



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ
ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Δ. Κομώτης
Αναπληρωτής Καθηγητής

Σ. Μαντά
Λέκτορας Π.Δ. 407/80

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	4
ΚΑΝΟΝΕΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ	5
ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ	7
ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ και ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	9
ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΟΥΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥΣ	11
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ	13
ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗ	18
ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΟΠΙΣΘΟΓΚΟΜΕΤΡΗΣΗ	19
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	19
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	20
Πορεία εργασίας	20
2.1. Τίτλοδότηση διαλυμάτων HCl και NaOH	20
Παρασκευή διαλύματος HCl 0,2 M και τίτλοδότησή του με Na ₂ CO ₃	20
Τίτλοδότηση διαλύματος NaOH με δευτερογενές πρότυπο διάλυμα HCl 0,2M.	21
2.2. Μέτρηση της αντιόξινης ισχύος των δισκίων	21
3. ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	23
2η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ	24
ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΝΕΡΟΥ	24
1. ΓΕΝΙΚΑ	24
2. ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ	24
3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΔΑΤΩΝ	25
4. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΕΡΟΥ	26
5. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΕΡΟΥ	28
6. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΝΕΡΟ	30
7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΚΛΗΡΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ	31
<u>ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ - 2007-2008</u>	

8.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΛΩΡΙΟΥΧΩΝ ΣΤΟ ΝΕΡΟ _____	35
9.	ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΝΕΡΩΝ _____	37
10.	ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ _____	38
12.	ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ _____	40
3η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ _____		42
ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ _____		42
ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ _____		42
1	ΓΕΝΙΚΑ _____	42
2.	ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΟΡΑΤΟΥ – ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ (Vis-UV). _____	42
3.	ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ _____	44
4.	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ _____	44
5.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ _____	47
	Αντιδραστήρια _____	48
6.	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ - ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ _____	49
8.	ΑΣΚΗΣΕΙΣ _____	50
9.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ _____	51
4η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ _____		52
ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΙΔΗΡΟΥ. _____		52
1.	ΓΕΝΙΚΑ _____	52
2.	ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ _____	54
3.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ _____	55
	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ _____	55
4.	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ - ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ _____	56
ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΑΣ ΜΕ ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ		
ΑΜΜΩΝΙΟΥ _____		59
1.	ΓΕΝΙΚΑ _____	59
2.	ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ _____	59
3.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ _____	60
<u>ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ – 2007-2008</u>		

4. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ _____	62
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ _____	63
6η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ _____	64
ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΙΓΜΑΤΟΣ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΕΚΧΥΛΙΣΗ _____	64
ΔΙΑΛΥΤΕΣ, ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ _____	64
1. ΓΕΝΙΚΑ _____	64
2. ΔΙΑΛΥΤΕΣ _____	64
<input type="checkbox"/> Διαλυτότητα _____	65
<input type="checkbox"/> Εκλογή του διαλύτη _____	67
3. ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ _____	68
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ _____	70
4. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ _____	72
7η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ _____	73
ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΟΣ (TLC) _____	73
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ _____	73
1. ΓΕΝΙΚΑ _____	73
2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ, ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΙΟΝΤΩΝ _____	74
3. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ _____	74
4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΕΠΙ ΧΑΡΤΟΥ. _____	76
5. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (TLC). _____	78
6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ _____	79
8η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ : _____	82
ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ . _____	82
1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ _____	82
2. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ _____	85

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι **Εργαστηριακές Ασκήσεις Αναλυτικής Χημείας**, προορίζονται για την υποστήριξη της εργαστηριακής εκπαίδευσης των φοιτητών στα πλαίσια του μαθήματος της «Αναλυτικής Χημείας», που διδάσκεται στο Β' εξάμηνο Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Η ύλη του μαθήματος της «Αναλυτικής Χημείας» περιλαμβάνει στοιχεία της κλασικής Ποσοτικής Ανάλυσης (Τιτλομετρία και Σταθμική Ανάλυση) και στοιχεία της Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης, ακολουθώντας τις σύγχρονες τάσεις να διδάσκεται η ενόργανη ανάλυση στα πρώτα έτη των Προγραμμάτων Σπουδών των Πανεπιστημιακών Τμημάτων.

Η επιλογή των θεμάτων που αναπτύσσονται στις **Εργαστηριακές Ασκήσεις της Αναλυτικής Χημείας** έγινε με βάση την εργαστηριακή εκπαίδευση των φοιτητών του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας στα μαθήματα της Γενικής Χημείας (Α' Εξάμηνο Σπουδών), όπου έχει ήδη αποκτηθεί μια σχετική εμπειρία και εξοικείωση με τις βασικές εργαστηριακές τεχνικές, την εργαστηριακή πρακτική και εργασία.

Με την επιλογή των εργαστηριακών ασκήσεων (που έγινε, εκτός των άλλων, και με κριτήριο την υλικοτεχνική υποδομή του εργαστηρίου και τη χρονική διάρκεια της εργαστηριακής άσκησης) **επιδιώκεται** πέραν της γνωριμίας με τις νέες τεχνικές και η **ανάπτυξη της επιδεξιότητας** των φοιτητών στις Τεχνικές της Χημικής Ανάλυσης, η **σωστή εφαρμογή** και ολοκληρωμένη **εκτέλεση** των τεχνικών αυτών, η αναγκαία **επεξεργασία των αποτελεσμάτων**, καθώς και η **κριτική θεώρηση** και η **σωστή έκφραση των αποτελεσμάτων**.

Συμπληρωματικά της εργαστηριακής εκπαίδευσης οι φοιτητές θα έχουν τη δυνατότητα μέσα από **εκπαιδευτικό οπτικοακουστικό υλικό** να γνωρίσουν τις περισσότερες Ενόργανες Τεχνικές Ανάλυσης στην πιο σύγχρονη μορφή τους.

Η εκπαίδευση των φοιτητών ολοκληρώνεται με

- Την παρουσίαση των εργαστηριακών ασκήσεων που εκτελούν,
- Την παρουσίαση βιβλιογραφικών θεμάτων με εφαρμογές της Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης (π.χ. στον έλεγχο φαρμακοδιεγερτικών ουσιών,...), καθώς και
- Την προετοιμασία και παρουσίαση νέων εργαστηριακών ασκήσεων από καθοδηγούμενες μικρές ομάδες φοιτητών.

ΚΑΝΟΝΕΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

1. Για λόγους ασφαλείας ο φοιτητής δεν εργάζεται ποτέ στο εργαστήριο ΜΟΝΟΣ.
2. Η χρησιμοποίηση εργαστηριακής ποδιάς, η οποία φέρει το ονοματεπώνυμο του φοιτητή, είναι ΥΠΟΧΡΕΩΤΙΚΗ.
3. Επειδή πολλά αντιδραστήρια είναι δηλητηριώδη ΑΠΑΓΟΡΕΥΕΤΑΙ η διατήρηση τροφών στις εργαστηριακές θέσεις, καθώς και η χρησιμοποίηση των σκευών του εργαστηρίου για φύλαξη τροφών ή πόση νερού. Συνίσταται η καλή έκπλυση των χεριών μετά το τέλος της εργασίας.
4. Σε περίπτωση επαφής διαβρωτικής ουσίας (ισχυρά οξέα ή βάσεις) με το δέρμα πρέπει η ουσία να απομακρυνθεί ΑΜΕΣΩΣ ΜΕ ΕΚΠΛΥΣΗ ΜΕ ΑΦΘΟΝΟ ΝΕΡΟ. Μετά την έκπλυση με το νερό, ακολουθεί εξουδετέρωση του μεν οξέος με διάλυμα ανθρακικού νατρίου (1% NaHCO_3), της δε βάσης με διάλυμα βορικού οξέος (1% H_3BO_3) ή διάλυμα οξικού οξέος (1% CH_3COOH).
5. Όλες οι εργασίες κατά τις οποίες παράγονται ατμοί (π.χ. ατμοί οξέων), δηλητηριώδη ή δύσσομα αέρια πρέπει να ΓΙΝΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΑΠΑΓΩΓΟ.
6. Δεν επιτρέπεται να γίνονται πειράματα, τα οποία δεν περιλαμβάνονται στο βιβλίο.
7. Η όσφρηση του περιεχομένου φιαλών δεν γίνεται ΠΟΤΕ ευθέως από το στόμιο των φιαλών (υπάρχει κίνδυνος λιποθυμίας), αλλά κρατώντας τη φιάλη σε απόσταση 10 εκατοστών και δημιουργώντας ρεύμα προς το πρόσωπο με τη παλάμη.
8. Η αναρρόφηση σε σιφώνια πυκνών οξέων, βάσεων και άλλων επικίνδυνων αντιδραστηρίων δεν γίνεται ΠΟΤΕ ΜΕ ΤΟ ΣΤΟΜΑ, αλλά με χρήση άπιου από καουτσούκ (πουάρ).
9. Δεν θερμαίνονται ΠΟΤΕ εύφλεκτα υλικά σε γυμνή φλόγα (π.χ. αλκοόλη, αιθέρας, ακετόνη κ.α.)
10. Δεν θερμαίνονται ΠΟΤΕ σε γυμνή φλόγα τα πιο κάτω υάλινα σκεύη (σπάζουν και εκτινάσσονται θραύσματα):
 - A. Ογκομετρικοί κύλινδροι
 - B. Ογκομετρικές φιάλες
 - Γ. Απλοί δοκιμαστικοί σωλήνες
 - Δ. Φιαλίδια αντιδραστηρίων
 - Ε. Φυγοκεντρικοί σωλήνεςΥπάρχουν ειδικά σκεύη για το σκοπό αυτό (απιοειδείς φιάλες, κάψες από πορσελάνη, χωνευτήρια, κ.λ.π.)
11. Εφίσταται προσοχή στα πιο κάτω:
 - A. Πυρωμένο γυαλί προκαλεί σοβαρά εγκαύματα.

Β. Στην αραίωση πυκνού θειικού οξέος (H_2SO_4): Η αραίωση του πυκνού θειικού οξέος γίνεται προσεκτικά με προσθήκη του πυκνού θειικού οξέος στο νερό σε μικρές δόσεις, με συνεχή ανάδευση και ψύξη (ΠΟΤΕ ΑΝΤΙΘΕΤΑ).

Γ. Κατά τη θέρμανση δείγματος σε κατάλληλο σκεύος πρέπει το ανοιχτό στόμιό του να μην κατευθύνεται προς τον ίδιο τον εργαζόμενο ή προς άλλο συνάδελφό του.

12. Σε περίπτωση ατυχήματος ενημερώνεται ΑΜΕΣΩΣ ο υπεύθυνος του εργαστηρίου.

13. Πριν την αναχώρηση από το εργαστήριο ελέγχονται επιμελώς οι στρόφιγγες νερού και οι διακόπτες του ηλεκτρικού ρεύματος.

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Για την καλή λειτουργία των εργαστηρίων και την αποδοτική εργασία ο φοιτητής υποχρεούται στην εφαρμογή διάφορων κανόνων και οδηγιών, που σχετίζονται με τη συμπεριφορά του στο εργαστήριο, τη χρησιμοποίηση των αντιδραστηρίων και του εργαστηριακού εξοπλισμού, τη συγγραφή και παράδοση των εργασιών των εργαστηριακών ασκήσεων κ.α. Οι κανόνες διεξαγωγής των εργαστηριακών ασκήσεων συνοψίζονται ως εξής:

1. Προσέλευση στο εργαστήριο

Η προσέλευση στο εργαστήριο γίνεται όχι αργότερα από 15 λεπτά από την ορισμένη έναρξη και όχι νωρίτερα ή αργότερα από το τέλος του εργαστηρίου.

2. Χρησιμοποίηση αντιδραστηρίων

Τα αντιδραστήρια πρέπει να χρησιμοποιούνται έτσι ώστε να μη σπαταλούνται και να μη μολύνονται. Χρήση μολυσμένων αντιδραστηρίων οδηγεί σε λανθασμένα αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό πρέπει να τηρούνται προσεκτικά οι παρακάτω κανόνες:

A. Τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι διαυγή, διαφορετικά διηθούνται πριν τη χρήση τους ή παρασκευάζονται από την αρχή.

B. Φωτο ευπαθή αντιδραστήρια (π.χ. AgNO_3) φυλάσσονται σε σκοτεινόχρωμες φιάλες.

Γ. Ατομικά σκεύη (π.χ. σπάτουλες, σιφώνια, σταγονόμετρα κ.α.) ποτέ δεν εισάγονται στις φιάλες αντιδραστηρίων. Μέρος του απαιτούμενου αντιδραστηρίου μεταγγίζεται από τη φιάλη σε καθαρό δοχείο, από το οποίο λαμβάνεται η αναγκαία ποσότητα.

Δ. Γενικός κανόνας: εάν ένα αντιδραστήριο μολυνθεί αντικαθίσταται με καθαρό, αφού προηγουμένως η φιάλη του πλυθεί σχολαστικά.

3. Προγραμματισμός Εργασίας

Ο προγραμματισμός της εργασίας είναι από τα σημαντικότερα σημεία κάθε επιστημονικής δραστηριότητας. Για το λόγο αυτό ο φοιτητής μελετά την εργαστηριακή άσκηση και προγραμματίζει τις εργασίες της άσκησης πριν από την προσέλευσή του στο εργαστήριο.

4. Παράδοση και συγγραφή εργασιών-Παρουσίαση των αποτελεσμάτων

Η τήρηση ακριβούς ημερολογίου των πειραματικών αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων αποτελεί απαραίτητο στοιχείο οποιασδήποτε επιστημονικής εργασίας. Οι παρατηρήσεις, οι οποίες γίνονται στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια της εργαστηριακής άσκησης, γράφονται αμέσως στο ημερολόγιο. Επειδή το ημερολόγιο αποτελεί επιστημονικό τεκμήριο πρέπει να διατηρείται πάντα καθαρό και τα πειραματικά αποτελέσματα γράφονται πάντα με καθαρά και

ευανάγνωστα γράμματα. Όλες οι παρατηρήσεις γράφονται λεπτομερώς, ώστε να είναι εύκολο να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον.

Ο προτεινόμενος τρόπος τήρησης ημερολογίου στο εργαστήριο αναλυτικής χημείας έχει ως εξής:

α. Γράφεται η διαγραμματική παράσταση της κάθε ανάλυσης

β. Γράφεται η πορεία της συστηματικής ανάλυσης

γ. Γράφονται οι παρατηρήσεις

δ. Καταχωρούνται τα αναλυτικά δεδομένα σε πίνακες όπως υποδεικνύεται για κάθε εργαστηριακή άσκηση στον εργαστηριακό οδηγό.

ε. Γράφονται και παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα αμέσως μετά τα παραπάνω σε ξεχωριστή σελίδα

στ. Καταχωρούνται τυχόν συμπεράσματα ή σχόλια των αποτελεσμάτων και απαντώνται οι ερωτήσεις που τυχόν τίθενται στην εργαστηριακή άσκηση.

ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ και ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Στην τιτλομετρία και γενικότερα στην ανάλυση, ορισμένες ουσίες υψηλής καθαρότητας, οι οποίες μπορούν να διατηρηθούν σταθερές και δεν παρουσιάζουν πτητικότητα χαρακτηρίζονται σαν **πρωτογενείς πρότυπες ουσίες** ή απλά σαν **πρωτογενή πρότυπα**.

Πρότυπο διάλυμα (standard solution) είναι διάλυμα με επακριβώς γνωστή συγκέντρωση της δραστικής ουσίας (αντιδραστήριο) ή άλλως με επακριβώς γνωστό τίτλο και χρησιμοποιείται στη χημική ανάλυση σαν διάλυμα αναφοράς. Τα πρότυπα διαλύματα πρέπει να συντηρούνται προσεκτικά γιατί κάθε απώλεια της διαλυμένης ουσίας ή του διαλύτη (λόγω αποσύνθεσης ή εξάτμισης) προκαλεί μεταβολές αγνώστου μεγέθους στην συγκέντρωση και επομένως το διάλυμα δεν θεωρείται πλέον πρότυπο.

Τα πρότυπα διαλύματα διακρίνονται σε πρωτογενή πρότυπα διαλύματα και σε δευτερογενή πρότυπα διαλύματα.

A. Πρωτογενές πρότυπο διάλυμα (primary standard solution)

Είναι διάλυμα που παρασκευάζεται με ζύγιση γνωστής, με ακρίβεια, ποσότητας πρωτογενούς προτύπου αντιδραστήριου (στερεού ή υγρού), διάλυσή της σε ορισμένο διαλύτη και αραίωσή της σε βαθμονομημένη ογκομετρική φιάλη καθορισμένου όγκου, ώστε να παρασκευαστεί ο ζητούμενος όγκος του διαλύματος.

B. Δευτερογενές πρότυπο διάλυμα (secondary standard solution)

Είναι διάλυμα του οποίου η ακριβής ποσότητα του αντιδραστήριου που είναι διαλυμένο σε ορισμένο όγκο του (ή η ακριβής συγκέντρωσή του) προσδιορίζεται δευτερογενώς με ογκομέτρηση (τιτλοδότηση) με πρωτογενή πρότυπα διαλύματα ή με σταθμική ανάλυση. Δευτερογενή πρότυπα διαλύματα παρασκευάζονται επίσης από γνωστό βάρος ενός δευτερογενούς προτύπου αντιδραστήριου.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων είναι τα πρωτογενή και τα δευτερογενή πρότυπα αντιδραστήρια:

A. Πρωτογενή πρότυπα αντιδραστήρια (primary standard reagents)

Τα ιδανικά πρωτογενή πρότυπα αντιδραστήρια θα πρέπει να έχουν τις ακόλουθες ιδιότητες:

- α) Γνωστό και υψηλό βαθμό καθαρότητας (τουλάχιστον 99,98 - 99,99%).
- β) Καθορισμένη σύσταση.
- γ) Σταθερότητα κατά την αποθήκευση, έκθεση στη ατμόσφαιρα (αδράνεια στα H₂O, O₂

και CO₂) και στην ξήρανση (110-120 °C), γιατί ένα πρωτογενές πρότυπο αντιδραστήριο ξηραίνεται πάντοτε πριν τη χρήση του.

- δ) Διαλυτότητα στο H₂O ή στον όποιο διαλύτη θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων.
- ε) Μεγάλο ισοδύναμο βάρους (χημικό ισοδύναμο). Αυτό γιατί θα πρέπει να ζυγιστεί μεγάλη ποσότητά του για να δώσει διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης. Το σχετικό σφάλμα στην ζύγιση μεγαλύτερου ποσού ουσίας είναι μικρότερο από αυτό μικρότερης ποσότητας. Η επαναληπτικότητα (presicion) στην ζύγιση είναι συνήθως 0.1-0.2 mg. Για ακρίβεια (accuracy) 1⁰/₁₀₀ είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν δείγματα τουλάχιστον 200 mg.
- στ) Επί πλέον πρέπει να δίνει διαλύματα που να είναι σταθερά, μη πτητικά, μη οξειδωτικά και ισχυροί ηλεκτρολύτες.

Ωστόσο, τα αντιδραστήρια που πληρούν όλες τις παραπάνω προϋποθέσεις, είναι λίγα.

Τα πρωτογενή πρότυπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στις ογκομετρήσεις είναι:

- (i) για αντιδράσεις εξουδετέρωσης
Na₂CO₃, Na₂B₂O₇ 10H₂O, HCl σταθερού σ.ζ., KH(IO₃)₂, C₆H₅COOH
- (ii) για αντιδράσεις καταβύθισης (Ag⁰, AgNO₃, NaCl, KCl, KBr).
- (iii) για αντιδράσεις συμπλοκομετρίας
Ag⁰, AgNO₃, NaCl, Zn⁰, Mg⁰, Cu⁰, Mn⁰
- (iv) για αντιδράσεις οξειδοαναγωγής
Fe⁰, K₂Cr₂O₇, KBrO₃, KIO₃, KH(IO₃)₂, I₂, As₂O₃

B. Δευτερογενή πρότυπα αντιδραστήρια (secondary standard reagents)

Είναι αντιδραστήρια των οποίων το περιεχόμενο σε ενεργό ουσία έχει βρεθεί σε σύγκριση με το πρωτογενές πρότυπο αντιδραστήριο. Τα δευτερογενώς πρότυπα αντιδραστήρια πρέπει επίσης να έχουν τις περισσότερες ιδιότητες των πρωτογενών προτύπων αντιδραστηρίων.

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΟΥΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥΣ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥΣ

ΑΚΡΙΒΕΙΑ: Κατά την μέτρηση ενός φυσικοχημικού μεγέθους λαμβάνονται και καταγράφονται διάφορες πειραματικές τιμές από τον αναλυτή. Η απόκλιση μιας τέτοιας πειραματικής τιμής X_i από την αληθή τιμή (μ), είναι το μέτρο της ακρίβειας της μεθόδου που χρησιμοποιείται (το σφάλμα, Error). Με άλλα λόγια η ακρίβεια περιγράφει την διαφορά μιας τιμής που βρέθηκε πειραματικά από την αληθή τιμή.

ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ: Η επαναληψιμότητα περιγράφει και αποκαλύπτει την διασπορά μιας σειράς τιμών πειραματικών δεδομένων. Επίσης μας δίνει μια εικόνα της κατανομής των πειραματικών δεδομένων.

ΣΦΑΛΜΑΤΑ ΚΑΙ ΛΑΘΗ: Όταν οι παράγοντες που επηρεάζουν την ακρίβεια και επαναληψιμότητα μιας μεθόδου επενεργήσουν συνολικά ή μερικά πάνω στα πειραματικά δεδομένα, τότε εμφανίζονται τα σφάλματα. Τα λάθη όμως είναι αποτέλεσμα απροσεξίας ή άγνοιας συνθηκών από μέρους του πειραματιστή και μπορεί να τα αποφύγει αν επαναλάβει το πείραμα. Η ζύγιση υγροσκοπικού δείγματος που έχει ήδη εκτεθεί στην ελεύθερη ατμόσφαιρα, η κακή επιλογή μεθόδου, η απροσεξία στους υπολογισμούς αποτελούν παραδείγματα λαθών. Αντίθετα τα σφάλματα συνοδεύουν οποιοδήποτε αναλυτικό αποτέλεσμα ή μέτρηση φυσικοχημικού μεγέθους. Τα σφάλματα διακρίνονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες: **α) τα συστηματικά** και **β) τα τυχαία**.

α) Τα συστηματικά ή καθορισμένα σφάλματα επιδρούν στο αποτέλεσμα μιας μέτρησης πάντα κατά την ίδια φορά, όσες επαναλήψεις και αν γίνουν υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες, είναι δηλαδή μονοκατευθυνόμενα θετικά ή αρνητικά. Για σειρά μετρήσεων υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες παραμένουν κατά κανόνα σταθερά. Οφείλονται σε αίτια που αποδίδονται στην αρχή της μεθόδου ή στις ατέλειες της μετρικής διάταξης και μπορούν με βελτιστοποίηση της τεχνικής και των μετρικών διατάξεων να τεθούν υπό έλεγχο από τον παρατηρητή, ώστε τελικά να ελαττωθούν ή να εξουδετερωθούν. Στους περισσότερους αναλυτικούς ποσοτικούς προσδιορισμούς τα συστηματικά σφάλματα εμφανίζονται λόγω υγροσκοπικότητας του ζυγισθέντος δείγματος, λόγω θερμικών διαστολών και παραμορφώσεων των βαθμονομημένων ογκομετρικών σκευών, λόγω πυριτικών αλάτων και αλκαλίων με τα οποία τα γυάλινα σκεύη τροφοδοτούν τα διαλύματα που περιέχουν, λόγω ατελών αντιδράσεων, λόγω μόλυνσεως των ιζημάτων, λόγω συγκαταβυθίσεων, λόγω

απωλειών κατά τις πυρώσεις, λόγω φαινομένων υδρολύσεως κ.α. Οι κυριότερες μέθοδοι διόρθωσης των συστηματικών σφαλμάτων είναι η συχνή βαθμονόμηση των οργάνων, η εκτέλεση τυφλού και η ανάλυση πρότυπων δειγμάτων.

Ένα συστηματικό σφάλμα μειώνει την ακρίβεια μιας μεθόδου και είναι δυνατόν να χειροτερεύσει την επαναληψιμότητά της, αναλόγως του αν αυτό είναι σταθερό ή μεταβλητό. Το μέγεθος του συστηματικού σφάλματος μπορεί να είναι σταθερό από δείγμα σε δείγμα ή αναλογικό του βάρους του δείγματος ή τέλος να μεταβάλλεται με πολυπλοκότερη σχέση με το βάρος του δείγματος. Η επίδραση του σταθερού συστηματικού σφάλματος είναι τόσο σοβαρότερη όσο μικρότερο είναι το μέγεθος του λαμβανόμενου δείγματος. Το απόλυτο μέγεθος ενός αναλογικού σφάλματος είναι ανάλογο προς την ποσότητα του προσδιοριζόμενου συστατικού, ενώ το σχετικό σφάλμα παραμένει σταθερό.

β) Τα τυχαία σφάλματα. τα οποία συνοδεύουν την μέτρηση ενός φυσικοχημικού μεγέθους ή έναν αναλυτικό προσδιορισμό είναι συνισταμένη πολλών παραγόντων που συνήθως δεν ελέγχονται από τον αναλυτή. Τα σφάλματα αυτά είναι δικατευθυνόμενα δηλαδή μπορεί να είναι θετικά ή αρνητικά. Προέρχονται από μη μόνιμα αίτια (ατέλειες αισθητήριων οργάνων του παρατηρητή, στην πεπερασμένη ταχύτητα με την οποία δύναται να εκτελεστεί μια μέτρηση, σε παρασιτικές διαταραχές που παρενοχλούν τη μέτρηση, σε ενδογενείς περιορισμούς της μεθόδου κ.α.) και επιδρούν επί του αποτελέσματος ακανόνιστα. Γενικά, κάθε μέτρηση υπόκειται σε τυχαία σφάλματα. Σε μια σειρά μετρήσεων, το μέγεθος αυτών ποικίλλει από μέτρηση σε μέτρηση, με συνέπεια οι ευρισκόμενες τιμές να είναι μικρότερες ή μεγαλύτερες της αληθούς τιμής. Τα τυχαία σφάλματα μειώνουν την επαναληψιμότητα της μεθόδου, αλλά με την εκτέλεση μεγάλου αριθμού προσδιορισμών είναι δυνατόν να μειώσουμε την απόκλιση του μέσου όρου από την αληθή τιμή, με την προϋπόθεση βέβαια ότι δεν υπάρχουν συστηματικά σφάλματα. Με την μαθηματική στατιστική επεξεργασία μόνο τα τυχαία σφάλματα μπορούν να διερευνηθούν ώστε να εξαχθούν αντικειμενικά μέτρα επαναληψιμότητας, δηλαδή εάν οι διαφορές που υπάρχουν σε μια σειρά μετρήσεων είναι στατιστικά σημαντικές ή όχι.

ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ: Σύμφωνα με το Διεθνές Λεξικό Βασικών και Γενικών Όρων στη Μετρολογία (International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology) η αβεβαιότητα μιας μέτρησης *ορίζεται ως η παράμετρος που σχετίζεται με το αποτέλεσμα της μέτρησης και χαρακτηρίζει την διακύμανση των τιμών που θα μπορούσαν να αποδοθούν στο μετρούμενο μέγεθος.* Η παράμετρος αυτή θα μπορούσε για παράδειγμα να είναι μια διακύμανση τιμών ή ένα εύρος εμπιστοσύνης.

Η αβεβαιότητα μιας μέτρησης συνήθως περιλαμβάνει πολλές επιμέρους αβεβαιότητες οι οποίες ανάλογα της φύσης τους υπολογίζονται από την στατιστική διακύμανση των αποτελεσμάτων μιας σειράς μετρήσεων και μπορούν να χαρακτηριστούν από τις τυπικές τους αποκλίσεις ή από πιθανές διακυμάνσεις που βασίζονται σε εμπειρικούς υπολογισμούς ή άλλες πληροφορίες. Κάθε επιμέρους αβεβαιότητα όταν εκφράζεται με μια τυπική απόκλιση ονομάζεται τυπική αβεβαιότητα (standard uncertainty). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να γίνει διάκριση του σφάλματος από την αβεβαιότητα. Το σφάλμα (error) ορίζεται ως η διαφορά μεταξύ μιας ανεξάρτητης μέτρησης και της αληθούς τιμής του μετρούμενου μεγέθους και έτσι το σφάλμα είναι μια μοναδική τιμή. Γενικά, εάν η τιμή του σφάλματος είναι γνωστή τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διόρθωση της μετρηθείσας τιμής. Αντίθετα, η αβεβαιότητα έχει τη μορφή του εύρους και αν υπολογιστεί για μια αναλυτική πορεία ποσοτικού προσδιορισμού και ένα δεδομένο τύπο δείγματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλους τους αναλυτικούς προσδιορισμούς που θα πραγματοποιηθούν με την εφαρμογή της συγκεκριμένης πορείας. Γενικά, η αβεβαιότητα δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διόρθωση των πειραματικών μετρήσεων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ

Τα βασικά βήματα της διαδικασίας υπολογισμού της αβεβαιότητας ενός ποσοτικού προσδιορισμού με μια συγκεκριμένη αναλυτική πορεία φαίνονται στο παρακάτω **σχήμα** και αναπτύσσονται ακολούθως:

Βήμα 1: Ορισμός μεγέθους μέτρησης

Κατά το στάδιο αυτό της διαδικασίας καθορίζεται το μετρούμενο μέγεθος της δοκιμής καθώς και η ποσοτική του έκφραση προσδιορίζοντας σαφώς τη σχέση του μετρούμενου μεγέθους και των ποσοτήτων που περιλαμβάνει η μέτρησή του και από τις οποίες εξαρτάται η αβεβαιότητα του αποτελέσματος.

Βήμα 2: Προσδιορισμός πηγών αβεβαιότητας

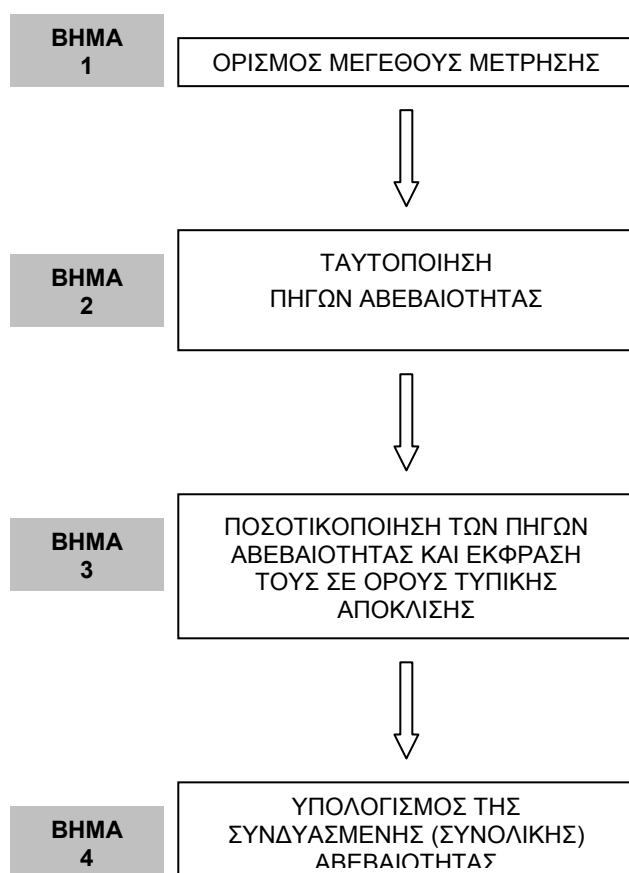
Κατά το στάδιο αυτό προσδιορίζονται οι πηγές από τις οποίες προέρχεται η αβεβαιότητα του αποτελέσματος του μετρούμενου μεγέθους. Ο προσδιορισμός των πηγών αβεβαιότητας θα περιλαμβάνει τις πηγές που συμβάλουν στην αβεβαιότητα των παραμέτρων που περιλαμβάνονται στην ποσοτική έκφραση του μετρούμενου μεγέθους που προσδιορίστηκε στο στάδιο 1 αλλά μπορεί να περιλαμβάνει και άλλες πηγές από χημικές θεωρήσεις.

Τυπικές πηγές αβεβαιότητας μιας δοκιμής είναι:

- Η δειγματοληψία

- Οι συνθήκες αποθήκευσης
- Επιδράσεις του εξοπλισμού δοκιμών
- Η καθαρότητα των αντιδραστηρίων
- Περιβαλλοντικές συνθήκες διεξαγωγής της δοκιμής
- Επιδράσεις του χειριστή
- Τυχαίες επιδράσεις

Επισημαίνεται ότι οι παραπάνω πηγές μπορεί να μην είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους.



Σχήμα 1. Σχηματική παράσταση διαδικασίας υπολογισμού αβεβαιότητας

Οι πηγές αβεβαιότητας της δοκιμής μπορεί να είναι:

- Τύπου Α. Είναι οι πηγές αβεβαιότητας που δημιουργούν στο αποτέλεσμα της δοκιμής σφάλματα τυχαία διασκορπισμένα γύρω από μια μέση.

- Τύπου Β. Είναι οι πηγές αβεβαιότητας που προκαλούν σφάλματα που παραμένουν σταθερά όταν η μέτρηση επαναλαμβάνεται με τις ίδιες συνθήκες (συστηματικά σφάλματα). Τέτοιες πηγές είναι π.χ. η αβεβαιότητα εξοπλισμού μετρήσεων κ.λ.π.

Οι εντοπισμένες πηγές αβεβαιότητας τοποθετούνται στο σχετικό διάγραμμα «αιτίας-επίδρασης» (cause-effect diagram) που δημιουργείται για την συγκεκριμένη δοκιμή.

Βήμα 3: Ποσοτικοποίηση των πηγών αβεβαιότητας

Στο στάδιο αυτό ομαδοποιούνται τυχόν πηγές αβεβαιότητας που συσχετίζονται μεταξύ τους. Κατόπιν ποσοτικοποιείται η αβεβαιότητα από τις συγκεκριμένες πηγές. Αυτό μπορεί να γίνει με:

- Υπολογισμό της αβεβαιότητας που προέρχεται από κάθε ξεχωριστή πηγή αβεβαιότητας και συνδυασμό αυτών ή/και
- Προσδιορισμό κατ' ευθείαν της συνδυασμένης αβεβαιότητας του αποτελέσματος της δοκιμής χρησιμοποιώντας δεδομένα εκτέλεσης της δοκιμής.

Οι τιμές της αβεβαιότητας τύπου Α προκύπτουν με στατιστική ανάλυση.

Οι τιμές της αβεβαιότητας τύπου Β προκύπτουν με μεθόδους άλλες από την στατιστική ανάλυση δεδομένων (π.χ. από τα πιστοποιητικά διακρίβωσης του εξοπλισμού μετρήσεων)

Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης σε κάθε περίπτωση εκφράζονται σε όρους τυπικής απόκλισης.

Βήμα 4: Υπολογισμός της συνδυασμένης αβεβαιότητας

Στο στάδιο αυτό υπολογίζονται η συνδυασμένη αβεβαιότητα (combined uncertainty) που προέρχεται από τις διάφορες καθορισμένες πηγές. Ο πιο απλός τρόπος υπολογισμού της συνδυασμένης αβεβαιότητας είναι με την εφαρμογή των κανόνων διάδοσης και συσσώρευσης της αβεβαιότητας όπως καθορίζεται από την αριθμητική σχέση μεταξύ του όρου που περιέχει το σφάλμα και της ποσότητας που υπολογίζεται (Βήμα 1):

Διάδοση και συσσώρευση αβεβαιότητας σε άθροισμα ή διαφορά

Για τον υπολογισμό της αβεβαιότητας που προκύπτει σε μια πράξη πρόσθεσης ή αφαίρεσης, π.χ. $y = (p + q + r + \dots)$ η συνδυασμένη αβεβαιότητα $u_c(y)$ είναι:

$$u_c(y(p,q,\dots)) = \sqrt{(u_p)^2 + (u_q)^2 + \dots}$$

Διάδοση και συσσώρευση αβεβαιότητας σε γινόμενο ή πηλίκο

Για τον υπολογισμό της αβεβαιότητας που προκύπτει σε μια πράξη πολλαπλασιασμού ή διαίρεσης, π.χ. $y = (p \times q \times r \times \dots)$ ή $y = p / (q \times r \times \dots)$ η συνδυασμένη αβεβαιότητα $u_c(y)$ είναι:

$$u_c(y) = y \sqrt{\left(\frac{u_p}{p}\right)^2 + \left(\frac{u_q}{q}\right)^2 + \dots}$$

Σημείωση: Για την ποσοτικοποίηση των αβεβαιοτήτων μπορεί εναλλακτικά να χρησιμοποιείται το μέγεθος της επι τοις εκατό σχετικής τυπικής απόκλισης.

Παράδειγμα 1: Να υπολογισθεί η αβεβαιότητα του προσδιοριζόμενου τίτλου ενός διαλύματος HCl, κατά την τιτλοδότηση του με στερεό Na₂CO₃ παρουσία δείκτη ηλιανθίνης:

Βήμα 1: Ορισμός μεγέθους μέτρησης

Ο υπολογισμός της κανονικότητας (προσδιοριζόμενος τίτλος) του HCl γίνεται με βάση το γενικό τύπο:

$$N_{HCl} = \frac{m_{Na_2CO_3}}{V_{HCl} \times I.B._{Na_2CO_3}} \times 1000 \quad (\text{τύπος 1})$$

Βήμα 2: Προσδιορισμός πηγών αβεβαιότητας

Η αβεβαιότητα του τίτλου εξαρτάται από την αβεβαιότητα της ζύγισης της μάζας (m) του Na₂CO₃ και την αβεβαιότητα του όγκου του HCl (σε ml) που προσδιορίζεται με την αναλυτική πορεία της ογκομέτρησης. Η αβεβαιότητα της ζύγισης του Na₂CO₃ εφόσον πραγματοποιηθεί σε απλό, ηλεκτρονικό αναλυτικό ζυγό, σύμφωνα με τον **πίνακα 1** είναι ±0,001. Η αβεβαιότητα του όγκου του HCl που προσδιορίζεται με την αναλυτική πορεία της ογκομέτρησης εξαρτάται από τις αποκλίσεις των δυο αναγνώσεων του όγκου στην προχοΐδα και την απόκλιση λόγω αλλαγής χρώματος του δείκτη ηλιανθίνης η οποία προσδιορίζεται από την μέτρηση του τυφλού.

Βήμα 3: Ποσοτικοποίηση των πηγών αβεβαιότητας

α) Η αβεβαιότητα της ζύγισης σύμφωνα με τον **πίνακα 1** είναι: $u(m_{Na_2CO_3}) = \pm 0,001$

β) Η αβεβαιότητα του όγκου του HCl εκφράζεται με την συνδυασμένη τυπική απόκλιση των δύο αναγνώσεων όγκου στην προχοΐδα και την αβεβαιότητα αλλαγής χρώματος του δείκτη:

$$u(V_{HCl}) = \sqrt{(u_{V_{HCl}})^2 + (u_{V_{HCl}})^2 + (u_{V_{HCl} \text{ τυφλο } \dot{\iota}})^2}$$

Βήμα 4: Υπολογισμός της συνδυασμένης αβεβαιότητας

Η συνδυασμένη ολική αβεβαιότητα του τίτλου του HCl, σύμφωνα με τους κανόνες διάδοσης των σφαλμάτων στη ποσοτική έκφραση του βήματος 1 είναι:

$$u_c(N_{HCl}) = N_{HCl} \sqrt{\left(\frac{u_{mNa_2CO_3}}{m_{Na_2CO_3}}\right)^2 + \left(\frac{u_{cV_{HCl}}}{V_{HCl}}\right)^2}$$

Πίνακας 1. Ακρίβεια αναλυτικών σκευών και οργάνων μέτρησης

Σκεύος η Όργανο	Μέγεθος	Απόλυτη Ακρίβεια
Αναλυτικός Ζυγός	100 g	±0,0001 g
Απλός Ζυγός	1000 g	±0,001 g
Προχοΐδα	50 mL	±0,02 mL
Σιφώνιο πλήρωσης	5 mL	±0,01 mL
	10 mL	±0,02 mL
	25 mL	±0,03 mL
	50 mL	±0,05 mL
Ογκομετρικές Φιάλες	25 mL	±0,03 mL
	50 mL	±0,05 mL
	100 mL	±0,08 mL
	250 mL	±0,12 mL
	500 mL	±0,15 mL
1000 mL	±0,30 mL	

ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗ

Είναι η διαδικασία κατά την οποία βρίσκεται η ακριβής συγκέντρωση ή η αντιδρώσα ισχύς (τίτλος) ενός δευτερογενούς προτύπου διαλύματος. Η τιτλοδότηση ενός διαλύματος γενικά απαιτεί μεγαλύτερο βαθμό ακρίβειας από μια κοινή ογκομετρική ανάλυση, γιατί το σφάλμα στην τιτλοδότηση μεταβιβάζεται σε όλες τις αναλύσεις που γίνονται χρησιμοποιώντας το διάλυμα αυτό. Συνήθως η τιτλοδότηση απαιτεί ακρίβεια 0.1%, αλλά αυτή δεν είναι πάντοτε εφικτή. Για μια τιτλοδότηση πρέπει να ικανοποιούνται οι ακόλουθες συνθήκες:

- Πρέπει να υπάρχει το κατάλληλο πρωτογενές πρότυπο αντιδραστήριο, που να πληρεί τους γνωστούς όρους
- Ο όγκος του πρωτογενούς προτύπου διαλύματος, που καταναλώνεται στην τιτλοδότηση δεν πρέπει να είναι ούτε πολύ μικρός ούτε πολύ μεγάλος, για να μειωθούν έτσι τα σφάλματα ανάγνωσης και τα σφάλματα αποστράγγισης (drainage) της προχοϊδας. Δηλαδή αν κάθε σφάλμα ανάγνωσης της προχοϊδας είναι 0,01 mL και αν υπάρχει σφάλμα αποστράγγισης 0,02 mL, τότε για έναν προσδιορισμό (2 μετρήσεις) το σφάλμα είναι 0,04 mL. Αν χρησιμοποιηθούν 40 mL πρωτογενούς προτύπου διαλύματος, το σχετικό σφάλμα είναι 0,1%, ενώ αν χρησιμοποιηθούν 20 mL είναι 0,2%.
- Γενικά, η τιτλοδότηση δευτερογενούς προτύπου διαλύματος έναντι άλλου ήδη τιτλοδοτημένου δευτερογενούς προτύπου διαλύματος πρέπει να αποφεύγεται, γιατί τα σφάλματα μπορεί να είναι προσθετικά.
- Γενικά, κάθε τιτλοδότηση πρέπει να γίνεται τρεις τουλάχιστον φορές (τρεις παράλληλοι προσδιορισμοί) και τα αποτελέσματα πρέπει να συμφωνούν εντός 0.1-0.2 %.
- Η τιτλοδότηση πρέπει να γίνεται με πειραματικές συνθήκες όσο το δυνατόν παρόμοιες με αυτές που θα χρησιμοποιηθούν για την ογκομέτρηση αγνώστων δειγμάτων. Τότε μειώνονται σημαντικά ή αναιρούνται τα σφάλματα ογκομέτρησης.

1η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ
ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΟΠΙΣΘΟΓΚΟΜΕΤΡΗΣΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην άσκηση αυτή προσδιορίζεται η ικανότητα εξουδετέρωσης εμπορικών διαθέσιμων αντιόξινων δισκίων. Οι δραστικές ουσίες των δισκίων είναι βάσεις, συνεπώς η άμεση ογκομέτρησή τους απαιτεί οξύ ως τιτλοδότη. Εντούτοις πολλές από αυτές δεν έχουν μεγάλη διαλυτότητα στο ύδωρ, ή αντιδρούν βραδέως με τα οξέα. Για να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα αυτά εφαρμόζεται μέθοδος της **οπισθοογκομέτρησης**. Συγκεκριμένα μία γνωστή ποσότητα ισχυρού οξέος (HCl) προστίθεται σε περίσσεια στο αντιόξινο δισκίο και το μείγμα θερμαίνεται ώστε να εξασφαλιστεί η πλήρης αντίδραση. Μέρος της ποσότητας του προστιθέμενου οξέος καταναλώνεται για την αντίδραση με τα βασικά συστατικά του δισκίου, ενώ μια ποσότητα οξέος παραμένει. Η ποσότητα αυτή που παραμένει ογκομετρείται με τιτλοδότη ισχυρή βάση (NaOH). Με αφαίρεση, της προσδιοριζόμενης με την ογκομέτρηση, ποσότητας του οξέος από τη συνολική ποσότητα του οξέος που χρησιμοποιήθηκε, προκύπτει η ποσότητα του οξέος που εξουδετερώθηκε από τα βασικά συστατικά του αντιόξινου δισκίου. Με άλλα λόγια προσδιορίζεται η ικανότητα εξουδετέρωσης που έχουν τα αντιόξινα δισκία (η ποσότητα οξέος που μπορεί να εξουδετερωθεί από ένα αντιόξινο δισκίο).

Τα αντιόξινα δισκία είναι από τα πλέον διαδεδομένα φάρμακα. Χρησιμοποιούνται για την ανακούφιση από ιατρικώς μη καθορισμένες στομαχικές διαταραχές (δυσπεψία, καούρες). Μολονότι οι στομαχικές ενοχλήσεις αποδίδονται συνήθως σε υπερπαραγωγή HCl, δεν είναι πάντοτε αυτό υπεύθυνο για διάφορα συμπτώματα, καθώς σε πολλές περιπτώσεις στομαχικών παθήσεων, η παραγωγή HCl είναι μειωμένη. Η διαδικασία της πέψεως επηρεάζεται από το pH του στομαχικού περιεχομένου, καθώς το πρωτεολυτικό ένζυμο ένζυμο πεψίνη δεν είναι δραστικό σε pH υψηλότερο του 4. Συνεπώς, τα αντιόξινα δισκία πρέπει να εξουδετερώνουν μόνο την ποσότητα HCl που πλεονάζει αυτής που παράγει ένας υγιής άνθρωπος μετά από γεύμα. Η περίσσεια αυτή προσδιορίζεται κατά μέσο όρο σε 10 mmol ανά ώρα.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Πορεία εργασίας

- 1) Τιτλοδότηση διαλυμάτων HCl και NaOH με πρωτογενή πρότυπα διαλύματα.
- 2) Μέτρηση της αντιόξινης ισχύος των δισκίων.

2.1. Τιτλοδότηση διαλυμάτων HCl και NaOH

Υπολογίστε την ποσότητα πυκνού υδροχλωρικού που θα σας χρειαστεί για την παρασκευή διαλύματος περίπου 1 M (500 – 1000 mL).

Παρασκευάστε το διάλυμα HCl 1 M.

Παρασκευή διαλύματος HCl 0,2 M και τιτλοδότησή του με Na₂CO₃

Μεταφέρουμε με σιφώνιο 50 mL από το πρότυπο διάλυμα HCl 1M σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL και αραιώνουμε με απεσταγμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Πωματίζουμε την φιάλη και αναμιγνύουμε το περιεχόμενο με συνεχείς αναστροφές. Το διάλυμα, που προκύπτει είναι 0,2 M. Για να επιβεβαιώσουμε τον τίτλο του προχωρούμε σε τιτλοδότησή του με πρωτογενή πρότυπη ουσία το Na₂CO₃.

Ζυγίζουμε με ακρίβεια ποσότητα περίπου 0,30g ξηρού, άνυδρου Na₂CO₃ (η ξήρανση επιτυγχάνεται με θέρμανση της ουσίας στους 275 °C σε πυριαντήριο). Την ποσότητα αυτή τη μεταφέρουμε σε κωνική φιάλη, προσθέτουμε 80-100 mL απεσταγμένου ύδατος, 2-3 σταγόνες ερυθρό του μεθυλίου (ηλιανθίνης) σαν δείκτη (το διάλυμα χρωματίζεται κίτρινο). Το βασικό διάλυμα ογκομετρείται με το παρασκευασθέν διάλυμα HCl μέχρι να επιτευχθεί αλλαγή του χρώματος από κίτρινο σε πορτοκαλέρυθρο.

Για την επίτευξη μεγαλύτερης ακρίβειας στον προσδιορισμό του τίτλου του HCl, εκτελείται τυφλός προσδιορισμός: σε κωνική φιάλη προστίθενται 80-100 mL απεσταγμένου ύδατος και 2-3 σταγόνες ερυθρό του μεθυλίου (ηλιανθίνη), το διάλυμα ογκομετρείται με το παρασκευασθέν διάλυμα HCl.

Από το όγκο του διαλύματος HCl, που απαιτήθηκε για την ογκομέτρηση, αφαιρείται ο όγκος του τυφλού προσδιορισμού και **υπολογίζεται** ο τίτλος του παρασκευασθέντος με αραιώση διαλύματος HCl. Το διάλυμα μας είναι πλέον δευτερογενές πρότυπο διάλυμα. Η τιτλοδότηση επαναλαμβάνεται εις τριπλούν και υπολογίζεται η κανονικότητα του διαλύματος (τύπος 1, σελ. 16).

Να υπολογιστεί η αβεβαιότητα του τίτλου με την διαδικασία που περιγράφεται στην αντίστοιχη εισαγωγική ενότητα (βλ. παράδειγμα σελ. 16).

Τιτλοδότηση διαλύματος NaOH με δευτερογενές πρότυπο διάλυμα HCl 0,2M.

Με βάση το δευτερογενές πρότυπο διάλυμα του HCl **να τιτλοδοτήσετε** διάλυμα NaOH περίπου 0,2 M (με δείκτη κυανού της θυμόλης). Η τιτλοδότηση να πραγματοποιηθεί εις τριπλούν, να υπολογιστεί η κανονικότητα του τίτλου ($\bar{X} \pm S_x$) και να προσδιοριστεί η αβεβαιότητά του λαμβάνοντας υπόψη τη διάδοση των σφαλμάτων του ζυγού, της προχοϊδας και της αλλαγής χρώματος του δείκτη.

2.2. Μέτρηση της αντιόξινης ισχύος των δισκίων

Το δισκίο μεταφέρεται σε κωνική φιάλη των 250 mL και προστίθενται 75,0 mL διαλύματος HCl 0,200 M (με σιφώνιο ή προχοϊδα). Παράλληλα προετοιμάζεται τυφλό δείγμα του προσδιορισμού όπου σε κωνική φιάλη των 250 mL προστίθενται 75,0 mL διαλύματος HCl 0,200 M (με σιφώνιο ή προχοϊδα).

Το διάλυμα του δείγματος θερμαίνεται μέχρι βρασμού σε θερμοαντική πλάκα ή σε λύχνο Bunsen και αφήνεται σε ήπιο βρασμό επί 10 λεπτά. Σε περίπτωση που το δισκίο δεν διαλυτοποιείται η διάλυση υποβοηθείται με γυάλινη ράβδο. Το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου με βύθιση της φιάλης σε δοχείο που περιέχει νερό βρύσης. Όταν αποκτήσει την επιθυμητή θερμοκρασία, προστίθενται 10 σγ. δείκτη κυανού της θυμόλης 0,1%. Το διάλυμα πρέπει να χρωματιστεί κόκκινο (pH < 2). Το διάλυμα ογκομετρείται με διάλυμα NaOH 0,200 M μέχρι αλλαγής του χρώματος από κόκκινο σε κίτρινο.

Κατά το ίδιο τρόπο ογκομετρείται και το τυφλό δείγμα.

