLC είναι άπολη, έτσι υπάρχει καλύτερη ισχύς έκλουσης στην άπολη κολώνα με άπολο διαλύτη καθώς οι ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως άπολες, οπότε θα έχουν πιο ισχυρή πρόσδεση και έτσι διαχωρίζονται καλύτερα. Αυτά επιβεβαιώνονται από τη κλίση της καμπύλης.



2. Ανάλυση αγνώστου δείγματος:

Από το χρωματογράφημα του αγνώστου δείγματος, υπολογίζονται οι χρόνοι έκλυσης στις κορυφές που εμφανίζονται και συγκρίνονται με τη μέση τιμή των χρόνων έκλυσης των ενώσεων του πρότυπου δείγματος. Με το τρόπο αυτό γίνεται ταυτοποίηση των ουσιών δηλ. ο ποιοτικός προσδιορισμός του αγνώστου δείγματος.



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 – Ασκήσεις:

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 εκλύεται πρώτα η βενζυλική αλκοόλη, ποια είναι η σειρά των επόμενων ενώσεων; Αν εκτός από τις ενώσεις σας είχατε και την ένωση Na_2SO_4 , που ακριβώς θα εκλουόταν και για ποιο λόγο;
3. Ποια είναι η διαφορά RLPC και HPLC;
4. Περιγράψτε σύντομα τη θεωρία του Hansch
5. Αν ο νεκρός χρόνος (t_0) είναι 3.3 min, ο δείκτης χωρητικότητας του τολουολίου είναι $K'=1.3$ και η παράμετρος Hansch του τολουολίου είναι $\pi=0.11$, να υπολογιστεί ο χρόνος κατακράτησης του βενζολίου ($t_{r\text{βενζ.}}$)

Άσκηση – Ιοντική Χρωματογραφία (IC)

Σκοπός της άσκησης είναι:

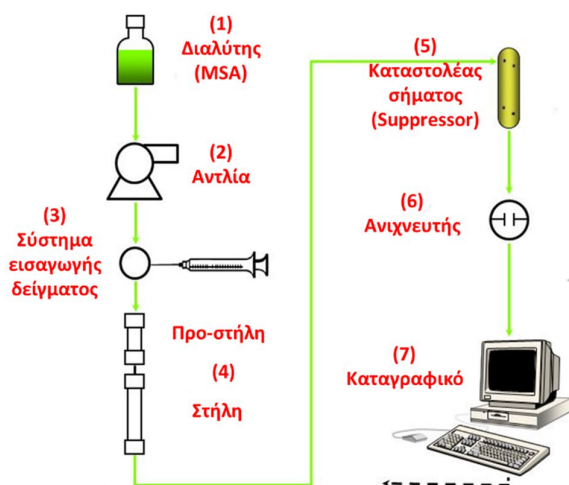
Η κατανόηση των παραμέτρων της ιοντικής χρωματογραφίας και ο προσδιορισμός κατιόντων σε δείγματα νερού.



Η άσκηση της ιοντικής χρωματογραφίας, χωρίζεται σε δύο μέρη:

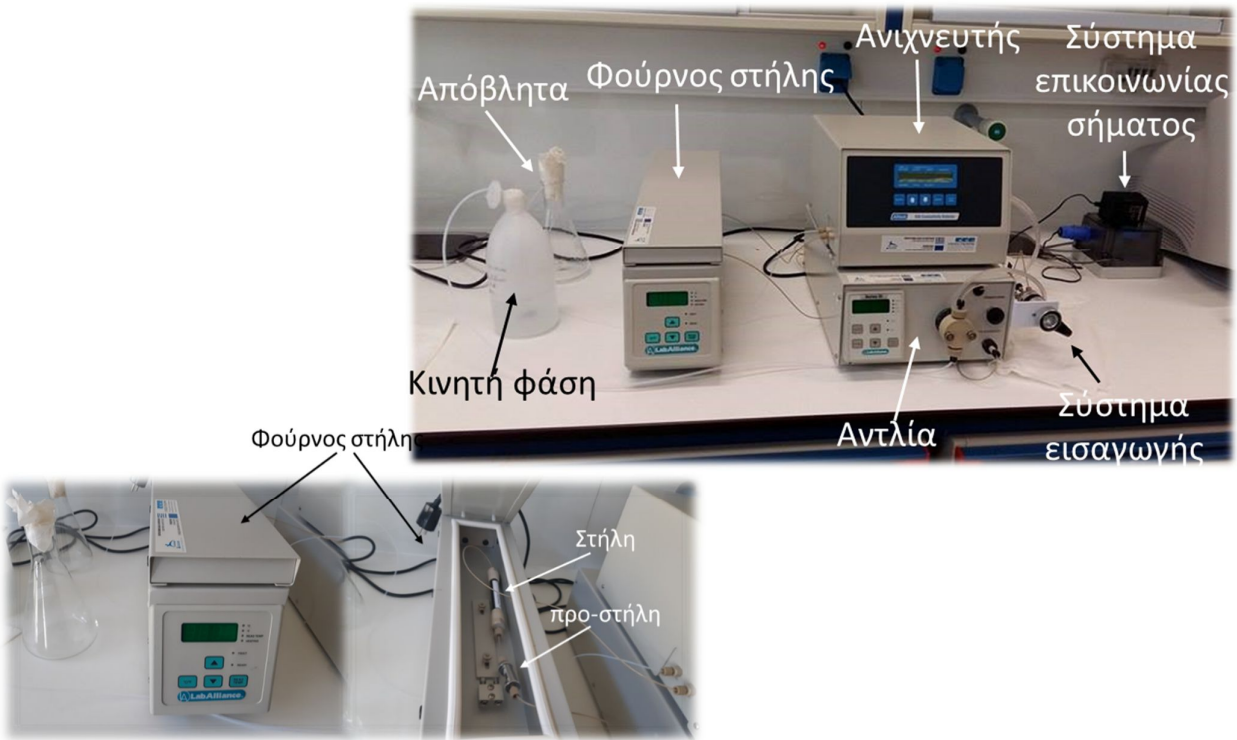
1. Στο πρώτο μέρος θα παρασκευαστούν πρότυπα διαλύματα ιόντων διαφορετικών συγκεντρώσεων με σκοπό τη δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης για κάθε κατιόν ξεχωριστά.
2. Στο δεύτερο μέρος θα γίνει ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός αγνώστου δείγματος καθώς και ενός δείγματος νερού από το δίκτυο του Πανεπιστημίου.

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
6. Τον ανιχνευτή
7. Το καταγραφικό

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



- Το δοχείο που περιέχει την κινητή φάση δεν είναι από γυαλί επειδή η κινητή φάση είναι ένα οξύ.
- Στο εσωτερικό της αντλίας υπάρχει το σύστημα καταστολής των παλμών.
- Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος (injector) είναι έξι οπών με βρόγχο (loop) σταθερού όγκου στα 20 μλ.
- Η στήλη και η προστήλη βρίσκονται μέσα σε φούρνο σε σταθερή θερμοκρασία στους 35 °C.
- Το κελί του αγωγιμομετρικού ανιχνευτή, είναι θερμαινόμενο στους 35 °C και η ευαισθησία του είναι ρυθμισμένη στη τιμή 10.
- Στη συγκεκριμένη διάταξη δεν υπάρχει ο καταστολέας του σήματος του διαλύτη, καθώς δεν είναι απαραίτητος, λόγο του ότι γίνονται αναλύσεις κατιόντων σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις.

Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια – Όργανα:

- Διαλύτης: Methansulfonic Acid (MSA)
- Πρότυπα διαλύματα ιόντων: Na⁺, K⁺, Mg⁺², Ca⁺²
- Υπερκάθαρο νερό (nanopure)
- Σύριγγα υγρών 50 μλ 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 βρόγχου (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. Το διάλυμα παρασκευάζεται με υπερκίθαρο νερό ώστε να μειωθεί το σήμα υποβάθρου και πριν χρησιμοποιηθεί απαρεώνεται στους υπερήχους για 45 λεπτά.

2. Φυσαλίδες

Για να αποφευχθεί η πιθανότητα δημιουργίας φυσαλίδων στην κινητή φάση (παρότι έχει γίνει ήδη απαέρωση του διαλύτη) ξεκινάτε πάντα με τη διαδικασία αφαίρεσης φυσαλίδων όπως αυτή περιγράφεται στην εισήγηση της υγρής χρωματογραφίας καθώς η εμφάνιση φυσαλίδων στην κινητή φάση εμφανίζεται στο ξεκίνημα της κίνησης της. Παρ' όλα αυτά μπορεί να εμφανιστούν και κατά τη διάρκεια της λειτουργίας της, οπότε θα πρέπει να γίνεται κατά διαστήματα έλεγχος για την εμφάνιση τους. Για μπορέσει να γίνει αυτός ο έλεγχος, το σωληνάκι μεταφοράς της κινητής φάσης είναι διαφανές.

3. Σταθεροποίηση σήματος

Καθώς ο ανιχνευτής είναι αγωγιμομετρικός χρειάζεται αρκετός χρόνος για να σταθεροποιηθεί το σήμα του (περίπου 30 με 45 λεπτά), για το λόγο αυτό ξεκινάτε άμεσα τη λειτουργία του.

Αρχικά ανοίγεται το χρωματογράφο, πατώντας το διακόπτη της αντλίας, του ανιχνευτή και του φούρνου της στήλης, συνδέετε το σύστημα μετατροπής του σήματος στη τροφοδοσία και τέλος ανοίγετε τον υπολογιστή. Στη συνέχεια κάνετε τη πολιτική διαδικασία αφαίρεσης φυσαλίδων και τέλος ξεκινάτε τη λειτουργία του στην επιθυμητή ροή της κινητής φάσης.

Προσοχή:

- κοιτάζετε τη πίεση του συστήματος να σταθεροποιηθεί σε φυσιολογικά επίπεδα (1000 – 1500 psi). Πολύ μεγαλύτερη ή πολύ μικρότερη τιμή είναι ένδειξη ότι κάτι δεν γίνεται σωστά ή ότι υπάρχει κάποια ζημιά στο σύστημα.
- Επίσης προσέχετε διαρκώς για την εμφάνιση φυσαλίδων, ειδικά στο ξεκίνημα της λειτουργίας 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 (C_0) που σας δίνεται από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου. Το αρχικό πρότυπο περιέχει και τα τέσσερα ιόντα που θα αναλυθούν και έχει συγκέντρωση 10 ppm ίδια για κάθε ιόν, δηλαδή είναι 10.0 ppm για το ιόν του Na^+ , 10.0 ppm για το ιόν του K^+ , 10.0 ppm για το ιόν του Mg^{2+} και 10.0 ppm για το ιόν του Ca^{2+} .

Τα πρότυπα διαλύματα θα τα παρασκευάσετε χρησιμοποιώντας πιπέτες ακριβείας μεταβλητού όγκου και σε τελικό όγκο αραιώσης 1 ml (1000 μl) 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 μl) θα πρέπει να πάρετε από το αρχικό πρότυπο C_0 ώστε να κάνετε τις αραιώσεις για κάθε πρότυπο διάλυμα.

Παρατήρηση: Τα πρότυπα διαλύματα θα έχουν ακρίβεια 3 σημαντικών ψηφίων (2 δεκαδικά). Αυτό καθορίζεται από την ακρίβεια του αρχικού πρότυπου που είναι 3 σημαντικά ψηφία (10.0 ppm) καθώς και από την ακρίβεια του όγκου που παίρνεται με τις πιπέτες μεταβλητού όγκου. Οι πιπέτες που χρησιμοποιούνται είναι τω 200 μl και των 1000 μl και οι δύο έχουν ακρίβεια μεγαλύτερη των 3 σημαντικών ψηφίων, οπότε ο περιοριστικός παράγοντας είναι η συγκέντρωση του αρχικού πρότυπου, δηλ. τα 3 σημαντικά ψηφία.

Σημείωση: Στην υγρή χρωματογραφία είναι σημαντικό όλα τα δείγματα να είναι φιλτραρισμένα, διαφορετικά πιθανές ακαθαρσίες θα περάσουν στη στήλη και θα της προκαλέσουν φθορά. Το φιλτράρισμα γίνεται με φίλτρο σωματιδίων 0.45 μm, το οποίο κατακρατά όλα τα σωματίδια που είναι μεγαλύτερα από 0.45 μm. Για ευκολία δεν φιλτράρονται τα τελικά πρότυπα (για να αποφευχθεί η επιμόλυνση από το ένα διάλυμα στο άλλο) αλλά φιλτράρονται μόνο το αρχικό πρότυπο (C_0) καθώς και το υπερκάθαρο νερό με το οποίο θα γίνουν οι αραιώσεις. Από τα φιλτραρισμένα διαλύματα (αρχικό πρότυπο και νερό) θα γίνουν οι αραιώσεις και έτσι τα τελικά διαλύματα θα είναι φιλτραρισμένα. Φιλτράρισμα θα πρέπει να γίνει και στα άγνωστα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν

5. Προετοιμασία λογισμικού επικοινωνίας:

Πριν από την εισαγωγή του δείγματος θα πρέπει να γίνει ρύθμιση του λογισμικού του χρωματογράφου. Από την οθόνη του ηλεκτρονικού υπολογιστή, ανοίγετε το πρόγραμμα «**integral**» και ρυθμίζονται οι παράμετροι του:

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 sec)
- Πατάτε **GO** και ανοίγουν δύο επιπλέον παράθυρα
- Στα νέα παράθυρα γράφετε:
 - τη ταυτότητα του δείγματος:

δηλ. το έτος, το όνομα της ομάδα, το δείγμα (πχ 2020 A1 2 ppm)

- Ρυθμίζεται ο επιθυμητός χρόνος: πχ 8 min.
- Πατάτε **ok** για να κατοχυρωθούν οι αλλαγές

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

6. Εισαγωγή του δείγματος (Injection):

- Βάζετε τον εισαγωγέα (injector) στη θέση **load**.
- Ξεπλένεται 3 φορές τη σύριγγα με υπερκάρθαρο νερό.
- Ξεπλένεται 3 φορές το βρόχο (loop) με υπερκάρθαρο νερό με τη χρήση της σύριγγας.
- Παίρνετε με τη σύριγγα ποσότητα δείγματος (χωρίς φυσαλίδες) τουλάχιστο τρεις φορές παραπάνω από τον όγκο του βρόχου ώστε να ξεπλυθεί ο βρόγχος και στο τέλος να μείνει η απαραίτητη ποσότητα του δείγματος σε αυτόν.
- Με τη σύριγγα να βρίσκεται μέσα στο σύστημα εισαγωγής, γυρνάτε γρήγορα και απότομα (όχι δυνατά) το μοχλό του injector από τη θέση **load** στη θέση **inject** (ώστε να γίνει η εισαγωγή του δείγματος στο χρωματογράφο) και ταυτόχρονα ένα δεύτερο άτομο από την ομάδα σας, πατάει το κουμπί «**start**» στο πρόγραμμα του υπολογιστή για να αρχίσει η καταγραφή του χρωματογραφήματος.
- Μόλις τελειώσει ο χρόνος καταγραφής, το χρωματογράφημα σώζετε αυτόματα.
- Από το μενού και το **dataRead** πατάτε το **stop** για να σταματήσει το πρόγραμμα.
- Κλείνετε τα παράθυρα του προγράμματος.
- Αφαιρείτε τη σύριγγα από το σύστημα εισαγωγής και ξεπλένετε 3 φορές με υπερκάρθαρο νερό.

Επαναλάβετε την ίδια διαδικασία για τα υπόλοιπα πρότυπα διαλύματα.

7. Άγνωστα δείγματα:

- a) Αρχικά φιλτράρετε το άγνωστο δείγμα με φίλτρο σωματιδίων 0.45 μm και στη συνέχεια κάνετε ένα injection με την ίδια ακριβώς διαδικασία που κάνετε και για τα πρότυπα διαλύματα.

Το άγνωστο δείγμα θα σας δοθεί από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου

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

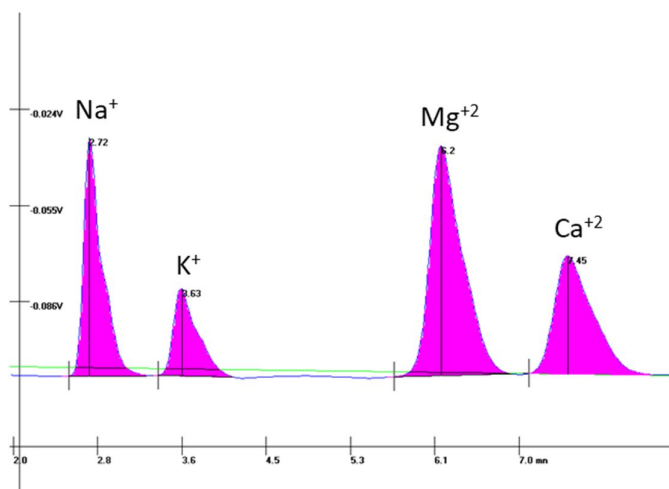
Συλλογή δεδομένων:

- **Ολοκλήρωση χρωματογραφήματος:**
 - από το πρόγραμμα το μενού «**chromato**» επιλέγετε το **load**, βρίσκετε 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.
 - Με **δεξί κλικ** από το ποντίκι επιλέγετε και δημιουργείτε την επιθυμητή **baseline**.
 - Πατώντας **αριστερό κλικ** στο ποντίκι ξεκινάει η ολοκλήρωση της κορυφής και πατώντας ξανά το **αριστερό κλικ** ολοκληρώνεται η διαδικασία.
 - Τη πρώτη φορά για κάθε κορυφή πατάτε το κουμπί «**newpic**» και ονομάζετε τη κάθε κορυφή (πχ Na).
 - Από το μενού στο «**Result**» τσεκάρτε το **logfile**, ώστε όλα τα δεδομένα των ολοκληρώσεων να σώζονται σε ένα αρχείο κειμένου (**txt**) που δημιουργείται στο φάκελο του προγράμματος.

- Στη συνέχεια ανοίγετε ένα-ένα τα χρωματογραφήματα από το μενού «**chromato**» επιλέγετε **load** και ολοκληρώνετε μία - μία τις κορυφές. Στην έξοδο θα σας ζητάει να πατήσετε **ok** ώστε τα δεδομένα να μεταφερθούν στο αρχείο **logfile**.
- Μεταφορά γραφημάτων:

Τα χρωματογραφήματα μπορείτε να τα μεταφέρετε ως εικόνα σε ένα αρχείο **word** και στη συνέχεια στην αναφοράς σας. Αφού έχετε επιλέξει το επιθυμητό χρωματογράφημα και στο επιθυμητό μέγεθος των κορυφών, επιλέγετε από το μενού «**chromato**» το **copy image** και στη συνέχεια πηγαίνετε στο αρχείο word και πατάτε επικόλληση.

Τα χρωματογραφήματα θα έχουν τη παρακάτω μορφή:



• **Αρχεία:**

- σε ένα usb stick αντιγράφετε το αρχείο κειμένου txt (**logfile**) καθώς και το αρχείο word με τα γραφήματα.

Το txt αρχείο θα βρίσκεται στο φάκελο: **Desktop\Integral32\..... .CHR**

και θα έχει τη μορφή:

```
File: C:\Documents and Settings\user1\Desktop\Integral32\17518325.CHR at: 10-18-2017 12:55:00
10-18-2017 10:50:41 Count 0 (Total= 0) ; 2017 G1 0.5 ppm
Time          Area          Heigh         Name    Count
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
```

Περιέχει ένα πίνακα όπου στη πρώτη στήλη καταγράφεται ο χρόνος που εμφανίζεται η κάθε κορυφή (ο χρόνος έκλουσης), στη δεύτερη στήλη καταγράφεται η επιφάνεια ολοκλήρωσης της, στη τρίτη το ύψος της και στη τέταρτη το όνομα του ιόντος που αντιστοιχεί η κάθε 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:

Στο χρόνο έκλουσης γίνεται με στρογγυλοποίηση δύο (2) δεκαδικών ψηφίων, για κάθε ιόν έχουν υπολογιστεί 4 χρόνοι έκλουσης, ένας από κάθε injection του κάθε προτύπου. Ένα χρόνο έκλουσης για το πρότυπο των 0.50 ppm, έναν για το 1.00 ppm, ένα για το 2.00 ppm και έναν για το πρότυπο των 5.00 ppm. Έτσι για παράδειγμα για το ιόν του Νατρίου θα είναι:

Συγκέντρωση πρότυπου (ppm)	0.50	1.00	2.00	3.00	4.00
Χρόνος έκλουσης (min)	2.42	2.43	2.42	2.42	2.44

Από αυτούς θα υπολογιστεί η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση για κάθε ιόν και ο χρόνος αυτός θα αποτελεί το χρόνο έκλουσης τους, έτσι:

Ιόν	t_r (min) average	t_r (min) Stdev
Na ⁺	2.43	0.01
K ⁺	3.18	0.01
Mg ⁺²	5.02	0.02
Ca ⁺²	6.04	0.01

Τελική έκφραση πχ. για το ιόν του Na⁺ : 2.43 ± 0.01 min

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

2. Δημιουργία καμπύλων αναφοράς για κάθε ιόν:

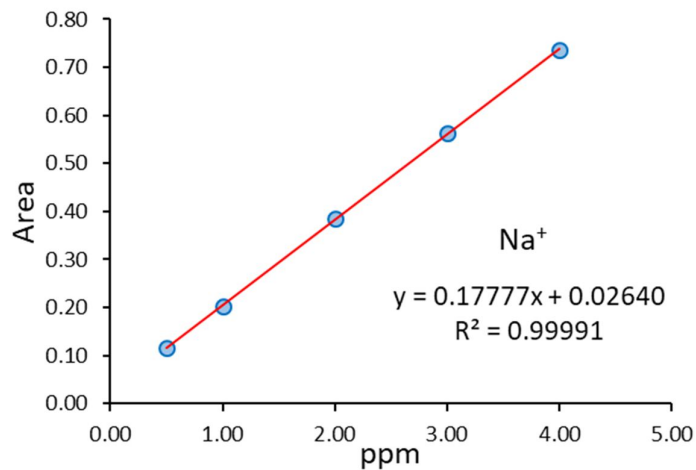
Στη συνέχεια θα δημιουργηθούν οι καμπύλες αναφοράς από τις επιφάνειες ολοκλήρωσης των πρότυπων δειγμάτων. Για κάθε ιόν θα έχετε 5 επιφάνειες ολοκλήρωσης που προκύπτουν από την ολοκλήρωση των 5 πρότυπων διαλυμάτων. Με τη χρήση ενός υπολογιστικού προγράμματος (όπως το excel ή το Origin) κατασκευάζετε ένα διάγραμμα XY scattering με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων δημιουργώντας για κάθε ιόν χωριστά (Na⁺, K⁺, Mg⁺² και Ca⁺²) την αντίστοιχη καμπύλη αναφορά του.

Στον άξονα του X θα βάλετε τις συγκεντρώσεις του πρότυπου δείγματος σε ppm και στον άξονα των Y τις επιφάνειες ολοκλήρωσης του.

Πχ 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

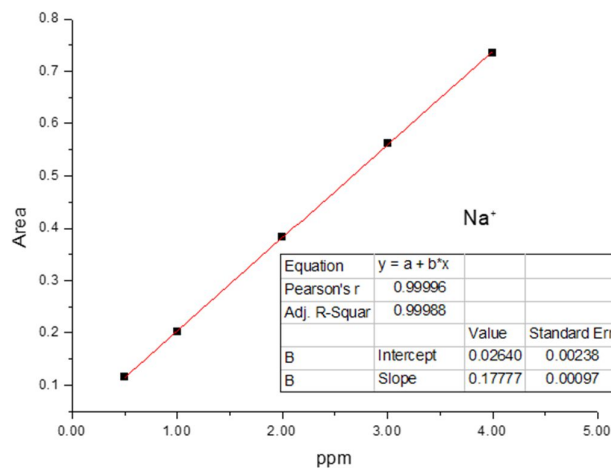
Η καμπύλη αναφοράς θα δώσει μια εξίσωση προσαρμογής της μορφής $Y = a \cdot X + b$ όπου a η κλίση της ευθείας και b η τεταγμένη. Ο συντελεστής προσαρμογής R δείχνει πόσο καλή είναι η προσαρμογή της, όσο πιο κοντά στη μονάδα τόσο καλύτερη είναι η προσαρμογή. Συνήθως η επιθυμητή προσαρμογή είναι τουλάχιστον με τρία εννιάρια (0.999). Μικρότερη προσαρμογή οφείλονται σε ατέλειες στη πειραματική διαδικασία, συνήθως σφάλματα που γίνονται κατά τη διαδικασία των αραιώσεων. Στο προηγούμενο παράδειγμα η εξίσωση θα είναι $Y = 0.17777 \cdot X + 0.02640$ με συντελεστή προσαρμογής $R^2 = 0.99991$.



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

Από τις καμπύλες αναφοράς του κάθε ιόν θα υπολογίσετε τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης για κάθε ιόν ξεχωριστά.

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



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

από τις παραμέτρους αυτούς υπολογίζεται για το ιόν του Na:

$$\text{το όριο ανίχνευσης είναι } LOD = \frac{3 \cdot S}{m} = \frac{3 \cdot 0.00097}{0.17777} = 0.016369 \sim 0.016$$

$$\text{το όριο ποσοτικοποίησης είναι } LOQ = \frac{10 \cdot S}{m} = \frac{10 \cdot 0.00097}{0.17777} = 0.054565 \sim 0.055$$

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 έκλυσης και οι επιφάνειες ολοκλήρωσης για κάθε κορυφή του άγνωστου δείγματος.

Παράδειγμα:

Κορυφή	t _r (min)	area
1	2.42	0.72658
2	3.17	0.12014
3	5.04	0.47813
4	6.04	0.23544

Οι χρόνοι έκλυσης των κορυφών συγκρίνονται με τους χρόνους έκλυσης των ιόντων στα πρότυπα δείγματα. Με βάση τις μέσες τιμές τους που έχουν υπολογιστεί προηγουμένως και εκτιμώντας το εύρος που δίνει η τυπική τους απόκλιση γίνεται αντιστοίχιση και τακτοποιούνται ποιοτικά τα ιόντα. Μικρή απόκλιση των χρόνων συνήθως οφείλονται σε σφάλματα κατά το συγχρονισμό στο ξεκίνημα του χρωματογραφήματος. Στο προηγούμενο παράδειγμα η πρώτη κορυφή θα αντιστοιχεί στο ιόν του Na⁺, η δεύτερη στο ιόν του K⁺, η τρίτη στο ιόν του Mg⁺² και η τέταρτη στο ιόν του Ca⁺².

Στη συνέχεια γίνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός, από την επιφάνεια ολοκλήρωσης του κάθε ιόντος και με τη χρήση της καμπύλης αναφοράς του αντίστοιχου ιόντος, υπολογίζεται η ποσότητα του σε ppm. Το τελικό αποτέλεσμα θα έχει την ακρίβεια των αρχικών πρότυπων διαλυμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς δηλ. με 3 σημαντικά ψηφία. Στο προηγούμενο παράδειγμα, το ιόν του Na⁺ έχει επιφάνεια ολοκλήρωσης 0.72658 και η καμπύλη βαθμονόμηση του Na⁺ είναι $Y = 0.17777 * X + 0.02640$. 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 με τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου για κάθε ιόν. Αν κάποια τιμή είναι μικρότερη από το όριο ανίχνευσης τότε ως αποτέλεσμα δίνεται το όριο ανίχνευσης, αν είναι μεγαλύτερη από το όριο ποσοτικοποίησης και μικρότερη από την τιμή του μεγαλύτερου πρότυπου τότε δίνεται κανονικά, ενώ αν είναι μεταξύ του ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ή μεγαλύτερη από την τιμή του μεγαλύτερου πρότυπου τότε η τιμή άγνωστου δείγματος δίνεται με επιφύλαξη της ακρίβεια της.

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

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

Παράδειγμα:

Κορυφή	t_r (min)	area
1	2.41	0.16282
2	3.16	0.02296
3	5.03	0.60531
4	5.98	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 τακτοποιούνται ποιοτικά τα ιόντα. Στο παράδειγμα η πρώτη κορυφή θα αντιστοιχεί στο ιόν του Na^+ , η δεύτερη στο ιόν του Mg^{+2} και η τρίτη στο ιόν του Ca^{+2} . Δεν ανιχνεύεται κορυφή στη περιοχή που εμφανίζατε το ιό του K^+ οπότε το δείγμα δεν περιέχει το ιόν αυτό.

Στη συνέχεια γίνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός. Από την επιφάνεια ολοκλήρωσης του κάθε ιόντος και με τη χρήση της καμπύλης αναφοράς του αντίστοιχου ιόντος, υπολογίζεται η ποσότητα του σε ppm. Η συγκέντρωση που υπολογίζεται θα πρέπει να διορθωθεί με την αραιώση που έχει γίνει στο δείγμα (1/10) και να δοθεί το τελικό αποτέλεσμα με βάση την αραιώση αυτή με 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 το δείγμα θα έχει 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 με τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου για κάθε ιόν. Αν κάποια τιμή είναι μικρότερη από το όριο ανίχνευσης τότε ως αποτέλεσμα δίνεται το όριο ανίχνευσης, αν είναι μεγαλύτερη από το όριο ποσοτικοποίησης και μικρότερη από την τιμή του μεγαλύτερου πρότυπου τότε δίνεται κανονικά, ενώ αν είναι μεταξύ του ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ή μεγαλύτερη από την τιμή του μεγαλύτερου πρότυπου τότε η τιμή άγνωστου δείγματος δίνεται με επιφύλαξη της ακρίβεια της.

Στο συγκεκριμένο παράδειγμα παρατηρείται ότι η τιμή του ιόντων K είναι μικρότερη από το όριο ανίχνευσης, οπότε ως αποτέλεσμα δίνεται η τιμή του ορίου ανίχνευσης δηλ. < 0.125 ppm. Επίσης η τιμή του Ca είναι εκτός των ορίων της καμπύλης βαθμονόμησης, είναι μεγαλύτερη από τη τιμή του μεγαλύτερου πρότυπου (5.00 ppm) οπότε το αποτέλεσμα αυτό δεν θεωρείται αξιόπιστο, δίνεται όμως ως τιμή καθώς είναι μεγαλύτερη από το όριο ανίχνευσης.

Όμως το δείγμα είχε αραιωθεί, θα πρέπει να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις των ιόντων στο αρχικό δείγμα υπολογίζοντας τη αραιώση, το τελικό αποτέλεσμα θα έχει τρία σημαντικά ψηφία.

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

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:

1. Με ευαισθησία στον ανιχνευτή να έχει τη τιμή 10, η επιφάνεια ολοκλήρωσης είναι 0.900. Κάνοντας ξανά το ίδιο δείγμα με τις ίδιες συνθήκες με μόνη διαφορά ότι η ευαισθησία του ανιχνευτή έχει μεγαλύτερη τιμή είναι 30, η επιφάνεια ολοκλήρωσης του ιόντος πόση θα είναι;
2. Αν η ισχύς του διαλύτη έκλουσης από 5 mM MSA γίνει 10 mM MSA, οι χρόνοι έκλουσης των ιόντων θα αλλάξουν; Οι επιφάνειες ολοκλήρωσης των ιόντων θα μεταβληθούν;
3. Αυξάνοντας τη ταχύτητα ροής του διαλύτη έκλουσης από 1 ml/min σε 2 ml/min, οι χρόνοι έκλουσης των ιόντων θα αλλάξουν; Οι επιφάνειες ολοκλήρωσης των ιόντων θα μεταβληθούν;
4. Αφαιρείτε τη προστήλη και τρέχετε τη χρωματογραφία μόνο με τη κύρια στήλη, οι χρόνοι έκλουσης των ιόντων θα αλλάξουν; Οι επιφάνειες ολοκλήρωσης των ιόντων θα μεταβληθούν;
5. Αν στο δείγμα προς ανάλυση, εκτός από τα κατιόντα (Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2}) προστεθεί και το ιόν του Li^+ , σε ποια σειρά θα βγει;
6. Πριν από τις κορυφές των ιόντων, εμφανίζεται μια πολύ μεγάλη κορυφή, που οφείλεται αυτή;

Άσκηση – Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης

Σκοπός της άσκησης είναι:

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων Mg και Ca σε πόσιμα νερά με τη χρήση της φασματοσκοπίας Ατομικής Απορρόφησης.



Στην ατομική φασματοσκοπία μια ουσία όταν βρεθεί σε υψηλή θερμοκρασία αποσυντίθεται σε άτομα, κάθε στοιχείο στην αέρια φάση απορροφάει ή εκπέμπει υπεριώδη ή ορατή ακτινοβολία σε χαρακτηριστικό μήκος κύματος.

Η ατομική φασματοσκοπία διακρίνεται σε τρεις κύριες κατηγορίες, ανάλογα με το τρόπο της ακτινοβολίας:

1. Φθορισμού
2. Εκπομπής
3. Απορρόφησης

1. Ατομικός Φθορισμός:

Τα άτομα ακτινοβολούνται από ένα λέιζερ για να διεγερθούν σε υψηλότερες ηλεκτρονικές καταστάσεις και από εκεί μπορούν να επανέλθουν στη θεμελιώδη κατάσταση μέσω φθορισμού.

2. Ατομική Εκπομπή:

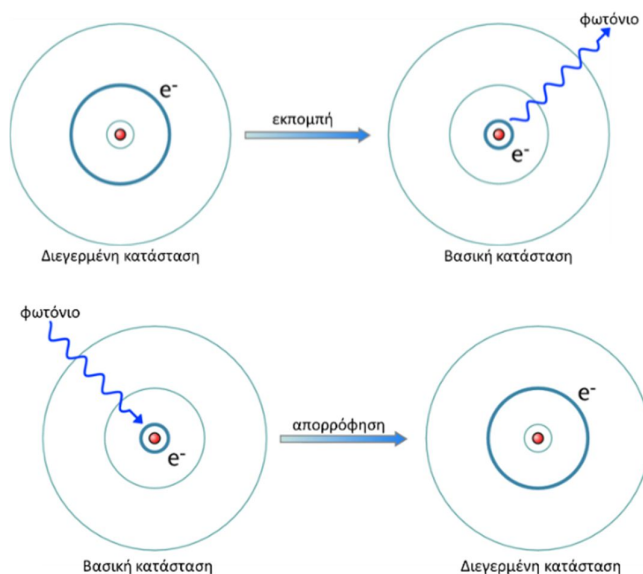
Τα άτομα που είναι ήδη σε διεγερμένη κατάσταση, αποδιηγείρονται, δίνοντας ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένες ηλεκτρονικές μεταπτώσεις.

3. Ατομική Απορρόφηση:

Η ατομική απορρόφηση (A. A.) βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης ακτινοβολίας από άτομα που βρίσκονται **ελεύθερα στη θεμελιώδη κατάσταση**. Η ακτινοβολία που χρησιμοποιείται είναι αυτή που μπορεί να παράγει με τη μετάπτωση από τη διεγερμένη του κατάσταση το ίδιο το στοιχείο που αναλύεται. Έτσι λοιπόν, τα ελεύθερα άτομα διεγείρονται (απορροφούν) την ακτινοβολία καθορισμένου μήκους

κύματος ακτινοβολία που παράγεται από τη λυχνία κοίλης καθόδου. Το ποσοστό της ακτινοβολίας που απορροφάτε εξαρτάται από τον αριθμό των ατόμων που βρίσκονται μέσα στη δέσμη φωτός.

Η επιλεκτικότητα που προσφέρει η ατομική απορρόφηση είναι ιδανική για ευρέως για πλήθος αναλύσεων, όπως: στη περιβαλλοντική και γεωργική έρευνα (βαρέα μέταλλα σε εδάφη, νερά κ.α.), έλεγχος ποιότητας τροφίμων και φαρμάκων κ.τ.λ.



Η συγκεκριμένη άσκηση εστιάζεται στη φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης, τα κυριότερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα είναι:

Πλεονεκτήματα:

- χρησιμοποιείται για τη ποιοτική και ποσοτική ανάλυση περίπου 70 στοιχείων.
- η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται σε μέρη ανά εκατομμύριο (ppm) ή μέρη ανά δισεκατομμύριο (ppb).
- είναι μια γρήγορη και εύκολη ανάλυση.

Μειονεκτήματα

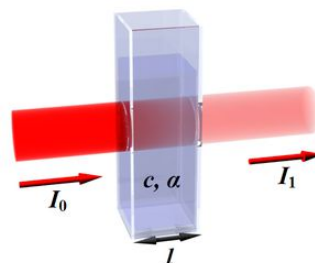
- είναι καταστροφική μέθοδος

Η φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης είναι παρόμοια με αυτή ενός απλού φασματοφωτόμετρου με μικρές παραλλαγές. Και σε αυτήν, η αρχή λειτουργίας της στηρίζεται στο νόμο των Beer-Lambert, μόνο που το ρόλο της κυψελίδας στην ΑΑ τον έχει το σύστημα ατομοποίησης:

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

Όπου:

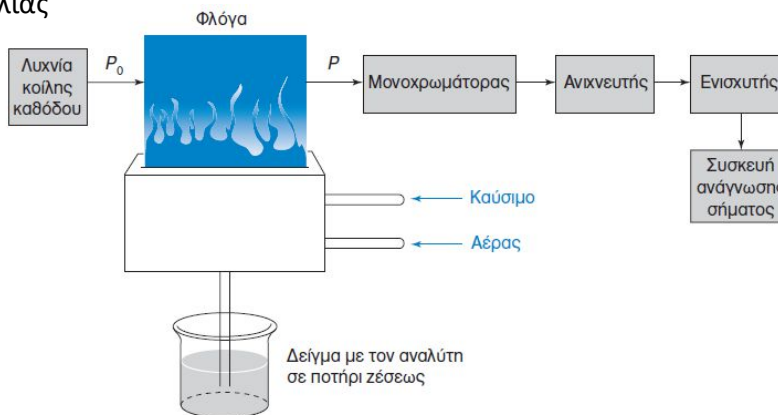
- A η απορρόφηση
- ϵ ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)
- b το πάχος της κυψελίδας (cm)
- c η συγκέντρωση του διαλύματος (M)



Οργανολογία

Η ατομική απορρόφηση αποτελείται από έξι κυρίως μέρη:

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



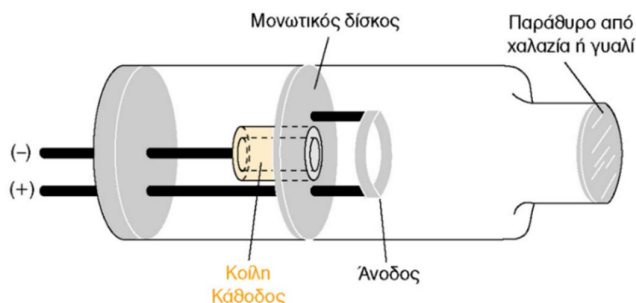
1) Σύστημα εκπομπής ακτινοβολίας

Δυο τύποι πηγής ακτινοβολίας χρησιμοποιούνται στην Α. Α. αυτοί είναι:

- A. Λυχνία κοίλης καθόδου (Hollow Cathode Lamp, HCL)
- B. Λυχνία εκκενώσεως άνευ ηλεκτροδίων (EDL) (Electro Deless Lamp)

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

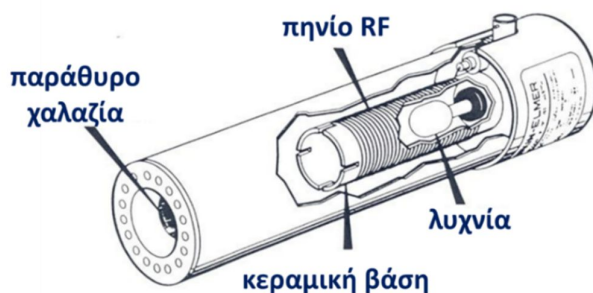
Είναι η συνηθέστερη πηγή ακτινοβολίας για μετρήσεις ατομικής απορρόφησης. Αποτελείται από μια άνοδο βολφραμίου και μια κυλινδρική κάθοδο, οι οποίες σφραγίζονται σε υάλινο σωλήνα, που περιέχει νέον ή αργό σε πίεση 1 έως 5 torr. Η κάθοδος κατασκευάζεται από το μέταλλο που θα αναλυθεί ή επιστρώνεται με ένα στρώμα αυτού του μετάλλου. Όταν εφαρμοστούν ~300 V μεταξύ ανόδου και καθόδου, το αέριο ιοντίζεται και τα θετικά ιόντα επιταχύνονται προς τη κάθοδο. Μετά τον ιοντισμό, η λυχνία διαρρέεται από σταθερό ρεύμα 2 – 30 mA, με το κατάλληλο δυναμικό. Αν το δυναμικό αυξηθεί αρκετά, τα κατιόντα του αερίου αποκτούν αρκετή κινητική ενέργεια, προσκρούουν στη κάθοδο εκτινάσσοντας από αυτήν στην αέρια φάση, άτομα ίδια με το στοιχείο που πρόκειται να αναλυθεί. Τα αέρια μεταλλικά άτομα διεγείρονται μέσω συγκρούσεων με ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας και κατά την αποδιέγερση τους στη βασική κατάσταση, εκπέμπουν τη χαρακτηριστική ακτινοβολία τους. Οι λυχνίες διακρίνονται σε μονοστοιχειακές και πολυστοιχειακές, ανάλογα αν περιέχουν ένα ή περισσότερα μέταλλα.



B. Λυχνία εκκενώσεως άνευ ηλεκτροδίων (EDL) (Electro Deless Lamp)

Οι λυχνίες εκκενώσεως χωρίς ηλεκτρόδια, αποτελούνται από ένα μικρό σφραγισμένο σωλήνα από χαλαζία, που περιέχει το προς ανάλυση μέταλλο ή άλας αυτού και αδρανές αέριο αργό (Ar) σε χαμηλή πίεση μερικών mm Hg. Ο σωλήνας περιβάλλεται από ένα σπείραμα συνδεδεμένο με γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων για τον ιονισμό του Ar. Τα ιόντα του αερίου συγκρούονται με το μέταλλο και αποσπών τα άτομά, τα οποία

στη συνέχεια εκπέμπουν ακτινοβολία χαρακτηριστικού μήκους κύματος. Χρησιμοποιούνται κυρίως για το προσδιορισμό στοιχείων που εξαχνώνονται γρήγορα, όπως: Sb, As, Cd, Se, Te, Sn, Pb, Hg, κ.α.



2) Σύστημα ατομοποίησης:

Για τη σωστή ανάλυση των στοιχείων, αυτά πρέπει να βρίσκονται στην ατομική τους κατάσταση (φορτίο = 0). Γι' αυτό το λόγο το πρώτο βήμα στην ανάλυση είναι η ατομοποίηση, διαδικασία που εξαερώνει το δείγμα, και ατομοποιεί τις διαλυμένες σε αυτό ουσίες. Τα άτομα ελευθερώνονται από τα διάφορα σύμπλοκα ή μόρια με τη χρήση υψηλής θερμοκρασίας. Αυτό το βήμα τις περισσότερες φορές ελέγχει τη ποιότητα της ανάλυσης (ευαισθησία, ακρίβεια= precision και accuracy).

Οι μέθοδοι ατομοποίησης είναι:

- A. Φλόγας
- B. Ηλεκτροθερμική
- Γ. ICP (Inductively Coupled Plasma) Επαγωγικά Συζευγμένο Πλάσμα

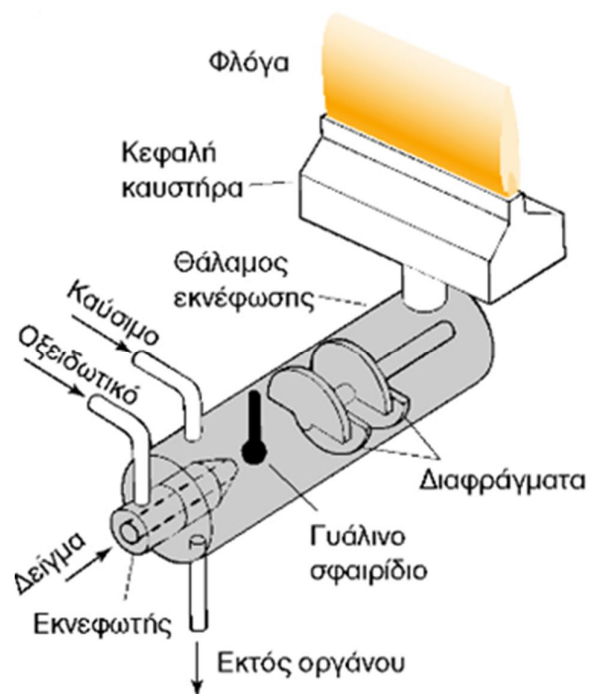
Οι μέθοδοι αυτοί διαφέρουν ως επί το πλείστον στη θερμοκρασία ατομοποίησης.

A. Φλόγα- Καυστήρας

Τα σταγονίδια εισέρχονται στη φλόγα, συνήθως μέσω ενός συστήματος προ ανάμιξης, όπου το καύσιμο, το οξειδωτικό και το δείγμα αναμειγνύονται πριν την εισαγωγή τους στη φλόγα. Το διάλυμα του δείγματος εισέρχεται στον εκνεφωτή μέσω της ροής του οξειδωτικού από το άκρο του τριχοειδούς του δείγματος. Το υγρό διασπάται σε πολύ μικρά σταγονίδια καθώς εξέρχεται από το τριχοειδή και κατευθύνονται σε ένα γυάλινο σφαιρίδιο πάνω στο οποίο διασπώνται σε ακόμη μικρότερα σωματίδια. Ο σχηματισμός μικρών σταγόνων ονομάζεται εκνέφωση. Το αιώρημα υγρού (ή στερεού) σε ένα αέριο ονομάζεται αερόλυμα, το αερόλυμα που δημιουργείται μαζί με το καύσιμο και το οξειδωτικό, διέρχονται μέσω διαφραγμάτων, όπου απομακρύνονται οι μεγάλες σταγόνες και τελικά όταν φτάσει στη φλόγα περιέχει μόνο το 5% περίπου του αρχικού δείγματος.

Έτσι όταν το διάλυμα εισαχθεί στη φλόγα γίνεται:

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



Πλεονεκτήματα:

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

Μειονεκτήματα:

- Μικρή ευαισθησία λόγω του ότι:
- Μικρή ποσότητα δείγματος φτάνει στη φλόγα
- Μικρός χρόνος των ατόμων στην οπτική διαδρομή

Δύο είναι οι πιο συνηθισμένες φλόγες που χρησιμοποιούνται στην ΑΑ:

I. Φλόγα : Αέρα – Ακετυλενίου:

Είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη φλόγα, με μειονέκτημα ότι σχηματίζονται δύσπηκτα οξείδια για αρκετά στοιχεία (Mg, Ca, Sr, Ba, U κ.α.)

II. Φλόγα : υποοξείδιο του αζώτου - Ακετυλενίου:

Η φλόγα αυτή παρέχει υψηλότερη θερμοκρασία και αναγωγικό περιβάλλον. Πλεονέκτημα της είναι ότι δεν σχηματίζονται οξείδια, όμως μειονέκτημα είναι ο ιονισμός πολλών στοιχείων.