Ο υπολογισμός της ποσότητας του δραστικού συστατικού γίνεται με τη βοήθεια των εξισώσεων:

$$eq_{\text{δραστικό}} = N_{\text{HCl}} \cdot V_{\text{HCl}} - N_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}$$

$$m_{\text{δραστικό } \acute{\upsilon}} = (N_{\text{HCl}} \cdot V_{\text{HCl}} - N_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}) \cdot IB_{\text{δραστικό } \acute{\upsilon}}$$

ενώ ο υπολογισμός της περιεκτικότητας του δισκίου σε δραστικό συστατικό γίνεται με τη βοήθεια της εξίσωσης:

$$\%_{\text{δραστικό}} = \frac{(N_{\text{HCl}} \cdot V_{\text{HCl}} - N_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}) \cdot IB_{\text{βάσεως}}}{m_{\text{δισκίου}}} \cdot 100$$

- Η μέτρηση εκτελείται εις τριπλούν και υπολογίζεται η μέση τιμή
- Το αποτέλεσμα των ποσοτικών αναλύσεων να παρουσιαστεί με τη μορφή της υπό του αναλυτού προτεινόμενης αληθούς τιμής (μ):

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{t \times s_{\bar{x}}}{\sqrt{n}} \quad \text{με} \quad s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x}_i)^2}{n - 1}}$$

όπου:

\bar{x} ο μέσος όρος των πειραματικών μετρήσεων

t = σταθερά συναρτήσει του επιπέδου αξιοπιστίας και του βαθμού ελευθερίας. Για αξιοπιστία 95% και για τρεις επαναλήψεις (n=3), t = 4,30.

n = ο αριθμός των μετρήσεων

- Να υπολογιστεί η συνολική αβεβαιότητα της μεθόδου προσδιορισμού της % περιεκτικότητας σε δραστική ουσία των αντιόξινων δισκίων.
- Συμπληρώνεται ο παρακάτω Πίνακας και σχολιάζονται τα αποτελέσματα.
- Εάν θεωρήσουμε ότι μία παθολογική δραστηριότητα του στομάχου κατά μέσο όρο παρουσιάζει μια υπερβολή παραγωγής οξέος της τάξης των 10 mmol ανά ώρα, ποια νομίζεται ότι πρέπει να είναι η δοσολογία του αντιόξινου σκευάσματος που εξετάσατε;

3. ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ομάδα εργασίας:

Δεδομένα - Υπολογισμοί	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3
Όνομα προϊόντος			
Δραστικό συστατικό			
Μάζα δισκίου			
Κανονικότητα διαλύματος HCl			
Όγκος δ/μ HCl που προστίθεται			
Κανονικότητα διαλύματος NaOH			
Αρχική ένδειξη προχοϊδας			
Τελική ένδειξη προχοϊδας			
Όγκος διαλύματος NaOH			
Μάζα δραστικού συστατικού			
% Περιεκτικότητα δισκίου σε δραστικό συστατικό			
Μέση % περιεκτικότητα χαπιού σε δραστικό συστατικό			
Εύρος			
% Σχετικό εύρος			
Τυπική απόκλιση			
% Σχετική τυπική απόκλιση			
Ικανότητα εξουδετέρωσης			
Προτεινόμενη δοσολογία			

2η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ
ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΝΕΡΟΥ

1. ΓΕΝΙΚΑ

Το νερό είναι απαραίτητο για την ζωή των ανθρώπων όχι μόνο γιατί αποτελεί το βασικότερο είδος διατροφής αλλά και γιατί αποτελεί μια από τις απαραίτητες πρώτες ύλες τόσο της πρωτογενούς παραγωγής, όπως είναι η γεωργία και η κτηνοτροφία, όσο και της δευτερογενούς παραγωγής, όπως είναι η βιομηχανία. Αποδεικνύεται ότι το νερό, ως φυσικός πόρος που συμμετέχει σε κάθε παραγωγική και αναπτυξιακή διαδικασία, έχει υπεισέλθει δυναμικά και προσδιορίζει πλέον τη δυνατότητα ή την αδυναμία επέκτασης των παραγωγικών δραστηριοτήτων, καθορίζοντας με αυτό τον τρόπο και την αποδοτικότητά τους. Συγχρόνως, καθώς ο πληθυσμός της γης αυξάνεται και η παραγωγή αγαθών αναπτύσσεται και εντατικοποιείται, το νερό γίνεται συνεχώς πολυτιμότερο.

Το νερό ως φυσική πρώτη ύλη, δεν αποτελεί καρπό μιας συγκομιδής, όπως άλλοι φυσικοί πόροι, ενώ έχει μια ιδιαίτερη κοινωνική και πολιτισμική αξία. Το μεγαλύτερο τμήμα της επιφάνειας της γης καλύπτεται από νερό, το οποίο όμως στο μεγαλύτερο ποσοστό του είναι πλούσιο σε διαλυμένα άλατα, με συνέπεια να είναι ακατάλληλο για κάλυψη ανθρώπινων αναγκών. Μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό υπόγειου και επιφανειακού νερού είναι κατάλληλο για ανθρώπινη χρήση και συνήθως εξαρτάται από τις κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν κάθε χρόνο, από την φυσική προσφορά και ζήτησή του από τους χρήστες και τις παρεμβάσεις του ανθρώπου ιδιαίτερα στα ποιοτικά του χαρακτηριστικά. Οι επιβλαβείς αλλοιώσεις στην ποιότητα το νερού έχουν ως συνέπεια πολλές φορές την απαγόρευση χρήσης του ή τουλάχιστον τον περιορισμό των δυνατοτήτων χρησιμοποίησής του.

2. ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

Για να αναπτύξει το σώμα του και να διασφαλίσει το μεταβολισμό και τις διάφορες λειτουργίες του, ο άνθρωπος αντλεί τα απαραίτητα στοιχεία από το εξωτερικό περιβάλλον, κυρίως μέσα από την τροφή του. Η τροφή πρέπει να παρέχει στον άνθρωπο συστατικά, όπως τα αμινοξέα, οι βιταμίνες και τα ανόργανα άλατα, τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και διατήρηση των κυττάρων και των ιστών του, καθώς και πηγές χημικής ενέργειας με την μορφή γλυκιδίων, λιπιδίων και πρωτεϊνών. Το πιο απαραίτητο πάντως θρεπτικό συστατικό εξακολουθεί να παραμένει το νερό. "**Ζωτικότερον γης, ύδωρ**" είπε ο Αριστοτέλης. Το ανθρώπινο σώμα λειτουργεί μέσα από ένα "κυκλοφοριακό χείμαρρο", ο οποίος μεταφέρει τα θρεπτικά συστατικά στα διάφορα σημεία του.

Το νερό εισέρχεται στο σώμα μας ως πόσιμο, ή σε συνδυασμό με άλλες τροφές ή ποτά μεταφέροντας ανόργανα άλατα, σε ποσότητες πολύ μικρές σε σχέση με την ποσότητά του, των οποίων η ευνοϊκή ή δυσμενής επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό είναι σημαντική. Οι ενήλικες χρειάζονται ημερησίως 35g έως 50g νερού για κάθε κιλό βάρους του σώματός τους κάτω από κανονικές κλιματολογικές συνθήκες, ενώ τα νήπια κάτω από τις ίδιες συνθήκες χρειάζονται αντίστοιχα 100g έως 150g, δηλαδή τρεις φορές περισσότερο απ' ότι οι ενήλικες. Αυτός είναι ο βασικός λόγος που τα παιδιά γενικά είναι περισσότερο ευαίσθητα σε ασθένειες που μεταδίδονται με το νερό.

3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΔΑΤΩΝ

Το νερό κάθε προέλευσης (θαλασσινό, πηγών, επιφανειακό) έχει καθοριστεί να ελέγχεται ποικιλοτρόπως και περιοδικώς, εξαιτίας της μεγάλης σπουδαιότητας και αναγκαιότητάς του ως κοινωνικού αγαθού πρώτης προτεραιότητας.

Οι έλεγχοι που προβλέπονται είναι πολλαπλοί και οι παράμετροι που ελέγχονται μπορούν να ενταχθούν σε μια από τις επόμενες κατηγορίες:

- Παράμετροι Οργανοληπτικού Ελέγχου
- Παράμετροι Γενικού Φυσικοχημικού Ελέγχου
- Παράμετροι Ελέγχου της Ρύπανσης των Νερών
- Βιολογικές Παράμετροι
- Μικροβιολογικές Παράμετροι
- Ραδιολογικές Παράμετροι
- Ειδικό Έλεγχοι

Ο οργανοληπτικός έλεγχος περιλαμβάνει έλεγχο όλων των παραμέτρων που σχετίζονται με την εμφάνιση και τα γενικά εξωτερικά χαρακτηριστικά του νερού τα οποία κρίνονται συνήθως υποκειμενικά. Τα χαρακτηριστικά αυτά ενδεχόμενα σχετίζονται με την προέλευση του νερού, τη μέθοδο επεξεργασίας του, καθώς επίσης και με το δίκτυο διανομής. Οι παράμετροι που εξετάζονται κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο είναι η οσμή, η γεύση, το χρώμα, η θολερότητα και τα στερεά.

Ο φυσικοχημικός έλεγχος περιλαμβάνει ελέγχους φυσικοχημικών ιδιοτήτων του νερού οι οποίες έχουν πρακτικό ενδιαφέρον για την ποιότητα, την επεξεργασία και τη διάθεσή του. Το νερό διαλύει ή μεταφέρει ως αιωρούμενα στερεά διάφορα συστατικά, τα οποία του προσδίδουν χημικά χαρακτηριστικά βιολογικής σπουδαιότητας. Ο τύπος, το μέγεθος και η αλληλεπίδραση των υλικών αυτών προσδιορίζουν διάφορα χαρακτηριστικά του νερού, όπως είναι η ποσιμότητα και η διαβρωτικότητα.

Οι φυσικοχημικές παράμετροι του νερού είναι η θερμοκρασία του, η αγωγιμότητα, η ενεργός οξύτητα (pH), η οξύτητα, η αλκαλικότητα, η σκληρότητα, τα χλωριούχα, η χλωριότητα, η αλατότητα.

4. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΕΡΟΥ

4.1. Γεύση

Η γεύση του νερού οφείλει να είναι ευχάριστη. Σε κάθε άλλη περίπτωση κρίνεται ακατάλληλο για πόση. Η αφαίρεση των ενώσεων που προκαλούν γευστική αλλοίωση γίνεται με διέλευση του νερού από στήλη ενεργού άνθρακα.

Τα προβλήματα γεύσης στο νερό οφείλονται στα διαλυμένα άλατα (TDS), καθώς επίσης στην παρουσία κάποιων συγκεκριμένων μετάλλων όπως είναι ο σίδηρος, ο χαλκός, το μαγγάνιο και ο ψευδάργυρος. Γενικά, τα νερά με σύνολο διαλυμένων αλάτων (TDS) μικρότερο από 1200 mg/L δεν παρουσιάζουν προβλήματα γεύσης και είναι αποδεκτά από τον καταναλωτή, αν και πρέπει να προτιμάται συγκέντρωση TDS μικρότερη από 500mg/L.

Το πιο κοινό παράπονο των καταναλωτών για το νερό των δικτύων ύδρευσης, σε σχέση με την οσμή και την γεύση, αφορά την χλωρίωση. Το όριο γεύσης του χλωρίου σε ουδέτερο pH είναι 0,2 mg/L το οποίο αυξάνει σε 0,5 mg/L για την τιμή pH=9. Επίσης, το όριο γεύσης της μονοχλωραμίνης εκτιμάται σε 0,48 mg/L. Το μεγαλύτερο όμως πρόβλημα με τη χλωρίωση του νερού είναι η δημιουργία οσμής και γεύσης από τις ενώσεις που προκύπτουν κατά την αντίδραση του χλωρίου με τα οργανικά συστατικά του νερού, όπως η φαινόλη.

4.2. Θολερότητα

Καθοριστική παράμετρος που μπορεί να περιορίσει τις χρήσεις του νερού. Οφείλεται στην παρουσία αιωρούμενων σωματιδίων ζωϊκής ή φυτικής προέλευσης ή λόγω παρουσίας ανόργανων ή οργανικών ενώσεων π.χ. σωματίδια ιλύος, υδροξειδίων σιδήρου και αργιλίου, πλαγκτόν.

Το πόσιμο νερό πρέπει να είναι διαυγές όταν φθάνει στον καταναλωτή. Γι αυτό αναφέρεται ανώτατο όριο για την θολερότητα στις υγειονομικές διατάξεις. Η διύλιση του νερού γίνεται δυσκολότερη και πιο δαπανηρή όσο αυξάνει η θολερότητα. Επίσης η απολύμανση του πόσιμου νερού δεν είναι αποτελεσματική αν υπάρχει θολερότητα, γιατί πολλοί παθογόνοι οργανισμοί εγκλωβίζονται στα σωματίδια που αιωρούνται και προστατεύονται από το απολυμαντικό. Επομένως η μέτρηση της θολερότητας στο νερό είναι σημαντική.

Για τη μέτρηση της θολερότητας χρησιμοποιούνται απλές οπτικές μέθοδοι αλλά και η νεφελομετρία. Οι απλές μέθοδοι μετρούν την παρεμβολή που προκαλείται από την θολερότητα στη διέλευση του φωτός. Κατά την νεφελομετρική μέθοδο μία πηγή φωτός φωτίζει το δείγμα και ένας ή περισσότεροι φωτοηλεκτρονικοί ανιχνευτές μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός σε ορθές γωνίες προς την διεύθυνση του προσπίπτοντος φωτός.

4.3. Στερεά

Η παρουσία των στερεών ουσιών επηρεάζει την ικανότητα χρήσης του νερού, αλλά και την διαχείριση των υγρών αποβλήτων. Η παράμετρος των στερεών περιλαμβάνει τις εξής κατηγορίες :

(i) Ολικά στερεά: Το σύνολο των στερεών ουσιών σε δείγμα νερού.

(ii) Αιωρούμενα στερεά: Ως αιωρούμενα στερεά στο νερό ορίζονται τα στερεά που περιέχονται σε αυτό σε μέγεθος μεγαλύτερο των μορίων, κατά κανόνα (όχι απαραίτητα) μη ορατά δια γυμνού οφθαλμού. Η κύρια πηγή προέλευσής τους είναι η αποσάθρωση των πετρωμάτων και οι βιολογικές διεργασίες. Τα άλγη και τα βακτήρια, καθώς και άλλοι ανώτεροι μικροοργανισμοί είναι τα κύρια είδη των αιωρούμενων στερεών βιολογικής προέλευσης.

Τα αιωρούμενα στερεά έχουν ευρεία επίδραση στην ποιότητα του νερού, η οποία εξαρτάται από τα φυσικά, χημικά και βιολογικά τους χαρακτηριστικά. Εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους έχουν μεγάλη ειδική επιφάνεια, η οποία συχνά λειτουργεί ως μέσο προσρόφησης-συγκράτησης τοξικών συστατικών, όπως είναι τα βαρέα μέταλλα και οι αλογονωμένοι υδρογονάνθρακες. Η μεγάλη επιφάνεια των αιωρούμενων στερεών προκαλεί ισχυρή διάχυση του φωτός, αλλοιώνοντας έτσι τη διαύγεια του νερού. Επίσης, τα αιωρούμενα στερεά, ως πηγή προσρόφησης διαφόρων ιόντων, παίζουν σπουδαίο ρόλο στο βιολογικό-γεωχημικό κύκλο.

(iii) Ολικά διαλυμένα στερεά (TDS): Τα ολικά διαλυμένα στερεά είναι μια μέτρηση όλων των ιόντων που υπάρχουν σε διάλυση. Η μέτρησή τους γίνεται με διήθηση του νερού για απομάκρυνση των αιωρούμενων στερεών, εξάτμιση μέχρι ξηρού του διηθήματος και ζύγιση του στερεού υπολείμματος. Αν και τα ολικά διαλυμένα στερεά δεν φαίνεται να είναι επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία, συνήθως συνιστάται να είναι λιγότερα από 500 mg/L στο πόσιμο νερό. Πάνω από αυτή τη συγκέντρωση το νερό σταδιακά αρχίζει να έχει ιδιάζουσα γεύση.

(iv) Καθιζάνοντα στερεά: Αποτελούν το σύνολο των στερεών ουσιών που καθιζάνουν από μόνες τους, χωρίς την χρήση κροκιδωτικών ή καταβυθιστικών ουσιών. Η παράμετρος αυτή χρησιμοποιείται πολύ στο σχεδιασμό και την αξιολόγηση των δεξαμενών καθίζησης.

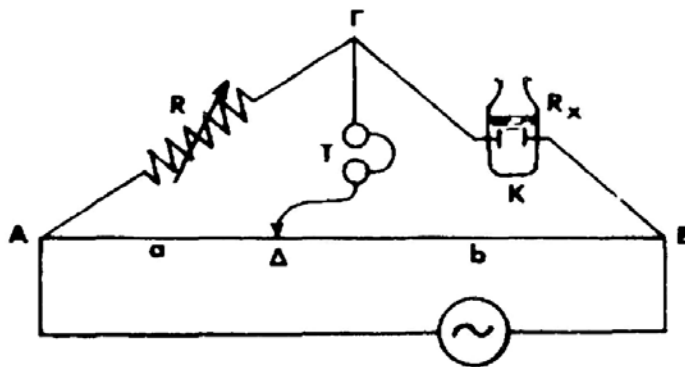
5. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΕΡΟΥ

5. 1. Ενεργός οξύτητα: Αντιστοιχεί στο pH του διαλύματος και αποτελεί σημαντική παράμετρο του ελέγχου των νερών και των υγρών αποβλήτων. Το pH του απεσταγμένου νερού, όπως και της βροχής, είναι περίπου 5,6, λόγω του διαλυμένου CO₂. Το pH των φυσικών νερών μπορεί να είναι από πολύ όξινο μέχρι βασικό ανάλογα με την προέλευσή τους. Επίσης το pH των υγρών αποβλήτων πρέπει να κυμαίνεται σε ορισμένη περιοχή τιμών μεταξύ 6,5 – 8,5.

5. 2. Αγωγιμότητα:

Με τον όρο αγωγιμότητα εννοούμε την ευκολία με την οποία το ηλεκτρικό ρεύμα διέρχεται μέσα από τους διάφορους αγωγούς, δηλαδή είναι το αντίθετο της ηλεκτρικής αντίστασης. Φορείς της αγωγιμότητας στους στερεούς αγωγούς είναι τα ελεύθερα ηλεκτρόνια.

Στην περίπτωση του νερού φορείς είναι τα διαλυμένα ιόντα (κατιόντα, ανιόντα). Η μέτρησή της γίνεται με την βοήθεια του αγωγιμομέτρου, του οποίου μια απλή σχηματική παράσταση φαίνεται παρακάτω.



Απλή διάταξη για την μέτρηση της αγωγιμότητας

Αντί της αγωγιμότητας συνήθως μετρείται η ειδική αγωγιμότητα (κ) με μονάδες $\text{Ohm}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ή mhos cm^{-1} ή mhos cm^{-1} .

Ο τύπος της είναι:

$$\kappa = \theta \cdot \Lambda_{\delta} \quad \text{όπου}$$

θ είναι η σταθερά της αγωγιμετρικής κυψέλης του αγωγιμέτρου με $\theta = K_0/\Lambda_0$

K_0 είναι η ειδική αγωγιμότητα του πρότυπου διαλύματος στη θερμοκρασία του πειράματος, σε mhos cm^{-1} ,

Λ_0 είναι η μετρούμενη αγωγιμότητα του πρότυπου διαλύματος στην ίδια θερμοκρασία, σε **mhos cm⁻¹**.

Λ_δ είναι η αγωγιμότητα του δείγματος νερού.

Η αγωγιμότητα του νερού είναι σπουδαιότατη παράμετρος στον έλεγχο της ποιότητας και του βαθμού ρύπανσης του νερού. Δίνει πληροφορίες για την ποσότητα των διαλυμένων αλάτων στο νερό και ειδικότερα για:

- Τον βαθμό καθαρότητας του απιονισμένου νερού
- Τον βαθμό επιβάρυνσης του νερού της βροχής με διάφορα ιόντα (φυσικές τιμές αγωγιμότητας βρόχινου νερού 20-50 mhos.cm⁻¹)
- Την ποσότητα διαλυμένων αλάτων σε δείγμα νερού.

5.3. Σκληρότητα

Ο όρος **ολική σκληρότητα νερού** εκφράζει το σύνολο των ιόντων του ασβεστίου (Ca²⁺) και του μαγνησίου (Mg²⁺), τα οποία βρίσκονται διαλυμένα σ' αυτό. Ανάλογα με το είδος των αλάτων του ασβεστίου και του μαγνησίου που περιέχονται στο νερό η ολική σκληρότητα διακρίνεται στην παροδική, που οφείλεται στα ευδιάλυτα όξινα ανθρακικά άλατα του ασβεστίου και του μαγνησίου και στη μόνιμη σκληρότητα, που οφείλεται στα χλωριούχα, θειϊκά, νιτρικά, πυριτικά, φωσφορικά και χουμικά άλατα του ασβεστίου και του μαγνησίου.

Η παροδική σκληρότητα εξαφανίζεται με το βρασμό του νερού (αντίδραση),



ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο με τη μόνιμη, όπως άλλωστε προδίδεται και από την ονομασία της. Το σύνολο της παροδικής και της μόνιμης σκληρότητας αποτελεί την ολική σκληρότητα του νερού, η οποία είναι σημαντικό ποιοτικό χαρακτηριστικό του πόσιμου νερού.

Η περιεκτικότητα σε άλατα του νερού έχει επίσης ιδιαίτερη αξία και στη βιομηχανική, αρδευτική, εργαστηριακή και οικιακή του χρήση.

Τα όρια της σκληρότητας για τα πόσιμα νερά είναι 100-500 mg/L. Τα σκληρά νερά έχουν γλυφή γεύση. Κατά γενική αντίληψη η σκληρότητα δεν έχει άμεση δυσμενή επίδραση στην υγεία, αν και ορισμένοι παραδέχονται ότι μπορεί να προκαλέσει βλάβες στα νεφρά ή εντερικές ανωμαλίες. Το κυριότερο μειονέκτημα του σκληρού νερού για τις οικιακές χρήσεις είναι η μεγάλη κατανάλωση σαπουνιού. Για πολλές βιομηχανίες το σκληρό νερό είναι τελείως ακατάλληλο, γιατί δημιουργεί ανωμαλίες στη λειτουργία των λεβήτων. Γι' αυτό γίνεται συνήθως αποσκλήρυνση του νερού, όταν η σκληρότητά του υπερβαίνει ορισμένα όρια.

Η σκληρότητα του νερού εκφράζεται σε **σκληρομετρικούς βαθμούς** (συνήθως γαλλικούς, γερμανικούς) ή σε **mg/L CaCO₃** (το σύνολο των αλάτων εκφράζεται με τη μορφή CaCO₃) ή σε **mg/L Ca²⁺**.

Ένας **γαλλικός βαθμός (°f)** σκληρότητας αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα αλάτων ασβεστίου και μαγνησίου ίση με 1mg CaCO₃ ανά 100mL δείγματος νερού (το σύνολο των αλάτων εκφράζονται σαν να ήταν με τη μορφή CaCO₃).

Ένας **γερμανικός βαθμός (°d)** σκληρότητας αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα αλάτων ασβεστίου και μαγνησίου ίση με 1mg CaO ανά 100mL δείγματος ύδατος (το σύνολο των αλάτων εκφραζόμενο με τη μορφή του CaO).

5. 4. Χλωριότητα – αλατότητα νερού:

Με τον όρο **χλωριότητα** (Cl ή Chlorinity) του νερού εκφράζεται συνολική ποσότητα αλογονούχων ιόντων (**Cl⁻, Br⁻, I⁻**) που υπάρχουν σε 1 Kg νερού.

Με τον όρο **αλατότητα** (S ή Salinity) του νερού εκφράζεται συνολική ποσότητα των αλάτων που υπάρχουν σε 1 kg θαλασσινού νερού και παραμένουν και μετά από την εξάτμιση του νερού και ξήρανση του ιζήματος.

Τα δύο παραπάνω μεγέθη εκφράζονται επί τοις χιλίοις και συνδέονται μεταξύ τους με τη σχέση: $S‰ = 1.800655 \cdot Cl‰$

Όπως φαίνεται από την παραπάνω σχέση, βάση για τον προσδιορισμό της αλατότητας ενός δείγματος νερού είναι ο προσδιορισμός της χλωριότητας. Η αλατότητα ενός δείγματος νερού μπορεί επίσης να προσδιοριστεί και αγωγιμομετρικά.

Η **αλατότητα** δίνει σημαντικές πληροφορίες για την ανάμειξη διαφορετικών νερών, όπως π.χ. στα δέλτα των ποταμών και είναι χαρακτηριστική παράμετρος των οστρακοκαλλιεργιών και της ανάπτυξης υδροβίων οργανισμών.

6. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΝΕΡΟ

6.1. Απεσταγμένο νερό

Είναι η επιθυμητή μορφή ύδατος για κάθε είδους εργαστηριακή χρήση, αφού περιέχει μόνο ύδωρ και προκύπτει από την απόσταξη και συμπύκνωση του πόσιμου νερού. Δεν περιέχει ιόντα, ούτε οποιουδήποτε τύπου ξένες ουσίες. Παρόλα αυτά έχει το μειονέκτημα του υψηλού κόστους παραγωγής του με αποτέλεσμα να μην χρησιμοποιείται όσο θα ήταν επιθυμητό.

6. 2. Απιονισμένο νερό:

Είναι η συνήθως χρησιμοποιούμενη μορφή εργαστηριακού νερού και προκύπτει με την μέθοδο της ιοντοανταλλαγής. Κατά αυτή την μέθοδο πόσιμο νερό διέρχεται μέσα από σύστημα ιοντοανταλλακτικών ρητινών (πολυμερείς οργανικές ενώσεις). Οι ρητίνες αποσπούν τα κατιόντα (κατιοντοανταλλακτικές ρητίνες) και τα ανιόντα (ανιοντοανταλλακτικές ρητίνες) με αποτέλεσμα να παράγεται νερό χωρίς περιεχόμενο σε άλατα. Όμως τελικά το απιονισμένο νερό θα περιέχει και ιχνοποσότητες ρητίνης, οπότε καθίσταται αμφίβολη η χρήση του σαν ποσίμου.

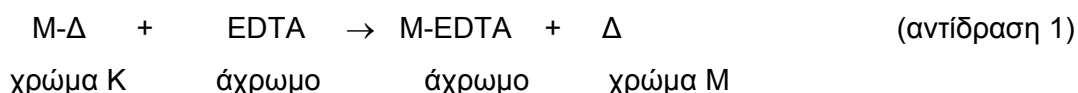
7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΚΛΗΡΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ

Εφ' όσον πρόκειται για πόσιμο νερό, για το οποίο θεωρούμε ότι είναι απαλλαγμένο από ιόντα όπως Fe^{3+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} κ.α., ο προσδιορισμός του συνόλου των ιόντων Ca^{2+} και Mg^{2+} , που περιέχονται σ' αυτό γίνεται με συμπλοκομετρική ογκομέτρηση με πρότυπο διάλυμα EDTA και παρουσία μεταλλικού δείκτη EBT.

Στις συμπλοκομετρικές ογκομετρήσεις χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια, τα οποία σχηματίζουν με τα κατιόντα των υπό προσδιορισμό μετάλλων ενώσεις συναρμογής (σύμπλοκα). Το αντιδραστήριο με την ευρύτερη εφαρμογή είναι το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ ή EDTA, το οποίο σχηματίζει με πολλά κατιόντα σταθερές, άχρωμες και υδατοδιαλυτές σύμπλοκες ενώσεις.

Το τελικό σημείο των συμπλοκομετρικών ογκομετρήσεων καθορίζεται με τη βοήθεια ειδικής κατηγορίας δεικτών, των μεταλλικών δεικτών. Οι μεταλλικοί δείκτες είναι οργανικές ενώσεις, οι οποίοι έχουν την ικανότητα συμπλεκόμενοι με τα μεταλλοκατιόντα, να σχηματίζουν σύμπλοκες ενώσεις, των οποίων το χρώμα είναι διαφορετικό από το χρώμα του μεταλλικού δείκτη σε ελεύθερη κατάσταση (μη συναρμοσμένου).