Διάφοροι Τύποι φλόγας σε °C :

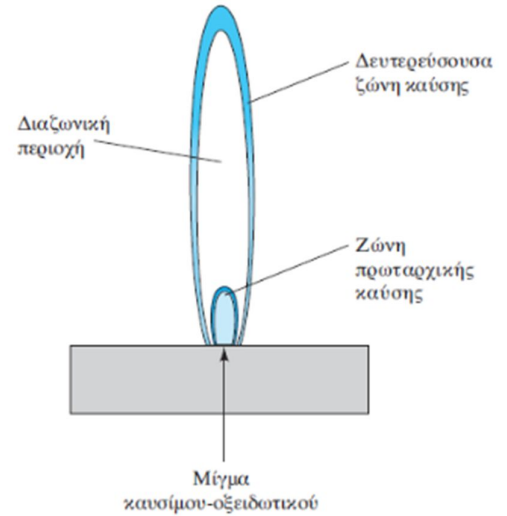
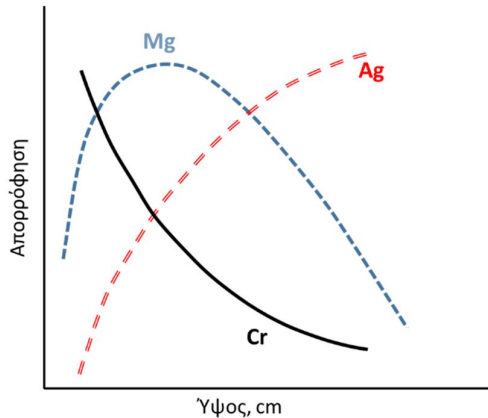
Καύσιμο \ Οξειδωτικό	Αέρας	N ₂ O	O ₂
	Προπάνιο	1950	2900
Ακετυλένιο	2300	3000	3050

Δομή της φλόγας

Η φλόγα διακρίνεται σε τρεις περιοχές:

- τη ζώνη πρωταρχικής καύσης,
- τη διαζωνική περιοχή
- τη δευτερεύουσα ζώνη καύσης.

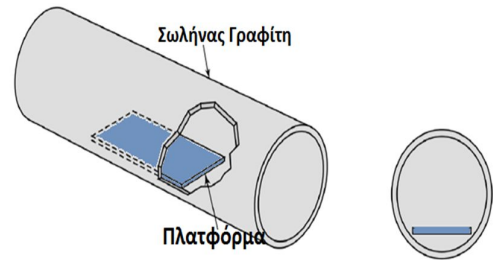
Το ύψος στη φλόγα στο οποίο παρατηρείται η μέγιστη ατομική απορρόφηση εξαρτάται από το στοιχείο και από τις ταχύτητες ροής του δείγματος, του καυσίμου και του οξειδωτικού. Για παράδειγμα το μαγνήσιο εμφανίζει το μέγιστο απορρόφησης περίπου στο μέσο της φλόγας.



“Για το λόγο αυτό η ρύθμιση της θέσης της φλόγας σε σχέση με τη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα είναι κρίσιμη”

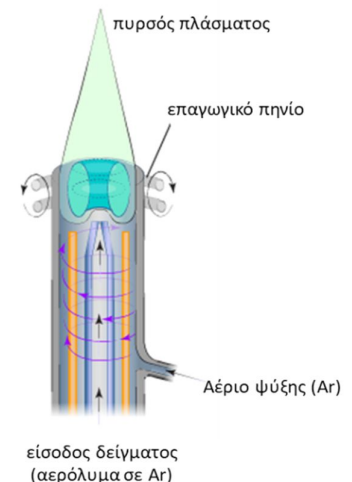
Β. Φούρνοι

Ο θερμαινόμενος φούρνος γραφίτη είναι πιο ευαίσθητος από τη φλόγα και απαιτεί μικρότερη ποσότητα δείγματος. Το δείγμα εισάγεται στο φούρνο μέσω μιας οπής, ενώ η ακτινοβολία της πηγής το διαπερνά κάθετα από αυτό. Οι φούρνοι θερμαίνονται με ηλεκτρικές αντιστάσεις έως τους 3000 °C, όπου το δείγμα ατμοποιείται. Ο γραφίτης περιβάλλεται από Ar για αποφυγή οξείδωσης και καύσης του γραφίτη.



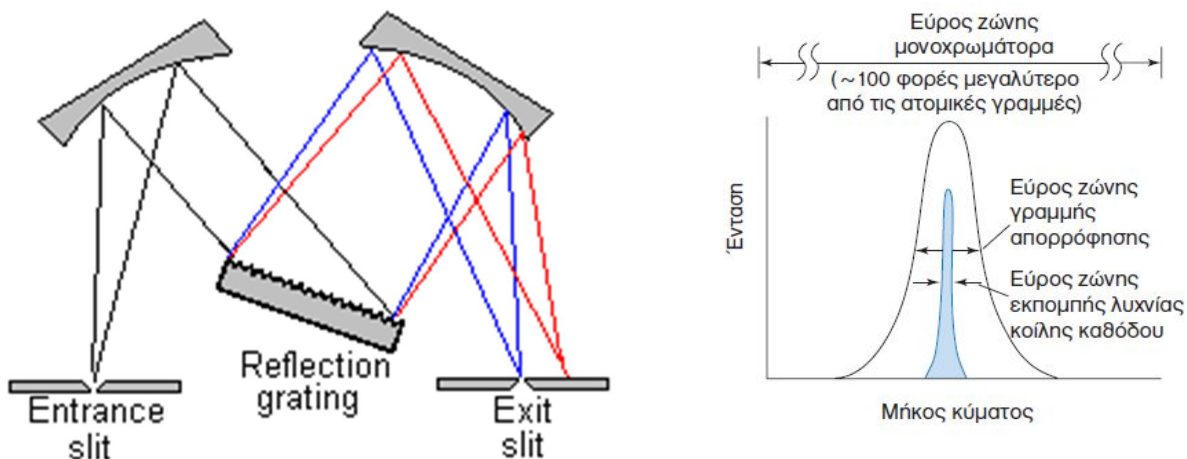
Γ. Επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα

Το επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (Inductively Coupled Plasma, ICP) είναι δύο φορές πιο θερμό από τη φλόγα καύσης. Η υψηλή θερμοκρασία, η σταθερότητα και η σχετικά αδρανής ατμόσφαιρα του Ar στο πλάσμα εξαλείφει τις περισσότερες παρεμποδισεις που αντιμετωπίζονται με τις φλόγες. Δίνει τη δυνατότητα της ταυτόχρονης ανάλυσης πολλών στοιχείων και χρησιμοποιείται συχνά στην ατομική φασματοσκοπία εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος. Τα όργανα πλάσματος έχουν πολύ μεγαλύτερο κόστος αγοράς και χρήσης από εκείνα της φλόγας.



3) Μονοχρωμάτορας

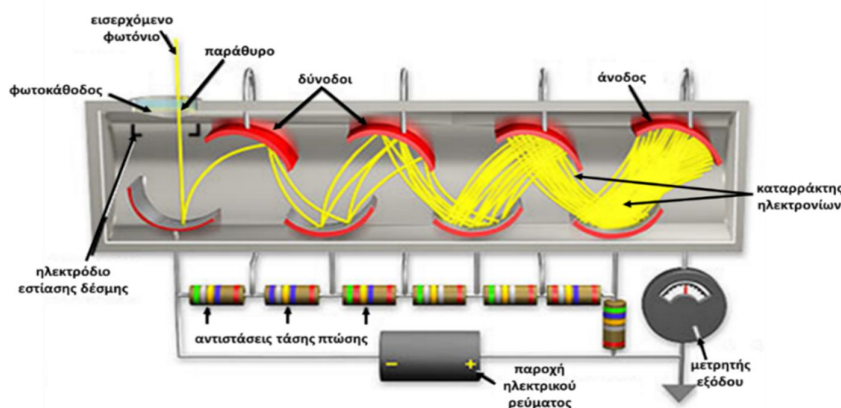
Η θέση του μονοχρωμάτορα είναι απαραίτητη μετά τη φλόγα και πριν τον ανιχνευτή. **Οι φλόγες εκπέμπουν φως το οποίο πρέπει να αφαιρείται από το σήμα.** Ο μονοχρωμάτορας αποτελείται από πρίσμα ή φράγμα, επιτρέποντας τη δίοδο μόνο επιθυμητής ακτινοβολίας.



Το φάσμα ατομικής απορρόφησης είναι σχεδόν γραμμικό με εύρος $\Delta\lambda=0.005$ nm περίπου, αυτό της εκπομπής είναι λίγο μικρότερο, ενώ η δυνατότητα του μονοχρωμάτορα είναι περίπου 0.5 nm. Η ακτινοβολία που στέλνει η λάμπα κοίλης καθόδου είναι ακτινοβολία εκπομπής, οπότε το εύρος της είναι τόσο μικρό που μετά από αυτήν δεν χρειάζεται η χρήση ενός μονοχρωμάτορα, όπως γίνεται στα απλά φασματοφωτόμετρα που μετά τη πηγή υπάρχει πάντα ένας μονοχρωμάτορας.

4) Ανιχνευτής:

Ο Ανιχνευτής είναι ένας απλός φωτοπολλαπλασιαστής που μετατρέπει τη ροή φωτονίων σε ηλεκτρικούς παλμούς οι οποίοι στη συνέχεια ενισχύονται από ένα ηλεκτρικό πεδίο και προκαλούν εκπομπή άλλων ηλεκτρονίων καθώς προσκρούουν σε άλλη επιφάνεια (10^6 ηλεκτρόνια για 1 φωτόνιο). Στη συνέχεια το σήμα που δίνει ο ανιχνευτής ενισχύεται από ένα ηλεκτρονικό κύκλωμα (ενισχυτής) ώστε να είναι δυνατή η καταγραφή του



5) Καταγραφικό:

Μια συσκευή που καταγράφει το σήμα. Αυτή μπορεί να είναι μια απλή οθόνη πάνω στο όργανο, ένας εκτυπωτής ή ακόμα και ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής με το αντίστοιχο λογισμικό

Παρεμποδίσεις στη Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης:

Όπως όλες οι αναλυτικές μέθοδοι, έτσι και η Α.Α. υποφέρει από ορισμένες παρεμποδίσεις για αυτόν το λόγο πρέπει η ανάλυση να γίνει κάτω από καλώς οριζόμενες και ελεγχόμενες συνθήκες.

Παρεμπόδιση είναι κάθε επίδραση που μεταβάλλει το σήμα, ενώ η συγκέντρωση του αναλύτη παραμένει ίδια. Η παρεμπόδιση μπορεί να διορθωθεί με την απομάκρυνση της πηγής της παρεμπόδισης ή με τη χρήση προτύπων που εμφανίζουν την ίδια παρεμπόδιση.

Οι παρεμποδίσεις διακρίνονται:

I. Φασματικές παρεμποδίσεις.

II. Φυσικές παρεμποδίσεις.

III. Ιονικές παρεμποδίσεις.

IV. Χημικές παρεμποδίσεις

I) **Οι φασματικές παρεμποδίσεις**, αναφέρονται στην επικάλυψη του σήματος του αναλύτη είτε από τα σήματα άλλων στοιχείων ή μορίων του δείγματος είτε από σήματα που προέρχονται από τη φλόγα ή το φούρνο.

II) **Οι φυσικές παρεμποδίσεις**, οφείλονται στις φυσικές ιδιότητες του διαλύματος όπως, το ιξώδες, η πυκνότητα, η επιφανειακή τάση και η τάση ατμών.

III) **Οι ιοντικές παρεμποδίσεις**, οφείλονται στον ιονισμό των ατόμων του προσδιοριζόμενου αναλύτη περιορίζοντας το πλήθος των ατόμων στη βασική κατάσταση.

IV) **Οι χημικές παρεμποδίσεις**, οφείλονται σε συστατικά του δείγματος που μειώνουν το ποσοστό ατομοποίησης του αναλύτη.

Απορρόφηση υποβάθρου:

Στη φλόγα εκτός από τον αναλύτη υπάρχουν και άλλα μόρια, οξείδια μετάλλων, μόρια H_2 , ρίζες OH , μόρια από το διαλύτη κλπ. τα οποία είτε απορροφούν είτε σκεδάζουν. Αυτά αποτελούν το υπόβαθρο. Αντιμετωπίζεται με τη χρήση τυφλού διαλύματος, δηλ. ένα διάλυμα που περιέχει οτιδήποτε υπάρχει στο δείγμα εκτός από τον αναλύτη.

Στη συγκεκριμένη άσκηση θα χρησιμοποιηθεί ατομική απορρόφηση της Agilent μοντέλο 55B. Περιέχει δύο λάμπες κοίλης καθόδου, μία λάμπα Mg για την ανάλυση του μαγνησίου και μία λάμπα Ca για την ανάλυση ασβεστίου. Το σύστημα ατομοποίησης λειτουργεί με καυστήρα και φλόγα που δημιουργείται από ανάφλεξη ακετυλενίου με συνθετικό αέρα.

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 D2	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 ποσότητα μαγνησίου και ασβεστίου από αρχικά διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης των 100 ppm τα οποία σας 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 τη ποσότητα Mg θα 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: $C_1V_1=C_0V_0$

C_1 είναι η τελική συγκέντρωση του Mg (0.2 ppm), V_1 ο τελικός όγκος (100 ml), C_0 η αρχική συγκέντρωση του Mg (100 ppm) και V_0 ο ζητούμενος όγκος, οπότε $V_0=0.2$ ml. Με τον ίδιο τρόπο υπολογίζεται η ποσότητα του Ca (0.4 ml).

Έτσι θα 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, να τα προσθέσετε στην ογκομετρική φιάλη των 100 ml και να αραιώσετε στα 100 ml με απιονισμένο νερό.

2) Προετοιμασία άγνωστων δειγμάτων:

- θα αναλύσετε 3 δείγματα πόσιμου νερού, διαφορετικών ετικετών ή χωρίς ετικέτες
- θα αναλύσετε το νερό από το δίκτυο του πανεπιστημίου.
- θα σας δοθεί άγνωστο δείγμα από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου, το οποίο θα το αναλύσετε τρεις φορές για να μπορέσετε να κάνετε στατιστική ανάλυση στα αποτελέσματα

Οι συγκεντρώσεις των άγνωστων δειγμάτων θα πρέπει να είναι μέσα στα όρια των πρότυπων καμπυλών που θα δημιουργήσετε, οπότε για το μαγνήσιο θα πρέπει να είναι μεταξύ 0.2 και 2.0 ppm και για το Ca μεταξύ 0.4 και 3.2 ppm. Αν οι αναμενόμενες συγκεντρώσεις είναι διαφορετικές θα πρέπει να γίνουν οι ανάλογες αραιώσεις των δειγμάτων έτσι:

- για τα διάφορα νερά, παρατηρείτε τις συγκεντρώσεις που έχουν στην ετικέτα τους και κάνετε την ανάλογη αραιώση. Συνήθως χρειάζεται **1/10 ή 1/20**.

- 2) Για το νερό από το δίκτυο του πανεπιστημίου θα κάνετε αραιώση 1/20
- 3) Για το άγνωστο δείγμα θα κάνετε αραιώση 1/20

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

Σε όλα τα 7 άγνωστα δείγματα θα μετρήσετε τις συγκεντρώσεις του Mg και του Ca.

Προσοχή:

- 1) Όλα τα διαλύματα πρότυπα και άγνωστα θα παρασκευασθούν με χρήση πιπετών ακριβείας μεταβλητού όγκου.
- 2) 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 το διακόπτη τροφοδοσία.
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' επιλέξετε τη σωστή μέθοδο

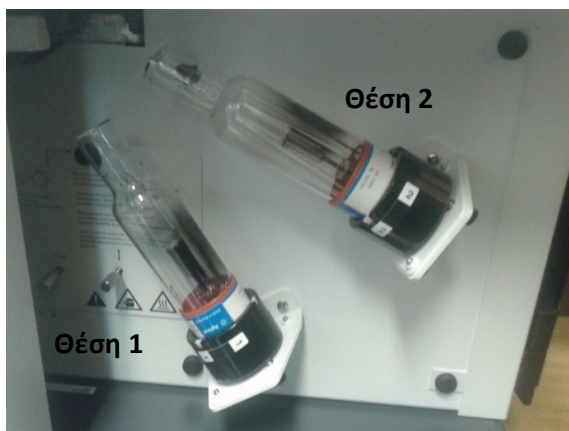
1. Οι ρυθμίσεις λειτουργίας ορίζονται στο μενού 'Instrument Parameters'.

- **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 ενεργοποίησή της, για το Mg συνιστάμενο είναι το 4 (με μέγιστο το 10) και για το Ca είναι το 10 (με μέγιστο το 10)

- **Standby current:**

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

- **D2 correction:**

για την ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση της διόρθωσης D2 (δεν χρησιμοποιείται)

- **Gas type:**
για το είδος του αερίου που θα χρησιμοποιηθεί (επιλογή air- acetylene)
 - **Wavelength:**
το μήκος κύματος της λυχνίας για το Mg 202.6 nm, για το Ca 422.7 nm
 - **Slit:**
το φασματικό εύρος ζώνης στο μονοχρωμάτορα για το Mg είναι 1.0 καθώς και για το Ca 0.5
 - **Save method:**
αποθήκευση μεθόδου
2. Οι ρυθμίσεις της μέτρησης ορίζονται στο μενού **‘Measurement Parameters’**
- **Next Sample:**
ορίζει τον αριθμό του δείγματος, επιλέγεται ο αριθμός 1.
 - **Batch number:**
ορίζει τον αριθμό της πατρίδας, επιλέγεται ο αριθμός 1.
 - **Pre-read Delay:**
ορίζει το χρόνο που θα τραβάει δείγμα, πριν αρχίζει αν το καταγράφει (συνήθως χρησιμοποιείται όταν είναι σε χρήση ένας auto sampler), , επιλέγεται ο αριθμός 0.
 - **Read Time:**
Ορίζει το χρόνο κατά τον οποίο μετράτε το δείγμα, επιλέγονται 5 sec.
 - **Replicate:**
Ορίζει πόσες φορές θα μετρηθεί το κάθε δείγμα δίνοντας σαν τελικό αποτέλεσμα το μέσο όρο τους, επιλέγονται 3 φορές.
 - **Precision:**
Αντί για το μέσο όρο των μετρήσεων, πραγματοποιεί συνεχώς μετρήσεις μέχρι να πετύχει την επιθυμητή ακρίβεια (%), δεν χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη άσκηση.

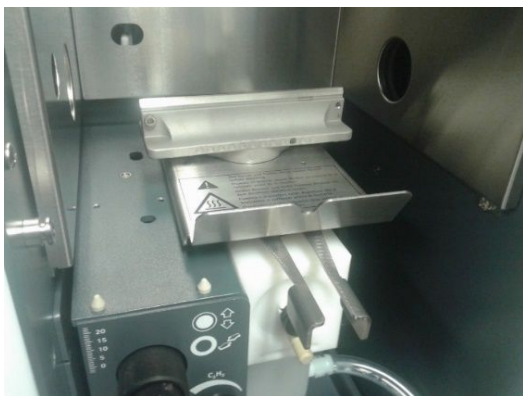
III. Βελτιστοποίηση συστήματος

Πηγαίνετε στο μενού **‘Optimization Page’**.

A) Ευθυγράμμιση του καυστήρα

Χρησιμοποιήστε μία από τις ταινίες καθαρισμού και ευθυγράμμισης καυστήρα που παρέχονται από την Agilent για να εντοπίσετε τη διαδρομή φωτός.

1. Περιστρέψτε το καυστήρα πιέζοντας τους οδοντές της λαβής περιστροφής, μέχρι η σχισμή να είναι παράλληλη με τη διαδρομή του φωτός.



2. Η σχισμή του καυστήρα πρέπει να είναι παράλληλη με τη διαδρομή του φωτός. Ελέγχεται τοποθετώντας τη κάρτα ελέγχου στα άκρα της σχισμής του καυστήρα και τροποποιείται από τα κουμπιά A και B που ρυθμίζουν το ύψος και την οριζόντια θέση του καυστήρα αντίστοιχα.



εξωτερικό κουμπί:

ρυθμίζει το ύψος του καυστήρα

εσωτερικό κουμπί:

ρυθμίζει το καυστήρα στην οριζόντια θέση

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

Β) Για να ανάψει η φλόγα:

- Πατήστε το πλήκτρο <Flame on> κρατήστε το πατημένο έως ότου να ανάψει η φλόγα.
- Αναρροφήστε 50 mL από το 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 για να αποκτήσετε τη μέγιστη απορρόφηση (αλλά διατηρήστε το καυστήρα κάτω από τη διαδρομή της δέσμης του φωτός).
- Μετακινήστε οριζόντια το καυστήρα (κουμπί (B) μέχρι να βελτιστοποιηθεί το σήμα.



IV. Βαθμονόμηση για το αντίστοιχο στοιχείο

- Από το μενού <Optimize> επιλέγετε 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).

Στο πεδίο αυτό γίνεται η μέτρηση του τυφλού δείγματος, έχει οριστεί η τιμή μηδέν και δεν αλλάζει.

- Standards 1...5 (Πρότυπα 1 ... 5).
 1. Γράφετε τη τιμή της συγκέντρωσης και πατάτε <enter>
 2. Την επιλέξετε ξανά και πατάτε <Read> για να τη μετρήσει.
 3. Αν δεν είναι το επιθυμητό αποτέλεσμα πατάτε ξανά <Read> για να γίνει μια επιπλέον μέτρηση του δείγματος.

V. Μέτρηση δειγμάτων:

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

- Πατήστε το πλήκτρο <Read>.
- Τοποθετήστε κατάλληλο δείγμα και πατήστε το πλήκτρο < Read> για να μετρηθεί.
- Αν δεν είναι το επιθυμητό αποτέλεσμα πατάτε ξανά το πλήκτρο <Read> για να γίνει επιπλέον μέτρηση του δείγματος.
- Επαναλάβετε το προηγούμενο βήμα για τα υπόλοιπα δείγματα. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται σε μορφή πίνακα η στήλη 'mean' εμφανίζει τη μέση τιμή για κάθε αποτέλεσμα.