Κατά τη συμπλοκομετρική ογκομέτρηση προστίθενται στο προς ογκομέτρηση διάλυμα μερικές σταγόνες δείκτη (Δ), ο οποίος συμπλέκεται με το κατιόν (M) και το διάλυμα χρωματίζεται από το χρώμα αυτής της όχι πολύ σταθεράς συμπλόκου ενώσεως ($M-\Delta$). Με την πρόσθεση των πρώτων σταγόνων EDTA αρχίζουν να συμπλέκονται τα ελεύθερα κατιόντα (δηλαδή αυτά που δε έχουν συμπλακεί με το δείκτη) με το EDTA προς σχηματισμό σταθερής, άχρωμης συμπλόκου ενώσεως $M-EDTA$. Όσο πλησιάζουμε στο ισοδύναμο σημείο αρχίζει να πραγματοποιείται η αντίδραση (1),



οπότε το διάλυμα αρχίζει να αλλάζει χρώμα καθώς απελευθερώνεται βαθμιαία ο δείκτης σε ελεύθερη κατάσταση. Στο ισοδύναμο σημείο, στο οποίο δεσμεύονται από το EDTA όλα τα μεταλλοκατιόντα, το διάλυμα χρωματίζεται από το χρώμα του δείκτη σε ελεύθερη μορφή. Το

τελικό σημείο της ογκομέτρησης προσδιορίζεται από αυτή τη μεταβολή του χρώματος του διαλύματος.

ΠΕΙΡΑΜΑ 1

Προσδιορισμός της σκληρότητας στο πόσιμο νερό

Όργανα - Συσκευές

Κωνικές φιάλες των 250 mL, Σιφώνια των 10, 100 mL, Προχοϊδες

Αντιδραστήρια

EDTA 2Na στερεό,

MgCl₂·6H₂O στερεό,

CaCO₃ στερεό, ξηραμένο

Διάλυμα HCl 2N,

Ρυθμιστικό διάλυμα NH₄OH-NH₄Cl (pH=10),

Διάλυμα NaOH 2N,

Διάλυμα δείκτη Eriochrome Black T (EBT),

Στερεό NH₄Cl, Πυκνή NH₃,

Διάλυμα δείκτη Calcon

Παρασκευή διαλύματος 0,01 M EDTA

Σε ποτήρι ζέσεως των 400 mL παίρνουμε από 3,5-4,0 g του δινάτριου άλατος του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA) και 0,1 g MgCl₂·6H₂O. Διαλύονται σε νερό και τα μεταφέρουμε σε ογκομετρική φιάλη του 1L όπου συμπληρώνουμε μέχρι την χαραγή.

Παρασκευή προτύπου διαλύματος CaCl₂ (0,01 M)

Ζυγίζουμε με ακρίβεια 0,10 g CaCO₃ (το CaCO₃ πρέπει να έχει προηγουμένως ξηρανθεί για μια τουλάχιστον ώρα στους 110°C), το μεταφέρουμε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, προσθέτουμε περίπου 50 mL νερό και αργά περίπου 5 mL 2N HCl μέχρι την πλήρη διαλυτοποίησή του CaCO₃. Συμπληρώνουμε με νερό μέχρι την χαραγή.

Προτυποποίηση διαλύματος 0,01 M EDTA

Σε κωνική φιάλη των 250 mL βάζουμε με σιφώνιο 25 mL του προτύπου διαλύματος ασβεστίου, 8 mL ρυθμιστικό διάλυμα pH=10 και 4 σταγόνες δείκτη EBT.

Ογκομετρούμε με το διάλυμα EDTA μέχρι να αλλάξει το χρώμα από βαθύ κόκκινο σε καθαρό γαλάζιο. Πριν από την κύρια ογκομέτρηση εκτελείται τυφλός προσδιορισμός όπου σε φιάλη των 250 mL βάζουμε με σιφώνιο 25 mL διαλύματος HCl 0,1N (σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL προστίθενται 5 mL HCl 2N και ο όγκος συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό μέχρι τη χαραγή), 8 mL ρυθμιστικό διάλυμα pH=10 και 4 σταγόνες δείκτη EBT και το διάλυμα ογκομετρείται με το διάλυμα EDTA.

Η ογκομέτρηση τιτλοδότησης του EDTA επαναλαμβάνεται εις τριπλούν και υπολογίζεται η συγκέντρωση (τίτλος) του διαλύματος EDTA. Να υπολογιστεί η αβεβαιότητα του τίτλου.

Προσδιορισμός της ολικής σκληρότητας νερού

Σε κωνική φιάλη των 250 mL μεταφέρονται (με τη βοήθεια σιφωνίου πληρώσεως) 50 mL από το προς ανάλυση δείγμα του ύδατος, προστίθενται 8 mL ρυθμιστικού διαλύματος NH₄OH - NH₄Cl (pH=10) καθώς και 4-5 σταγόνες δείκτη Eriochrome Black T (EBT). Η ογκομέτρηση γίνεται με το πρότυπο διάλυμα EDTA (το οποίο προηγουμένως τιτλοδοτήσατε) μέχρι να παρατηρηθεί απότομη αλλαγή χρώματος από κόκκινο σε μπλε.

Η ολική σκληρότητα του δείγματος νερού δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\text{Ολική Σκληρότητα σε mg CaCO}_3/\text{L} = V_{\text{EDTA}} M_{\text{EDTA}} MB_{\text{CaCO}_3} 100 / V_{\text{δείγματος}}$$

όπου V_{EDTA} ο όγκος του πρότυπου διαλύματος EDTA που καταναλώθηκε και M_{EDTA} η μοριακότητά του.

- Η μέτρηση εκτελείται εις τριπλούν και υπολογίζεται η μέση τιμή
- Το αποτέλεσμα των ποσοτικών αναλύσεων να παρουσιαστεί με τη μορφή της υπό του αναλυτού προτεινόμενης αληθούς τιμής (μ):

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{t \times s_{\bar{x}}}{\sqrt{n}} \quad \text{με} \quad s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x}_i)^2}{n - 1}}$$

όπου:

\bar{x} ο μέσος όρος των πειραματικών μετρήσεων

t = σταθερά συναρτήσεως του επιπέδου αξιοπιστίας και του βαθμού ελευθερίας. Για αξιοπιστία 95% και για τρεις επαναλήψεις (n=3), t = 4,30.

n = ο αριθμός των μετρήσεων

- Να υπολογιστεί η συνολική αβεβαιότητα της μεθόδου προσδιορισμού της ολικής σκληρότητας του νερού.

Προσδιορισμός σκληρότητας ασβεστίου και σκληρότητας μαγνησίου

Σε κωνική φιάλη των 250 mL μεταφέρονται (με τη βοήθεια σιφωνίου πληρώσεως) 100 mL από το προς ανάλυση δείγμα του ύδατος, προστίθενται 10 mL διαλύματος NaOH 2N και 4-5 σταγόνες **δείκτη Calcon**. Το διάλυμα χρωματίζεται κόκκινο. Στην συνέχεια το διάλυμα ογκομετρείται με το πρότυπο διάλυμα EDTA. Η ογκομέτρηση τελειώνει όταν το διάλυμα από κόκκινο γίνει απότομα κυανούν.

Η σκληρότητα που προσδιορίζεται με την ογκομέτρηση αυτή αντιστοιχεί στα κατίοντα ασβεστίου και υπολογίζεται από σχέση ανάλογη με την παραπάνω. Η σκληρότητα μαγνησίου βρίσκεται με απλό υπολογισμό αφαιρώντας από τη συνολική τη σκληρότητα ασβεστίου.

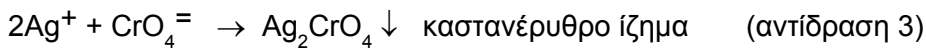
8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΛΩΡΙΟΥΧΩΝ ΣΤΟ ΝΕΡΟ

Τα χλωριούχα στο πόσιμο νερό μπορεί να έχουν φυσική προέλευση (περιοχές με κρυσταλλικά πετρώματα NaCl, KCl κ.λ.π.) ή να προέρχονται από διεργασίες, απαραίτητες για να γίνει το νερό πόσιμο (απολύμανση, χλωρίωση).

Ο προσδιορισμός των χλωριούχων σε υδατικά διαλύματα γίνεται με ογκομετρία καθίζησης με πρότυπο διάλυμα νιτρικού αργύρου. Η βασική αντίδραση στην οποία στηρίζεται ο προσδιορισμός είναι:

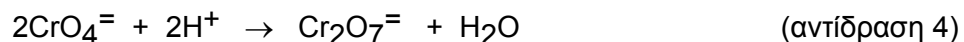


Ο προσδιορισμός των χλωριούχων με τη μέθοδο του Mohr βασίζεται στην κλασματική καθίζηση των χλωριούχων παρουσία χρωμικών ιόντων. Προηγείται η ποσοτική καταβύθιση των χλωριούχων σαν AgCl (λευκό ίζημα) και ακολουθεί η καταβύθιση των χρωμικών σαν Ag₂CrO₄ (καστανέρυθρο ίζημα).

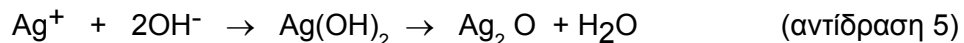


Στο ισοδύναμο σημείο, όταν όλα τα χλωριούχα έχουν καταβυθισθεί σαν AgCl (αντίδραση 2), μικρή περίσσεια Ag⁺ αντιδρά με τα χρωμικά και σχηματίζει τον χρωμικό άργυρο Ag₂CrO₄ (αντίδραση 3). Το τελικό σημείο της ογκομέτρησης καθορίζεται από την εμφάνιση καστανέρυθρου χρώματος, που οφείλεται στο σχηματισμό του Ag₂CrO₄.

Η εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει ρύθμιση του ογκομετρούμενου διαλύματος μεταξύ 7 και 10. Σε όξινο περιβάλλον μειώνεται σημαντικά η συγκέντρωση των χρωμικών (αντίδραση 4) με συνέπεια το μη σχηματισμό του χρωμικού αργύρου.



Τα δε διχρωμικά ιόντα, που προκύπτουν δεν σχηματίζουν ίζημα με τα ιόντα του αργύρου. Αντίθετα σε ισχυρά αλκαλικό περιβάλλον υπάρχει κίνδυνος σχηματισμού δυσδιάλυτου υδροξειδίου του αργύρου (αντίδραση 5).



Πρέπει επίσης να προσεχθεί ώστε η θερμοκρασία του διαλύματος να μην υπερβαίνει τους 30°C καθώς η ευαισθησία του δείκτη μειώνεται σημαντικά (μεταβολή της διαλυτότητας του χρωμικού αργύρου με τη θερμοκρασία).

Η μέθοδος αυτή συνίσταται για περιεκτικότητες Cl⁻ πλέον των 10 mg L⁻¹. Τα αποτελέσματα δίνονται με προσέγγιση 1 mg L⁻¹ Cl⁻.

Από την βιβλιογραφία προκύπτει ότι ο προσδιορισμός χλωριούχων σε συνθετικό δείγμα που ήταν άγνωστο για 40 εργαστήρια έδωσε σχετικό σφάλμα 1,7 % και σχετική σταθερή απόκλιση 4,2%. Η σύσταση του συνθετικού δείγματος ήταν ανά λίτρο 241 mg χλωριούχων,

108 mg ασβεστίου, 82 mg μαγνησίου, 3,1 mg καλίου, 19,9 mg νατρίου, 1.1 mg αζώτου νιτρωδών, 259 mg θειικών και 42,5 mg ολικής αλκαλικότητας (εκ του NaHCO_3)

Ιόντα που παρεμποδίζουν είναι τα βρωμιούχα τα ιωδιούχα και τα κυανιούχα ιόντα, τα οποία συμπροσδιορίζονται. Επίσης παρεμποδίζουν τα φωσφορικά ιόντα όταν βρίσκονται σε σημαντικές συγκεντρώσεις ($>25\text{mg/L}$) όπως και τα ιόντα σιδήρου ($>10\text{mg/L}$) γιατί επικαλύπτουν το τελικό σημείο.

Σφάλμα της μεθόδου: Λόγω της αρκετά μεγάλης διαφοράς στη διαλυτότητα του AgCl και του Ag_2CrO_4 , για την επίτευξη του γινομένου διαλυτότητας του χρωμικού αργύρου είναι απαραίτητη μια αισθητή περίσσεια ιόντων αργύρου. Έτσι ο δείκτης "αντιδρά" κατά κάποιο τρόπο με μικρή καθυστέρηση σε σχέση με το πραγματικό ισοδύναμο σημείο της αντίδρασης.

Το σφάλμα αυτό μπορεί να διορθωθεί με λευκό προσδιορισμό, με ογκομέτρηση δηλαδή κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες, ενός δείγματος που δεν περιέχει χλωριούχα (π.χ. απεσταγμένο νερό). Η ποσότητα του νιτρικού αργύρου που καταναλώθηκε κατά τον λευκό προσδιορισμό αφαιρείται από την ποσότητα που καταναλώνεται για κάθε ογκομέτρηση.

ΠΕΙΡΑΜΑ 2

Προσδιορισμός χλωριούχων στο πόσιμο νερό

α) Αντιδραστήρια

Πρότυπο διάλυμα νιτρικού αργύρου, 0,0282 N

Δείκτης χρωμικού καλίου

β) Όργανα - Συσκευές

2 προχοϊδες των 50 mL, βαθμολογημένες σε 0,1mL, 1 κωνική φιάλη των 250 mL

2 ογκομετρικές φιάλες του 1L, 1 σκουρόχρωμη φιάλη του 1L

Παρασκευή και τιτλοδότηση διαλύματος AgNO_3

Διαλύονται 1,6986 g AgNO_3 αναλυτικώς καθαρού σε δις απεσταγμένο νερό (που δεν περιέχει χλωριούχα) και αραιώνεται στα 1000 mL. Μετά από καλή ανακίνηση, το διάλυμα μεταφέρεται σε σκουρόχρωμη φιάλη.

Για την τιτλοδότηση του διαλύματος αυτού παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,0100N, με διάλυση 0,5845g NaCl (αναλυτικώς καθαρού μετά από ξήρανση στους 140°C) σε δις απεσταγμένο νερό και αραιώση στα 1000 mL.

Προσδιορισμός χλωριούχων

Παίρνουμε δείγμα νερού 100 mL ή μικρότερο όγκο που αραιώνεται στα 100 mL. Το pH του δείγματος ρυθμίζεται ώστε να είναι μεταξύ των τιμών 7-10. Προστίθεται 1 mL από το διάλυμα του δείκτη και ογκομετρείται με το πρότυπο διάλυμα του AgNO₃ μέχρι να εμφανισθεί καστανέρυθρο χρώμα.

Υπολογισμοί

Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας του δείγματος σε χλώριο δίνεται από την σχέση:

$$Cl^- (mg.L^{-1}) = (V_{\pi} - V_a) \times N \times MB_{Cl} / V_{\delta}$$

όπου

V_π = ο όγκος πρότυπου διαλύματος AgNO₃ σε mL για το δείγμα

V_a = ο αντίστοιχος όγκος για το τυφλό προσδιορισμό (blanc)

V_δ = ο όγκος του δείγματος σε mL

N = η κανονικότητα του διαλύματος AgNO₃ (παρατ. 2)

Εάν θέλουμε να υπολογίσουμε την αντίστοιχη περιεκτικότητα σε NaCl χρησιμοποιούμε την σχέση :

$$mg L^{-1} NaCl = 1,65 mg L^{-1} Cl^-$$

Στην συνέχεια συμπληρώνεται ο πίνακας των δεδομένων και υπολογίζεται η συγκέντρωση των χλωριούχων στο νερό.

9. ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΝΕΡΩΝ

Η αγωγιμότητα του νερού οφείλεται στην ύπαρξη διαλυμένων αλάτων. Δείκτης της αγωγιμότητας του νερού είναι η ειδική αγωγιμότητα (κ). Η τιμή της ειδικής αγωγιμότητας επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία και αυξάνει με αυτή. Για το λόγο αυτό σε κάθε μέτρηση πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η θερμοκρασία του δείγματος. Για την μέτρησή της ειδικής αγωγιμότητας χρησιμοποιείται το αγωγιμόμετρο.

ΠΕΙΡΑΜΑ 3

Προσδιορισμός αγωγιμότητας

Θα γίνει προσδιορισμός αγωγιμότητας σε τρία δείγματα νερού (βρύσης, απιονισμένο, πηγής).

Πριν από την μέτρηση της αγωγιμότητας κάθε δείγματος προσδιορίζεται η σταθερά αγωγιμομετρικής κυψέλης, με την εισαγωγή στην κυψέλη του αγωγιμομέτρου ποσότητας διαλύματος 0,1M KCl γνωστής αγωγιμότητας.

Καταγράφεται η μετρούμενη τιμή της αγωγιμότητας του διαλύματος και υπολογίζεται η τιμή της σταθεράς αγωγιμομετρικής κυψέλης (θ) που παρέχεται από την σχέση:

$$\theta = K_0 / \Lambda_0$$

όπου:

K_0 είναι η ειδική αγωγιμότητα του πρότυπου διαλύματος στη θερμοκρασία του πειράματος, σε $\text{mhos} \cdot \text{cm}^{-1}$,

Λ_0 είναι η μετρούμενη αγωγιμότητα του πρότυπου *διαλύματος* στην ίδια θερμοκρασία, σε $\text{mhos} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Η τιμή της K_0 λαμβάνεται από τον παρακάτω πίνακα:

Τιμές ειδικής αγωγιμότητας διαλυμάτων KCl σε $\text{mhos} \cdot \text{cm}^{-1}$

KCl M	18 °C	20 °C	25 °C
0,1M	11,191	11,676	12,886
0,01M	1,223	1,278	1,412

Ακολουθεί η μέτρηση της αγωγιμότητας καθενός από τα δείγματα, καταγραφή των τιμών της αγωγιμότητας. Τελικά υπολογίζεται η τιμή της ειδικής αγωγιμότητας κ_δ για κάθε δείγμα από την σχέση: $\kappa_\delta = \theta \cdot \Lambda_\delta$ όπου:

θ είναι η σταθερά της αγωγιμομετρικής κυψέλης του αγωγιμέτρου,

Λ_δ είναι η αγωγιμότητα του δείγματος νερού.

10. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

ανίχνευση χλωριούχων

Η παρουσία χλωριούχων σε υδατικά διαλύματα ανιχνεύεται από το σχηματισμό θολώματος που παρατηρείται μετά από προσθήκη μερικών σταγόνων διαλύματος Ag^+ (διάλυμα AgNO_3) στο υδατικό διάλυμα, το οποίο προηγουμένως έχει οξινισθεί με HNO_3 . Το σχηματιζόμενο ίζημα (AgCl) είναι αδιάλυτο σε HNO_3 και διαλυτό στην αμμωνία.

ανίχνευση θειϊκών

Η παρουσία θειϊκών σε υδατικά διαλύματα ανιχνεύεται από το σχηματισμό θολώματος που παρατηρείται μετά από προσθήκη μερικών σταγόνων διαλύματος Ba^{2+} (διάλυμα BaCl_2) στο υδατικό διάλυμα, λόγω σχηματισμού του λευκού ιζήματος BaSO_4 .

ανίχνευση ανθρακικών

Τα ανθρακικά ανιχνεύονται σε στερεά δείγματα από την έκλυση αερίου CO₂, που παρατηρείται μετά από επίδραση οξέων (HCl 4N, CH₃COOH 4N). Το CO₂ όταν περάσει μέσα από διάλυμα Ba(OH)₂ ή Ca(OH)₂ δημιουργεί θόλωμα λόγω σχηματισμού λευκού ιζήματος BaCO₃ ή CaCO₃.

ανίχνευση νιτρώδων

Τα νιτρώδη ιόντα ανιχνεύονται σε υδατικά διαλύματα από το σχηματισμό ενώσεως με χαρακτηριστικό βαθύ κόκκινο χρώμα κατόπιν προσθήκης σε μικρή ποσότητα δείγματος ύδατος σταγόνων διαλύματος σουλφανιλαμιδίου και σταγόνων διαλύματος N-(1-ναφθυλο)αιθυλενοδιαμίνης. Η αντίδραση αυτή είναι ειδική για τα νιτρώδη ιόντα και σ' αυτή βασίζεται και ο ποσοτικός προσδιορισμός των NO₂⁻ φασματοφωτομετρικά. Επίσης στην αντίδραση αυτή βασίζεται και ο ποσοτικός προσδιορισμός των νιτρικών (NO₃⁻), τα οποία προσδιορίζονται αφού αναχθούν (παρουσία καδμίου) σε νιτρώδη.

11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Γ. ΒΑΣΙΛΙΚΙΩΤΗΣ, "Χημεία Περιβάλλοντος", Θεσ/νίκη 1984.
2. Γ. ΒΟΥΛΓΑΡΟΠΟΥΛΟΣ, Γ. ΖΑΧΑΡΙΑΔΗΣ και Ι. ΣΤΡΑΤΗΣ, "Εισαγωγή στην Ποσοτική Χημική Ανάλυση", 1999, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.
3. Σ. ΓΚΛΑΒΑΣ, "Εργαστηριακές Ασκήσεις Ποσοτικής Ανάλυσης", Παν/μιο Πατρών,
4. Πάτρα 1987
5. Π. ΙΩΑΝΝΟΥ, "Βασικές Αρχές Ποσοτικής Ανάλυσης", Πάτρα 1992.
6. Ν. ΚΑΤΣΙΡΗΣ " Χημεία Περιβάλλοντος", Υγειονομική Σχολή Αθηνών, Αθήνα 1991
7. Θ. ΚΟΥΙΜΤΖΗ, Κ. ΣΑΜΑΡΑ-ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ, "Έλεγχος Ρύπανσης Περιβάλλοντος"
8. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσ/νίκη 1994.
9. Μ. ΜΗΤΡΑΚΑΣ, "Ποιοτικά Χαρακτηριστικά και Επεξεργασία Νερού", Θεσ/νίκη 1996
10. Κ. ΞΕΝΟΣ, "Εργαστηριακές Ασκήσεις Αναλυτικής Χημείας", Μακεδονικές Εκδόσεις 1999
11. Ι. ΣΤΡΑΤΗΣ, Γ. ΖΑΧΑΡΙΑΔΗΣ και Γ. ΒΟΥΛΓΑΡΟΠΟΥΛΟΣ. "Εργαστηριακές μέθοδοι Ποσοτικής Χημικής Ανάλυσης", 2000, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.
12. Θ. ΧΑΤΖΗΩΑΝΝΟΥ, Α. ΚΑΛΟΚΑΙΡΙΝΟΣ και Μ. ΤΙΜΟΘΕΟΥ-ΠΟΤΑΜΙΑ. "Ποσοτική Ανάλυση", Αθήνα 2000.

12. ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Ολική σκληρότητα

Όγκος προτύπου διαλύματος EDTA, που καταναλώθηκε

V : _____

Μοριακότητα προτύπου διαλύματος EDTA

M : _____

Όγκος δείγματος, που χρησιμοποιήθηκε

V_δ: _____

Ισχύει 1 mL EDTA (0,01M) = 0,4008 mg Ca²⁺

Σκληρότητα ασβεστίου και μαγνησίου

.....
.....
.....

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Περιεκτικότητα Ca²⁺ σε 100 mL δείγματος νερού : ___ mg/100mL

Περιεκτικότητα Mg²⁺ σε 100 mL δείγματος νερού : ___ mg/100mL

Περιεκτικότητα CaCO₃ σε 100 mL δείγματος νερού : ___ mg/100mL

Σκληρότητα νερού σε Γαλλικούς βαθμούς : ___ (°f)

Σκληρότητα νερού σε ppm CaCO₃ : ___ ppm

Αγωγιμότητα : ___

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ

ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Όγκος δείγματος που ογκομετρήθηκε V_{δ} : _____
Κανονικότητα προτύπου διαλύματος N _____
Όγκος διαλύματος $AgNO_3$ N που καταναλώθηκε
κατά την ογκομέτρηση του δείγματος (φιάλη Π) V_{π} : _____
Όγκος διαλύματος $AgNO_3$ N που καταναλώθηκε
κατά τον τυφλό προσδιορισμό (φιάλη Α) V_a : _____

Η συγκέντρωση των χλωριούχων σε **mg Cl⁻/L** δίνεται από τη σχέση:

mg Cl⁻/L =

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Περιεκτικότητα του δείγματος σε Cl^- (mg/L) : _____
Περιεκτικότητα του δείγματος σε Cl^- (ppm) : _____
Περιεκτικότητα του δείγματος σε Cl^- (meq/L) : _____
Περιεκτικότητα του δείγματος σε $NaCl$ (mg/L) : _____

3η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

1 ΓΕΝΙΚΑ

Σκοπός της άσκησης είναι η γνωριμία των φοιτητών με μία φασματοφωτομετρική μέθοδο και η εφαρμογή της στην ποσοτική ανάλυση. Η εφαρμογή αφορά μια φασματοφωτομετρική μέθοδο που πρωτοεμφανίστηκε το 1976 (Marion Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, volume 72, pages 248-254) και χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών.

2. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΟΡΑΤΟΥ – ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ (Vis-UV).

Όταν ορατό (λευκό) φως περάσει από ένα γυάλινο πρίσμα αναλύεται σε ένα συνεχές φάσμα από ακτινοβολίες σε διαφορετικά μήκη κύματος ($\lambda = 390-770 \text{ nm}$). Αν, πριν περάσει από το πρίσμα, το φως προσπέσει σε διάλυμα έγχρωμης ουσίας τότε το φάσμα παρουσιάζει μερικές σκοτεινές ταινίες που αντιστοιχούν στις ακτινοβολίες που απορροφούνται από την ουσία. Το τροποποιημένο αυτό φάσμα που προκύπτει λέγεται **φάσμα απορρόφησης** της ουσίας και είναι χαρακτηριστικό της ουσίας. Από τις διάφορες ακτινοβολίες που απορροφούνται από μία ένωση το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που απορροφάται σε μεγαλύτερο ποσοστό καλείται **μήκος κύματος μεγίστης απορρόφησης**, λ_{max} και είναι χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης ένωσης.

Εκτός από την ορατή ακτινοβολία διάφορες χημικές ενώσεις απορροφούν ακτινοβολίες στην περιοχή του υπεριώδους (200-390 nm) και υπερύθρου (770-1000 nm). Τα φάσματα ορατού και εγγύς υπεριώδους (Vis-UV) προέρχονται από ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις σχετικά χαμηλής ενέργειας. Δύο βασικές ομάδες χημικών ενώσεων εμπλέκονται σ' αυτά τα φάσματα: ενώσεις που περιέχουν μέταλλα (κυρίως μεταβατικά) και ενώσεις που εμφανίζουν δομές αρωματικών δακτυλίων ή συστημάτων συζυγιακών διπλών δεσμών. Οι ηλεκτρονικές μεταπτώσεις, που οφείλονται στις μοριακές απορροφήσεις είναι συνήθως πολύ ευρείες και γι' αυτό τα φάσματα μοριακής απορρόφησης ορατού και UV δεν παρουσιάζονται σαν γραμμικά φάσματα, αλλά παρουσιάζουν ευρείες (λίγο ή πολύ) κορυφές σε ορισμένα (για κάθε ένωση) μήκη κύματος.