1) Φορτώνετε τη μέθοδο για την ανάλυση του Mg

2) Αναλύεται όλα τα δείγματα για το Mg

a. βάζετε απιονισμένο νερό για να καθαρίσει ο καυστήρας

b. στη συνέχεια τα πρότυπα από το πιο αραιό στο πιο πυκνό (ενδιάμεσα δεν χρειάζεται να βάζετε απιονισμένο νερό)

c. βάζετε απιονισμένο νερό για να καθαρίσει ο καυστήρας

d. μετράτε διαδοχικά τα 3 άγνωστα δείγματα (ενδιάμεσα δεν χρειάζεται να βάζετε απιονισμένο νερό)

e. Βάζετε απιονισμένο νερό για να καθαρίσει ο καυστήρας

f. μετράτε τα δείγματα από τα πόσιμα νερά, όμως εδώ πρέπει μεταξύ των δειγμάτων να βάζετε απιονισμένο νερό για να καθαρίζει ο καυστήρα από το προηγούμενο δείγμα.

g. βάζετε απιονισμένο νερό για να καθαρίσει ο καυστήρας

h. βάζετε το δείγμα από το νερό του δικτύου του πανεπιστημίου

i. βάζετε απιονισμένο νερό για να καθαρίσει ο καυστήρας

3) φορτώνετε τη μέθοδο για την ανάλυση του Ca

4) Αναλύεται όλα τα δείγματα για το Ca με τον ίδιο τρόπο και με την ίδια σειρά που έγινε στο Mg

5) κλείνετε τη φλόγα

6) κλείνετε τα αέρια

7) κλείνετε το όργανο

Αποτελέσματα και ανάλυση

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

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

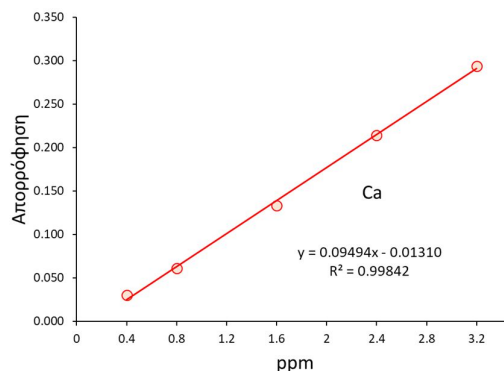
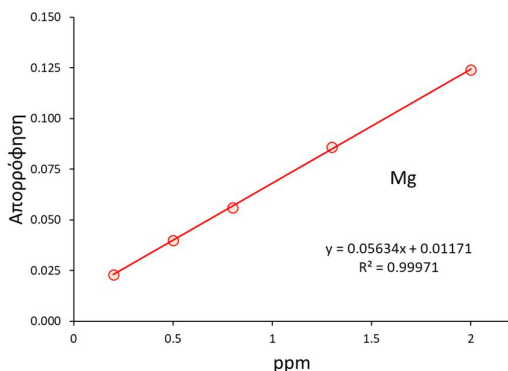
Παράδειγμα:

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 (πχ 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 αντίστοιχα. Στον άξονα των Y θα βάλετε τις τιμές της απορρόφησης και στον άξονα του X τις τιμές των συγκεντρώσεων σε ppm.

Έτσι στο προηγούμενο παράδειγμα θα έχετε:



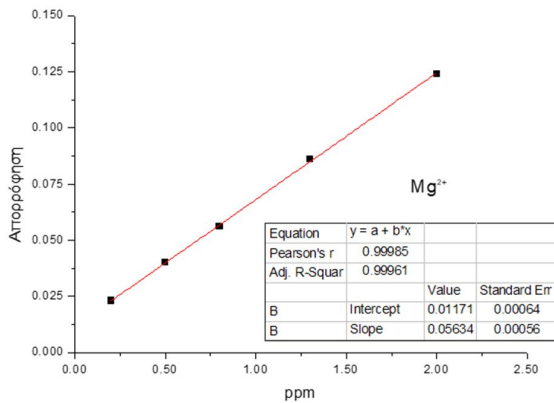
Πρότυπες καμπύλες αναφοράς για το Mg και το Ca.

B. Υπολογισμός ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου:

Από τις καμπύλες αναφοράς του κάθε ιόν θα υπολογίστε τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης για κάθε ιόν ξεχωριστά.

Παράδειγμα:

Για το ιόν του Mg από την καμπύλη βαθμονόμησης προκύπτει:



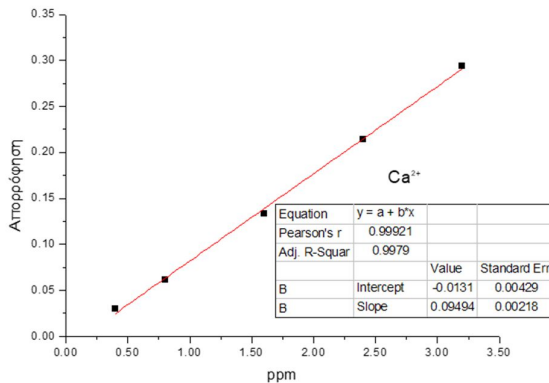
το όριο ανίχνευσης είναι:

$$LOD = \frac{3*S}{m} = \frac{3*0.00056}{0.05634} = 0.029819 = 0.030$$

και το όριο ποσοτικοποίησης είναι:

$$LOQ = \frac{10*S}{m} = \frac{10*0.00056}{0.05634} = 0.099397 = 0.099$$

Για το ιόν του Ca από την καμπύλη βαθμονόμησης προκύπτει:



το όριο ανίχνευσης είναι:

$$LOD = \frac{3*S}{m} = \frac{3*0.00218}{0.09494} = 0.068886 = 0.069$$

και το όριο ποσοτικοποίησης είναι:

$$LOQ = \frac{10*S}{m} = \frac{10*0.00218}{0.09494} = 0.229619 = 0.230$$

Ιόν	LOD	LOQ
Mg ²⁺	0.030	0.099
Ca ²⁺	0.069	0.230

Γ. Υπολογισμός αγνώστων δειγμάτων:

1. Με τη χρήση των πρότυπων καμπυλών θα προσδιορίσετε τη ποσότητα σε Mg και σε Ca σε όλα τα δείγματα που αναλύσατε, πόσιμα νερά, νερό από το δίκτυο του πανεπιστημίου καθώς και στα άγνωστα δείγματα κάνοντας αναγωγή στην αρχική τους συγκέντρωση .
2. Συγκρίνετε και σχολιάσετε τις τιμές των πόσιμων νερών με τις τιμές που αναγράφουν στις ετικέτες τους.
3. Σχολιάσετε τις συγκεντρώσεις Mg και Ca στο νερό του δικτύου του Πανεπιστημίου, συγκρίνοντας με τιμές πόσιμων νερών.
4. Στο άγνωστο δείγμα αφού υπολογίσετε τις 3 συγκεντρώσεις θα κάνετε στατιστική ανάλυση υπολογίζοντας τη μέση τιμή και τη τυπική απόκλιση .

Παράδειγμα:

Έστω ότι τα νερά που αναλύσατε είναι από τις ετικέτες, Ζαρός, Ρούβας και Σεληνάρι και σε όλα τα δείγματα, νερά, νερό από το δίκτυο του πανεπιστημίου και στο άγνωστο κάνατε αραιώση 1/20.

Οι μετρήσεις τις απορροφήσεις σε Mg και Ca θα είναι:

Διάλυμα (αραίωση 1/20)	Απορρόφηση Mg	Απορρόφηση Ca
Ζαρός	0.048	0.095
Ρούβας	0.047	0.091
Σεληνάρι	0.051	0.134
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 του Mg ($y = 0.05634x + 0.01171$) και του Ca ($y = 0.09494x - 0.01310$), υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις του Mg και του Ca στα άγνωστα δείγματα, **ελέγχονται αν είναι μέσα στα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης** και γίνονται οι απαραίτητες αναγωγές λόγω της αρχικής αραιώσης τους.

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

Άγνωστο Διάλυμα	Συγκέντρωση Mg (ppm)	Συγκέντρωση Ca (ppm)
Ζαρός	12.9	22.8
Ρούβας	12.5	21.9
Σεληνάρι	13.9	31.0
Δίκτυο Πανεπιστημίου	18.6	37.1

Το άγνωστο δείγμα θα έχει τελικές τιμές:

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

Οπότε η μέση τιμή και η τυπική του απόκλιση θα 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 – Ασκήσεις:

1. Σε ένα φασματοφωτόμετρο UV-VIS ο μονοχρωμάτορας είναι πριν την κυψελίδα του δείγματος ενώ στην ατομική απορρόφηση ο μονοχρωμάτορας είναι μετά τη φλόγα δηλαδή μετά την 'κυψελίδα'. Για ποιο λόγο γίνεται αυτό;
2. Γιατί δεν υπάρχει μονοχρωμάτορας και πριν τη φλόγα;
3. Αν αντικατασταθεί η κεφαλή του καυστήρα της φλόγα από μία άλλη που θα έχει το 1/5 του μήκους της, η απορρόφηση του δείγματος θα μεταβληθεί; και για πιο λόγο;
4. Όταν θέλετε να μετρήσετε τα δείγματα Mg, η λάμπα κοίλης από πιο στοιχείο αποτελείται και για πιο λόγο;
5. Η καμπύλη αναφορά από για το Mg είναι $y = 0.05634x + 0.01171$, όπου Y η απορρόφηση και X η συγκέντρωση σε ppm. Σε άγνωστο δείγμα που κάνατε αραιώση 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 του φωσφόρου σε ποτά κόλας με τη μέθοδο μπλε του μολυβδαινίου και την εξοικειώσει των φοιτητών με τη χρήση φασματοφωτομέτρων.



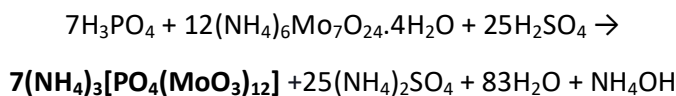
Το φωσφορικό οξύ χρησιμοποιείται στα αναψυκτικά ως πρόσθετο, στο οποίο οφείλεται η όξινη γεύση των αναψυκτικών. Παράλληλα όμως έχει και αντιεμετική δράση, τα αναψυκτικά περιέχουν μεγάλες ποσότητες γλυκαντικής ουσίας, που η πρόσληψη της από τον οργανισμό προκαλεί τάση για εμετό, το φωσφορικό οξύ αποτρέπει αυτή τη διαδικασία. Μεγάλες ποσότητες πρόσληψης φωσφορικού οξέος μπορεί να προκαλέσουν ανεπιθύμητες καταστάσεις όπως ζημιά στα δόντια, αλλά και επίδραση στο μεταβολισμό του Ca (εμποδίζει τη δέσμευση του Ca από τον οργανισμό) που είναι επικίνδυνο για την υγεία ειδικά για τα παιδιά και εγκύους που τους είναι απαραίτητη η μεγάλη πρόσληψη ασβεστίου.

Μέθοδος προσδιορισμού

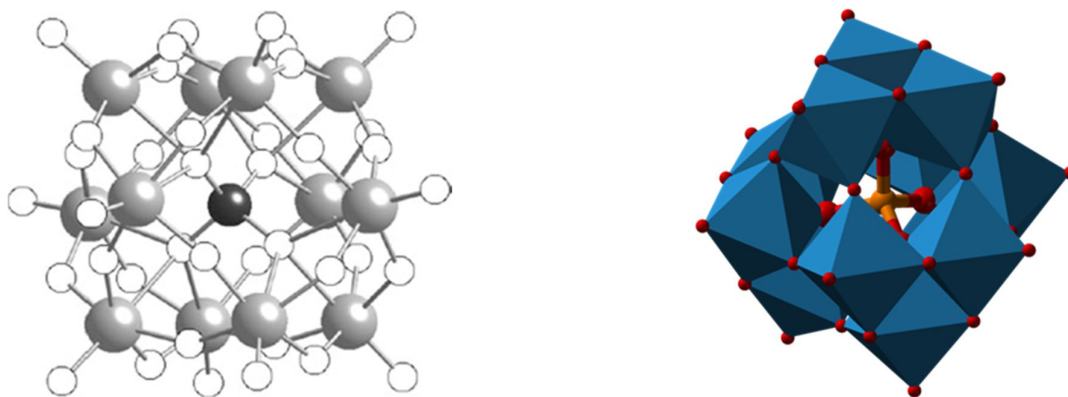
Η μέθοδος στηρίζεται στο σχηματισμό ενός συμπλόκου του φωσφορικού ιόντος με μια ένωση του μολυβδαινίου το οποίο έχει χαρακτηριστικό μπλε χρώμα, για το λόγο αυτό η μέθοδος ονομάζεται και “μπλε του μολυβδαινίου”.

Η μέθοδος γίνεται σε δύο στάδια:

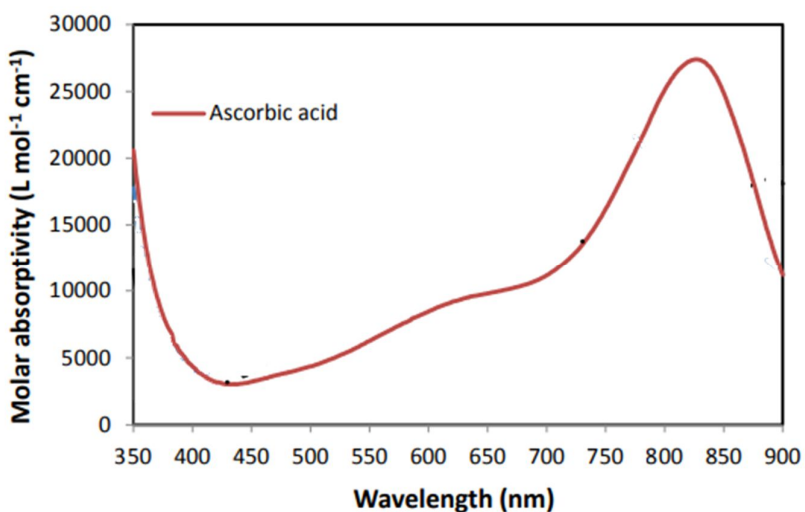
1. Αρχικά το φωσφορικό ιόν αντιδρά με το τετραένυδρο μολυβδαινικό αμμώνιο σε όξινο περιβάλλον και δίνει το φωσφορομολυβδαινικό αμμώνιο, ένα άχρωμο εξασθενές φωσφορικό σύμπλοκο του μολυβδαινίου $[(\text{PO}_4\text{Mo}_{12}^{\text{VI}}\text{O}_{36})^3]$.



Το σύμπλοκο έχει τη δομή ιόντος Keggin:



2. Στη συνέχεια με τη παρουσία ασκορβικού οξέος, που χρησιμοποιείτε ως αναγωγικό μέσο, μετατρέπεται σε σύμπλοκο ετεροπολυμολυβδαινίου $(\text{PO}_4\text{Mo}_4^{\text{V}}\text{Mo}_8^{\text{VI}}\text{O}_{36})^{7-}$ όπου 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 κατά επέκταση από την αρχική ποσότητα του φωσφορικού οξέος. Η θέρμανση είναι ένας παράγοντας που βοηθάει 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 και όχι μόνο σε αναψυκτικά. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μέτρηση φωσφορικών σε δείγματα πόσιμων και θαλάσσιων νερών κ.α. υπάρχουν πολλές παραλλαγές της κυρίως ως προς το αναγωγικό μέσο.



Οργανολογία

Χρησιμοποιείται φασματοφωτόμετρο UV-VIS για τις μετρήσεις της απορρόφησης



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 (πλαστικές)
- 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 τι όγκο θα πρέπει να πάρετε από το αρχικό πρότυπο διάλυμα για να κάνετε την αραιώση

Το αρχικό πρότυπο παρασκευάζεται διαλύοντας 0.1941 gr 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 Cola):

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

Υπολογίστε πόσο όγκο του αναψυκτικού θα πρέπει να χρησιμοποιήσετε

3. Αναγωγικό μέσο:

Αρχικά ετοιμάζετε τα παρακάτω τρία διαλύματα:

- A. **Ammonium molybdate:** παρασκευάζεται από διάλυση 1.00 gr ammonium molybdate tetrahydrate σε 50 ml απιονισμένου νερού.
- B. **Διάλυμα ασκορβικού οξέος:** παρασκευάζεται από διάλυση 1.76 gr ασκορβικού οξέος σε 100 ml απιονισμένου νερού.
- Γ. **Διάλυμα H_2SO_4 :** παρασκευάζεται από αραιώση 17 ml πυκνού θειικού οξέος σε 200 ml απιονισμένου νερού.

Στη συνέχεια παίρνετε:

- 3.9 ml από το διάλυμα A
- 6.0 ml από το διάλυμα B
- 12.5 ml από το διάλυμα Γ
- και συμπληρώνετε σε όγκο 25 ml σε ογκομετρική φιάλη με απιονισμένο νερό.

Το μίγμα αυτό θα είναι το αναγωγικό μέσο. Όπως έχει αναφερθεί στη μέθοδο, το μπλε σύμπλοκο γίνεται σε δύο στάδια, κατά το πρώτο στάδιο χρειάζεται μολυβδαίνιο και όξινες συνθήκες (διαλύματα A και Γ) για να γίνει το αρχικό άχρωμο σύμπλοκο του εξασθενούς μολυβδαινίου και στη συνέχεια με το αναγωγικό μέσο (διάλυμα B) και με την βοήθεια θέρμανσης δημιουργείται το σύμπλοκο με τη πεντασθενή μορφή του μολυβδαινίου που έχει το μπλε – πορφυρό χρώμα. Εσείς προσθέτετε όλα τα αντιδραστήρια μαζί (περιέχονται στο αναγωγικό μίγμα) θερμαίνοντας ταυτόχρονα, έτσι και τα δύο αυτά στάδια θα γίνουν αυτόματα το ένα μετά το άλλο.

Όλες οι αραιώσεις γίνονται στις αντίστοιχες ογκομετρικές φιάλες

4. Προετοιμασία δειγμάτων:

Συνολικά θα παρασκευάσετε 5 πρότυπα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων, 3 δείγματα του ίδιου αγνώστου (από το αναψυκτικό) και ένα τυφλό διάλυμα (blank).

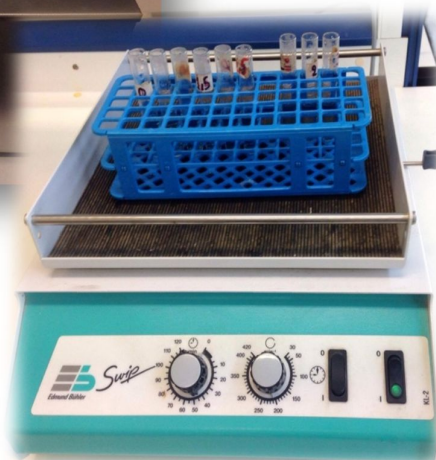
Οι αραιώσεις θα γίνονται κατευθείαν μέσα στους δοκιμαστικούς σωλήνες χρησιμοποιώντας πιπέτες ακριβείας μεταβλητού όγκου. Για τη παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων, θα προσθέσετε διαφορετικές ποσότητες του προτύπου των 4 ppm, από 0.5 έως 2.5 ml όπως δίνονται στο παρακάτω πίνακα. Το άγνωστο θα γίνει τρεις φορές (για στατιστικούς λόγους) θα προσθέσετε 0.25 ml αναψυκτικού σε κάθε ένα από τους τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες. Σε όλους τους δοκιμαστικούς (πρότυπα, δείγματα και τυφλό) θα βάλετε την ίδια ποσότητα από το μίγμα με το αναγωγικό μέσο (2 ml) και 0.1 ml από καραμελόχρωμα.

Όγκος (ml)	Blank	1°	2°	3°	4°	5°	A	B	Γ
Πρότυπο	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5			
Δείγμα							0.25	0.25	0.25
Αναγωγικό	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Χρώμα	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
νερό	2.9	2.4	1.9	1.4	0.9	0.4	2.65	2.65	2.65

Η προσθήκη του καραμελόχρωματος χρειάζεται επειδή το δείγμα που αναλύεται είναι αναψυκτικό τύπου cola που έχει έντονο καραμελέ χρώμα, το οποίο επηρεάζει την απορρόφηση για το λόγο αυτό θα πρέπει να προστεθεί σαν μήτρα στα πρότυπα και στο τυφλό. Όμως επειδή δεν είναι διαθέσιμο καθαρό καραμελόχρωμα, προστίθεται 0.1 ml από το ίδιο το αναψυκτικό χρησιμοποιώντας έμμεσα το ίδιο του το χρώμα, προσοχή όμως θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί το **αραιωμένο 1/20 δείγμα της cola** και όχι το αρχικό πυκνό δείγμα. Θα πρέπει να προσέξετε ότι το αναψυκτικό εκτός από το χρώμα έχει και φωσφορικά, δημιουργείται έτσι ένα σταθερό λάθος, που για να απαλειφθεί προστίθεται η ίδια ποσότητα και στα δείγματα. Έτσι η επιπλέον ποσότητα φωσφορικών που προστίθεται θα είναι η ίδια και στα πρότυπα και στα δείγματα και στο τυφλό με αποτέλεσμα κατά τη μέτρηση της απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο η απορρόφηση που θα αφορά το τυφλό αφαιρείται από όλα τα άλλα δείγματα και έτσι απαλείφεται το σταθερό αυτό λάθος. Αν χρησιμοποιούσατε κανονικό καραμελόχρωμα (δηλ. χωρίς να περιέχει φωσφορικά) τότε θα το προσθέτατε μόνο στα πρότυπα δείγματα και στο τυφλό, για τη δημιουργία της μήτρας και δεν θα ήταν απαραίτητη η προσθήκη του και στα άγνωστα δείγματα. Τέλος συμπληρώνονται οι δοκιμαστικοί σωλήνες σε τελικό όγκο 5 ml με απιονισμένο νερό με πιπέτα ακριβείας μεταβλητού όγκου.



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



Αφού περάσει ο απαιτούμενος χρόνος, μεταφέρετε τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε shaker (μπαλαρίνα), για περίπου 5 λεπτά, ώστε να γίνει ομογενοποίηση των διαλυμάτων και επίσης να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου.

Κλείνετε τους δοκιμαστικούς με PARAFIM αναδεύετε ήπια και γεμίζετε τις κυψελίδες με τα διαλύματα των 9 δοκιμαστικών σωλήνων.

Προσοχή: ο 1^{ος} σωλήνας αφορά το τυφλό και μπαίνει στη κατάλληλη θέση στο φασματοφωτόμετρο.

Τέλος, πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στα 830nm.

Αποτελέσματα και ανάλυση

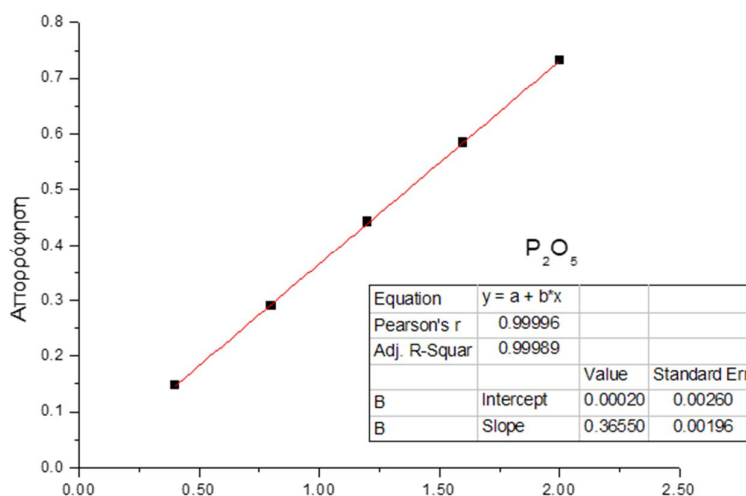
Καταγράφετε τις απορροφήσεις για τα πρότυπα δείγματα και τα άγνωστα

Παράδειγμα:

Διάλυμα	Συγκέντρωση P ₂ O ₅ (ppm)	Απορρόφηση
Πρότυπο 1	0.4	0.147
Πρότυπο 2	0.8	0.290
Πρότυπο 3	1.2	0.442
Πρότυπο 4	1.6	0.584
Πρότυπο 5	2.0	0.731
Άγνωστο Α		0.291
Άγνωστο Β		0.293
Άγνωστο Γ		0.291

Εύρεση συγκέντρωσης P₂O₅ στα άγνωστα διαλύματα:

Κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη, όπου στον άξονα των Y βάζετε την απορρόφηση και στον άξονα των X τη συγκέντρωση εκφρασμένη σε ppm P₂O₅.



Υπολογίζεται τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης:

- το όριο ανίχνευσης είναι: $LOD = \frac{3 \cdot S}{m} = \frac{3 \cdot 0.00196}{0.36550} = 0.016088 = 0.016$
- και το όριο ποσοτικοποίησης είναι: $LOQ = \frac{10 \cdot S}{m} = \frac{10 \cdot 0.00196}{0.36550} = 0.053625 = 0.054$

Υπολογισμός Αγνώστου Δείγματος:

Αρχικά από τη πρότυπη καμπύλη υπολογίζεται η συγκέντρωση σε ppm P₂O₅ σε κάθε άγνωστο δείγμα και ελέγχεται αν είναι μέσα στα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.