Το ποσοστό της μονοχρωματικής ακτινοβολίας που απορροφάται από το διάλυμα μιας ουσίας είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης του διαλύματος, της διαδρομής της ακτινοβολίας, της φύσης της διαλυμένης ουσίας και του μήκους κύματος της ακτινοβολίας και

δίνεται από τον νόμο των **Lambert-Beer** :

$$A = \log P/P_0 = -\log T = \log(100/T\%) = abc_{g/l} = \epsilon bc_{mol/l}$$

όπου

A = απορρόφηση (absorbance),

P₀ = ισχύς προσπίπτουσας ακτινοβολίας,

P = ισχύς εξερχόμενης ακτινοβολίας,

T = διαπερατότητα (transmittance)

α = απορροφητικότητα (adsorptivity)

b = μήκος οπτικής διαδρομής

ε = μοριακή απορροφητικότητα (molar adsorptivity)

c = συγκέντρωση του διαλύματος

Στην πράξη η απορρόφηση μιας ουσίας σε διάλυμα δεν υπολογίζεται άμεσα, αλλά έμμεσα με την χρήση ενός "λευκού" διαλύματος ή "**μάρτυρα**" (**blank**). Φωτομετρούμε δηλαδή σε μία όμοια κυψελίδα και κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες, την απορρόφηση του διαλύματος που περιέχει όλα τα συστατικά εκτός από την ουσία που επιθυμούμε να προσδιορίσουμε και ρυθμίζουμε το όργανο ώστε να δείχνει μηδενική απορρόφηση (μηδενισμός οργάνου).

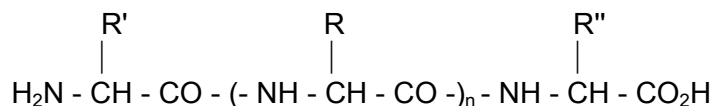
Η φασματοφωτομετρία είναι πολύτιμη μέθοδος για τους βιοχημικούς, γιατί επιτρέπει την ταυτοποίηση μιας ουσίας σε διάλυμα, με χρήση του φάσματος απορρόφησης της και τον ποσοτικό προσδιορισμό της με τη χρήση της καμπύλης αναφοράς (πρότυπης καμπύλης).

Όπως έχουμε ήδη πει η καταγραφή του φάσματος απορρόφησης είναι η συνάρτηση $A = f(\lambda)$, που χρησιμεύει στην ταυτοποίηση μιας ένωσης και στον προσδιορισμό του λ_{max} (μήκους κύματος της μέγιστης απορρόφησης).

Η καμπύλη αναφοράς ή πρότυπη καμπύλη είναι η γραφική παράσταση που απεικονίζει την απορρόφηση A διαλύματος μιας ουσίας, σε μήκος κύματος λ_{max} σε σχέση με την συγκέντρωση της ουσίας, C. Η συνάρτηση $A = f(C)$ χρησιμεύει για να υπολογίζουμε την συγκέντρωση της ουσίας σε ένα άγνωστο διάλυμα.

3. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Τα πεπτίδια και οι πρωτεΐνες είναι ομάδες ενώσεων με παρόμοια δομή, που διαφέρουν μόνο στο μέγεθος του μορίου. Και τα δύο είναι πολυαμίδια που προέρχονται από α-αμινοξέα και έχουν την γενική δομή



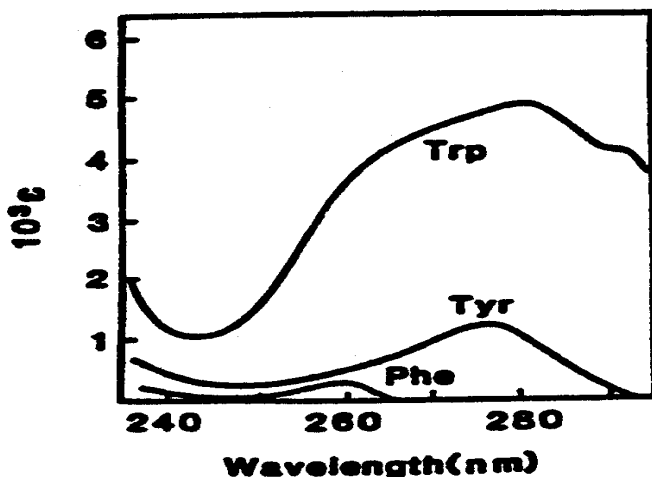
Ο όρος "πρωτεΐνη" χρησιμοποιείται για ενώσεις στις οποίες ο αριθμός των αμινοξέων είναι πολύ μεγάλος, π.χ. γνωρίζουμε πρωτεΐνες που έχουν σχετικές μοριακές μάζες ως 10^7 ή 10^8 , παρά του ότι δεν υπάρχει κανένας καθαρά περιορισμός ως προς το κατώτατο όριο για την χρήση του όρου.

Οι πρωτεΐνες έχουν μεγάλη βιολογική σημασία, γιατί αποτελούν σημαντικό συστατικό του μαλακού δομικού ιστού των ζώων. Πρωτεΐνες γνωστές σαν ένζυμα, δρουν σαν καταλύτες για κυτταρικές αντιδράσεις και γνωρίζουμε πολυάριθμες πολυπεπτιδικές ορμόνες. Η μεταβολική δράση στο κύτταρο ελέγχεται από νουκλεοπρωτεΐνες και στο αίμα διαλυτές πρωτεΐνες επιτελούν τη μεταφορά του οξυγόνου (αιμοσφαιρίνη) και την ανοσολογική αντίδραση ανάμεσα σε πολλές άλλες λειτουργίες.

4. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η μέθοδος του προσδιορισμού των πρωτεϊνών φασματοφωτομετρικά στηρίζεται στην ιδιότητα τους να απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή με μέγιστο στα 280nm, λόγω της παρουσίας των αρωματικών αμινοξέων τυροσίνης και κυρίως τρυπτοφάνης (**Σχήμα 4.1**). Η μέθοδος έχει αρκετά μειονεκτήματα, όπως την μη ικανοποιητική ακρίβεια και εξειδίκευση, δεδομένου ότι και άλλες ουσίες εκτός από τις πρωτεΐνες απορροφούν στα 280 nm. Έχει όμως το μεγάλο πλεονέκτημα ότι κατά την μέτρηση το πρωτεϊνικό παρασκεύασμα δεν καταστρέφεται.

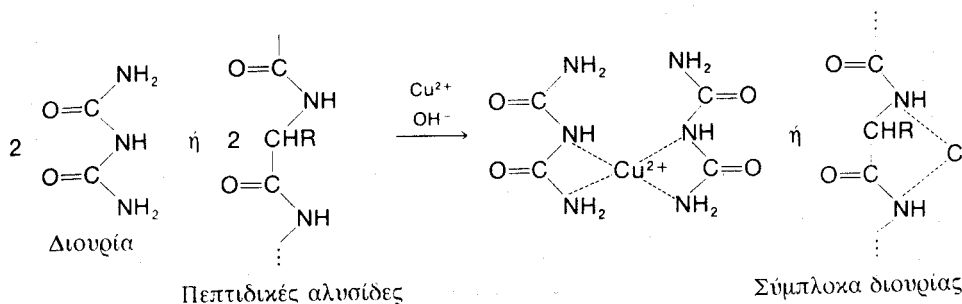
Καθαρά διαλύματα πρωτεϊνών συγκέντρωσης 1 mg/mL παρουσιάζουν στα 280 nm απορρόφηση περίπου ίση με 1,0 όταν προσδιορίζονται σε κυψελίδα πάχους 1cm. Τα νουκλεϊνικά οξέα με μέγιστο απορρόφησης στα 260 nm παρουσιάζουν αρκετή απορρόφηση και στα 280 nm. Μπορούν βέβαια να γίνουν οι κατάλληλες διορθώσεις, δεδομένου ότι για καθαρές πρωτεΐνες είναι γνωστό ότι ο λόγος απορρόφησης σε μήκη κύματος 280/260 nm είναι 1,75, ενώ για καθαρά νουκλεϊνικά οξέα ο λόγος αυτός είναι 0,5. Υπάρχουν επίσης πίνακες που δίνουν κάποιες ενδιάμεσες τιμές και αντιστοιχούν σε μίγματα πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων.



Σχήμα 4.1. Φάσματα απορρόφησης των αρωματικών αμινοξέων

4.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΟΥΡΙΑΣ (Biuret)

Οι πεπτιδικοί δεσμοί των πρωτεϊνών όταν αντιδράσουν με αραιό διάλυμα θειικού χαλκού σε αλκαλικό περιβάλλον σχηματίζουν εσωτερικά σύμπλοκα με χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα. Το όνομα της δοκιμής προέρχεται από το γεγονός ότι η ένωση της διουρίας (Biuret) δίνει μία θετική αντίδραση. Το χρώμα προφανώς αναπτύσσεται από ένα σύμπλοκο συναρμογής του ατόμου του χαλκού και τεσσάρων ατόμων αζώτου δύο από κάθε αλυσίδα πεπτιδίου (Σχήμα 4.2.).



Σχήμα 4.2. Η αντίδραση της διουρίας

Η δοκιμή είναι επαναλήψιμη για κάθε πρωτεΐνη, αλλά απαιτεί μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης (~20mg) για τον σχηματισμό του χρώματος.

4.2. ΜΕΘΟΔΟΣ Lowry ή Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται από το 1951 και μπορεί να εφαρμοσθεί σε ξηρό δείγμα όπως και σε διαλύματα. Το χρώμα που αναπτύσσεται από το αντιδραστήριο Folin-

Ciocalteu, δημιουργείται από την αντίδραση της πρωτεΐνης με διάλυμα αλκαλικού χαλκού (όπως η δοκιμή διουρίας) και την αναγωγή των φωσφορομολυβδαινικών και φωσφοροβολφραμικών αλάτων του αντιδραστηρίου, από την τυροσίνη και την τρυπτοφάνη των πρωτεϊνών.

Επειδή το περιεχόμενο των διαφόρων πρωτεϊνών ποικίλλει ως προς τις περιεχόμενες ποσότητες των δύο αμινοξέων, η ανάπτυξη χρώματος ανά mg πρωτεΐνης δεν είναι σταθερή και μπορεί να διαφέρει από αυτό της πρότυπης πρωτεΐνης. Παρ' όλα αυτά η μέθοδος είναι χρήσιμη για την παρακολούθηση της αλλαγής στην περιεχόμενη πρωτεΐνη σε διάφορα δείγματα κατά την διαδικασία του καθαρισμού των πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, η μέθοδος είναι ευαίσθητη, δηλαδή δείγματα που περιέχουν μέχρι και 5 mg πρωτεΐνης αναλύονται εύκολα.

4.3. ΜΕΘΟΔΟΣ Bradford

Η μέθοδος Bradford για τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 595nm ($\lambda_{\max} = 595\text{nm}$). Η μέθοδος αυτή έχει τα εξής πλεονεκτήματα :

- α)** είναι απλή γιατί η μέτρηση γίνεται μετά από ανάμιξη του διαλύματος της πρωτεΐνης με ένα μόνο διάλυμα χρωστικής,
- β)** είναι πολύ γρήγορη,
- γ)** είναι πολύ ευαίσθητη (επιτρέπει προσδιορισμό μέχρι και 1 μg πρωτεΐνης)
- δ)** οι παράγοντες που την παρεμποδίζουν είναι πολύ λιγότεροι σε σχέση με τις άλλες μεθόδους

5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αντιδραστήρια

1. Αντιδραστήριο Bradford

Διαλύονται 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 σε 50 mL αιθανόλης 95%. Μετά την πλήρη διάλυση της χρωστικής διηθούμε ώστε να απομακρύνουμε την ποσότητα της χρωστικής που δεν διαλύθηκε και προσθέτουμε 100 mL ορθοφωσφορικού οξέος 85 % w/w. Τέλος προσθέτουμε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου ενός λίτρου (1L). Το αντιδραστήριο αυτό είναι σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου για μερικές εβδομάδες.

2. *Ρυθμιστικό διάλυμα* φωσφορικών 0,05 M και pH = 7,2.

3. *Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης (Bovine Serum Albumin, BSA)*, συγκέντρωσης 0,2 mg πρωτεΐνης ανά mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0,05 M (pH=7.2) π.χ. για την παρασκευή 100 mL προτύπου διαλύματος ζυγίζουμε 20 mg αλβουμίνης τα οποία διαλύουμε σε 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών.

Πειραματική Διαδικασία

1. Λήψη φάσματος απορρόφησης

Σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα προσθέτουμε 5 mL διαλύματος χρωστικής, 0,5 mL προτύπου διαλύματος πρωτεΐνης και 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών. Ρυθμίζουμε το φασματοφωτόμετρο σύμφωνα με τις οδηγίες και ορίζουμε το μήκος κύματος στα 400nm. Τοποθετούμε την κυψελίδα με το τυφλό (6 mL H₂O) στο φασματοφωτόμετρο και μηδενίζουμε την απορρόφηση. Αφαιρούμε την κυψελίδα με το τυφλό, τοποθετούμε την κυψελίδα που περιέχει το δείγμα και σημειώνουμε την απορρόφηση που δείχνει. Επαναλαμβάνουμε τις φωτομετρήσεις, μεταβάλλοντας κάθε φορά το μήκος κύματος κατά 20 nm, έως λ=700 nm και μηδενίζοντας το όργανο με το τυφλό για κάθε μεταβολή του μήκους κύματος. Στην περιοχή μέγιστης απορρόφησης πραγματοποιούμε επιπλέον μετρήσεις, μεταβάλλοντας το μήκος κύματος κατά 5 nm.

Καταγράφουμε σε πίνακα τις τιμές απορρόφησης που αντιστοιχούν σε κάθε μήκος κύματος και κατασκευάζουμε το φάσμα απορρόφησης σε χιλιοστομετρικό χαρτί και με τη βοήθεια H/Y. Συγκρίνεται το λ_{max} που προκύπτει με αυτό που αναφέρεται στην εισαγωγή σαν μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης για το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης.

2. Κατασκευή της πρότυπης καμπύλης ή καμπύλης αναφοράς - Προσδιορισμός της συγκέντρωσης αγνώστου διαλύματος πρωτεΐνης

Την καμπύλη αναφοράς ή πρότυπη καμπύλη θα την κατασκευάσουμε

χρησιμοποιώντας σειρά προτύπων διαλυμάτων αλβουμίνης. Παίρνουμε δηλαδή μία σειρά δοκιμαστικών σωλήνων στους οποίους προσθέτουμε διαφορετικούς όγκους προτύπου διαλύματος αλβουμίνης και σταθερούς όγκους αντιδραστηρίου Bradford.

Ρυθμίζουμε το φασματοφωτόμετρο στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης.

Χρησιμοποιούμε δέκα δοκιμαστικούς σωλήνες που προηγουμένως έχουν πλυθεί καλά και τους οποίους αριθμούμε από 1 έως 10.

Ακολουθούμε το πρωτόκολλο του Πίνακα 1. Χρησιμοποιούμε μικροπιπέτα για την μέτρηση του όγκου των διαλυμάτων και την μεταφορά τους στους δοκιμαστικούς σωλήνες. Αφήνουμε τα διαλύματα να παραμείνουν για περίπου 10 λεπτά πριν μετρήσουμε τις απορροφήσεις τους (από την στιγμή που το χρώμα αναπτυχθεί παραμένει σταθερό για περίπου 1 ώρα).

Τιμές απορρόφησης που γίνονται δεκτές $0.2 < A < 0.8$

Πίνακας 1

<u>Αντιδραστήρια</u>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης (mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,5	0,6	0,7	0,8	0	0
ρυθμιστικό διάλυμα (mL)	1,0	0,9	0,8	0,7	0,5	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2
Αντιδρ. Bradford (mL)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
άγνωστο διάλυμα αλβουμίνης (mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	0,8

* Η μέτρηση του όγκου του προτύπου διαλύματος αλβουμίνης θα πρέπει να γίνει πολύ προσεκτικά γιατί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε αυτό είναι αρκετά μεγάλη, ενώ οι μετρούμενοι όγκοι πολύ μικροί με αποτέλεσμα το ελάχιστο σφάλμα στην μέτρησή τους να συνεπάγεται πολύ "κακή" καμπύλη αναφοράς.

Παρατηρήσεις:

Ο όγκος του προστιθέμενο προτύπου διαλύματος αλβουμίνης στους δοκιμαστικούς σωλήνες Νο 2 έως 8 βαίνει αυξανόμενος, ενώ ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος βαίνει μειούμενος, έτσι ώστε σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα να έχουμε :

$$\text{όγκος διαλύματος αλβουμίνης} + \text{όγκος ρυθμιστικού διαλύματος} = 1.$$

Ο συνολικός όγκος του διαλύματος σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα είναι 6 mL. Για τη

μέτρηση της απορρόφησης χρησιμοποιείται μέρος αυτού, όσο προστίθεται κάθε φορά στην κυψελίδα (συνήθως γεμίζεται μέχρι τα 2/3 του ύψους της).

Ο δοκιμαστικός σωλήνας Νο 1 αποτελεί τον λεγόμενο "μάρτυρα", είναι δηλαδή εκείνο το διάλυμα που περιέχει όλα τα συστατικά που είναι δυνατόν να απορροφούν στο συγκεκριμένο μήκος κύματος, εκτός από την προς προσδιορισμό ουσία (αλβουμίνη). Αν ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου γίνει με την βοήθεια του μάρτυρα, τότε οι τιμές απορρόφησης που μετρούμε για τα άλλα διαλύματα χρησιμοποιούνται ως έχουν (σε αντίθετη περίπτωση οι μετρούμενες τιμές απορρόφησης θα πρέπει να διορθωθούν με αφαίρεση της τιμής απορρόφησης του μάρτυρα)

6. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ - ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. Συμπληρώνουμε τον παρακάτω πίνακα με τις πειραματικές μας μετρήσεις

Αντιδραστήρια	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
όγκος διαλύματος (mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,8
συγκέντρωση αλβουμίνης (mg/mL)										
Απορρόφηση (A)										

Η συγκέντρωση της αλβουμίνης σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα υπολογίζεται εύκολα εφόσον είναι γνωστή η συγκέντρωση του προτύπου διαλύματος αλβουμίνης (0,2 mg/mL) και ο όγκος αυτού που προστέθηκε κάθε φορά

Κατασκευάζουμε σε χιλιοστομετρικό χαρτί την πρότυπη καμπύλη ή καμπύλη αναφοράς τοποθετώντας στον άξονα των τετμημένων (x) τις τιμές συγκέντρωσης της αλβουμίνης (mg/mL) σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και στον άξονα των τεταγμένων (y) τις μετρούμενες τιμές απορρόφησης σε μήκος κύματος $\lambda_{\max} = 595 \text{ nm}$.

Χρησιμοποιώντας την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων με την συγκέντρωση ως ανεξάρτητη μεταβλητή x και την απορρόφηση A ως την εξαρτημένη μεταβλητή y, υπολογίζουμε την εξίσωση της βέλτιστης ευθείας (καμπύλη αναφοράς) που διέρχεται από τα πειραματικά μας αποτελέσματα. Αυτή θα πρέπει να περνάει από την αρχή των αξόνων και είναι ευθεία που δείχνει την ισχύ του νόμου του Beer στην περιοχή συγκεντρώσεων που μελετήθηκε (εφόσον η τιμή του συντελεστή συσχέτισης r προσεγγίζει την μονάδα, δηλ. $r > 0,99$).

Από την τιμή της κλίσης της ευθείας και με γνωστή την τιμή του πάχους της κυψελίδας υπολογίζεται η τιμή της απορροφητικότητας, α ($\text{mg}^{-1} \text{L cm}^{-1}$). Στην συνέχεια και χρησιμοποιώντας τον νόμο του Beer $A = \alpha b c_{\text{mg/L}}$ ή $c_{\text{mg/L}} = A / \alpha b$ υπολογίζεται η συγκέντρωση της αλβουμίνης (mg/L) στο άγνωστο διάλυμα.

Η τιμή της απορρόφησης A που χρησιμοποιείται για το άγνωστο διάλυμα είναι ο μέσος όρος των μετρούμενων τιμών απορρόφησης για τα δείγματα 9 και 10.

8. ΑΣΚΗΣΕΙΣ

1. Σε βασικό διάλυμα το K_2CrO_4 παρουσιάζει ένα μέγιστο απορρόφησης στα 372 nm. Ένα βασικό διάλυμα $3,00 \cdot 10^{-5} \text{ M K}_2\text{CrO}_4$ έχει διαπερατότητα 71,6% της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στα 372 nm όταν τοποθετείται σε κυψελίδα 1,00 cm

(α) Ποια είναι η απορρόφηση του διαλύματος;

(β) Ποια είναι η μοριακή απορροφητικότητα του K_2CrO_4 στα 372 nm;

(γ) Ποια θα ήταν η % διαπερατότητα αν το μήκος της κυψελίδας ήταν 3,00 cm;

2. Μία ένωση X έχει μοριακή απορροφητικότητα $2,45 \cdot 10^3 \text{ L/mole cm}$ στα 450 nm.

Ποια είναι η συγκέντρωση ενός διαλύματος της ουσίας X που προκαλεί ελάττωση της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας κατά 25% στα 450 nm με κυψελίδα που έχει μήκος 1,00 cm;

3. Το τιτάνιο και το βανάδιο σχηματίζουν έγχρωμα σύμπλοκα με υπεροξειδίο του υδρογόνου. Χωριστά διαλύματα που περιέχουν 5,00 mg αυτών των μετάλλων κατεργάζονται με υπερχλωρικό οξύ και υπεροξειδίο του υδρογόνου και αραιώνονται σε 100 mL. Ένα τρίτο διάλυμα παρασκευάζεται με διάλυση 1,00g κράματος (που περιέχει Ti και V χωρίς άλλα μέταλλα) και κατεργάζεται με τον ίδιο τρόπο όπως τα πρότυπα διαλύματα. Οι απορροφήσεις των τριών διαλυμάτων μετρήθηκαν στα 410 και 460 nm σε κυψελίδες 1,00 cm. Υπολογίστε το % V και % Ti στο κράμα.

Διάλυμα	A_{410}	A_{460}
Ti	0,760	0,513
V	0,185	0,250
Κράμα	0,715	0,657

4. Ένα υδατικό διάλυμα ενός ασθενούς οξέος HB ($K_a = 1,00 \cdot 10^{-5}$) απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία με ένα μέγιστο στα 280 nm και $\epsilon = 975$. Τα B⁻ δεν απορροφούν. Υποθέστε ότι αρχίζετε με ένα διάλυμα $2,00 \cdot 10^{-3}$ M HB, κάνετε στη συνέχεια τρεις διαδοχικές αραιώσεις 1:1 και μετράτε την απορρόφηση αυτών των διαλυμάτων. Το σύστημα θα δείξει θετική ή αρνητική απόκλιση από τον νόμο του Beer; Η κυψελίδα έχει μήκος 1,00 cm.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

G. A. Taylor, "Οργανική Χημεία για Ιατρικές και Βιολογικές Επιστήμες", Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα 1988.

N. Χατζηλιάδης, "Χημεία Αμινοξέων και Πρωτεϊνών", Παν/μιο Ιωαννίνων, Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα ΕΠΕΑΕΚ στη Βιοανόργανη Χημεία, Ιωάννινα 1999.

J. Clark and R. Switzer, "Πειραματική Βιοχημεία" (ελληνική μετάφραση), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1992.

M. M. Bradford, "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", Analytical Biochemistry 72, 248-254 (1976)

Lowry O. H., Rosebrough, N. J., Farr A.L. and Randall R.J., J. Biol. Chem. 193, 265-271, 1951.

Θ.Π. Χατζηιωάννου, Μ.Α. Κουπάρη, " Ενόργανη Ανάλυση", Αθήνα, 2000.

4η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΙΔΗΡΟΥ.

1. ΓΕΝΙΚΑ

Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός ιχνοποσοτήτων κατιόντων διαφόρων μετάλλων βασίζεται στην συμπλοκοποίηση τους με ειδικά οργανικά αντιδραστήρια. Προτιμώνται αντιδραστήρια τα οποία έχουν τις παρακάτω ιδιότητες:

- (i) να είναι εκλεκτικά ως προς το προσδιοριζόμενο μεταλλοκατιόν
- (ii) να αντιδρούν ταχύτατα μαζί τους προς σχηματισμό σταθερών συμπλόκων
- (iii) να μην επηρεάζεται η θέση της ισορροπίας στην αντίδραση συμπλοκοποίησης από μικρές μεταβολές στις πειραματικές συνθήκες, όπως το pH, η ιονική ισχύ, η θερμοκρασία κ.λ.π.

Το σχηματιζόμενο σύμπλοκο θα πρέπει:

- (iv) να έχει μεγάλη τιμή μοριακής απορρόφησης (ϵ) στο υπεριώδες ή το ορατό φάσμα
- (v) να υπακούει στον νόμο του Beer για μία ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων και
- (vi) το φάσμα απορρόφησης του να μην επικαλύπτει τα φάσματα απορρόφησης του υποκατάστατη και του μεταλλοκατιόντος

Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου αντιδραστηρίου για τα κατιόντα του δισθενή σιδήρου είναι η 1,10-φαινανθρολίνη (και τα παράγωγά της), $C_{12}H_8N_2$. Η φαινανθρολίνη αντιδρά με το ιόν του Fe(II) προς σχηματισμό του συμπλόκου $[Fe(C_{12}H_8N_2)_3]^{2+}$, το οποίο ονομάζεται *φερροίνη* και έχει κόκκινο χρώμα. Το σύμπλοκο αυτό είναι πολύ σταθερό και παρουσιάζει σε μήκος κύματος $\lambda=510$ nm έντονη απορρόφηση ($\epsilon = 1,27 \times 10^4$). Η απορρόφηση αυτή είναι πρακτικά ανεξάρτητη του pH στην περιοχή 2-9 και μεταβάλλεται λίγο με το μήκος κύματος στην περιοχή 460-520 nm.