Στη συνέχεια με τη χρήση του παρακάτω τύπου υπολογίζεται η συγκέντρωση σε ppm φωσφόρου (P).

$$P(\text{ppm}) = 20 * 20 * X(\text{ppm}) * \frac{62 (P)}{142 (P_2O_5)}$$

Όπου:

- X η τιμή που υπολογίστηκε από τη πρότυπη καμπύλη αναφοράς (σε ppm P₂O₅)
- Διαιρείται η μοριακή μάζα του P₂O₅ (142).
- Πολλαπλασιάζεται με την ατομική μάζα του φωσφόρου (62).
- Πολλαπλασιάζεται με το 20 λόγω της πρώτης αραιώσης που κάνατε (αρχικά αραιώσατε το αναψυκτικό τύπου cola 1/20).
- Πολλαπλασιάζεται ξανά με το 20 λόγω της δεύτερης αραιώσης που κάνατε. Προσθέσατε 0.25 ml από το αραιωμένο αναψυκτικό σε δοκιμαστικό σωλήνα με τελικό όγκο τα 5 ml, έτσι πραγματοποιήσατε μια δεύτερη αραιώση 0.25/5 δηλ. 1/20.

Υπολογίζεται τη συγκέντρωση P και στα επόμενα δύο δείγματα αγνώστου με τον ίδιο τρόπο (σε ppm)

Οπότε στο αρχικό παράδειγμα θα είναι:

Διάλυμα	Συγκέντρωση P (ppm)
Άγνωστο Α	139.0
Άγνωστο Β	139.9
Άγνωστο Γ	139.0

Στα αποτελέσματα υπολογίζεται τη **μέση τιμή** και τη **τυπική απόκλιση** του αναψυκτικού σε συγκέντρωση φωσφόρου(P) σε ppm.

Συγκέντρωση αγνώστου σε P	ppm
Μέση τιμή	139.3
Τυπική απόκλιση	0.5

Τελική έκφραση της συγκέντρωσης του αγνώστου σε P:
139.3 ± 0.5 ppm

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 – Ασκήσεις:

1. Περιγράψετε τη μέθοδο «μπλε του μολυβδαινίου»
2. Για πιο λόγο προστίθεται μέρος του αναψυκτικού στα πρότυπα δείγματα και στο τυφλό;
3. Ποιος είναι ο ρόλος του ασκορβικού οξέος στη μέθοδο «μπλε του μολυβδαινίου»;
4. Η καμπύλη αναφοράς είναι $Y = 0.4500 \cdot X + 0.080$, όπου Y η απορρόφηση και X η συγκέντρωση των πρότυπων διαλυμάτων σε ppm P_2O_5 . Αν η απορρόφηση του άγνωστου δείγματος είναι 0.350, πόση είναι η συγκέντρωση του σε ppm φωσφόρου (P);
5. Αν στη προηγούμενη ερώτηση ο τελικός όγκος των δοκιμαστικών σωλήνων ήταν 10 ml αντί για 5 ml, αλλά είχατε την ίδια καμπύλη αναφοράς ($Y = 0.4500 \cdot X + 0.080$) και την ίδια απορρόφηση στο άγνωστο δείγμα (0.350), πόση θα ήταν η τελική συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος σε ppm φωσφόρου (P);
6. Αν αντί για 0.1 ml χρώματος (δείγμα αναψυκτικού ως καραμελόχρωμα) προστίθεται 0.2 ml χρώματος, η καμπύλη αναφοράς θα ήταν διαφορετική; για ποιο λόγο θα γινόταν αυτό;
7. 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:

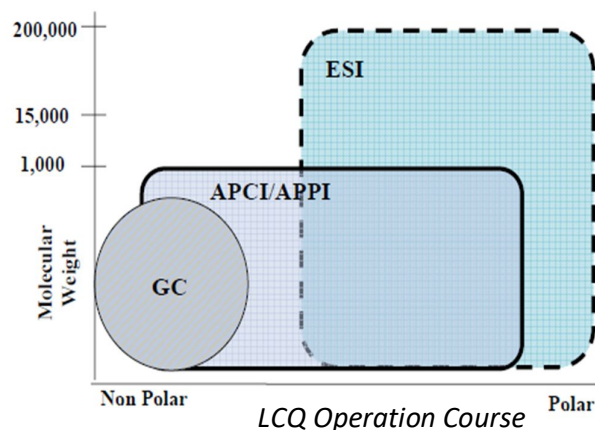
ο προσδιορισμός της σχετικής μοριακής μάζας πρωτεΐνης με την χρήση φασματομετρίας μάζας ηλεκτροψεκασμού και η εξοικείωση των φοιτητών με την τεχνική αυτή.



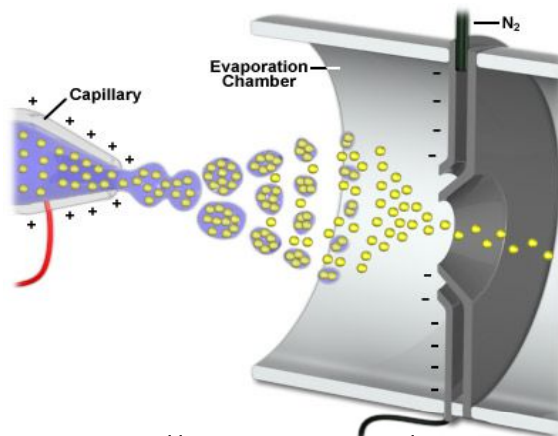
Πρώτος ο John Fenn το 1984 ανέδειξε τη δυνατότητα χρησιμοποίησης της φασματομετρίας μάζας ηλεκτροψεκασμού (electrospray ionization - mass spectrometry, ESI-MS) για την ανάλυση βιολογικών μορίων μεγάλης μοριακής μάζας. Για την τεχνική που ανέπτυξε τιμήθηκε με μέρος του βραβείου Nobel Χημείας το 2002. Ο ηλεκτροψεκασμός είναι μια τεχνική “ήπιου ιοντισμού” (δηλαδή δεν προκαλεί θραυσματοποίηση των μορίων που αναλύει), ο οποίος πραγματοποιείται υπό ατμοσφαιρική πίεση και υπερیشύει έναντι άλλων τεχνικών φασματομετρίας μάζας όπως ο Χημικός Ιοντισμός σε ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, APCI) και ο φωτοϊοντισμός σε Ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric Pressure Photolionisation, APPI) που ενώ είναι ήπιες τεχνικές προκαλούν κάποια θραυσματοποίηση. Η τεχνική του ESI μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση ενώσεων ισχυρά πολικών, μη-πτητικών και θερμικά ασταθών, μικρής και μεγάλης μοριακής μάζας, ενώ οι τεχνικές APCI, APPI εφαρμόζονται σε μικρότερα και πιο άπολα μόρια. Στον ESI το εύρος των μοριακών βαρών που μπορούν να αναλυθούν είναι μέχρι περίπου 100.000 Da, λόγω της πιθανής 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:

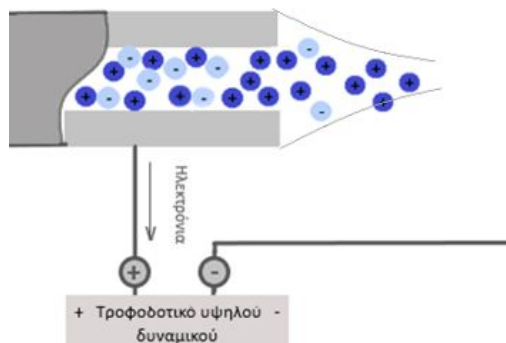
Στην τεχνική του ηλεκτροψεκασμού, τα ιόντα του αναλύτη που προϋπάρχουν στο διάλυμα του δείγματος, μεταφέρονται στην αέρια φάση μέσω ψεκασμού του υγρού δείγματος υπό την επίδραση ηλεκτρικού ισχυρού πεδίου (ηλεκτροψεκασμός – electrospray) και με τη βοήθεια ενός αδρανούς αερίου.



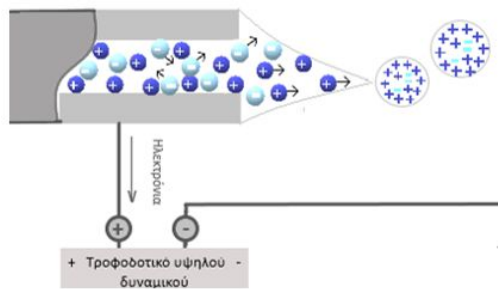
Αραιό διάλυμα αναλύτη με την βοήθεια αντλίας διέρχεται με ροή 3 – 10 μl/min μέσω ενός τριχοειδή σωλήνα από ανοξείδωτο χάλυβα, στο άκρο του οποίου εφαρμόζεται υψηλό δυναμικό, 2 – 5 kV. Το δυναμικό αυτό είναι θετικό ή αρνητικό ανάλογα με το είδος των ιόντων που θέλουμε να αναλύσουμε. Στην παρούσα άσκηση 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.



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



Με την εφαρμογή του θετικού δυναμικού στην άκρη του τριχοειδούς σωλήνα, τα θετικά ιόντα του διαλύματος κινούνται προς την επιφάνεια του και την εμπλουτίζουν, ενώ τα αρνητικά απομακρύνονται από αυτή. Το 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 από αυτόν μικρές θετικά φορτισμένες σταγόνες που περιέχουν τον αναλύτη καθώς και διαλύτη. Το “όριο Rayleigh” είναι η στιγμή που οι απωστικές δυνάμεις Coulomb μεταξύ των φορτίων και η επιφανειακή τάση του υγρού εξισορροπούνται.

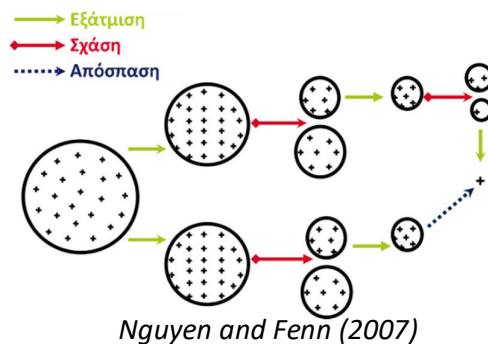
Η διάμετρος των σταγόνων που δημιουργούνται εξαρτάται από:

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

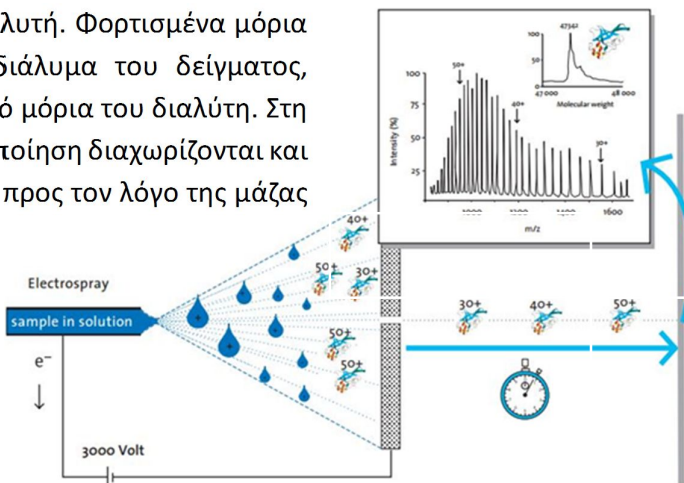
Στη συνέχεια οι φορτισμένες σταγόνες κατευθύνονται προς την είσοδο του φασματόμετρου λόγω του διαβαθμισμένου δυναμικού, υπό το ρεύμα αδρανές αερίου (N₂). Κατά την διαδρομή τους, οι σταγόνες απαλλάσσονται από τον διαλύτη με εξάτμιση, ώστε στο τέλος της πορείας μόνο τα φορτισμένα μόρια του αναλύτη που εισέρχονται στο φασματόμετρο.

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

1. Με εξάτμιση του διαλύτη λόγω του ρεύματος του αδρανούς αερίου (N_2).
2. Με σχάση της σταγόνας σε μικρότερες. Αυτό γίνεται λόγω του ότι καθώς εξατμίζεται ο διαλύτης το μέγεθος της σταγόνας μειώνεται και έτσι τα θετικά φορτισμένα μόρια έρχονται πιο κοντά μεταξύ τους, με αποτέλεσμα να αυξάνονται έτσι οι απωστικές δυνάμεις Coulomb. Όταν αυτές περάσουν το κρίσιμο σημείο που όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως ορίζεται ως "όριο Rayleigh" θα σπάσουν σε μικρότερες σταγόνες.
3. Με την απόσπαση κάποιου φορτισμένου μορίου του αναλυτή από την σταγόνα.



Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού γίνεται σε ατμοσφαιρική πίεση και είναι μια ήπια τεχνική που δεν προκαλεί θραυσματοποίηση των μορίων του αναλυτή. Φορτισμένα μόρια της πρωτεΐνης, που προϋπάρχουν μέσα στο διάλυμα του δείγματος, μεταφέρονται στην αέρια φάση απαλλαγμένα από μόρια του διαλύτη. Στη συνέχεια, χωρίς να πραγματοποιείται θραυσματοποίηση διαχωρίζονται και καταγράφονται από το φασματομετρο 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 .



Markides and Graslund, (2002)

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. Τετράπολα
5. Ανιχνευτής
6. Καταγραφικό

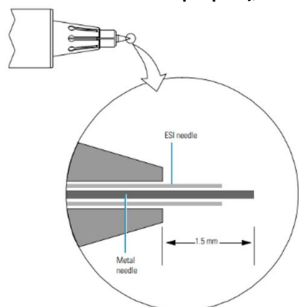
1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος:

Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, είναι ένας μηχανισμός στον οποίο τοποθετείται μια απλή σύριγγα υγρών που συνδέεται με το σύστημα ηλεκτροψεκασμού με ένα 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 μl/min.



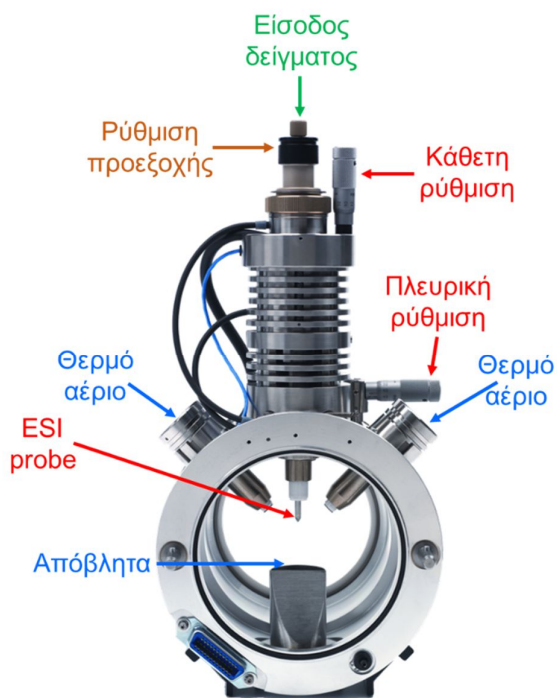
2. Σύστημα ηλεκτροψεκασμού:

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 και το αρνητικό φορτίο (η γείωση δηλαδή) εφαρμόζεται στην είσοδο του φασματομέτρου. Στην πραγματικότητα, επειδή το υλικό του τριχοειδή σωλήνα είναι από πολυμερές, το θετικό φορτίο εφαρμόζεται στον ανοξειδωτο σωλήνα



μέσα από τον οποίο βγαίνει ο τριχοειδής και λόγω την κοντινής απόστασης είναι σαν να εφαρμόζεται πάνω στο τριχοειδή σωλήνα. Η απόσταση του τριχοειδή από τον ανοξειδωτο 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.

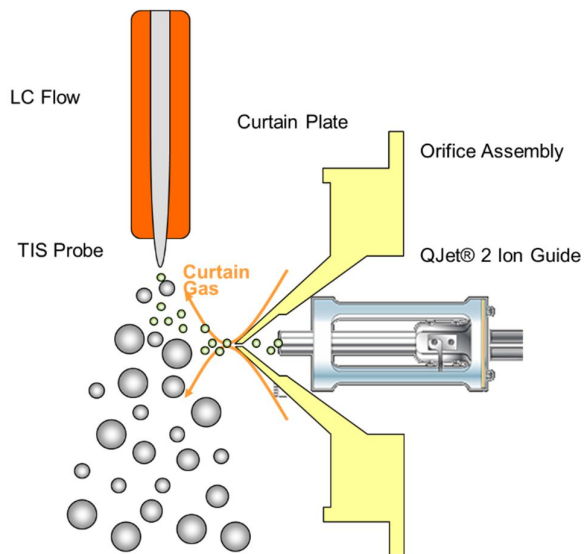




Το αέριο εκνέφωσης (nebulizer gas) βοηθά τόσο στο σχηματισμό σταγονιδίων κατά την διάρκεια του ηλεκτροψεκασμού όσο και στη ξήρανση τους. Παράλληλα, στο σύστημα διοχετεύεται και δεύτερο αέριο από την πλάγια είσοδο του συστήματος, αέριο **Θέρμανσης (heating gas)** που βοηθά τη διαδικασία εξάτμισης του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

Η είσοδος του φασματόμετρου είναι σε κάθετη θέση ως προς τον τριχοειδή σωλήνα υποχρεώνοντάς έτσι τα θετικά φορτισμένα μόρια να κάνουν στροφή 90 μοιρών για να εισέρθουν μέσα σε αυτόν. Αυτό προστατεύει το όργανο από το να μην εισέρχονται τυχόν ακαθαρσίες ή μη φορτισμένα μόρια τα οποία λόγω αδράνειας θα πάνε ευθεία οδηγούμενα προς τα απόβλητα και στο

φασματόμετρο θα εισέρθουν μόνο τα θετικά φορτισμένα μόρια. Στην είσοδο του οργάνου υπάρχει μια επιπλέον ροή αερίου (curtain gas: αέριο παραπέτασμα) με ροή αντίθετη από την πορεία των ιόντων. Το αέριο αυτό απωθεί τα σταγονίδια διαλύτη και τα ουδέτερα μόρια από την είσοδο του οργάνου προστατεύοντάς τον οδηγό ιόντων Q_{Jet} και το τετράπλο εστίασης Q₀ από μόλυνση.

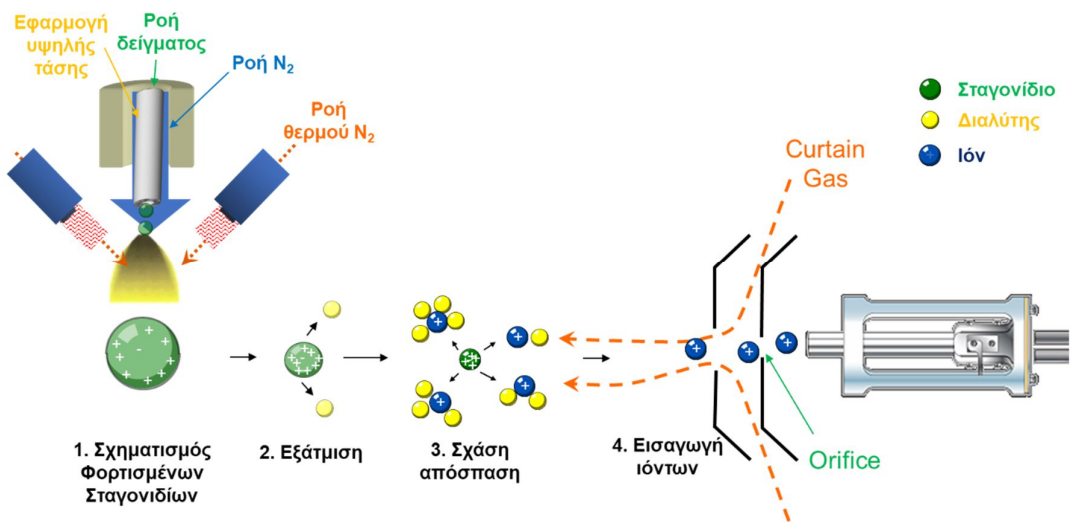


Και τα τρία αέρια, εκνέφωσης, θέρμανσης και παραπέτασμα είναι αέριο άζωτο που διοχετεύεται από μια γεννήτρια αζώτου την οποία τροφοδοτεί με ατμοσφαιρικό αέρα ειδικός αεροσυμπιεστής.

Η ένταση του δυναμικού για τον ηλεκτροψεκασμό είναι 5.5 kV.

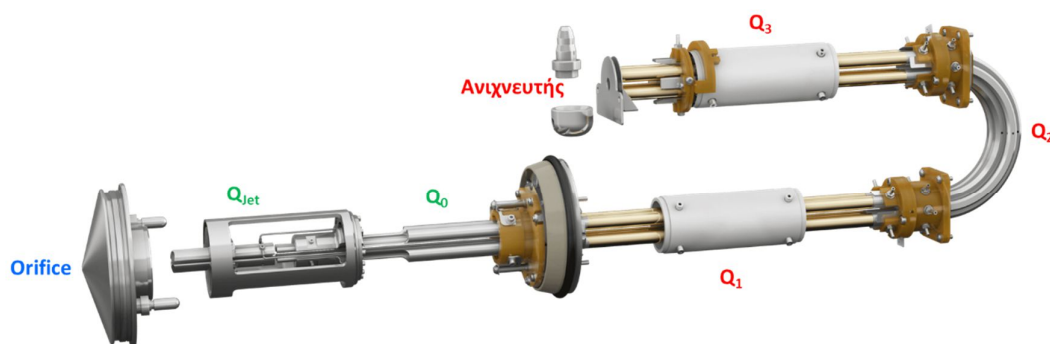
Οι ροές των αερίων εκνέφωσης και θέρμανσης είναι 18 και το αέριο παραπέτασμα 35.

Η θερμοκρασία θέρμανσης του αερίου θέρμανσης και της πηγής ηλεκτροψεκασμού είναι 150°C.



Η είσοδος του οργάνου γίνεται από ένα μικρό στόμιο (orifice), η δέσμη των ιόντων εισέρχεται αρχικά στο Q_{jet} και μετά στο Q_0 και στη συνέχεια στα τετράπολα Q_1 , Q_2 και Q_3 και τέλος στον ανιχνευτή.

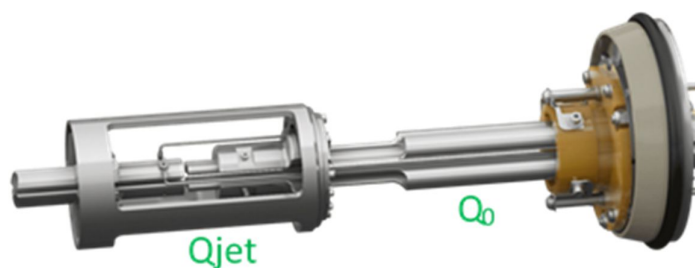
Το σύστημα του ηλεκτροψεκασμού βρίσκεται σε ατμοσφαιρική πίεση, κενό αρχίζει να δημιουργείται από την είσοδο του οργάνου από μερικά Torr, αυξάνοντας σταδιακά σε μερικά 10^{-3} Torr στη περιοχή των Q_{jet} και Q_0 φτάνοντας στα $\sim 0.6 \times 10^{-5}$ Torr στη περιοχή των τετράπολων και του ανιχνευτή.



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

3. Σύστημα εστίαση δέσμης ιόντων :

Περιλαμβάνει δύο μέρη: τον οδηγό ιόντων Q_{jet} και το τετράπολο εστίασης Q_0 . Και τα δύο μέρη σκοπό έχουν την εστίαση της δέσμης ιόντων. Καθώς τα ιόντα εισάγονται στο όργανο βρίσκονται σε συνθήκες κενού, για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η εστίαση τους, βελτιώνοντας έτσι την μεταφορά τους προς τα τετράπολα με αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας.



4. Τετράπολα:

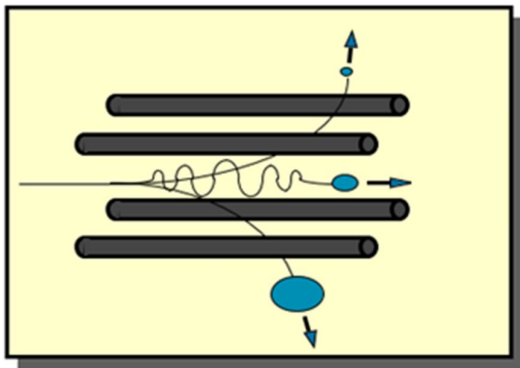
Τα τετράπολα αποτελούν την καρδιά του φασματοφωτόμετρου. Υπάρχουν δύο ειδών τετράπολα: τα κλασικά (Quadrupoles) και οι κυψέλες σύγκρουσης (Collision Cell).

A. Τα κλασικά τετράπολα (Quadrupoles)

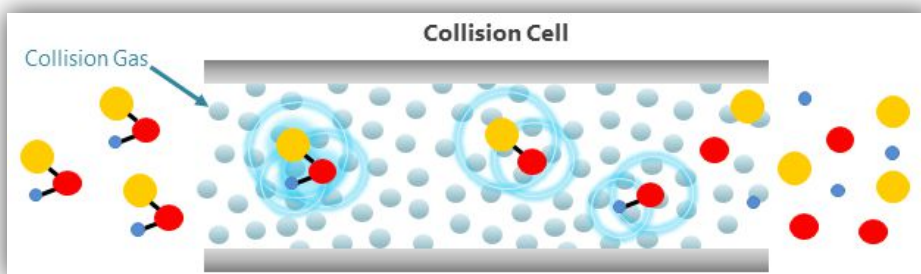
Αυτά μπορούν να κάνουν τρεις λειτουργίες:

1. (RF) Απλή μεταφορά ιόντος, σε αυτή την λειτουργία απλά διατηρούν τα ιόντα σε πορεία.
2. (Scan) Σάρωση ιόντων, στην λειτουργία αυτή επιλέγουν το κάθε ιόν ξεχωριστά με βάση τον λόγο m/z

3. (Single Ion Monitoring, SIM) Επιλογή ιόντος, στην λειτουργία αυτή επιλέγεται ένα συγκεκριμένο ιόν με βάση τον λόγο του m/z



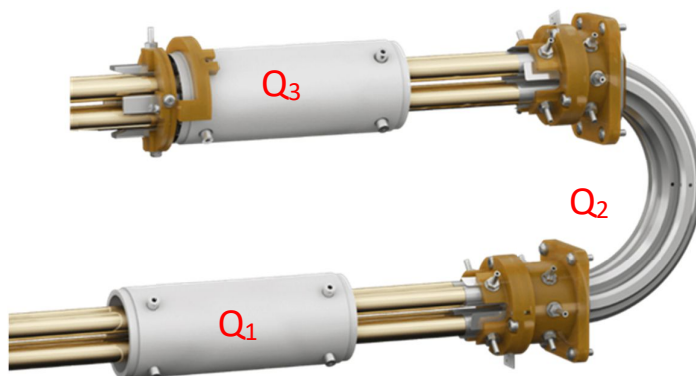
B. Οι κυψέλες σύγκρουσης (Collision Cell)



Οι κυψέλες σύγκρουσης έχουν δύο κυρίως λειτουργίες:

1. (RF) Απλή μεταφορά ιόντος, σε αυτή την λειτουργία απλά διατηρούν τα ιόντα σε πορεία.
2. (Fragmentation) Θραυσματισμό ιόντων, στην λειτουργία αυτή με την βοήθεια ενός αερίου σύγκρουσης (collision gas) που συνήθως είναι το άζωτο γίνεται κατακερματισμό των πρόδρομων ιόντων δημιουργώντας θραύσματά τους.

Το όργανο έχει τρία τετράπολα το Q_1 το Q_2 και το Q_3 δίνοντας την δυνατότητα λειτουργίας MS ή MS/MS. Τα τετράπολα Q_1 και Q_3 είναι τα κλασικά, ενώ το τετράπολο Q_2 είναι τετράπολο κυψέλης σύγκρουσης.



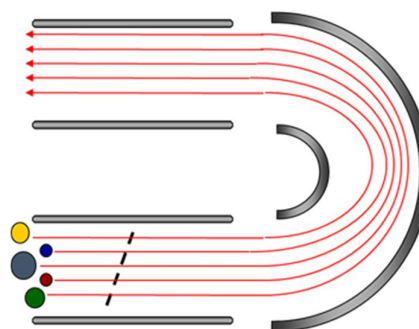
Το Triple Quad 3500 είναι ένα MS/MS ανιχνευτής με δυνατότητα σάρωσης από 5 έως 2000 (m/z) με βήμα 0.1 δίνοντας πολλές διαφορετικές δυνατότητες λειτουργίας ανάλογα με τον τρόπο λειτουργίας των τριών τετράπολων (Q_1 , Q_2 και Q_3).

Οι κύριες λειτουργίες είναι:

- Σάρωση όλων των ιόντων:

Το τετράπολο Q_1 κάνει σάρωση των ιόντων με τον λόγο m/z , ενώ τα τετράπολα Q_2 και Q_3 είναι σε λειτουργία απλά μεταφοράς ιόντων, έτσι φτάνουν σταδιακά όλα τα ιόντα στον ανιχνευτή.

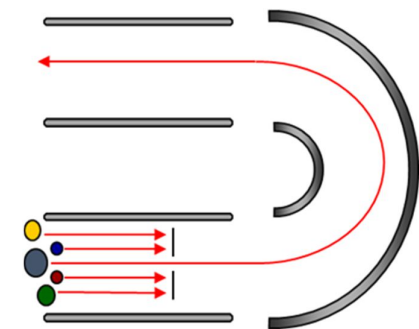
Τετράπολο	επιλογή
Q_1	Scan
Q_2	RF
Q_3	RF



- Παρακολούθηση ενός ιόντος:

Το τετράπολο Q_1 επιλέγει ένα συγκεκριμένο ιόν με βάση τον λόγο του m/z ενώ τα Q_2 και Q_3 είναι σε λειτουργία απλά μεταφοράς ιόντων, έτσι στον ανιχνευτή φτάνει μόνο το επιθυμητό ιόν.

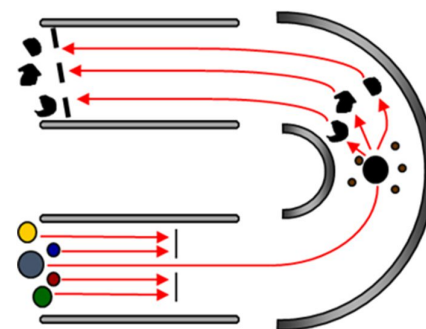
Τετράπολο	επιλογή
Q_1	SIM
Q_2	RF
Q_3	RF



- Σάρωση θραυσμάτων επιλεγμένου ιόντος:

Το τετράπολο Q_1 επιλέγει ένα συγκεκριμένο ιόν με βάση το λόγο του m/z , το Q_2 , που είναι κυψέλη σύγκρουσης, κάνει θραυσματοποίηση του ιόντος και το τετράπολο Q_3 κάνει σάρωση σε όλα τα θραύσματα που δημιουργήθηκαν στο Q_2 , τα οποία καταλήγουν στον ανιχνευτή και καταγράφονται.

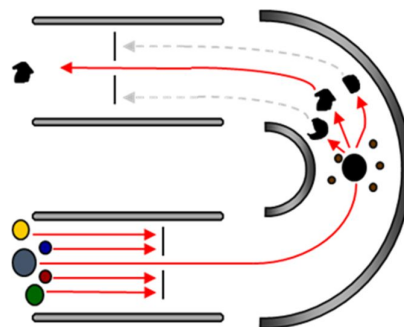
Τετράπολο	επιλογή
Q_1	SIM
Q_2	Fragmentation
Q_3	Scan



- Επιλογή θραύσματος επιλεγμένου ιόντος:

Το τετράπολο Q_1 επιλέγει ένα συγκεκριμένο ιόν με βάση το λόγο του m/z , το Q_2 που είναι κυψέλη σύγκρουσης κάνει θραυσματοποίηση του ιόντος και το τετράπολο Q_3 επιλέγει ένα συγκεκριμένο θραύσμα με βάση τον λόγο m/z , έτσι φτάνει στον ανιχνευτή μόνο το επιλεγμένο θραύσμα από ένα συγκεκριμένο ιόν.

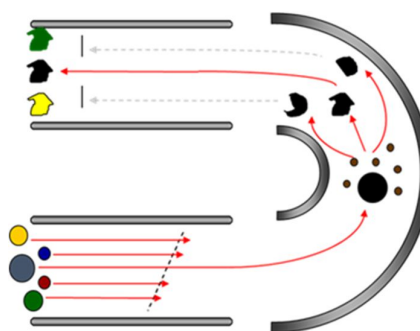
Τετράπολο	επιλογή
Q_1	SIM
Q_2	Fragmentation
Q_3	SIM



- Αναζήτηση ιόντων που δίνουν το ίδιο τελικό θραύσμα:

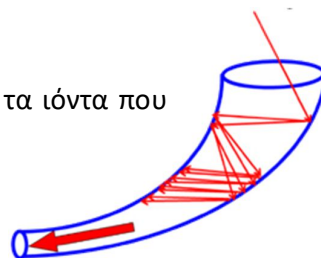
Το τετράπολο Q_1 κάνει σάρωση των ιόντων με το λόγο m/z , το Q_2 , που είναι κυψέλη σύγκρουσης, κάνει θραυσματοποίηση του κάθε ιόντος που περνάει και το τετράπολο Q_3 επιλέγει ένα συγκεκριμένο θραύσμα με βάση τον λόγο m/z , έτσι φτάνει στον ανιχνευτή μόνο το επιλεγμένο θραύσμα από το κάθε ιόν που μπορεί 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 ένα ηλεκτρονιο-πολλαπλασιαστής που καταγράφει τα ιόντα που εξέρχονται από την παγίδα ιόντων δίνοντας το αντίστοιχο σήμα.



6. Καταγραφικό:

Το σήμα μετατρέπεται σε ψηφιακό, ενισχύεται και καταγράφεται από ένα ηλεκτρονικό υπολογιστή με το κατάλληλο λογισμικό, δίνοντας ένα φάσμα μάζας της σχετικής έντασης των φορτίων ως προς τον λόγο μάζα προς φορτίο (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:

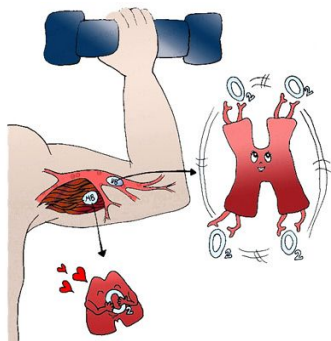
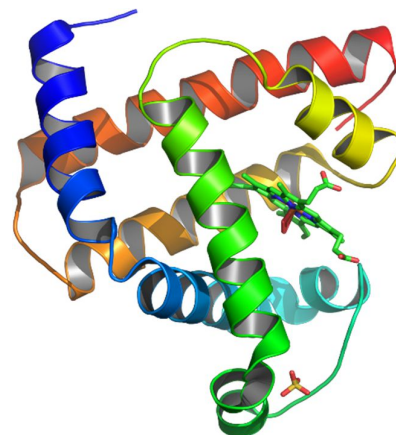
το κεφ. 22 του Β' Τόμου του Daniel C. Harris «Ποσοτική Χημική Ανάλυση» (παράγραφος: Ηλεκτροψεκασμός και πρωτεΐνες)

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)

Ηλεκτροψεκασμός και Πρωτεΐνες:

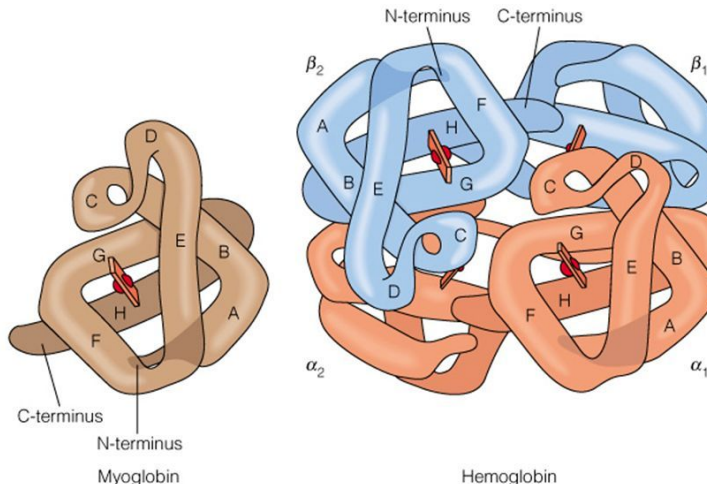
Οι πρωτεΐνες, ανάλογα με τα αμινοξέα που τις αποτελούν, περιέχουν ελεύθερες βασικές και όξινες ομάδες οι οποίες, ανάλογα με το pH του διαλύματος, μπορούν να δώσουν συνολικό θετικό ή αρνητικό φορτίο στην πρωτεΐνη. Για παράδειγμα, οι αμινομάδες της πρωτεΐνης συνήθως πρωτονιώνονται, ενώ τα καρβοξυλικά οξέα 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, άρα στην περίπτωση των πρωτεϊνών εισάγει πολλαπλά φορτισμένα ιόντα πρωτεϊνών 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 μιοσφαιρίνη (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

Myoglobin (Mb) and Hemoglobin (Hb)

αιμοσφαιρίνη που έχει 4 μονάδες αίμης και βρίσκεται στο αίμα. Η πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται στην άσκηση είναι από καρδιακό μυ αλόγου, η πληροφορία αυτή είναι απαραίτητη για να βρείτε από την βιβλιογραφία την σωστή σχετική μοριακή μάζα της πρωτεΐνης και να συγκρίνετε με αυτό που θα υπολογίσετε στην αναφορά σας.



Copyright © 2000 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Πειραματικό μέρος

Αρχικά ετοιμάζεται το διάλυμα της μυογλοβίνης:

Ζυγίζονται 0.5 mg myoglobin , προστίθενται 5 ml μεθανόλης (MeOH), 0.5 ml οξικού οξέος (CH₃COOH) 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 να μπορέσει να γίνει η 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 βοηθά στο να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου της αλυσίδας (όχι οι ομοιοπολικοί δεσμοί της αλυσίδας) και να γίνει αναδιάταξη της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης. Αυτό δίνει την δυνατότητα στα πρωτόνια του διαλύματος να έχουν πρόσβαση και σε εσωτερικές ομάδες της αλυσίδας της και έτσι να μπορούν να τις πρωτονιώσουν. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται πολλαπλή πρωτονίωση της πρωτεΐνης κάτι που είναι απαραίτητο στη συγκεκριμένη τεχνική. Οι πρωτεΐνες έχουν μεγάλη μοριακή μάζα ακόμα και οι μικρές όπως η μυογλοβίνη η σχετική μοριακή μάζα της είναι κοντά στις 17000 Da. Το φασματόμετρο που χρησιμοποιείται στην συγκεκριμένη άσκηση μπορεί να ανιχνεύσει λόγο μάζα προς φορτίο (m/z) μέχρι 2000. Έτσι τα μόρια της πρωτεΐνης που θα πάρουν μόνο ένα πρωτόνιο θα έχουν λόγο m/z κοντά στα 17000 που είναι εκτός ορίων του οργάνου, τα μόρια που θα πάρουν 2 πρωτόνια θα έχουν m/z περίπου 8500, πάλι εκτός ορίων. Ενώ μόρια που θα έχουν προσλάβει πχ 10 πρωτόνια ο λόγος m/z θα είναι περίπου 1700 που είναι μέσα στα όρια λειτουργίας του. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η πολλαπλή πρωτονίωση της πρωτεΐνης. Στην πραγματικότητα υπάρχουν μόρια με διαφορετικές πρωτονιώσεις (ακόμα και με 1 και με 2 πρωτόνια) δίνοντας μια κατανομή φορτίων που σε κάποιες περιπτώσεις μοιάζει με την κατανομή Gauss. Στο φάσμα όμως του οργάνου θα εμφανιστούν μόνο αυτά που έχουν λόγο m/z κάτω από 2000.

Η προσθήκη της μεθανόλης βοηθάει αφενός στο να σπάσουν πιο εύκολα οι δεσμοί υδρογόνου στην τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης και αφετέρου βοηθά στην διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού να δημιουργούνται πιο μικρά σταγονίδια.

Εισαγωγή δείγματος:

Θα χρησιμοποιηθεί μια σύριγγα υγρών, αρχικά ξεπλένεται με διάλυμα MeOH – H₂O 50%-50% το οποίο θεωρείται ως το τυφλό (blank) διάλυμα και στη συνέχεια η σύριγγα φορτώνεται με 300 – 400 μL από το διάλυμα μυογλοβίνης χωρίς φυσαλίδες. Τυχόν φυσαλίδες δεν δημιουργούν τα προβλήματα που δημιουργούνται στην υγρή χρωματογραφία απλά θα υπάρχει ένα κενό στην αλληλουχία των φασμάτων, το οποίο όμως είναι καλό να αποφεύγεται.

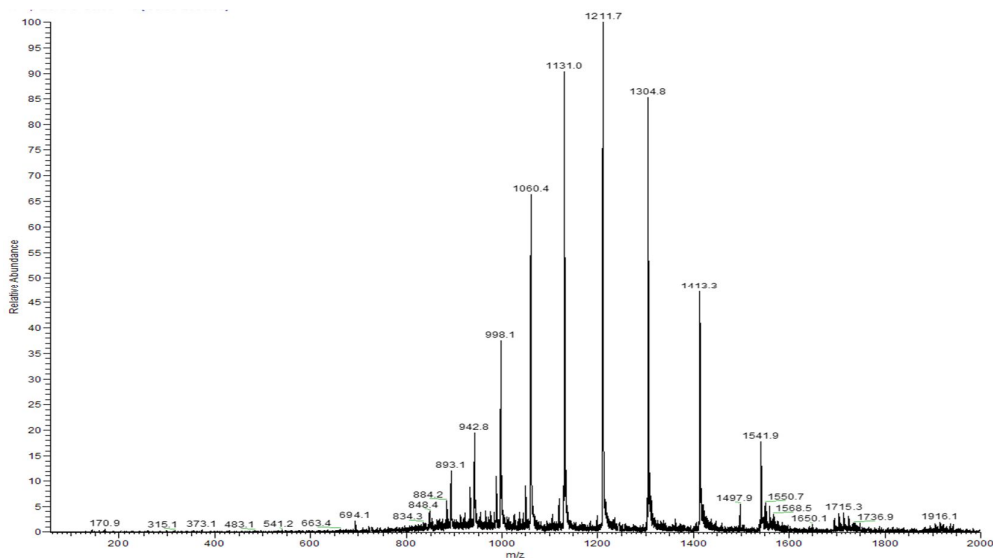
Η σύριγγα συνδέεται με τον τριχοειδή σωλήνα μέσω ειδικού συνδέσμου και τοποθετείται στην θέση της αντλίας σύριγγας. Μέσω του λογισμικού προγράμματος ηλεκτρονικού υπολογιστή το έμβολο της σύριγγας τοποθετείται σε κίνηση βάζοντας ταυτόχρονα σε λειτουργία και το δυναμικό της πηγής ηλεκτροψεκασμού (5.5 kV). Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη θα εισέρχεται στο φασματόμετρο με μια συνεχή ροή και μόλις φτάσει στον ανιχνευτή, το συνολικό σήμα του οργάνου θα ανέβει και θα αρχίσουν να εμφανίζονται στην οθόνη του υπολογιστή τα φάσματα της. Μόλις καταγραφεί ο απαιτούμενος αριθμός φασμάτων ολοκληρώνεται η διαδικασία. Ο μεγάλος αριθμός φασμάτων είναι επιθυμητός ώστε να μειωθεί αισθητά ο θόρυβος.

Η σύριγγα ξεπλένεται με το τυφλό διάλυμα (MeOH-H₂O 50%-50%) και στη συνέχεια εισάγονται 300 -400 μL από το τυφλό διάλυμα και τοποθετείται στο όργανο όπως πριν, θέτοντας το ξανά σε λειτουργία. Με

τον τρόπο αυτό ξεπλένεται το όργανο, ώστε να μην μείνουν υπολείμματα πρωτεΐνης μέσα σε αυτό. Το τυφλό που χρησιμοποιείται δεν είναι καθαρό νερό, αλλά ένα διάλυμα που περιέχει και οργανικό φορτίο (μεθανόλη) και αυτό γίνεται επειδή η πρωτεΐνη είναι ένα μεγάλο οργανικό μόριο και ένας οργανικός διαλύτης θα βοηθούσε στον καθαρισμό της. Μετά από λίγο χρόνο θα παρατηρηθεί ότι δεν θα εμφανίζονται ευκρινή φάσματα (θα είναι κυρίως θόρυβος) και το συνολικό σήμα του οργάνου θα μειωθεί. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι έχει απομακρυνθεί ο πρωτεΐνη από το όργανο.

Φάσματα:

Το φάσμα της πρωτεΐνης θα έχει την παρακάτω μορφή:



Στον άξονα τον X είναι ο λόγος m/z από 50 έως 2000 που είναι τα όρια λειτουργίας του οργάνου, με διακριτική ικανότητα 0.1 και στον άξονα των Y είναι ένταση του σήματος. Το φάσμα που καταγράφεται είναι ο μέσος όρος όλων των φασμάτων που έγιναν κατά την διάρκεια της μέτρησης, το συγκεκριμένο παράδειγμα είναι ο μέσος όρος 138 φασμάτων. Επιδιώκεται να παίρνεται μεγάλο αριθμό φασμάτων για τον μέσο όρο τους για να μειωθεί αισθητά ο θόρυβος και να είναι ευδιάκριτες έτσι οι κύριες κορυφές της πρωτεΐνης. Ο θόρυβος είναι τυχαίος μια θα είναι προς τα πάνω μια προς τα κάτω οπότε παίρνοντας ένα μέσο όρο φασμάτων, αυτός θα εξουδετερώνεται. Αντίθετα μια κανονική κορυφή θα βγαίνει πάντα στο ίδιο σημείο και έτσι στον μέσο όρο των φασμάτων θα ενισχύεται.

Παρατηρείται ένα πλήθος κορυφών που έχει την κατανομή Gauss που αναφέρθηκε πριν. Οι κορυφές που μας ενδιαφέρουν είναι οι μεγάλες που είναι οι κύριες και αποτελούν κορυφές της ίδιας πρωτεΐνης. Έχουν όμως πρωτονιωθεί με διαφορετικό αριθμό πρωτονίων και ενώ έχουν την ίδια μοριακή μάζα έχουν διαφορετικό λόγο m/z με αποτέλεσμα να οδηγούν στην εμφάνιση διαφορετικών κορυφών στο φάσμα της πρωτεΐνης. Ανάλογα με τον βαθμό πρωτονίωσης της η κατανομή αυτή θα είναι μετατοπισμένη δεξιά ή αριστερά.

Κάθε κύρια κορυφή διαφέρει από την διπλανή της κατά φορτίο 1. Προς τα αριστερά κατά +1, οπότε το z μεγαλώνει και έτσι ο λόγος m/z μειώνεται, αντίθετα προς τα δεξιά κατά -1 οπότε το z μικραίνει και έτσι ο λόγος m/z μεγαλώνει.