Υπάρχουν κάποια ιόντα τα οποία δρουν παρεμποδιστικά για τον ποσοτικό προσδιορισμό του σιδήρου, είτε σχηματίζοντας συμπλόκα με την φαινανθρολίνη (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} κλπ.) ή με τον σίδηρο (CN^- , F^- , PO_4^{3-}), είτε καθιζάνοντας σαν αδιάλυτες ενώσεις (Ag^+ , Bi^{3+} , κλπ.). Με την χρήση καλυπτικών αντιδραστηρίων αίρεται η παρεμποδιστική δράση πολλών κατιόντων, όπως π.χ. με μίγμα κιτρικού οξέος και EDTA για τα ιόντα Ag^+ , Cu^{2+} και Ni^{2+} .

Εφαρμογή της φασματοφωτομετρίας, μέσω σχηματισμού συμπλόκων, γίνεται επίσης κατά τον **προσδιορισμό του σιδήρου στον ορό του αίματος**. Ο σίδηρος που απαιτείται για την βιοσύνθεση μεταφέρεται μέσω του κυκλοφοριακού συστήματος και ο προσδιορισμός του

είναι πολύ ευαίσθητος. Το ανθρώπινο αίμα περιέχει περίπου 45% κύτταρα και 55% πλάσμα. Αν το αίμα συλλέγεται χωρίς αντιπηκτικό, τότε μετά από κάποιο χρονικό διάστημα υφίσταται πήξη. Το πήγμα απομακρύνεται και το υγρό που παραμένει αποτελεί τον *ορό του αίματος*, ο οποίος περιέχει περίπου 1 μg Fe/ mL.

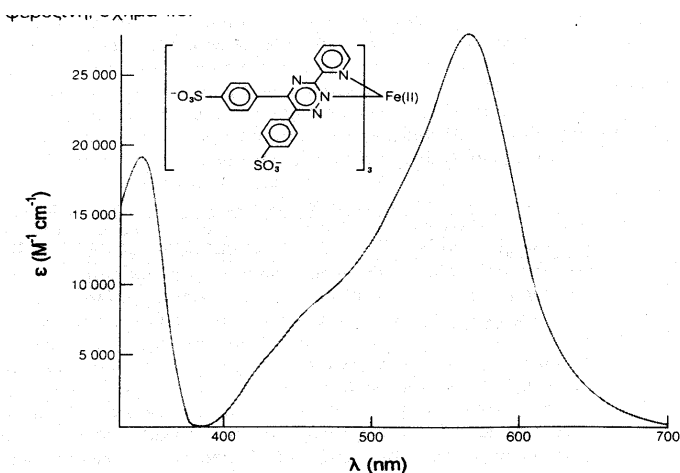
Παρακάτω αναφέρονται τα στάδια του προσδιορισμού του σιδήρου στο αίμα, με ένα άλλο ειδικό αντιδραστήριο, τη φεροζίνη:

Ο Fe(II) που βρίσκεται με την μορφή συμπλόκου με την τρανσφερίνη θα πρέπει να αναχθεί με υδροχλωρική υδροξυλαμίνη, ή θειγλυκονικό ή ασκορβικό οξύ έτσι ώστε να απελευθερωθεί από την πρωτεΐνη.

Με προσθήκη CCl_3COOH στο διάλυμα οι πρωτεΐνες καταβυθίζονται και απομακρύνονται με φυγοκέντρηση, αλλιώς τα αποτελέσματα της ανάλυσης ως προς Fe(II) θα είναι εσφαλμένα.

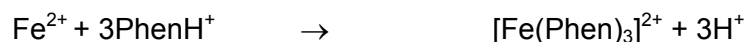
Γνωστός όγκος από το υπερκείμενο διάλυμα μετά τη φυγοκέντρηση μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως, όπου μετά από προσθήκη περίσσειας αντιδραστηρίου φεροζίνης (ferrocene) έχουμε τον σχηματισμό συμπλόκου του αντιδραστηρίου με τον σίδηρο και την εμφάνιση χαρακτηριστικού χρώματος. Η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος είναι απαραίτητη για την διατήρηση της τιμής του pH στην περιοχή όπου η αντίδραση των ιόντων του Fe(II) με την φεροζίνη για τον σχηματισμό συμπλόκου είναι πλήρης.

Παρακάτω δίνεται το φάσμα απορρόφησης διαλύματος του συμπλόκου της φεροζίνης με τον δισθενή σίδηρο.



2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο δισθενής σίδηρος του διαλύματος προσδιορίζεται μετά την αντίδρασή του με υδροχλωρικό άλας της 1,10-φαινανθρολίνη (PhenH⁺) για τον σχηματισμό του συμπλόκου [Fe(Phen)₃]²⁺ σύμφωνα με την αντίδραση:



Παρατηρούμε ότι ένα ιόν Fe²⁺ συμπλέκεται με τρία μόρια φαινανθρολίνης και παράγεται ένα μόριο συμπλόκου ένωσης ερυθρού χρώματος. Το pH της αντίδρασης ρυθμίζεται στην περιοχή 3-6, συνήθως μετά από προσθήκη CH₃COONa.

Το διάλυμα φωτομετρείται στα 510 nm (μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης, λ_{max}) και η περιεκτικότητα σε ολικό σίδηρο (δισθενή και τρισθενή) υπολογίζεται από την καμπύλη αναφοράς.

Ο ολικός σίδηρος (δισθενής και τρισθενής) που υπάρχει σε ένα διάλυμα προσδιορίζεται μετά από την αναγωγή (με οξύ και υδροξυλαμίνη) του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή και ακολουθώντας την ίδια διαδικασία, όπως προαναφέρθηκε. Τέλος μια απλή αφαίρεση της περιεκτικότητας του δισθενή από τον ολικό σίδηρο μας δίνει την περιεκτικότητα του διαλύματος σε τρισθενή σίδηρο, Fe(III).

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- α. Απεσταγμένο νερό (χωρίς ίχνη σιδήρου)
- β. Υδροχλωρικό οξύ πυκνό, HCl, περιεκτικότητας < 0,00005% σε σίδηρο
- γ. Διάλυμα υδροξυλαμίνης 10%: Διαλυτοποίηση 10g NH₂OH·HCl σε 100mL απεσταγμένου νερού
- δ. Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου: Διαλυτοποιούμε 250 g NH₄C₂H₃O₂ σε 150 mL απεσταγμένο νερό. Προσθέτουμε 700 mL παγόμορφο οξικό οξύ.
- ε. Διάλυμα οξικού νατρίου: 2M (1L)
- στ. Διάλυμα φαινανθρολίνης: Διαλυτοποιούμε 100 mg 1,10-phenanthroline hydrochloride σε 100 mL απεσταγμένου νερού με συνεχή ανάδευση. (ΣΗΜΕΙΩΣΗ: 1mL του παραπάνω διαλύματος είναι αρκετό για περίπου 100 µg Fe)
- ζ. Διάλυμα εργασίας σιδήρου (stock iron solution) με περιεκτικότητα 200µg Fe/ 1.00 mL διαλύματος. Χρησιμοποιούμε θειικό ή εναμμώνιο θειικό σίδηρο, δηλ. προσθέτουμε 2mL πυκνού H₂SO₄ (πολύ προσεκτικά) σε λίγο απεσταγμένο νερό και διαλυτοποιούμε το άλας του σιδήρου. Προσθέτουμε στάγδην 0,1N KMnO₄ για μόνιμη εμφάνιση ελαφρώς ροζ χρώματος (100mL stock solution).
- η. Πρότυπα διαλύματα σιδήρου, (1,00 mL = 10,0 µg Fe). Πρέπει να παρασκευάζονται καθημερινά με αραιώση του διαλύματος εργασίας, καθώς δεν είναι σταθερά. Παίρνουμε με σιφώνιο 5 mL από το διάλυμα εργασίας σε μία ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώνουμε μέχρι την χαραγή με απεσταγμένο νερό.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Κατασκευή της πρότυπης καμπύλης (καμπύλη αναφοράς)

Παρασκευάζουμε διαλύματα 1 έως 5 µg Fe /mL τελικού διαλύματος παίρνοντας με σιφώνιο 5,0, 7,5, 10,0, 12,5, 15,0, 20,0, 22,5 και 25,0 mL από το πρότυπο διάλυμα σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL. Προσθέτουμε 0,1 mL διαλύματος NH₄OH·HCl και 5 σταγόνες διαλύματος οξικού νατρίου σε κάθε φιάλη. Διαλύουμε με απεσταγμένο νερό περίπου στα 7 mL, προσθέτουμε 5 mL διαλύματος φαινανθρολίνης και αραιώνουμε στα 10 mL. Αναμιγνύουμε πολύ καλά και αφήνουμε το διάλυμα να παραμείνει για 10 min.

Μετράμε την απορρόφηση κάθε διαλύματος στα 510 nm ως προς απεσταγμένο νερό (μάρτυρας). Αντιστοιχώντας την μετρούμενη τιμή απορρόφησης έναντι της συγκέντρωσης (µg Fe /mL) για κάθε πρότυπο διάλυμα φτιάχνουμε την καμπύλη αναφοράς ή πρότυπη καμπύλη.

B. Υπολογισμός της συνολικής συγκέντρωσης Σιδήρου σε άγνωστο διάλυμα

Αναμιγνύουμε το δείγμα πολύ καλά και στην συνέχεια παίρνουμε με σιφώνιο 5,0 mL σε μια φιάλη των 25 mL. Προσθέτουμε 0,5 mL πυκνό HCl και 0,1 mL διαλύματος υδροξυλαμίνης. Προσθέτουμε μερικά γυάλινα σφαιρίδια (glass beads) και θερμαίνουμε μέχρι βρασμού (συνεχίζουμε τον βρασμό μέχρι να πάρουμε τελικό όγκο διαλύματος 1-2 mL). Ψύχουμε σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφέρουμε σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL. Προσθέτουμε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου, 1-2 mL διαλύματος φαινανθρολίνης και αραιώνουμε με απεσταγμένο νερό μέχρι την χαραγή. Αναμιγνύουμε καλά και αφήνουμε το διάλυμα για 10 έως 15 min ώστε να έχουμε μέγιστη ανάπτυξη του χρώματος.

Φωτομετρούμε στα 510 nm χρησιμοποιώντας σαν "τυφλό" διάλυμα που περιέχει όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια εκτός από σίδηρο. Επαναλαμβάνουμε την διαδικασία τρεις φορές και μέσω της καμπύλης αναφοράς υπολογίζουμε την συνολική συγκέντρωση του σιδήρου στο άγνωστο διάλυμα.

Γ. Υπολογισμός της συγκέντρωσης Σιδήρου (II) σε άγνωστο διάλυμα

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του Fe(II), προσθέτουμε 0,2 mL πυκνού HCl σε 5 mL δείγματος ώστε να αποφευχθεί η οξειδωση. Προσθέτουμε 2 mL διαλύματος φαινανθρολίνης και 1 mL διαλύματος οξικού αμμωνίου με συνεχή ανάδευση. Αραιώνουμε στα 10 mL και φωτομετρούμε σε χρονικό διάστημα 10 min.

Επαναλαμβάνουμε την διαδικασία τρεις φορές και μέσω της καμπύλης αναφοράς υπολογίζουμε την συγκέντρωση του Σιδήρου (II) στο άγνωστο διάλυμα.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Το διάλυμα δεν πρέπει να εκτεθεί καθόλου στο φως. (Η ανάπτυξη του χρώματος είναι γρήγορη με την παρουσία περίσσειας φαινανθρολίνης. Ο όγκος της φαινανθρολίνης είναι επαρκής για λιγότερο από 5 µg ολικού σιδήρου, αν υπάρχουν μεγαλύτερες ποσότητες χρησιμοποιήστε μεγαλύτερο όγκο φαινανθρολίνης ή πυκνότερα αντιδραστήρια).

4. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ - ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

α. Κατασκευή της πρότυπης καμπύλης (καμπύλη αναφοράς)

Βάσει των πειραματικών μας αποτελεσμάτων, τα οποία καταγράφονται σε πίνακα (Α, συγκέντρωση σιδήρου µg/ml, μάζα σιδήρου µg), κατασκευάζουμε την πρότυπη καμπύλη ή καμπύλη αναφοράς με τις μετρούμενες τιμές στην απορρόφηση στον άξονα των y και τις γνωστές τιμές στην συγκέντρωση ή τη μάζα στον άξονα των x.

Αν ο γενικός τύπος της ευθείας είναι $y = ax + \beta$ τότε η κλίση της a θα είναι η μεταβολή του y για μεταβολή του x κατά μία μονάδα και θα δίνεται από τον τύπο:

$$a = \{N\sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i\} / \{N\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2\}$$

Σύμφωνα με τον νόμο του Beer

$$A = \log(P_0/P) = -\log T = \log(100/T) = a b C_{g/L} = \epsilon b C_{mol/L}$$

και για $b=1\text{cm}$ η κλίση της πρότυπης καμπύλης θεωρητικά θα πρέπει να συμπίπτει με το συντελεστή μοριακής απορρόφησης στα 510 nm ($\epsilon = 12700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Συγκρίνετε τις δύο τιμές και υπολογίστε το πειραματικό σφάλμα (%).

Ποια είναι η ευαισθησία της μεθόδου;

Στην συνέχεια υπολογίστε τον συντελεστή γραμμικότητας (correlation coefficient, r) της ευθείας βάσει του τύπου:

$$r = (\sum x_i y_i - Nxy) / (\sum x_i^2 - Nx^2) (\sum y_i^2 - Ny^2) = (N\sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i) / [N\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2] [N\sum y_i^2 - (\sum y_i)^2]$$

ο οποίος θα πρέπει να είναι $r > 0,99$ για να πούμε ότι η καμπύλη αναφοράς μας υποδεικνύει πολύ καλή γραμμικότητα, δηλαδή ότι έχουμε εφαρμογή του νόμου του Beer.

b. Υπολογισμός της ολικής συγκέντρωσης Σιδήρου σε άγνωστο διάλυμα.

Για τις τρεις μετρούμενες τιμές απορρόφησης του αγνώστου διαλύματος υπολογίζουμε:

- 1) Την μέση τιμή x των πειραματικών μετρήσεων
- 2) Την τυπική (σταθερή) απόκλιση
- 3) Την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής ή τυπικό σφάλμα
- 4) Το όριο ανίχνευσης για 95% στάθμη εμπιστοσύνης

Με βάση την εξίσωση που προέκυψε από την καμπύλη αναφοράς, αλλά και γραφικά, υπολογίζουμε την συγκέντρωση του ολικού σιδήρου στο άγνωστο διάλυμα.

Επιπλέον υπολογίζουμε τα όρια εμπιστοσύνης για μια στάθμη εμπιστοσύνης 95% και εκφράζουμε το τελικό αποτέλεσμα.

Η συγκέντρωση του αγνώστου που προσδιορίστηκε δεν πρέπει να είναι πολύ κοντά στο όριο ανίχνευσης, αλλιώς τα αποτελέσματά μας δεν είναι αξιόπιστα.

c. Υπολογισμός της συγκέντρωσης Σιδήρου (III) και Σιδήρου (II) στο άγνωστο διάλυμα

Ακολουθούμε ακριβώς την ίδια διαδικασία με την προηγούμενη παράγραφο και προσδιορίζουμε την συγκέντρωση των ιόντων Fe^{2+} στο διάλυμα με τα όρια εμπιστοσύνης και στην συνέχεια συγκρίνουμε με το όριο ανίχνευσης .

Η διαφορά στην συγκέντρωση Ολικός Σίδηρος - Σίδηρος (II) μας δίνει την συγκέντρωση των ιόντων Σιδήρου (III) στο άγνωστο διάλυμα.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Αν είχαμε μικροκυψελίδα με πάχος 0,5 cm θα ακολουθούσαμε την ίδια πειραματική διαδικασία; Ναι ή όχι και γιατί;
2. Αν όχι ποιο θα ήταν το πρωτόκολλο της νέας πειραματικής διαδικασίας;

5η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ
ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΑΣ ΜΕ ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ
ΑΜΜΩΝΙΟΥ

1. ΓΕΝΙΚΑ

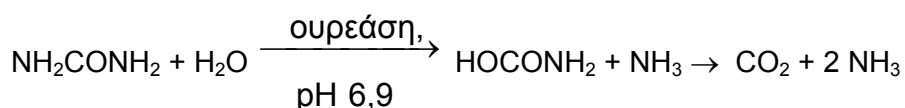
Η ουρία, η κρεατινίνη, το ουρικό οξύ, η αμμωνία και τα αμινοξέα αποτελούν τις μη πρωτεϊνικές αζωτούχες ουσίες του αίματος. Η ουρία είναι το κυριότερο τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πρωτεϊνών στον άνθρωπο. Συντίθεται, κυρίως, στο ήπαρ από αμμωνία (που είναι αρκετά τοξική ουσία), εισέρχεται στο αίμα και αποβάλλεται στα ούρα. Επειδή διέρχεται εύκολα από τις κυτταρικές μεμβράνες και τα τοιχώματα των τριχοειδών, έχει ομοιόμορφη κατανομή και σχεδόν την ίδια συγκέντρωση στα διάφορα υγρά του οργανισμού (ορός, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, σίελος, ιδρώτας κ.λ.π.).

Τα επίπεδα της ουρίας στον ορό καθορίζονται από τους ρυθμούς σύνθεσης (πέψη και καταβολισμός των πρωτεϊνών της τροφής, καταβολισμός των πρωτεϊνών των ιστών) και απέκκρισής της. Οι φυσιολογικές διακυμάνσεις των ρυθμών αυτών είναι αρκετά μεγάλες, επειδή επηρεάζονται τόσο από την ποσότητα των λευκωμάτων που καταναλίσκονται με τις τροφές, όσο και από τον όγκο των αποβαλλομένων ούρων.

Ο προσδιορισμός της ουρίας στα βιολογικά υγρά είναι ο δεύτερος σε συχνότητα εκτελούμενος προσδιορισμός στα Εργαστήρια Κλινικής Χημείας. Η ουρία στον ορό μπορεί να προσδιοριστεί είτε άμεσα (μη εξειδικευμένη αντίδραση της ουρίας με τη διακετυλομονοξίμη προς σχηματισμό χρωμοφόρου ενώσεως) είτε έμμεσα με ενζυμική μέθοδο υδρολύσεως παρουσία του ενζύμου ουρεάσης. Μετά την ενζυμική υδρόλυση ακολουθεί η παρακολούθηση της παραγόμενης αμμωνίας-αμμωνίου ποτενσιομετρικά ή φασματοφωτομετρικά (π.χ. με αντιδράσεις της αμμωνίας και παρακολούθηση των έγχρωμων προϊόντων τους, όπως η αντίδραση Berthelot).

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η ουρία υδρολύεται εκλεκτικά με το ένζυμο ουρεάση σε pH 6-7 σύμφωνα με την αντίδραση:



Ανάλογα με το pH του διαλύματος η αμμωνία μπορεί να δεσμευτεί σαν αμμώνιο (NH_4^+) σε όξινο περιβάλλον, είτε σαν αμμωνία (NH_3) σε αλκαλικό περιβάλλον.

Η παραγόμενη αμμωνία ή το αμμώνιο προσδιορίζεται με ποτενσιομετρικό

ανιχνευτή με τη μέθοδο της γνωστής προσθήκης. _____

Από τη συγκέντρωση της αμμωνίας/αμμωνίου υπολογίζεται εμμέσως η συγκέντρωση της ουρίας, αφού για κάθε mole ουρίας σχηματίζονται δύο moles αμμωνίας/αμμωνίου.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Όργανα

1. Ποτενσιομετρικός ανιχνευτής (ηλεκτρόδιο) αμμωνίου Orion
2. Ιοντόμετρο Orion
3. Μαγνητικός αναδευτήρας
4. Ογκομετρικές φιάλες 100 mL
5. Ποτήρια 50 mL
6. Σιφώνια 1 και 25 mL, και ρυθμιζόμενα μικροσιφώνια (5 - 50 μ L & 100 -1000 μ L)

Αντιδραστήρια

1. Ρυθμιστικά διαλύματα Na_2HPO_4 0,10 M – EDTA 10^{-3} M.
α. pH 6,9 με 1M NaOH, β. pH 5,0 με 1 M HCl, γ. pH 2,0 με 1 M HCl
2. Διάλυμα ουρεάσης ενζυμικής ενεργότητας 33 IU/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα Na_2HPO_4 0,10 M – EDTA 10^{-3} M.
3. Διάλυμα HCl 5 M.
4. Διάλυμα NH_4Cl 0,1000 M.
5. Απεσταγμένο νερό.
6. Άγνωστο δείγμα (διάλυμα) ουρίας ή δείγμα ούρων ή δείγμα ορού αίματος.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΥΡΙΑΣ ΣΕ ΑΓΝΩΣΤΟ ΔΕΙΓΜΑ

α. Κατασκευή καμπύλης γραμμικής αποκρίσεως του ηλεκτροδίου. Βαθμονόμηση ηλεκτροδίου

Σε ποτήρι 50 mL μεταφέρονται με σιφώνιο 25,00 mL ρυθμιστικού διαλύματος Na_2HPO_4 0,10M – EDTA 10^{-3} M, pH = 5,0 . Βυθίζεται το ηλεκτρόδιο σε βάθος 1cm από την επιφάνεια του διαλύματος και ρυθμίζεται η ταχύτητα του αναδευτήρα σε ομαλή ανάδευση χωρίς φυσαλίδες. Με τα μικροσιφώνια γίνονται διαδοχικά προσθήκες (10, 10, 30, 50, 100, 300, 500 & 1000 μ L) διαλύματος NH_4Cl 0,1000 M και μετρείται το δυναμικό μετά από κάθε

προσθήκη.

Η πειραματική διαδικασία επαναλαμβάνεται με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος Na_2HPO_4 0,10M – EDTA 10^{-3} M, pH = 2,0.

Καταγράφονται σε πίνακα οι τιμές E (mV), $C_{\text{NH}_4^+}$ και $\log C_{\text{NH}_4^+}$.

Ακολούθως κατασκευάζονται (για κάθε πειραματική διαδικασία) δύο διαγράμματα, ένα E (mV) - $C_{\text{NH}_4^+}$ και ένα E (mV) - $\log C_{\text{NH}_4^+}$, που δίνει και την καμπύλη αποκρίσεως του ηλεκτροδίου (με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων προκύπτει η γραμμικότητα της απόκρισης και υπολογίζεται η κλίση S της καμπύλης απόκρισης).

Εξηγείστε την επίδραση του pH στην τιμή του δυναμικού E (mV).

Ποιος είναι ο ρόλος της ρύθμισης του pH;

Εξηγείστε την επίδραση του pH στη συγκέντρωση του αμμωνίου. Μπορείτε χρησιμοποιώντας βιβλιογραφικές αναφορές να την δικαιολογήσετε και ποσοτικά;

β. Εκτέλεση ενζυμικής αντίδρασης

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, όπου περιέχονται 10 mL αγνώστου δείγματος, προστίθενται 25,00 mL ρυθμιστικού διαλύματος Na_2HPO_4 0,10M – EDTA 10^{-3} M, pH 6,9 και 1,00 mL διαλύματος ουρεάσης. Το διάλυμα αναδεύεται ελαφρά και αφήνεται να ολοκληρωθεί η αντίδραση επί 20 τουλάχιστον λεπτά με τη φιάλη πωματισμένη.

Στη συνέχεια προστίθενται HCl 5M, ώστε το pH να ρυθμιστεί σε 5,0 και προστίθεται ύδωρ μέχρι τη χαραγή. (Διάλυμα Α). Η ίδια πειραματική διαδικασία επαναλαμβάνεται για ίση ποσότητα δείγματος με ρύθμιση του pH = 2,0. (Διάλυμα Β).

γ. Προσδιορισμός αμμωνίου

Σε ποτήρι των 50 mL μεταφέρονται 25,00 mL διαλύματος Α. Βυθίζεται το ηλεκτρόδιο σε βάθος 1 cm από την επιφάνεια του διαλύματος, ρυθμίζεται η ταχύτητα του αναδευτήρα σε ομαλή ανάδευση χωρίς φυσαλίδες, και μετρείται το δυναμικό, E_1 . Στη συνέχεια προστίθενται στο διάλυμα 100 μL διαλύματος NH_4Cl 0,1000 M και με την παραπάνω διαδικασία μετρείται το δυναμικό, E_2 .

Η ίδια πειραματική διαδικασία επαναλαμβάνεται για το διάλυμα Β .

Η συγκέντρωση αμμωνίου C_0 του διαλύματος υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$C_0 = C_{\Delta} / (10^{AE/S} - 1)$$

όπου C_0 : αρχική συγκέντρωση του αμμωνίου (mmol/mL),

- C_Δ: μεταβολή συγκεντρώσεως από την προσθήκη
ΔΕ: διαφορά δυναμικού, E₁ – E₂
S: κλίση του ηλεκτροδίου (mV/δεκάδα)

Η διαδικασία εκτελείται εις τριπλούν. Για κάθε πειραματική διαδικασία δίνεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων, η τυπική απόκλιση καθώς και η σχετική τυπική απόκλιση .

δ. Υπολογισμός συγκεντρώσεως ουρίας στο άγνωστο δείγμα

Η ποσότητα της ουρίας στο δείγμα σε mg, υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\text{Ουρία (mg/100 mL)} = \frac{C_o (\text{mmol NH}_{4+} / \text{mL}) \cdot 100 \text{ mL} \cdot 60,06 (\text{mg ουρίας} / \text{mmol})}{2 \text{ mmol NH}_{4+} / \text{mmol ουρίας}}$$

Ακολούθως υπολογίζεται η συγκέντρωση του αγνώστου δείγματος σε ουρία και εκφράζεται σε mg ουρίας/100ml δείγματος, σε mmol ουρίας/L δείγματος.

Τα αποτελέσματα δίνονται ως εξής: υπολογίζεται ο μέσος όρος και η σχετική τυπική απόκλιση τους για κάθε πειραματική διαδικασία (διάλυμα Α με pH=2 και διάλυμα Β με pH=5).

Τι παρατηρείτε; Τα αποτελέσματα των μετρήσεων διαφοροποιούνται για κάθε πειραματική διαδικασία ή όχι;

Θα μπορούσαμε να πούμε ότι η μέθοδος προσδιορισμού της ουρίας είναι ανεξάρτητη του pH για την περιοχή 2<pH<5;

4. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Να αποδειχθεί η σχέση $C_o = C_{\Delta} / (10^{\Delta E/S} - 1)$
2. Αν διαθέταμε ηλεκτρόδια αέριας αμμωνίας και όχι ηλεκτρόδιο αμμωνίου ποιες αλλαγές θα ήταν αναγκαίες στο περιγραφόμενο πρωτόκολλο εργασίας ώστε να καταστεί δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός της ουρίας;
3. Με δεδομένο ότι τα φυσιολογικά επίπεδα στον ορό του αίματος είναι 18-40 mg/100ml και στα ούρα 15-24g/L, ποια θα ήταν η προετοιμασία του δείγματος των ούρων σε κάθε περίπτωση πριν τη μέτρηση;
4. Η ουρία στον ορό του αίματος εκφράζεται και σαν άζωτο ουρίας στο αίμα (BUN: Blood Urea Nitrogen). Να εκφράσετε τα αποτελέσματα των μετρήσεων σας σαν BUN.
5. Προτείνετε διαδικασίες με τις οποίες θα μπορεί να προκύψει η ορθότητα των μετρήσεων της ουρίας στα βιολογικά υγρά καθώς και η επαναληψιμότητα της

ακολουθούμενης μεθόδου;

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. "Handbook of Electrode Technology", Orion Research Inc. Cambridge Mass., 1982.
2. "Ammonia electrode, Model 95-10: Instruction Manual", Orion Research Inc., Cambridge Mass, 1976.
3. "Εργαστηριακές Ασκήσεις Ποσοτικής Αναλυτικής Χημείας", Θ.Π. Χατζηϊωάννου, Αθήνα, 1980.
4. "Εργαστηριακές Ασκήσεις Ειδικών Κεφαλαίων Αναλυτικής Χημείας", Δ.Π. Παπασταθόπουλος, Αθήνα, 1991.
5. "Μαθήματα Κλινικής Χημείας" Π.Α. Σίσκος, Αθήνα 1997.
6. " Εργαστηριακές Ασκήσεις Κλινικής Χημείας" Ε.Φ. Διαμαντής, Π.Α. Σίσκος, Α. Παπαναστασίου-Διαμαντή, Αθήνα 1987.
7. Urea-Bun, Enzymatic-spectrophotometric, Biosystems, Barcelona, Spain.

6η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ
ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΙΓΜΑΤΟΣ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΕΚΧΥΛΙΣΗ
ΔΙΑΛΥΤΕΣ, ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ

1. ΓΕΝΙΚΑ

Η πειραματική αυτή άσκηση αποσκοπεί στο να καταδείξει την εργαστηριακή τεχνική της εκχύλισης ως τεχνικής διαχωρισμού οργανικών ενώσεων. Ακόμη παρουσιάζονται ο τρόπος απομόνωσης και παραλαβής των οργανικών ενώσεων καθώς και η ταυτοποίησή τους με τη χρήση απλών εργαστηριακών τεχνικών, όπως σε αυτήν την περίπτωση του προσδιορισμού του σημείου τήξεως.

Στα εισαγωγικά κρίθηκε σκόπιμα να παρουσιαστεί μία ενότητα που να αναφέρεται στους **διαλύτες**, στα χαρακτηριστικά τους, στην συμπεριφορά τους και στις χρήσεις στους καθόσον είναι καθοριστική η συμμετοχή τους στην επιτυχή εφαρμογή των διαχωρισμών (ανακρυστάλλωση, εκχύλιση , χρωματογραφία, ...).

Επίσης σε μία παράγραφο παρουσιάζεται και **η τεχνική της εκχύλισης** ώστε η εκτέλεση και η εκμάθησή της από τους φοιτητές να γίνεται με ασφαλή και αποτελεσματικό τρόπο. Η θεωρία της εκχύλισης παρουσιάζεται αναλυτικά και με ασκήσεις στο εκπαιδευτικό σύγγραμμα.

• **Παρουσίαση του θέματος της εργαστηριακής άσκησης**

Μίγμα ουσιών αποτελείται από αζωβενζόλιο (ουδέτερη ένωση, πορτοκαλόχρους) και βενζοϊκό οξύ (όξινη ένωση, λευκό). Οι ενώσεις διαχωρίζονται με τη μέθοδο της εκχύλισης και παραλαμβάνονται σε καθαρή μορφή με την τεχνική της ανακρυστάλλωσης. Αρχικά η ταυτοποίησή τους γίνεται από το χρώμα τους, αλλά ο τελικός έλεγχος καθαρότητας των δυο προϊόντων γίνεται με τον προσδιορισμό του σημείου τήξης τους.

Από το παρασκευαστήριο λαμβάνεται δείγμα του μίγματος γνωστής περιεκτικότητας στις δύο ενώσεις. Το δείγμα ζυγίζεται πριν από την εκτέλεση της άσκησης και από την εκατοστιαία σύστασή του υπολογίζεται η ποσότητα της κάθε μιας ένωσης. Στο τέλος της άσκησης τα παραληφθέντα προϊόντα ζυγίζονται και **προσδιορίζεται η απόδοση της εκχύλισης.**

2. ΔΙΑΛΥΤΕΣ

Οι διαλύτες είναι οι ουσίες οι οποίες χρησιμοποιούνται περισσότερο και σε μεγάλες ποσότητες στα χημικά εργαστήρια τόσο σαν διαλυτικά μέσα, όσο και για την κατεργασία διαφόρων υποστρωμάτων αλλά και την εκτέλεση διάφορων βασικών χημικών διεργασιών.

Είναι γνωστό ότι οι περισσότερες **χημικές μετατροπές** συνήθως διεξάγονται και μελετούνται **σε υγρά διαλύματα**, όπου οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται πιο εύκολα, οι συνθήκες ελέγχονται καλλίτερα και τα προϊόντα τους είναι σχετικά εύκολο να απομονωθούν. Πολλές φορές οι διαλύτες συμμετέχουν στις αντιδράσεις είτε επιδρώντας (ανάλογα με τη φύση του διαλύτη) σημαντικά στην ταχύτητα των αντιδράσεων, είτε συμμετέχοντας στην αντίδραση σαν αντιδραστήριο.

Επίσης μεγάλες ποσότητες διαλυτών χρησιμοποιούνται σαν **εκχυλιστικά μέσα** τόσο στο εργαστήριο όσο και σε βιομηχανική κλίμακα. Είναι ιδιαίτερα σημαντική η προσπάθεια που γίνεται για την ανάπτυξη νέων τεχνικών και διεργασιών εκχύλισης που θα στοχεύουν στη μείωση του συνολικά χρησιμοποιούμενου όγκου των διαλυτών και για λόγους μείωσης του κόστους αλλά και για λόγους μείωσης της περιβαλλοντικής επιβάρυνσης.

Οι διαλύτες επίσης χρησιμοποιούνται και για τον **καθαρισμό** στερεών οργανικών ουσιών, δεδομένου ότι οι περισσότερες ουσίες καθαρίζονται με ανακρυστάλλωση. Ακόμη η διαλυτότητα μιας άγνωστης ένωσης σε διάφορους διαλύτες χρησιμεύει στην **ταυτοποίησή** της.

Συμπεράσματα για την διαλυτότητα και εν γένει για τις ιδιότητες των διαλυτών σε σχέση με τις διάφορες ουσίες και τα υποστρώματα προκύπτουν από τη γνώση της φύσης των ουσιών, όπως τη φύση του χημικού δεσμού (ιονικός, ομοιοπολικός), την πολικότητα των ομοιοπολικών ενώσεων καθώς και τη φύση των ενδομοριακών δυνάμεων που μπορούν να αναπτυχθούν μεταξύ των μορίων του διαλύτη και των μορίων των διαφόρων ουσιών.

- **Διαλυτότητα**

Κατά ένα γενικό τρόπο μπορούμε να αναφέρουμε ότι
τα όμοια διαλύουν τα όμοια,
δηλαδή οι χημικές ενώσεις διαλύονται από διαλύτες που έχουν
παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με αυτές.

Ένα ιονικό στερεό ή ένα μη ιονικό πολικό στερεό ή μία πολική ουσία υγρή ή στερεά διαλύεται σε έναν πολικό διαλύτη, όχι όμως σε ένα μη πολικό. Στις περιπτώσεις αυτές κυρίαρχο ρόλο ασκεί η διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη (όσο αυξάνει η τιμή της τόσο αυξάνει και η διαλυτική ικανότητα του διαλύτη).

Αντίστοιχα ενώσεις άπολες ή με πολύ μικρή πολικότητα διαλύονται σε άπολους διαλύτες. Οι δυνάμεις που καθορίζουν το φαινόμενο είναι οι διαμοριακές επιδράσεις μεταξύ των μορίων και κυρίως οι δυνάμεις διασποράς. Οι διαλύτες χαρακτηρίζονται από την

πολικότητά τους, που εξαρτάται από τη δομή του μορίου, τη γεωμετρία και τις ομάδες τις οποίες φέρει. Πολικότητα σε ένα μόριο εισάγουν πολικές ομάδες, όπως το καρβοξύλιο, το υδροξύλιο, τα αλογόνα, κ.α. Δεν υπάρχει φυσικοχημικός παράγοντας που να εκφράζει ποσοτικά την πολικότητα των διαλυτών.

Συνήθως η παράμετρος που λαμβάνεται υπόψη στο καθορισμό των ιδιοτήτων των διαλυτών είναι η διηλεκτρική σταθερά τους ϵ , η οποία είναι πολύ μικρή για τις άπολες ενώσεις, ενώ παίρνει μεγάλες τιμές όσο αυξάνεται η πολικότητα του διαλύτη (το νερό, που θεωρείται ο πιο πολικός διαλύτης, έχει πολύ μεγάλη τιμή διηλεκτρικής σταθεράς). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι πλέον χρησιμοποιούμενοι διαλύτες κατά σειρά πολικότητας καθώς και άλλες σημαντικές τους ιδιότητες, όπως το σ.ζ., η πυκνότητά και η ευφλεκτότητά τους.

ΔΙΑΛΥΤΗΣ	σ.ζ. ($^{\circ}\text{C}$)	Πυκνότητα (g/cm^3)	Διηλεκτρική Σταθερά (20°C)	Ευφλεκτότητα	Πολικότητα
κ-εξάνιο	68,7	0,66	1,9	ΠΕ	↓
Πετρελαϊκός αιθέρας	30 -60			ΠΕ	
Τετραχλωράνθρακας	76,8	1,59	2,2	A	
Βενζόλιο	80,1		2,3	ΠΕ	
Τολουόλιο	110,6	0,86	2,4	ΠΕ	
Διαιθυλικός αιθέρας	34,4		4,3	ΠΕ	
Χλωροφόρμιο	61,2		4,8	A	
Οξικός αιθυλεστέρας	77,2	0,90	6,0	E	
Διχλωρομεθάνιο	40,0	1,33	9,1	A	
Ισοπροπανόλη	82,2	0,78	18,3	ΠΕ	
Ακετόνη	56,1	0,79	20,7	ΠΕ	
Αιθανόλη	78,2	0,79	24,3	E	
Μεθανόλη	64,6		32,6	E	
Ακετονιτρίλιο	81,6	0,78	37,5	E	
Ύδωρ	100	1,00	78,5		

Θα ήταν χρήσιμο να κατατάξουμε μερικούς κοινούς διαλύτες με σειρά αυξανόμενης πολικότητας θεωρώντας το νερό σαν το πρότυπο πολικού διαλύτη:

Εξάνιο < βενζόλιο < διαιθυλαιθέρας < αιθανόλη < νερό

Οι γειτονικοί διαλύτες είναι μεταξύ τους πολύ διαλυτοί και συνεπώς **αναμίξιμοι**. Όσο απομακρυσμένοι είναι τόσο πιο πολύ δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους και παραμένουν σε διαφορετικές στιβάδες. Για παράδειγμα το τολουόλιο και το βενζόλιο που είναι, σύμφωνα με την πολικότητά τους, γειτονικοί στην κατάταξη διαλύτες διαλύονται σε μεγάλο βαθμό μεταξύ τους. Αντίθετα το νερό με το εξάνιο, που όπως βλέπουμε από τον πίνακα, έχουν μεγάλη διαφορά πολικότητας δεν αναμιγνύονται σχηματίζοντας διαφορετικές φάσεις.

• **Εκλογή του διαλύτη**

Η εκλογή ενός διαλύτη για μια δεδομένη χρήση εξαρτάται καταρχήν από τη χρήση (π.χ. επιλογή διαλύτη σαν εκχυλιστικό μέσο, για την ανακρυστάλλωση, κ.α.) και από τη φύση των ουσιών που θα διαλύσει. Ακόμη ένας διαλύτης, πέρα από τη διαλυτική δράση που πρέπει να έχει, θα πρέπει να είναι αδρανής και να μην αντιδρά με τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια ή με τα προϊόντα. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες στην επιλογή ενός διαλυτικού μέσου είναι, η πτητικότητα του (όσο μικρότερο σ.ζ. έχει τόσο πιο εύκολα θα απομακρύνεται ο διαλύτης), το κόστος του αλλά και η επικινδυνότητα που παρουσιάζει η χρήση του.

Από τους πιο κοινούς διαλύτες είναι **η ακετόνη**, η οποία έχει πολλαπλές χρήσεις. Η ακετόνη χρησιμοποιείται επίσης στο εργαστήριο για τον καθαρισμό και το πλύσιμο των γυάλινων συσκευών καθώς, πέραν της απομάκρυνσης των οργανικών ουσιών, απομακρύνει και τα σταγονίδια του νερού που απομένουν στις φιάλες, απομακρύνοντας έτσι και τα άλατα που είναι διαλυμένα στο νερό.

Οι οργανικοί διαλύτες διατίθενται στο εμπόριο σε **διαφόρους βαθμούς καθαρότητας**. Οι διαλύτες γενικά χαρακτηρίζονται ως:

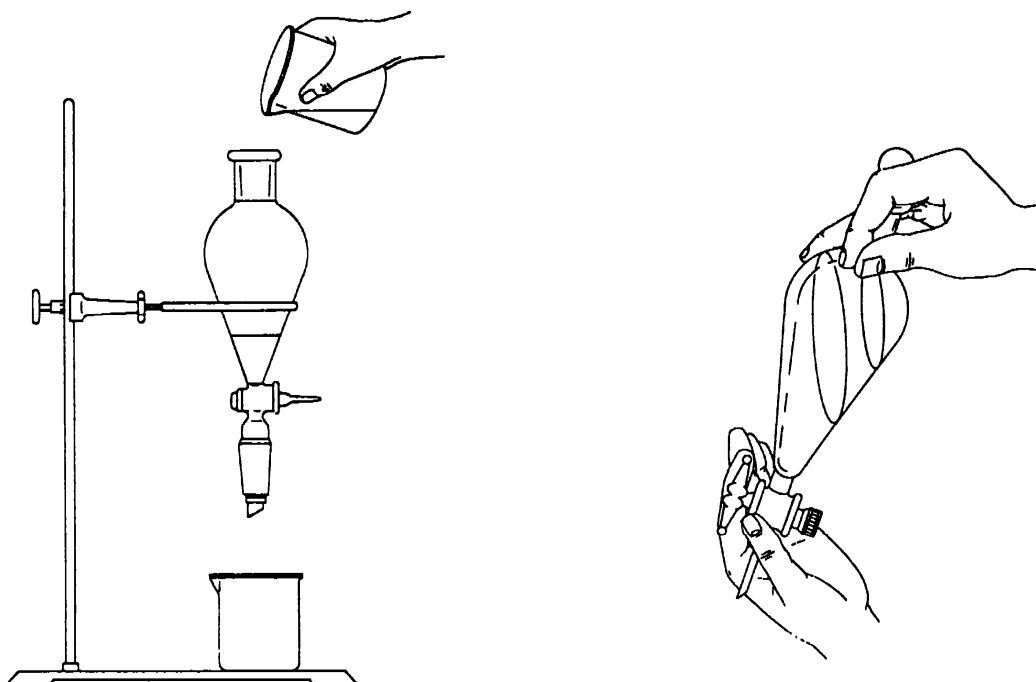
1. For synthesis: για συνθετικούς σκοπούς.
2. Pro analysis ή Analytical grade: αναλυτικώς καθαροί.
3. Chemical pure ή Extra pure: χημικώς καθαροί χωρίς πιστοποιητικό καθαρότητας.
4. For spectroscopy: υψηλής καθαρότητας για φασματοσκοπία.
5. For chromatography: υψηλής καθαρότητας για χρωματογραφία.
6. Pharmacopoeia: υψηλής καθαρότητας για φαρμακευτικούς σκοπούς.

3. ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Εκτέλεση της εκχύλισης υγρού/υγρού (Υ/Υ)

Η εκχύλιση Υ/Υ γίνεται μέσα σε ένα γυάλινο σκεύος, **τη διαχωριστική χοάνη**, όπου προστίθενται οι δύο φάσεις (το υπόστρωμα και το εκχυλιστικό μέσο) και αναμιγνύονται με ανατάραξη. Για λόγους ασφαλείας αλλά και καλλίτερης ανάμιξης των φάσεων ο συνολικός όγκος των υγρών στη χοάνη δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 3/4 της χωρητικότητάς της.

Η ανατάραξη γίνεται προσεκτικά με ταυτόχρονη συγκράτηση του πώματος της χοάνης. Αυτό συμβαίνει γιατί η πίεση που αναπτύσσεται στο εσωτερικό της χοάνης, λόγω της πηκτικότητας των διαλυτών, μπορεί να εκτινάξει το πώμα, με αποτέλεσμα την απώλεια ουσίας και πιθανό ατύχημα. Ο κίνδυνος είναι μεγαλύτερος όταν χρησιμοποιούνται πολύ πηκτικοί διαλύτες (π.χ. αιθέρας) ή όταν κάποιο από τα διαλύματα είναι θερμό. **Για τους λόγους αυτούς όχι μόνο αποφεύγεται η συνεχής ανατάραξη, αλλά και επιβάλλεται κατά διαστήματα να ανοίγεται η στρόφιγγα, ώστε να διαφεύγουν οι ατμοί των διαλυτών (απαερισμός).** Όταν εκτελούμε τον απαερισμό της διαχωριστικής χοάνης, το άκρο της χοάνης στο οποίο βρίσκεται η στρόφιγγα είναι γυρισμένο προς τα επάνω και φυσικά στραμμένο σε χώρο όπου δεν υπάρχουν άτομα ή εστία θέρμανσης (π.χ. φλόγα) .



Μόλις ολοκληρωθεί η ανατάραξη, η διαχωριστική χοάνη τοποθετείται σε μεταλλικό δακτύλιο να ισορροπήσει το σύστημα των δύο φάσεων. Όταν οι δύο φάσεις ξεχωρίσουν πρώτα απομακρύνεται από τη διαχωριστική χοάνη η βαρύτερη (η κάτω στιβάδα) φάση ανοίγοντας τη στρόφιγγα. Η μεταφορά της ολοκληρώνεται με το κλείσιμο της στρόφιγγας, όταν η διεπιφάνεια των δύο φάσεων φτάσει στο ύψος της στρόφιγγας. Ακολουθεί μετά η μεταφορά και της άλλης φάσης και έτσι ολοκληρώνεται η εκχύλιση. Χρειάζεται φυσικά να γνωρίζουμε από πριν τη θέση (πάνω/κάτω) των δύο φάσεων από τη σχετική πυκνότητα των δύο διαλυτών και ανάλογα να συλλέξουμε τη φάση στην οποία βρίσκεται η εκχυλιζόμενη ουσία.

Μετά την εκτέλεση του αναγκαίου αριθμού εκχυλίσεων συγκεντρώνονται όλα τα εκχυλίσματα της φάσης που περιέχει την εκχυλιζόμενη ουσία, ξηραίνονται και ακολούθως απομακρύνεται ο διαλύτης με απόσταξη απλή ή σε ελαττωμένη πίεση, ώστε να παραληφθεί η εκχυλισθείσα ουσία.

Πολλές φορές η εκχύλιση από ένα υδατικό διάλυμα υποβοηθείται με την προσθήκη ανόργανων αλάτων (π.χ. χλωριούχο νάτριο), έτσι ώστε να κορένεται το υδατικό διάλυμα και να ελαττώνεται κατά πολύ η διαλυτότητα των οργανικών ουσιών στην υδατική στιβάδα. Το φαινόμενο αυτό λέγεται εξαλάτωση και χρησιμοποιείται αρκετά συχνά στις εκχυλίσεις.

- **Επιλογή του διαλύτη εκχύλισης**

Ένας καλός διαλύτης για να χρησιμοποιηθεί σαν εκχυλιστικό μέσο θα πρέπει αφενός να έχει μικρή διαλυτότητα στην άλλη φάση (υπόστρωμα) για να μην αναμιγνύεται με αυτή, και αφετέρου να έχει ικανοποιητική διαλυτική ικανότητα ως προς τις ουσίες που θέλουμε να εκχυλίσουμε. Επιθυμητό είναι να παρουσιάζει εκλεκτική διαλυτική ικανότητα, ώστε να εκχυλίζονται μόνο οι επιθυμητές ουσίες και όχι και άλλες ουσίες που συνυπάρχουν στο υπόστρωμα. Ακόμη θα πρέπει να έχει χαμηλό σημείο ζέσεως ώστε να απομακρύνεται γρήγορα και να ανακτάται εύκολα η εκχυλιζόμενη ουσία. Στην περίπτωση που η εκχύλιση γίνεται για να απομακρύνουμε τις προσμίξεις (έκπλυση) ο διαλύτης πρέπει να διαλύει τις προσμίξεις αλλά όχι την ουσία, όμως και σε αυτή την περίπτωση πρέπει να μην αναμιγνύεται με την άλλη φάση. Κοινά διαλυτικά που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση είναι ο διαιθυλαιθέρας (που συχνά αναφέρεται και απλά σαν αιθέρας), ο πετρελαϊκός αιθέρας, το εξάνιο, το βενζόλιο, το χλωροφόρμιο, το διχλωρομεθάνιο και ο τετραχλωράνθρακας (για περισσότερες πληροφορίες για τις ιδιότητες των διαλυτών ανατρέξτε στο κεφάλαιο των διαλυτών). Συμπερασματικά παρακάτω αναφέρονται τα κριτήρια επιλογής ενός διαλύτη σαν εκχυλιστικό μέσο:

Καθαρότητα του διαλύτη, Χημική αδράνεια, Πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό (< 5%), Πυκνότητα διαφορετική από το νερό, Μεγάλη ικανότητα διάλυσης της εκχυλιζόμενης ουσίας, Σχετικά χαμηλό σ.ζ. (δηλαδή να είναι πτητικός), Αποφυγή σχηματισμού γαλακτωμάτων με την υδατική στοιβάδα, Μη τοξικός, μη εύφλεκτος, Χαμηλό κόστος.

• **Εκχύλιση οργανικών οξέων και βάσεων**

Στην περίπτωση που θέλουμε να εκχυλίσουμε οργανικά οξέα από ένα οργανικό διαλύτη μετατρέπουμε το οξύ σε άλας χρησιμοποιώντας αλκαλικά υδατικά διαλύματα, (π.χ. όξινο ανθρακικού νατρίου, ανθρακικού νατρίου ή καυστικού νατρίου) οπότε το οξύ (με την ιονική του μορφή, σαν αλάτι) μεταφέρεται στην υδατική φάση. Κατόπιν με οξίνιση της υδατικής φάσης το ανιόν του οξέος μετατρέπεται σε οξύ και το οργανικό οξύ ανακτάται με επανεκχύλιση με οργανικό διαλύτη ή με ανακρυστάλλωση.

Όμοια για την εκχύλιση μιας οργανικής βάσης χρησιμοποιείται σαν εκχυλιστικό μέσο όξινο υδατικό διάλυμα (συνήθως αραιό διάλυμα θειϊκού ή υδροχλωρικού οξέος) και η ανάκτησή της από την υδατική φάση γίνεται μετά από αλκάλωση και επανεκχύλιση με ένα οργανικό διαλύτη.

Την παραπάνω διαδικασία θα χρησιμοποιήσουμε κατά την εκτέλεση της εργαστηριακής άσκησης, όπου θα διαχωριστούν το βενζοϊκό οξύ και το αζωβενζόλιο από ένα μίγμα τους.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

• **Αντιδραστήρια**

Διχλωρομεθάνιο, Πρότυπο διάλυμα NaOH 1,5 M, Κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl.

Πυκνό διάλυμα NaOH, Πυκνό διάλυμα HCl.

Μίγμα αζωβενζολίου / βενζοϊκού οξέος γνωστής σύστασης και μάζας.

• **Όργανα - Σκεύη**

Αναλυτικός ζυγός, λουτρό παραφινέλαιου, διαχωριστικές χοάνες (125 mL ή 250 mL), ογκομετρικοί κύλινδροι (100 mL, 50 mL), κωνικές φιάλες (100 mL), σιφώνια.

A. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΒΕΝΖΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΑΖΩΒΕΝΖΟΛΙΟΥ ΜΕ ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Από τη τιμή της μάζας του μίγματος και την περιεκτικότητα του υπολογίζεται η μάζα του κάθε ενός συστατικού, του βενζοϊκού οξέος και του αζωβενζολίου.

Υπολογίζεται ο διπλάσιος θεωρητικός όγκος του διαλύματος NaOH 1,5 M που απαιτείται για την ποσοτική μετατροπή του βενζοϊκού οξέος σε βενζοϊκό νάτριο

Το μίγμα διαλυτοποιείται σε περίπου 60 mL διχλωρομεθανίου. Εάν υπάρχουν

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ – 2007-2008

αδιάλυτες προσμίξεις τότε το διάλυμα διηθείται. Το διάλυμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη 125 mL. Το διάλυμα εκχυλίζεται εις διπλούν, χρησιμοποιώντας κάθε φορά το ήμισυ του όγκου του διαλύματος NaOH που υπολογίσθηκε παραπάνω. Διαχωρίζεται η οργανική στιβάδα και οι υδατικές φάσεις συνδυάζονται και φυλάσσονται χωριστά. Η υδατική φάση επανεκχυλίζεται δύο φορές με 15 mL διχλωρομεθανίου για την πλήρη απομάκρυνση του αζωβενζολίου. Στην υδατική φάση βρίσκεται το βενζοϊκό νάτριο ενώ στην οργανική στιβάδα το αζωβενζόλιο.

Δώστε με διάγραμμα ροής την πορεία διαχωρισμού που ακολουθήσατε.

Προτείνετε ένα σχήμα διαχωρισμού ενός μίγματος τολουολίου, βενζοϊκού οξέος και ανιλίνης χρησιμοποιώντας σαν εκχυλιστικό μέσο διχλωρομεθάνιο. Δώστε με διάγραμμα ροής την πορεία διαχωρισμού που θα ακολουθήσετε.

Μπορεί αντί για διχλωρομεθάνιο να χρησιμοποιηθεί διαιθυλικός αιθέρας ή αιθανόλη; Αν ναι ποιες αλλαγές στην εκτέλεση της εκχύλισης θα συμβούν;

B. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΕΝΖΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΑΖΩΒΕΝΖΟΛΙΟΥ

Η υδατική στιβάδα τοποθετείται σε κωνική φιάλη Erlenmeyer και ψύχεται σε παγόλουτρο. Το διάλυμα του βενζοϊκού νατρίου οξινίζεται προσεκτικά με την προσθήκη μικρής περίσσειας πυκνού HCl (το βενζοϊκό οξύ καθιζάνει ως λευκό ίζημα). Η οξύτητα του διαλύματος ελέγχεται με πεχαμετρικό χαρτί. Το μίγμα ψύχεται για λίγα λεπτά ακόμη και το βενζοϊκό οξύ λαμβάνεται με διήθηση σε χωνί Buchner. Το ίζημα εκπλύνεται με λίγα mL κρύου νερού, ξηραίνεται στον αέρα και υπολογίζεται η μάζα του.