Αν γίνει μεγέθυνση σε μια κύρια κορυφή, θα παρατηρηθούν δίπλα σε αυτήν κάποιες μικρότερες κορυφές, οι οποίες:

1. Δεν μπορεί να είναι:

- θόρυβος (λόγω των μεγάλου αριθμού φασμάτων στο μέσο όρο τους) ο θόρυβος είναι πολύ μικρότερος,
- θραύσματα της πρωτεΐνης, η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού είναι μια ήπια τεχνική που δεν προκαλεί θραυσματοποίηση του μορίου.

2. Μπορεί να είναι:

a. Ισότοπα:

Η πιθανότητα ύπαρξη ισοτόπων σε ένα μόριο πρωτεΐνης είναι πολύ μεγάλη, λόγω του μεγάλου αριθμού ατόμων που περιέχει η αλυσίδα της. Η πιθανότητα αυτή είναι όσο είναι και η αφθονία τους στην φύση. π.χ ο ^{13}C σε σχέση με τον ^{12}C βρίσκεται σε αναλογία 1.07% οπότε για κάθε 100 άτομα C αναμένεται να υπάρχει ένα άτομο ^{13}C . Αντίστοιχα και τα άλλα άτομα. Έτσι οι κορυφές αυτές είναι μόρια της ίδιας πρωτεΐνης που όμως έχουν διαφορετικά ισότοπα, με αποτέλεσμα η μοριακή της μάζα να είναι διαφορετική.

b. Τροποποίηση πρωτεΐνης:

Υπάρχει η πιθανότητα της τροποποίησης κάποιων μορίων της πρωτεΐνης από ακαθαρσίες που πιθανόν να βρίσκονται μέσα στο διάλυμα της.

Παράδειγμα: σε κάποιο καρβονύλιο ενός αμινοξέως θα μπορούσε να αντικατασταθεί ένα H^+ από ένα ιόν Na^+ . Αυτό θα έχει σαν αποτέλεσμα να αλλάξει η μοριακή μάζας της κατά 22 (-1 λόγω H^+ , +23 λόγω Na^+ , σύνολο +22), ή η πρωτεΐνη να είναι φωσφορυλιωμένη με προσθήκη φωσφορικής ομάδας με αποτέλεσμα την τροποποίηση της μοριακής της μάζας κατά +96.

Όσο περισσότερο χρόνο έχει δημιουργηθεί το διάλυμα της πρωτεΐνης τόσο είναι μεγαλύτερη η πιθανότητα να έχει τροποποιηθεί. Για τον λόγο αυτό το διάλυμα δεν πρέπει να είναι ούτε πολύ παλιό αλλά και ούτε πολύ καινούργιο. Χρειάζεται κάποιος χρόνος ώστε να γίνει επαρκής πρωτονίωση της αλλά όχι πολύ μεγάλο διάστημα για να αποφευχθεί η τροποποίηση της.

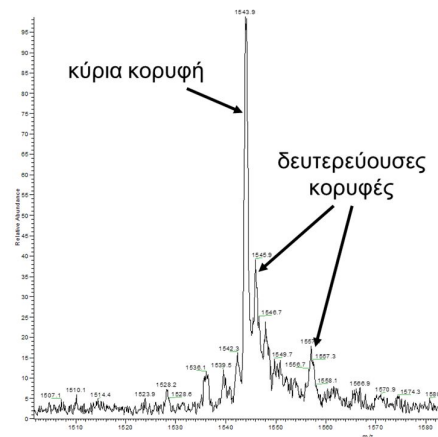
Από την διαφορά της μικρής κορυφής ως προς την κύρια γνωρίζοντας και πόσο είναι το φορτίο z του λόγου αυτού μπορεί να υπολογιστεί πόσο διαφέρει το τροποποιημένο μόριο της πρωτεΐνης από το αρχικό και από την διαφορά αυτή να γίνει αντιληπτό εάν οφείλεται στην παρουσία ισοτόπων και σε ποια ή αν οφείλεται στην τροποποίηση του μορίου και από τι ακριβώς.

Υπολογισμός σχετικής μοριακής μάζας πρωτεΐνης:

Αρχικά καταγράφονται οι τιμές του λόγου m/z των κύριων κορυφών. Στο παράδειγμα μας 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 υπολογίσει 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 την μέση τιμή και την τυπική τους απόκλιση:

Μοριακή μάζα μυογλοβίνης:

16949.9 ± 1.2 Da

Αν για κάποιο λόγο η τυπική απόκλιση σας είναι μεγάλη, πιθανόν να έχετε κάνει κάποιο λάθος στους υπολογισμούς των μοριακών

Αναφορά:

Για την σύνταξη της αναφορά σας θα κάνετε τα εξής:

1. Μια περιγραφή για την τεχνική ESI-MS καθώς και για το όργανο που χρησιμοποιείται.
2. Αναλυτικά την πειραματική διαδικασία και σχολιασμός του φάσματος που πήρατε.
3. Υπολογισμός της σχετικής μοριακής μάζας της πρωτεΐνης στο φάσμα σας σε όσο το δυνατό περισσότερες κύριες κορυφές, σε υπολογιστικό αρχείο που θα δίνεται μαζί με την αναφορά σας. Να φαίνονται στο κείμενο της αναφορά σας με πίνακα όλα τα στάδια των υπολογισμών ώστε πάνω σε αυτόν να είναι δυνατό να διορθωθούν τυχόν λάθη.
4. Υπολογισμός της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης των τιμών των μοριακών μαζών που υπολογίστηκαν.
5. Σύγκριση της μέσης τιμής της σχετικής μοριακής μάζας της μυογλοβίνης που υπολογίστηκε με τιμή από την βιβλιογραφία για μυογλοβίνη από καρδιά αλόγου και να προσδιοριστεί το επί της % το απόλυτο σφάλμα της μέτρησή σας.
6. Στο διάλυμα της μυογλοβίνης που χρησιμοποιήθηκε, να υπολογιστεί η συγκέντρωση της μυογλοβίνης σε mg/ml καθώς και οι συγκεντρώσεις της MeOH και του CH₃COOH σε επί % (v/v).
7. Στο διάλυμα της μυογλοβίνης που χρησιμοποιήθηκε, να υπολογιστεί η συγκέντρωση της μυογλοβίνης σε ppm, θεωρώντας ότι ο τελικός όγκος αραίωσης είναι 50 ml. Δίνονται οι πυκνότητες σε Kg/l: για το H₂O 1.000, την MeOH 0.792 και για το CH₃COOH 1.049.
8. Εκτός του αρχείου της αναφοράς σας (σε μορφή pdf ή word) θα πρέπει να στείλετε 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/UCrDdUXUiTxyhezA140Rlew>

Παράρτημα – Οδηγίες Λειτουργία Οργάνων

1) Πρόγραμμα INTEGRAL για τις ασκήσεις:

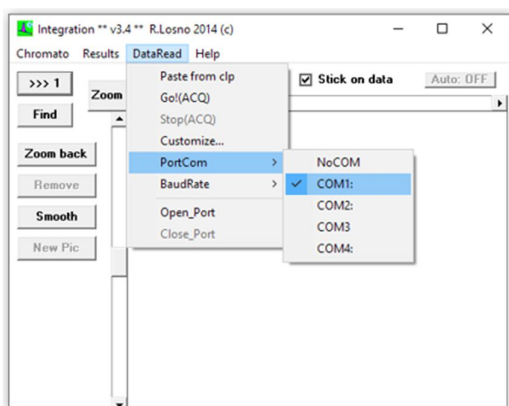
α. Ιοντική Χρωματογραφία

β. Υγρή Χρωματογραφία Αντίστροφη Φάσης

γ. Αέρια Χρωματογραφία με ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας

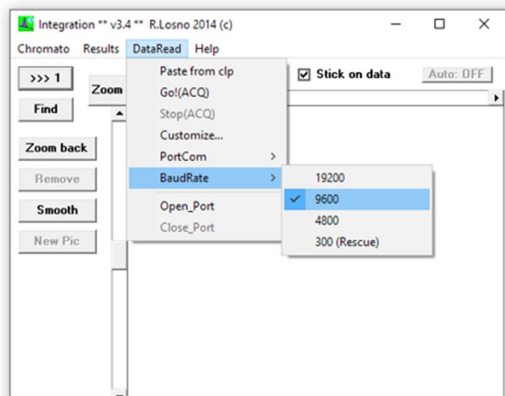
Το ίδιο λογισμικό πρόγραμμα χρησιμοποιείται για τις ασκήσεις της Ιοντικής Χρωματογραφίας (IC) της RPLC και της TCD με μικρές διαφοροποιήσεις. Πριν από την εισαγωγή του δείγματος θα πρέπει να γίνει ρύθμιση του λογισμικού. Από την οθόνη του ηλεκτρονικού υπολογιστή, ανοίγετε το πρόγραμμα «**integral**» και ρυθμίζονται οι παράμετροι του:

1. Ρύθμιση λογισμικού



Από το παράθυρο “Data Read”

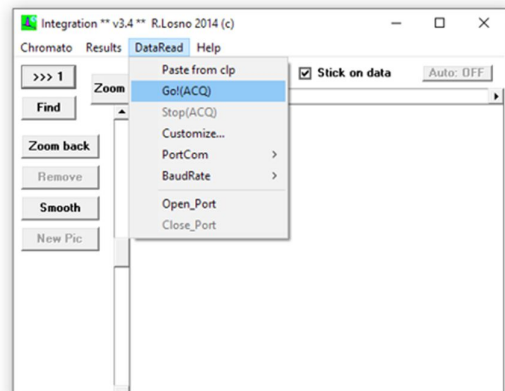
- Ρυθμίζεται το **port come** στο **com1** (θύρα σύνδεσης στον υπολογιστή)



- Ρυθμίζεται το **Baud Rates** στα **9600** (ρυθμός μετάδοσης δεδομένων ανά sec) εκτός στην ιοντική χρωματογραφία που ρυθμίζεται στα **19200**.

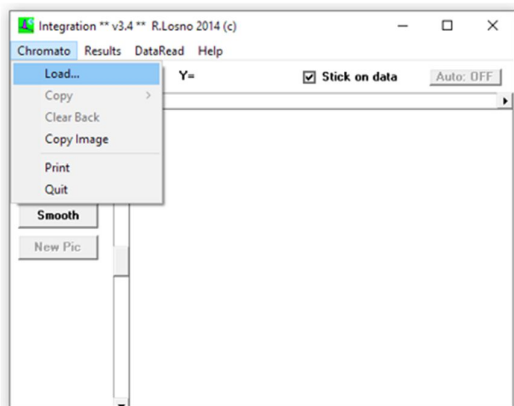
Πατάτε GO και ανοίγουν δύο επιπλέον παράθυρα

- Στα νέα παράθυρα γράφετε:
 - α. τη ταυτότητα του δείγματος:
δηλ. το έτος, το όνομα της ομάδας, το δείγμα (πχ 2020 A1 2 ppm)
 - β. Ρυθμίζεται ο επιθυμητός χρόνος:
πχ 8 min.
 - γ. Πατάτε **ok** για να κατοχυρωθούν οι αλλαγές

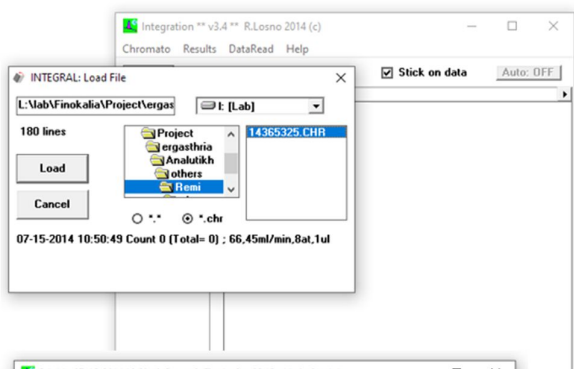


Το λογισμικό είναι έτοιμο να ξεκινήσει μόλις πατήσετε το κουμπί «start»

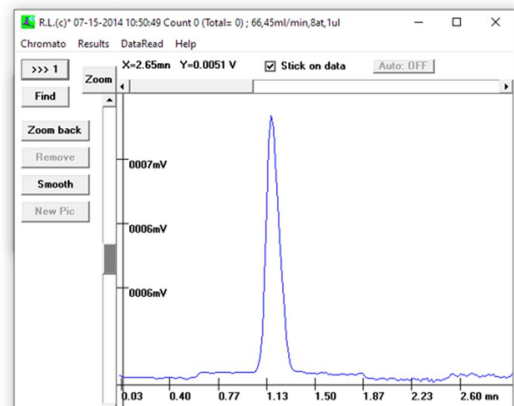
2. Ολοκλήρωση χρωματογραφημάτων:



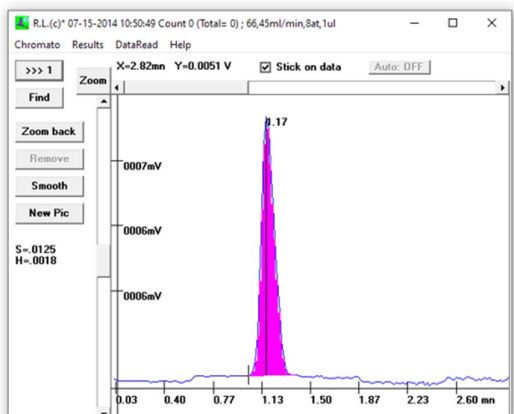
- από το πρόγραμμα το μενού «chromato» επιλέγετε το **load**



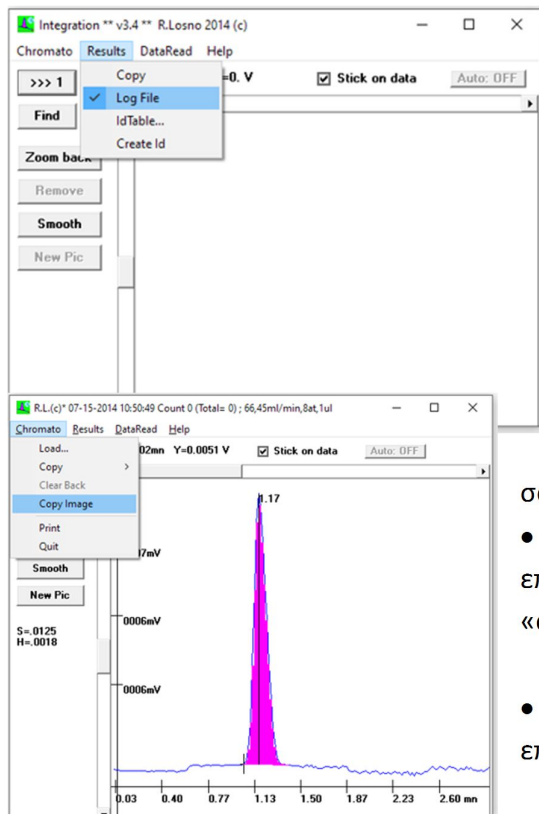
- βρίσκετε το επιθυμητό χρωματογράφημα (με το όνομα που του έχετε δώσει) και το φορτώνετε.



Με το κουμπί «zoom» μεγαλώνετε τις κορυφές όσο χρειάζεται ώστε να είναι ευδιάκριτες.



- Με **δεξί κλικ** από το ποντίκι επιλέγετε και δημιουργείτε την επιθυμητή **baseline**.
 - Πατώντας **αριστερό κλικ** στο ποντίκι ξεκινάει η ολοκλήρωση της κορυφής και πατώντας ξανά το **αριστερό κλικ** ολοκληρώνεται η διαδικασία.
 - Τη πρώτη φορά για κάθε κορυφή πατάτε το κουμπί «newpic» και ονομάζετε τη κάθε κορυφή (πχ Na).
3. **Συλλογή δεδομένων** (μόνο για την άσκηση της Ιοντικής Χρωματογραφίας):



- Από το μενού στο «**Result**» τσεκάρετε το **logfile**, ώστε όλα τα δεδομένα των ολοκληρώσεων να σώζονται σε ένα αρχείο κειμένου (**txt**) που δημιουργείται στο φάκελο του προγράμματος.

- Στη συνέχεια ανοίγετε ένα-ένα τα χρωματογραφήματα από το μενού «**chromato**» επιλέγετε **load** και ολοκληρώνετε μία - μία τις κορυφές. Στην έξοδο θα σας ζητάει να πατήσετε **ok** ώστε τα δεδομένα να μεταφερθούν στο αρχείο **logfile**.

4. Μεταφορά γραφημάτων:

- Τα χρωματογραφήματα μπορείτε να τα μεταφέρετε ως εικόνα σε ένα αρχείο **word** και στη συνέχεια στην αναφοράς σας.

- Αφού έχετε επιλέξει το επιθυμητό χρωματογράφημα και στο επιθυμητό μέγεθος των κορυφών, επιλέγετε από το μενού «**chromato**» το **copy image**

- και στη συνέχεια πηγαίνετε στο αρχείο **word** και πατάτε επικόλληση.

5.Αρχεία:

- σε ένα **usb stik** αντιγράφετε το αρχείο **word** με τα γραφήματα καθώς (μόνο για την άσκηση της Ιοντικής Χρωματογραφίας) και το αρχείο κειμένου **txt (logfile)**.

Το **txt** αρχείο θα βρίσκετε στο φάκελο: **Desktop\Integral32\..... .CHR**

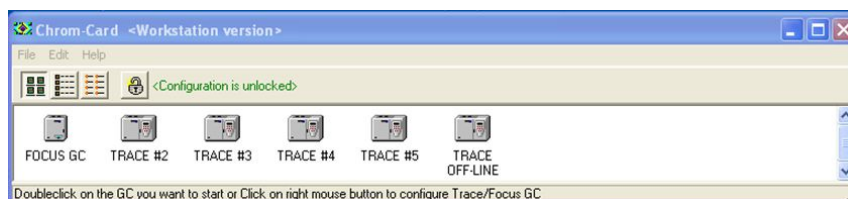
και θα έχει τη μορφή:

```
File: C:\Documents and Settings\user1\Desktop\Integral32\17518325.CHR at: 10-18-2017 12:55:00
10-18-2017 10:50:41 Count 0 (Total= 0) ; 2017 G1 0.5 ppm
Time          Area          Heigh         Name    Count
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
```

Περιέχει ένα πίνακα όπου στη πρώτη στήλη καταγράφεται ο χρόνος που εμφανίζεται η κάθε κορυφή (ο χρόνος έκλουσης), στη δεύτερη στήλη καταγράφεται η επιφάνεια ολοκλήρωσης της, στη τρίτη το ύψος της και στη τέταρτη το όνομα του ιόντος που αντιστοιχεί η κάθε κορυφή.

2) Λειτουργικό Chrom-Card για τηνΑέρια Χρωματογραφία (GC-FID):

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

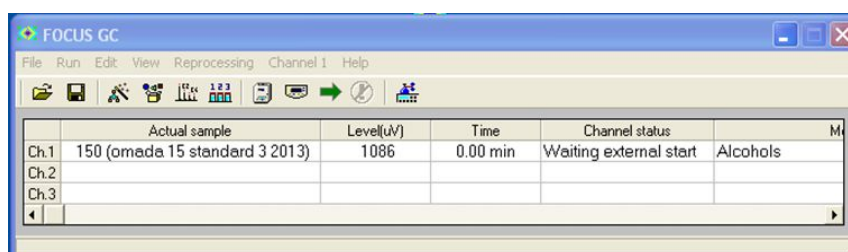


Στο παράθυρο που εμφανίζεται επιλέγετε:

Edit → Edit GC parameter → edit method → file open

από το φάκελο Anal-chem II-methods επιλέγετε τη μέθοδο alcohols γγγγ.gcm

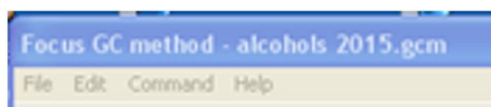
(όπου τα γγγγ είναι το έτος, πχ alcohol 2020.gcm)



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

από το μενού επιλέγεται command → send method to GC → ok

Ακούγεται ένας χαρακτηριστικός ήχος στο χρωματογράφο (είναι επιβεβαίωση ότι η μέθοδος έχει φορτωθεί στο όργανο). Ο χρωματογράφος αρχίζει να ανεβάζει τις θερμοκρασίες και να ρυθμίζει τις ροές της επιλεγμένης μεθόδου, μόλις γίνει αυτό 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:

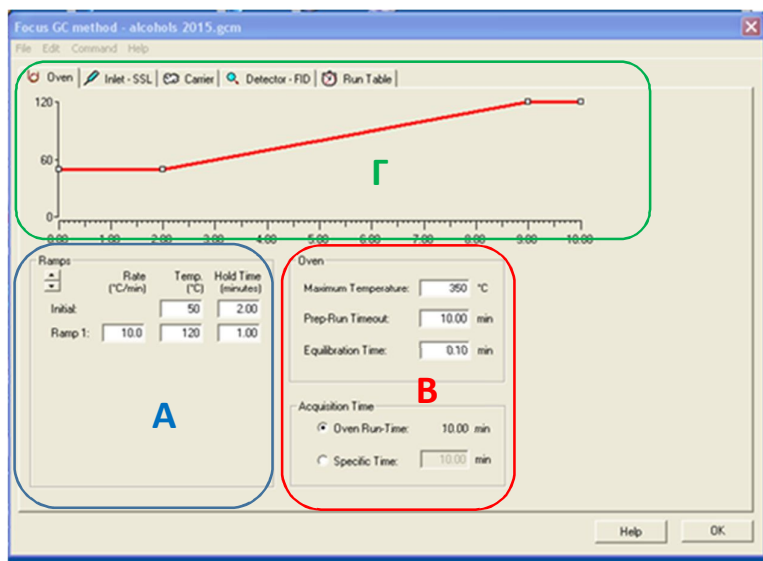
- Το φούρνο (Oven)
- Τον εισαγωγέα, injector (Inlet-SSL)
- Το φέρον αέριο (Carrier)
- Τον ανιχνευτή (Detector – FID)



a) Φούρνος (Oven):

Η καρτέλα χωρίζεται σε τρία μέρη:

κάτω αριστερά **A**, κάτω δεξιά **B** και το πάνω μέρος **Γ**.



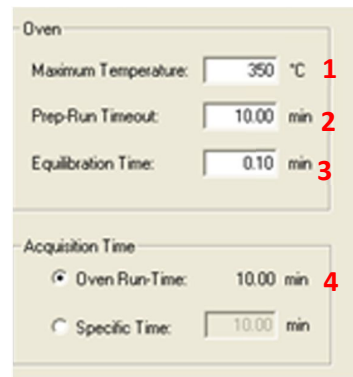
Στο μέρος **A**, ορίζεται η θερμοκρασία που θα έχει αρχικά ο φούρνος και επόμενος και η στήλη. Αυτό καθορίζεται από τις ενώσεις που αναλύονται καθώς και το διαλύτη που χρησιμοποιείτε για τη διάλυση τους. Η θερμοκρασία θα πρέπει να είναι χαμηλότερη από το χαμηλότερο σημείο ζέσεως τους, ώστε μόλις εισέρθουν στη στήλη να συγκρατηθούν από αυτήν.

Η αρχική θερμοκρασία της στήλης πρέπει να είναι κάτω από τους 55.2 °C, ορίζεται 50.0 °C (θέση 1) και ορίζεται να παραμείνει σε αυτή τη θερμοκρασία για 2 λεπτά (θέση 2), ώστε όλες οι ενώσεις θα έχουν εισέρθει και θα έχουν κατακρατηθεί από την υγρή στατική φάση της στήλης. Στη θέση 3 είναι ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας και ορίζεται 10.0 °C/min, οπότε σε κάθε ένα λεπτό θα έχει ανέβει η θερμοκρασία κατά 10 βαθμούς Κελσίου. Στη θέση 4 ορίζεται η μέγιστη θερμοκρασία της στήλης. Αυτή πρέπει να είναι μεγαλύτερη από το μεγαλύτερο σημείο ζέσεως των ενώσεων, ώστε να απομακρυνθούν όλες από τη στήλη. Το μεγαλύτερο σημείο ζέσεως είναι 117.7 °C που είναι της βουτανόλης, έτσι ορίζεται 120 °C και να παραμείνει για 1 λεπτό (θέση 5), ώστε να προλάβει να απομακρυνθεί όλη η βουτανόλη.

Ramps	Rate (°C/min)	Temp. (°C)	Hold Time (minutes)
Initial:		50	2.00
Ramp 1:	10.0	120	1.00

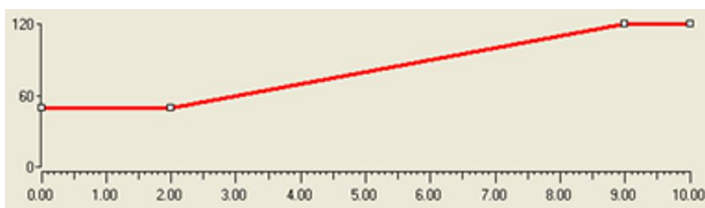
Μόλις ολοκληρωθεί ο κύκλος του θερμοκρασιακού προγράμματος ο φούρνος θα αρχίσει να κρυώνει ώστε να φτάσει στην αρχική θερμοκρασία για να είναι έτοιμη η στήλη για το επόμενο δείγμα. Καθώς γίνεται αυτή η διαδικασία θα ανάψει το λαμπάκι no ready στη κονσόλα του οργάνου και μόλις φτάσει στην επιθυμητή θερμοκρασία ο χρωματογράφος θα είναι σε κατάσταση Stand by περιμένοντάς το επόμενο δείγμα

Στο μέρος **B** της καρτέλας ορίζονται κάποια όρια για τη προστασία του χρωματογράφου. Στη θέση 1 (maximum temperature) καθορίζει τη μέγιστη επιτρεπόμενη θερμοκρασία στο φούρνο για τη προστασία της στήλης από λάθος επιλογές κατά τη δημιουργία του θερμοκρασιακού προγράμματος. Το όριο αυτό καθορίζεται από τη κατασκευή της στήλης, στην άσκηση είναι 350 °C.



- Θέση 2 (PrepRun Timeout) το χρονικό όριο μέσα στο οποίο πρέπει να γίνει η ένεση που ο χρωματογράφος είναι σε κατάσταση Stand by, στην άσκηση είναι 10 λεπτά.
- Θέση 3 (equilibration time) η παράμετρος καθορίζει το χρόνο εξισορρόπησης για τη σταθεροποίηση της θερμοκρασίας του φούρνου μετά το ξεκίνημα (run), στην άσκηση είναι 0.1 λεπτά.
- Θέση 4 (Oven Run-Time) υπολογίζει το συνολικό χρόνο που θα κρατήσει η διαδικασία της ανάλυσης σύμφωνα με το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που επιλεκτικέ . Στην άσκηση είναι 10 λεπτά, αυτό προκύπτει επειδή: αρχικά είναι 2 λεπτά όπου η στήλη είναι στην αρχική θερμοκρασία, στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξάνει από τους 50 έως τους 120 oC (σύνολο 70 βαθμούς) έτσι με ρυθμό 10.0 °C/min θα κάνει 7 λεπτά και στο τέλος 1 ακόμα λεπτό που μένει στη μέγιστη θερμοκρασία δίνει σύνολο 10 λεπτά.

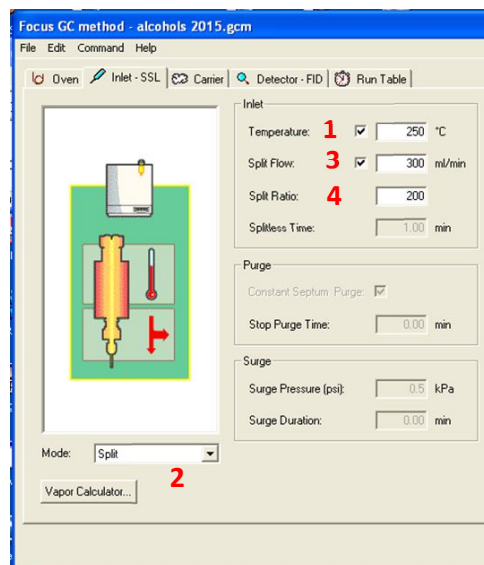
Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα παρουσιάζεται γραφικά στο πάνω μέρος της καρτέλας (Γ)



b) Εισαγωγέας, injector Split/SplitLess (Inlet-SSL):

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

- Ορίζεται η θερμοκρασία του μια θερμοκρασία αρκετά μεγαλύτερη από τα σημεία ζέσεως των ενώσεων ώστε το δείγμα να εξατμιστεί άμεσα, στην άσκηση ορίζεται 250 °C (1).
- Ορίζεται αν θα είναι σε λειτουργία Split / Splitless / on Column (2)
- Αν είναι σε λειτουργία διαμοιρασμού (Split), ορίζεται η ροή αραίωσης (split flow), στην άσκηση είναι 300 ml/min (3)
- Υπολογίζεται ο λόγος διαμοιρασμού (split ratio) (4). Αυτός είναι ο λόγος της ροής αραίωσης (split flow) προς τη ροή της κινητής φάσης (που στην άσκηση είναι 1.5 ml/min). Έτσι (split flow)/(Carrier flow) → 300/1.5 → 200 οπότε 1/200 μέρη του δείγματος θα πάει προς τη στήλη και τα υπόλοιπα (199) θα πάνε στο περιβάλλον από την έξοδο split του οργάνου. Για να αλλάξει ο λόγος αυτός και πχ από 200 να γίνει 100, θα πρέπει να αλλάξουν οι ροές, όμως δεν μεταβάλλεται η ροή της κινητής φάσης (γιατί αυτή επηρεάζει των

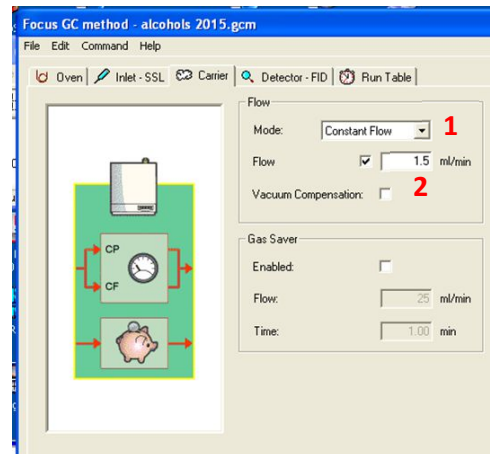


διαχωρισμό των ενώσεων) έτσι μεταβάλλεται μόνο της ροή της αραίωσης. Έτσι κάνοντας τη ροή αραίωση από 300 ml/min σε 150 ml/min ο λόγος διαμοιρασμού γίνεται:

$$(\text{split flow})/(\text{Carrier flow}) \rightarrow 150/1.5 \rightarrow 100$$

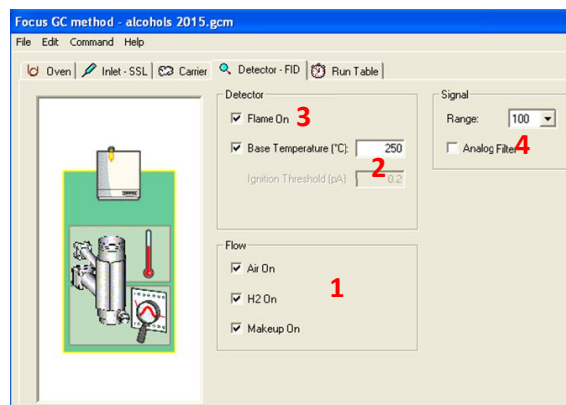
Φέρον αέριο (Carrier):

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 είναι με σταθερή ροή (1). Στην επιλογή σταθερή ροή, η ροή μέσα στη στήλη θα είναι σταθερή σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης, παρότι η πίεση μπορεί να αλλάζει λόγω των αλλαγών των θερμοκρασιών. Ορίζεται και η ροή της κινητής φάσης (2) στην άσκηση είναι 1.5 ml/min.



c) Ανιχνευτής (Detector – FID)

Στη καρτέλα αυτή ορίζονται οι παράμετροι λειτουργίας του ανιχνευτή:



Για να ανοίξουν οι βαλβίδες των αερίων στο όργανο (οι ροές τους ρυθμίζονται σε διαφορετικό σημείο). Οπότε επιλέγεται να ενεργοποιηθούν τα αέρια, αέρας (air) και υδρογόνο (H₂) που χρειάζονται για τη φλόγα, όπως και το makeup που χρειάζεται για τη σωστή λειτουργία του ανιχνευτή (1)

Ορίζεται η θερμοκρασία λειτουργίας του ανιχνευτή (2) στην άσκηση είναι 250 °C.

Ορίζεται να είναι ανοικτή η φλόγα (3). Αυτό γίνεται αυτόματα, μόλις ο ανιχνευτής φτάσει στη σωστή θερμοκρασία και επιτευχθούν οι ροές των αερίων. Σε παλιούς χρωματογράφους δεν λειτουργούσε το αυτόματο άνοιγμα της φλόγας, οπότε ο παραδοσιακός τρόπος ήταν με ένα αναπτήρα, όπως ανάβεται το γκαζάκι στο σπίτι. Πρέπει να ήσαστε σίγουροι ότι η φλόγα είναι αναμμένη γιατί εκτός του ότι δεν θα υπάρχουν αποτέλεσμα στην ανάλυση, το σημαντικό είναι ότι όταν η φλόγα είναι κλειστή το υδρογόνο βγαίνει άκαυτο στο δωμάτιο και η συσσώρευση του είναι πολύ επικίνδυνη. Όμως η φλόγα είναι στο εσωτερικό του ανιχνευτή και δεν είναι ορατή, ο τρόπος που την ελέγχετε είναι από το σήμα που δίνει, όταν η φλόγα είναι αναμμένη το σήμα του δίνει ο ανιχνευτής είναι πολύ μεγαλύτερο από όταν είναι κλειστή ή ελέγχοντας στην έξοδο του ανιχνευτή αν εμφανίζεται υγρασία. Επειδή η καύση δημιουργεί νερό εμφανίζεται στην έξοδο του ανιχνευτή υγρασία, αυτό διαπιστώνεται εύκολα βάζοντας ένα μικρό καθαρεφτάκι στην έξοδο και βλέπετε να θαμπώνει από την υγρασία. Στη συγκεκριμένο χρωματογράφο δεν

είναι απαραίτητος αυτός ο έλεγχος, γίνεται αυτόματα από αυτόν και στη περίπτωση που δεν είναι αναμμένη η φλόγα κλείνει τη παροχή του υδρογόνου και στέλνει ειδοποίηση (alarm).

Ορίζεται η ευαισθησία του ανιχνευτή σε τιμή 100 (range) (4). Η τιμή της ευαισθησίας είναι αντίστροφος ανάλογη με την ένταση του σήματος, έτσι όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της τόσο λιγότερο ευαίσθητος θα είναι ο ανιχνευτής.

Στην άσκηση της Ιοντικής χρωματογραφίας αναλύεται η λειτουργία της ευαισθησίας.

Injection δείγματος

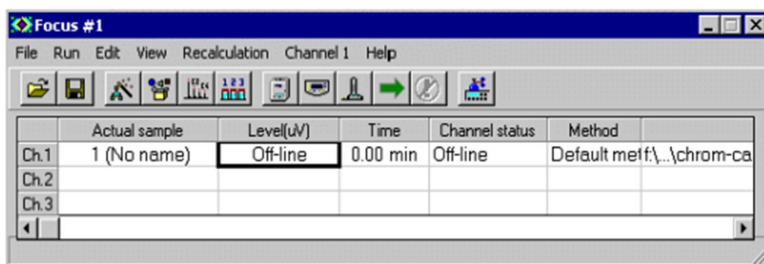
Ο χρωματογράφος είναι σε κατάσταση standby, θα πρέπει να πάει αρχικά σε κατάσταση ready. Πατώντας μια φορά το κουμπί start από τη κονσόλα του οργάνου, πηγαίνει από τη κατάσταση standby σε ready. Στη κατάσταση ready η ροή του makeup είναι σε χρήση. Η λειτουργία του αερίου makeup χρειάζεται μόνο όταν περνάει δείγμα μέσα από τον ανιχνευτή και επειδή η ροή του είναι πολύ μεγάλη όταν ο χρωματογράφος είναι σε κατάσταση standby η ροή του αερίου makeup είναι κλειστή.

Από το κεντρικό παράθυρο επιλέγεται:

edit sample και γράφεται στο Act, ανοίγει ένας πίνακας όπου:

1. στη πρώτη στήλη (sample name) γράφεται το έτος, το όνομα της ομάδας και ποιο injection κάνετε, πχ 2020 omada A1 standard 1
2. στη δεύτερη στήλη (filename) γράφεται ακριβώς το ίδιο (πχ 2020 omada A1 standard 1) και αφού βγείτε από το κελί πατάτε OK

Στη πρώτη στήλη θα είναι το όνομα που θα βλέπετε στην οθόνη και στη δεύτερη το όνομα με το οποίο θα σωθεί το χρωματογράφημα.



	Actual sample	Level(uV)	Time	Channel status	Method
Ch.1	1 (No name)	Off-line	0.00 min	Off-line	Default meff\...\chrom-ca
Ch.2					
Ch.3					

Μόλις η νέα καταχώρηση γίνει ενεργή, επιλέγεται από το μενού:

View→view sample being acquired

και ανοίγει ένα παράθυρο όπου θα φαίνεται το χρωματογράφημα καθώς θα τρέχει.



Διαδικασία κλεισίματος

Από το λειτουργικό φορτώνεται η μέθοδος για το κλείσιμο του οργάνου. Από το κεντρικό μενού:

Edit → Edit GC parameter → edit method → file open

Εκεί βρίσκονται έτοιμες μέθοδοι από το φάκελο Anal-chemII-methods επιλέγετε τη μέθοδο shut down yyyg.gcm(όπου τα yyyg είναι το έτος, πχ shutdown 2020.gcm)

Στέλνετε τη μέθοδο στο χρωματογράφο:

command → send method to GC → ok

(ακούτε πάλι τον αντίστοιχο ήχο, πιο αδύναμος από πριν)

Με τη μέθοδο αυτή κλείνει η φλόγα και χαμηλώνουν οι θερμοκρασίες, στον εισαγωγέα, στο φούρνο και στον ανιχνευτή. 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 χρωματογράφημα:

view chromatogram → file → load chrom → Anal-chemII-methods

Ανοίγετε το επιθυμητό αρχείο με βάση τα ονόματα που έχετε δώσει, με το που θα ανοίξει θα γίνει αυτόματη ολοκλήρωση, έχει ρυθμίσει το πρόγραμμα να κάνει αυτόματη ολοκλήρωση. Κάνετε zoom για να φανούν καλύτερα οι κορυφές.

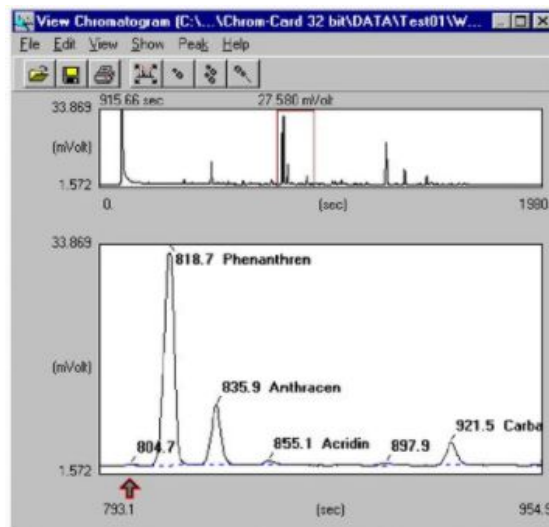
Από το show είναι δυνατή η επιλογή (baseline, Retention time, peak name).

peak data → view peak data

Καταγράφετε για κάθε κορυφή το χρόνο έκλουσης και το peak area

Σώσετε την εικόνα για να μπορέσετε να την έχετε στην αναφορά σας.

file → print → save to pdf



3) Λειτουργία Ατομικής Απορρόφησης Agilent 55B

- I. Ενεργοποίηση οργάνου
- II. Επιλογή αντίστοιχη μεθόδου για κάθε στοιχείο
- III. Βελτιστοποίηση συστήματος
- IV. Βαθμονόμηση για το αντίστοιχο στοιχείο
- V. Μέτρηση δειγμάτων
- VI. Κλείσιμο οργάνου

I. Ενεργοποίηση οργάνου

- Ανοίξτε το διακόπτη τροφοδοσία.
- Ενεργοποιήστε τον απορροφητήρα.
- 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

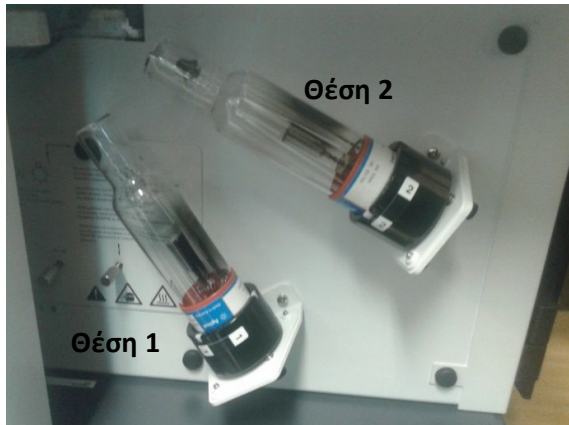
Οι ρυθμίσεις λειτουργίας ορίζονται στο μενού 'Instrument Parameters'.

- **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 ενεργοποίησή της, για το Mg συνιστάμενο είναι το 4 (με μέγιστο το 10) και για το Ca είναι το 10 (με μέγιστο το 10)

- **Standby current:**

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

- **D2 correction:**

για την ενεργοποίηση ή απενεργοποίησης της διόρθωσης D2 (δεν χρησιμοποιείται)

- **Gas type:**

Για το είδος του αερίου που θα χρησιμοποιηθεί (επιλογή air- acetylene)

- **Wavelength:**

το μήκος κύματος της λυχνίας για το Mg 202.6 nm, για το Ca 422.7 nm

- **Slit:**
το φασματικό εύρος ζώνης στο μονοχρωμάτορα για το Mg είναι 1.0 καθώς και για το Ca 0.5
- **Save method:**
αποθήκευση μεθόδου

Οι ρυθμίσεις της μέτρησης ορίζονται στο μενού '**Measurement Parameters**'

- **Next Sample:**
ορίζει τον αριθμό του δείγματος, επιλέγεται ο αριθμός 1.
- **Batch number:**
ορίζει τον αριθμό της πατρίδας, επιλέγεται ο αριθμός 1.
- **Pre-read Delay:**
ορίζει το χρόνο που θα τραβάει δείγμα, πριν αρχίζει αν το καταγράφει (συνήθως χρησιμοποιείται όταν είναι σε χρήση ένας auto sampler), , επιλέγεται ο αριθμός 0.
- **Read Time:**
Ορίζει το χρόνο κατά τον οποίο μετράτε το δείγμα, επιλέγονται 5 sec.
- **Replicate:**
Ορίζει πόσες φορές θα μετρηθεί το κάθε δείγμα δίνοντας σαν τελικό αποτέλεσμα το μέσο όρο τους, επιλέγονται 3 φορές.
- **Precision:**
Αντί για το μέσο όρο των μετρήσεων, πραγματοποιεί συνεχώς μετρήσεις μέχρι να πετύχει την επιθυμητή ακρίβεια (%), δεν χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη άσκηση.

III. Βελτιστοποίηση συστήματος

Πηγαίνετε στο μενού '**Optimization Page**'.

Ευθυγράμμιση του καυστήρα

Χρησιμοποιήστε μία από τις ταινίες καθαρισμού και ευθυγράμμισης καυστήρα που παρέχονται από την Agilent για να εντοπίσετε τη διαδρομή φωτός.

- Περιστρέψτε το καυστήρα πιέζοντας τους οδοντές της λαβής περιστροφής, μέχρι η σχισμή να είναι παράλληλη με τη διαδρομή του φωτός.
- Τοποθετήστε τη κάρτα ευθυγράμμισης στη μέση της υποδοχής του καυστήρα και ρυθμίστε το ύψος του καυστήρα (κουμπί A) μέχρι η φωτεινή δέσμη να πέσει στη περιοχή προορισμού.



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

Για να ανάψει η φλόγα:

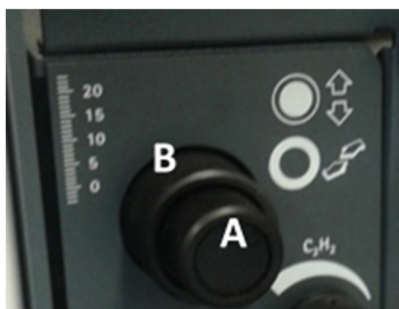
- Πατήστε το πλήκτρο <Flame on> και κρατήστε το πατημένο έως ότου να ανάψει η φλόγα.
- Αναρροφήστε 50 mL από το κατάλληλο διαλύτη.



- **Οξειδωτικό (Αέρας):** Αριστερό ροόμετρο, η μπίλια στο ύψος της κόκκινης γραμμής.
- **Καύσιμο (ακετυλένιο):** Δεξιό ροόμετρο, η μπίλια στο 1.

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 για να αποκτήσετε τη μέγιστη απορρόφηση (αλλά διατηρήστε το καυστήρα κάτω από τη διαδρομή της δέσμης του φωτός).
- Μετακινήστε οριζόντια το καυστήρα (κουμπί (B) μέχρι να βελτιστοποιηθεί το σήμα.



εξωτερικό κουμπί (A):

ρυθμίζει το ύψος του καυστήρα

εσωτερικό κουμπί (B):

ρυθμίζει το καυστήρα στην οριζόντια θέση.

IV. Βαθμονόμηση για το αντίστοιχο στοιχείο

- Από το μενού <Optimize> επιλέγετε 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).
Στο πεδίο αυτό γίνεται η μέτρηση του τυφλού δείγματος, έχει οριστεί η τιμή μηδέν και δεν αλλάζει.
- Standards 1...5 (Πρότυπα 1 ... 5).
 1. Γράφετε τη τιμή της συγκέντρωσης και πατάτε <enter>
 2. Την επιλέξετε ξανά και πατάτε <Read> για να μετρήσει.
 3. Αν δεν είναι το επιθυμητό αποτέλεσμα πατάτε ξανά <Read> για να γίνει μια επιπλέον μέτρηση του δείγματος.

V. Μέτρηση δειγμάτων:

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

- Πατήστε το πλήκτρο <Read>.
- Τοποθετήστε κατάλληλο δείγμα και πατήστε το πλήκτρο < Read> για να μετρηθεί.
- Αν δεν είναι το επιθυμητό αποτέλεσμα πατάτε ξανά το πλήκτρο <Read> για να **γίνει επιπλέον μέτρηση** του δείγματος.
- Επαναλάβετε το προηγούμενο βήμα για τα υπόλοιπα δείγματα.

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται σε μορφή πίνακα η στήλη 'mean' εμφανίζει τη μέση τιμή για κάθε αποτέλεσμα.

**Επιλέγεται τη μέθοδο του επόμενου στοιχείου
και επαναλάβετε τα βήματα IV και V**

VI. Κλείσιμο οργάνου:

- Αφήνετε να τραβήξει λίγο τυφλό δείγμα ώστε να καθαρίσει η καυστήρας.
- Κλείνετε τη φλόγα.
- Κλείνετε τα αέρια.
- Κλείνετε τον απορροφητήρα.
- Απενεργοποιείται το όργανο.

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>