Στην οργανική στιβάδα έχει παραμείνει μόνο το αζωβενζόλιο γι' αυτό ακριβώς η οργανική στιβάδα αποκτά πορτοκαλόχρωμη χροιά, που γίνεται εντονότερη με την εξάτμιση του διαλύτη. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη σε περιστροφικό εξατμιστήρα στους 70°C. Λαμβάνεται το υπόλειμμα και ζυγίζεται.

Από τα αποτελέσματα της ζύγισης των δύο συστατικών που απομονώθηκαν υπολογίζεται η απόδοση της εκχύλισης.

Να αποδοθεί διαγραμματικά (διάγραμμα ροής) η διαδικασία της απομόνωσης των δύο ουσιών από το αρχικό μίγμα.

Γ. ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΛΗΦΘΕΝΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Μέτρηση του σημείου τήξεως.

Για το κάθε ένα από τα δύο συστατικά τα οποία παραλάβαμε με τις παραπάνω διαδικασίες προσδιορίζεται το σημείο τήξης του. Συγκεκριμένα μικρή ποσότητα τοποθετείται

σε τριχοειδή σωλήνα κλειστό από το ένα άκρο του. Ο σωλήνας αυτός προσαρμόζεται σε θερμόμετρο και εμβαπτίζεται σε λουτρό παραφινελαίου. Παρατηρείται η φυσική κατάσταση της στερεάς ουσίας στον τριχοειδή και καταγράφεται η θερμοκρασία στην οποία το στερεό αρχίζει να τήκεται.

Να γίνει έλεγχος με το πραγματικό σημείο τήξεως των δύο ενώσεων για να διαπιστωθεί η καθαρότητά των παραληφθέντων μετά την εκχύλιση ουσιών.

4. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Η διαλυτότητα της καφεΐνης σε θερμοκρασία 20°C είναι 2.5g/100mL και 20g/100mL στο χλωροφόρμιο, ενώ σε θερμοκρασία 60°C είναι 45g/100mL στο νερό και 90g/100mL στο χλωροφόρμιο. Σε ποιες συνθήκες θερμοκρασίας μπορεί να εκχυλισθεί από το χλωροφόρμιο η μεγαλύτερη ποσότητα καφεΐνης από ένα υδατικό της διάλυμα; Υπολογίστε πόσες εκχυλίσεις θα χρειασθούν για να εκχυλισθεί το 80% της ποσότητας της καφεΐνης στην ιδανικότερη περίπτωση.
2. Προτείνετε ένα σχήμα απομόνωσης διάφορων οργανικών ουσιών από ένα υδατικό περιβαλλοντικό δείγμα, ώστε να επακολουθήσει ποσοτικός του προσδιορισμός. Αν αυτές οι ουσίες είναι φαινόλες και το pH του δείγματος νερού που αναλύουμε είναι γύρω στο 8 τι χρειάζεται ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή εκχύλισή τους;

7η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΟΣ (TLC)

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

1. ΓΕΝΙΚΑ

Η **χρωματογραφία** είναι μια διαχωριστική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, τον καθαρισμό και την ταυτοποίηση πολλών χημικών ουσιών κυρίως οργανικού και βιολογικού ενδιαφέροντος. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και για παρασκευαστικούς σκοπούς αλλά και με συνοδεία κατάλληλων ανιχνευτών και για ποσοτικούς προσδιορισμούς των διαχωρισθέντων ουσιών. Επίσης χρησιμοποιείται για την απομόνωση και τον καθαρισμό ουσιών με πολύ μεγάλο Μοριακό Βάρος, όπως μακρομορίων και οργανιδίων του κυττάρου.

Σ' όλες τις χρωματογραφικές τεχνικές διακρίνονται δύο φάσεις, η **στατική φάση** (στερεά ή υγρή) πάνω στην οποία συγκρατούνται τα προς διαχωρισμό συστατικά και η **κινούμενη φάση** (υγρή ή αέρια) με την οποία επιτυγχάνεται η μετατόπιση των συστατικών πάνω στη στατική φάση. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται γιατί οι ουσίες με διαφορετική σύνθεση κατανέμονται σε διαφορετικό βαθμό μεταξύ στατικής και κινούμενης φάσης.

Ανάλογα με το μηχανισμό δράσης διακρίνονται τα παρακάτω είδη χρωματογραφίας:

- Χρωματογραφία προσροφήσεως (Adsorption chromatography)
- Χρωματογραφία κατανομής (Partition chromatography)
- Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (ion-exchange chromatography)
- Χρωματογραφία διαπερατότητας ή μοριακής διήθησης (gel permeation exclusion chromatography).

Οι διάφορες μορφές χρωματογραφίας περιλαμβάνουν τουλάχιστο ένα από αυτά τα φαινόμενα. Στην πραγματικότητα όμως κατά τη διάρκεια μιας χρωματογραφικής ανάλυσης δραστηριοποιούνται ένα, δύο ή και περισσότερα φαινόμενα.

Τα παραπάνω είδη χρωματογραφίας επιτυγχάνονται εργαστηριακά με διαφορετικές τεχνικές ανάλογα με τη μορφή της στατικής φάσης και διακρίνονται στα εξής είδη χρωματογραφίας.

- Χρωματογραφία χάρτου (paper chromatography)

- Χρωματογραφία στήλης (column chromatography)
- Χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (thin layer chromatography) η TLC

Πλεονεκτήματα των χρωματογραφικών μεθόδων είναι η ελάχιστη ποσότητα δείγματος που απαιτείται (μg-mg), ο σχετικά μικρός χρόνος ανάλυσης, η μεγάλη ικανότητα διαχωρισμού και συγχρόνως η δυνατότητα ταυτοποίησης και προσδιορισμού των ουσιών.

2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ, ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΙΟΝΤΩΝ

Η κατανομή των ουσιών μεταξύ της στατικής και κινητικής φάσης ακολουθεί είτε μηχανισμό κατανομής, είτε προσρόφησης, είτε ανταλλαγής ιόντων, ανάλογα με τον τύπο της στατικής φάσης που χρησιμοποιείται.

Στο μηχανισμό κατανομής η στατική φάση είναι υγρή (στηρίζεται πάνω σε ένα στερεό υπόστρωμα), όπως και η κινητή φάση. Οι ουσίες κατανέμονται στις δύο φάσεις ανάλογα με τη διαλυτότητά της στα δύο υγρά. Οι ουσίες που είναι περισσότερο διαλυτές στον διαλύτη της κινητής φάσης μετακινούνται γρηγορότερα από εκείνες που είναι περισσότερο διαλυτές στη στατική φάση. Η χρωματογραφία κατανομής είναι πιο αποτελεσματική για τον διαχωρισμό ουσιών που διαφέρουν στη διαλυτότητα τους, π.χ. ουσίες μιας ομόλογης σειράς.

Στη **χρωματογραφία προσρόφησης** η στατική φάση είναι ένα στερεό προσροφητικό, η δε κινητή φάση υγρό. Κατά την προσρόφηση σχηματίζονται διαμοριακές δυνάμεις ανάμεσα στη στατική φάση και τις προς διαχωρισμό ουσίες με αποτέλεσμα οι ουσίες να προσροφώνται σε διαφορετικό βαθμό από το προσροφητικό, ανάλογα με τη φύση τους (δηλαδή τις ομάδες που περιέχουν). Η χρωματογραφία προσρόφησης προτιμάται από τις άλλες τεχνικές και γιατί μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεγαλύτερες ποσότητες δείγματος. Σαν προσροφητικά υλικά χρησιμοποιούνται κυρίως η πηκτική του διοξειδίου του πυριτίου **SiO₂** (silica gel), η γή διατόμων (Kieselguhr), η αλουμίνα **Al₂O₃**, το **MgCO₃** και **MgO**.

Στη **χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής** χρησιμοποιούνται ιονανταλλακτικές ρητίνες ή πηκτές (γέλες) ως στερεή στατική φάση. Τα ιονικά συστατικά του μίγματος συγκρατούνται ηλεκτροστατικά σε διαφορετικό βαθμό από τις αντίθετα φορτισμένες ιονικές ομάδες της στατικής φάσης.

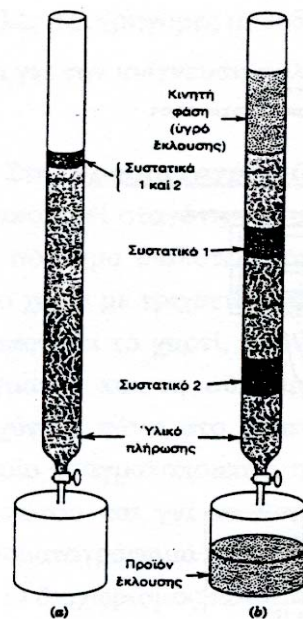
Οι χρωματογραφίες κατανομής, προσρόφησης και ιοντοανταλλαγής, εφαρμόζονται στη χρωματογραφία στήλης, λεπτής στιβάδος και επί χάρτου.

3. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ

Στη χρωματογραφία προσρόφησης επί στήλης η οποία ονομάζεται και κλασική χρωματογραφία (ή χρωματογραφία του Tswett), η στερεά φάση είναι μία προσροφητική

ουσία ή μίγμα τέτοιων ουσιών, που βρίσκεται σε μορφή στήλης μέσα σε γυάλινο σωλήνα. Η κινητή φάση είναι ένας οργανικός διαλύτης. Ο διαχωρισμός των συστατικών του μίγματος βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης των συστατικών του μίγματος στη στερεά φάση και στη διαφορετική διαλυτότητά τους στη κινητή φάση. Η ταχύτητα μετακίνησης μιας ουσίας κατά μήκος της στήλης εξαρτάται από τον ανταγωνισμό του προσροφητικού μέσου και του διαλύτη για αυτήν.

Η εφαρμογή της τεχνικής αυτής έχει ως εξής: μέσα σε γυάλινο σωλήνα τοποθετείται κατάλληλο προσροφητικό υλικό δημιουργώντας έτσι την προσροφητική στήλη δια μέσου της οποίας διαβιβάζεται το διάλυμα των προς διαχωρισμό ουσιών. Οι ουσίες διαχωρίζονται στη στήλη λόγω διαφορετικής προσρόφησης και εμφανίζονται σε διαφορετικά ύψη υπό μορφή ζωνών ή δακτυλίων.



Διαχωρισμός μίγματος ουσιών με χρωματογραφία στήλης

α) πριν την έκλυση, μίγμα στη κορυφή της στήλης

β) μετά την έκλυση, πλήρης διαχωρισμός

Μετά την απόθεση του μίγματος των ουσιών στην κορυφή της στήλης, διαβιβάζεται στη στήλη το εκλουστικό υγρό ή η κινητή φάση, που μπορεί να είναι ένας διαλύτης ή μίγμα διαλυτών. Οι προσροφηθείσες ουσίες αναδιαλύονται και προσροφούνται εκ νέου σε χαμηλότερα σημεία της στήλης. Έτσι με διαδοχικές προσροφήσεις και εκροφήσεις με τη

συνεχή διαβίβαση του εκλουστικού υγρού επιτυγχάνεται ο πλήρης διαχωρισμός των ουσιών κατά ζώνες, από πάνω προς τα κάτω κατά σειρά μειούμενης έντασης προσρόφησής τους. Το στάδιο αυτό ονομάζεται ανάπτυξη. Κατόπιν ακολουθεί η παραλαβή των ουσιών που διαχωρίστηκαν προηγουμένως με τη χρήση κατάλληλων διαλυτών. Το στάδιο παραλαβής ονομάζεται ανάληψη ή έκλουση.

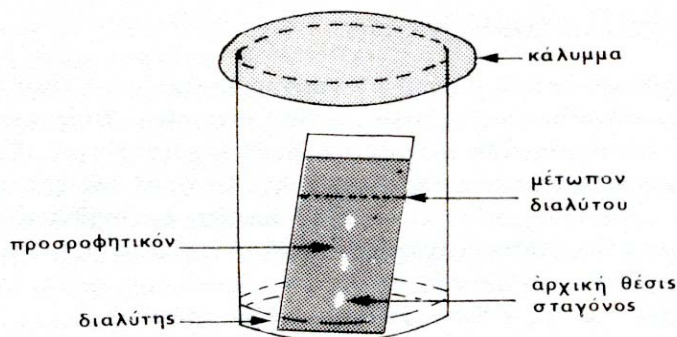
Στην περίπτωση όπου στη στήλη αντί για προσροφητική ουσία χρησιμοποιείται συνθετική ρητίνη που περιέχει ιονίσιμες δραστικές ομάδες τότε η τεχνική αυτή ονομάζεται χρωματογραφία ιονανταλλαγής στήλης και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ουσιών που μπορούν να ιονισθούν.

4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΕΠΙ ΧΑΡΤΟΥ.

Στη χρωματογραφία κατανομής επί χάρτου τα συστατικά του προς διαχωρισμό μίγματος κατανέμονται μεταξύ δύο μη μιγνυόμενων υγρών, ενός στατικού, καθηλωμένο στο χαρτί (στατική φάση) και ενός κινητού το οποίο κινείται επάνω στο χαρτί. Η κινητή φάση είναι ένα μίγμα οργανικού διαλύτη και ύδατος. Ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών του μίγματος μεταξύ των δύο υγρών. Θεωρείται ότι το καθηλωμένο υγρό είναι το ύδωρ.

Η πορεία διαχωρισμού έχει ως εξής: σε ταινία ειδικού χάρτου, συνήθως από καθαρή κυτταρίνη, φέρεται με μικροσιφώνιο ή μικροσύριγγα το προς εξέταση

διάλυμα (διαδικασία φόρτισης). Η δημιουργούμενη κηλίδα ξηραίνεται με εξάτμιση του διαλύτη και στη συνέχεια ο χάρτης εμβαπτίζεται κατά το ένα άκρο του σε δοχείο το οποίο περιέχει τη κινητή φάση ή το διαλύτη ανάπτυξης, όπως αλοιώς λέγεται. Το δοχείο αυτό το οποίο πρέπει να κλείνει καλά λέγεται δοχείο ή θάλαμος ανάπτυξης.



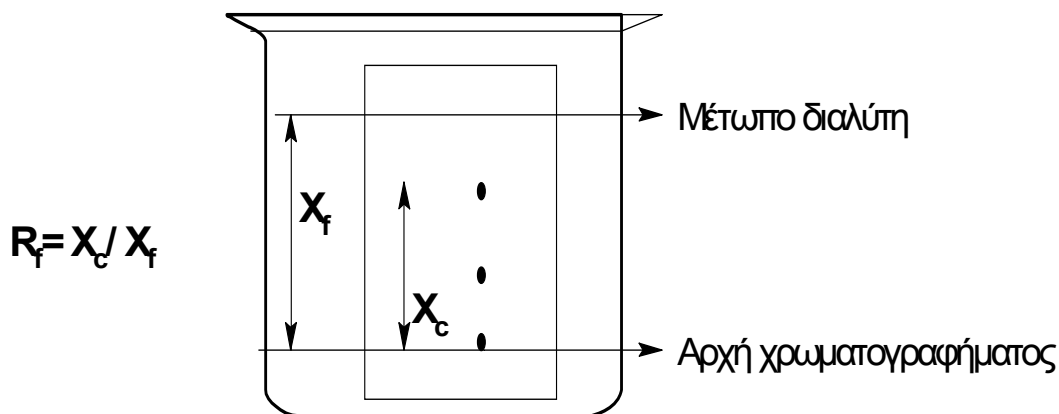
Θάλαμος ανάπτυξης για χρωματογραφία επί χάρτου και λεπτής στιβάδος

Ο διαλύτης ανερχόμενος στο χαρτί παρασύρει τις ουσίες που αποτελούν την κηλίδα και οι οποίες κινούνται η κάθε μία με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με το λόγο κατανομής τους μεταξύ των δύο υγρών. Όσο περισσότερο υδρόφοβη είναι μια ουσία τόσο ταχύτερα μετακινείται με τον οργανικό διαλύτη, ενώ όσο περισσότερο υδρόφιλη είναι τόσο μεγαλύτερη είναι η τάση αυτής να παραμείνει στη στατική φάση επιτυγχάνοντας έτσι το διαχωρισμό των ουσιών.

Όταν ο διαλύτης φθάσει στο άλλο άκρο του χάρτου, σημειώνεται η θέση αυτού (μέτωπο διαλύτη), ο χάρτης ξηραίνεται και επακολουθεί η εμφάνιση του χρωματογραφήματος, δηλ. η ανίχνευση των ουσιών που έχουν διαχωριστεί.

Η εμφάνιση γίνεται είτε με τη χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων, τα οποία σχηματίζουν έγχρωμες ενώσεις με τις διαχωριζόμενες ουσίες, είτε με έκθεση του χρωματογραφήματος σε υπεριώδη ακτινοβολία, οπότε οι μεν φθορίζουσες ουσίες παρέχουν κιτρινοπράσινες ή κυανές κηλίδες, οι δε ουσίες που απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία φαίνονται ως μελανές κηλίδες στο κυανό φθορίζον πεδίο του χάρτου.

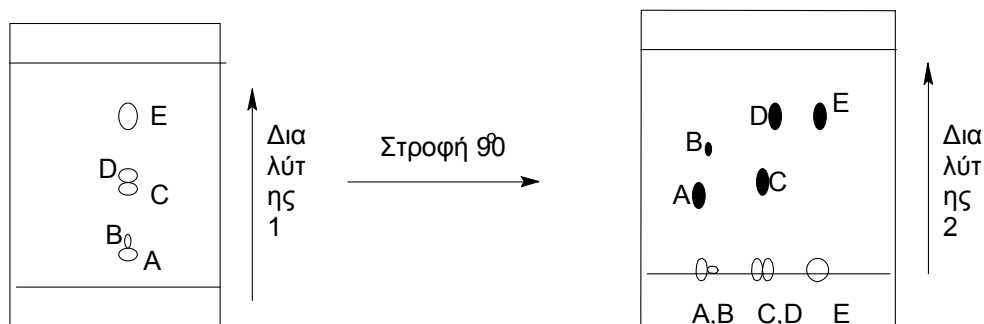
Η διαπίστωση της ταυτότητας των συστατικών ενός μίγματος μπορεί να γίνει και με βάση την τιμή R_F που ορίζεται ως εξής : $R_F = X_c / X_f$.



όπου: X_c απόσταση διανυθείσα από την ουσία και
 X_f απόσταση διανυθείσα από το μέτωπο του διαλύτη

Το R_F , γνωστό και ως συντελεστής επιβράδυνσης, είναι πάντοτε μικρότερο της μονάδας και η τιμή αυτού επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως π.χ. από τη σύσταση του διαλύτη ανάπτυξης, από τη φύση του χάρτου, από τον τρόπο ανάπτυξης του χρωματογραφήματος από τη θερμοκρασία κλπ. Υπό καθορισμένες όμως συνθήκες αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση μιας άγνωστης

ουσίας με σύγκριση της τιμής R_F αυτής της ουσίας με τις τιμές R_F γνωστών ουσιών υπό τις ίδιες συνθήκες.



Διαχωρισμός των συστατικών μίγματος με δυσδιάστατη χρωματογραφία χάρτου.

Άλλη τεχνική η οποία χρησιμοποιείται κυρίως όταν οι τιμές R_F των προσδιοριζόμενων ενώσεων είναι περίπου ίδιες είναι η τεχνική της δυσδιάστατης χρωματογραφίας. Σύμφωνα με αυτήν χρησιμοποιείται τετράγωνο φύλλο χάρτου, αφού δε γίνει η ανάπτυξη του χρωματογραφήματος με ένα διαλύτη, ο χάρτης στρέφεται κατά ορθή γωνία και γίνεται δεύτερη ανάπτυξη με άλλο διαλύτη.

5. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (TLC).

Στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας η στατική φάση και ο μηχανισμός στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος, είναι όμοιοι με αυτούς της χρωματογραφίας επί στήλης γι' αυτό και η ονομασία της τεχνικής αυτής ως χρωματογραφία ανοικτής στήλης.

Η τεχνική λήψης του χρωματογραφήματος είναι η ίδια όπως στη χρωματογραφία επί χάρτου. Το χρωματογραφικό υπόστρωμα είναι επιστρωμένο (λεπτή στιβάδα πάχους 250-500 μ) σε γυάλινη πλάκα, ή φύλλο αλουμινίου ή πλαστικό. Τα προσροφητικά που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως ενεργοποιημένο διοξείδιο του πυριτίου, οξείδιο του αργιλίου, μικροκρυσταλλική κυτταρίνη κλπ.

Η πορεία διαχωρισμού έχει ως εξής: το προς χρωματογράφιση διάλυμα τίθεται πάνω στην πλάκα με μικροσιφώνιο ή μικροσύριγγα σε μικρή απόσταση από το ένα άκρο αυτής. Ακολούθως η πλάκα τοποθετείται μέσα στο θάλαμο χρωματογράφεως ο οποίος περιέχει το διαλύτη αναπτύξεως και εμβαπτίζεται στο άκρο όπου φέρει το δείγμα. Ο διαλύτης προσροφείται στη λεπτή στιβάδα και ανερχόμενος παρασύρει τα συστατικά του μίγματος με διαφορετικές ταχύτητες, επιτυγχάνοντας έτσι το διαχωρισμό τους. Μετά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος η πλάκα ξηραίνεται και ακολουθεί η εμφάνιση του

χρωματογραφήματος όπως στη χρωματογραφία χάρτου.

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων μεθόδων υγρής χρωματογραφίας. Αυτή έχει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα και είναι περισσότερο ευέλικτη και ταχύτερη της χρωματογραφίας επί χάρτου. Χρησιμοποιείται εύκολα για το διαχωρισμό υδρόφοβων ουσιών και κατά την εμφάνιση χρωματογραφημάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν δραστικά μέσα, μη χρησιμοποιήσιμα επί χάρτου. Όπως αναφέρεται και στη χρωματογραφία χάρτου, πολλές φορές για τον επιτυχή διαχωρισμό των συστατικών χρησιμοποιείται η τεχνική της δυσδιάστατης χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας.

6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της εργαστηριακής άσκησης: Η πειραματική αυτή άσκηση έχει ως σκοπό την εξοικείωση των ασκούμενων φοιτητών με την τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Η εφαρμογή αφορά το διαχωρισμό τριών αρωματικών ενώσεων σε υπόστρωμα γέλης οξειδίου του πυριτίου (silica). Θα δοκιμαστούν δύο τεχνικές ανάγνωσης (μια σε θάλαμο υπεριώδους και μία σε θάλαμο ιωδίου).

Όργανα:

Θάλαμος ανάπτυξης για χρωματογραφικές πλάκες (ποτήρι ζέσεως με κάλυμμα κρυσταλλωτήριο),

Χρωματογραφικές πλάκες (Silica gel) σε φύλλο αλουμινίου, Τριχοειδείς σωλήνες για φόρτιση, Λάμπα ανάγνωσης στο υπεριώδες ή Θάλαμος εμφάνισης I₂ (υάλινο δοχείο ερμητικά κλειστό που περιέχει I₂).

Αντιδραστήρια:

Οξικός Αιθυλεστέρας (EtAc), Εξάνιο(Hx),

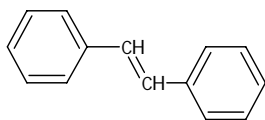
Άγνωστο διάλυμα αρωματικών ενώσεων (1%) σε EtAc

Διάλυμα ανάπτυξης I : (EtAc / Hx, 50/50),

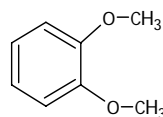
Διάλυμα ανάπτυξης II : (EtAc / Hx, 10/90),

Πρότυπα διαλύματα αρωματικών ενώσεων (1%) σε Οξικό Αιθυλεστέρα,

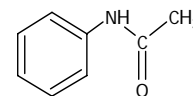
Αρωματικές ενώσεις: trans-Στιλβένιο, 1,2 διμεθοξυ-βενζένιο και ακετανιλίδη.



trans-Στιλβένιο (Σ)



1,2 διμεθοξύβενζενιο (Δ)



Ακετανιλίδη (Α)

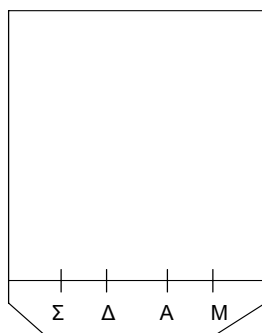
Εκτέλεση

Φτιάξτε 20ml από τα διαλύματα ανάπτυξης, τοποθετήστε τα σε 2 διαφορετικά ποτήρια ζέσεως 1 και 2 και καλύψτε τα με 2 κρυσταλλωτήρια.

Με τη βοήθεια ψαλιδιού, κόψτε 2 χρωματογραφικές πλάκες (5x10cm περίπου). Ψαλιδίστε τις 2 άκρες τις στενής πλευράς τις κάθε πλάκας.

Με τη βοήθεια ενός μολυβιού χαράξτε ελαφρά σε μια απόσταση 1.5cm περίπου από το άκρο της πλάκας μια γραμμή. Πάνω στη γραμμή και σε κανονικές αποστάσεις σημειώνουμε τις θέσεις των προτύπων διαλυμάτων και του αγνώστου δείγματος(M).

Για την εφαρμογή των διαλυμάτων συνήθως χρησιμοποιούμε τριχοειδείς σωλήνες η μικροσιφώνια η μικροσύριγγες. Η εφαρμογή γίνεται με μεγάλη προσοχή (προσπαθώντας να έχουμε όσο το δυνατόν γίνεται μικρότερες κηλίδες ~0,2cm) και σε τρεις δόσεις, αφήνοντας να ξεραθεί καλά, μεταξύ των δόσεων, το σημείο εφαρμογής (βλέπε κάτωθι σχήμα).



Σε πρόχειρο φύλλο χαρτιού αναπαράγουμε σε φυσικό μέγεθος τη πλάκα, τη γραμμή και τις θέσεις εφαρμογής, όπου σημειώνουμε τα ονόματα των ουσιών – δειγμάτων.

Στη συνέχεια, με μεγάλη προσοχή τοποθετούμε τις χρωματογραφικές πλάκες μια σε κάθε θάλαμο ανάπτυξης. Προσέχουμε ώστε η θέση των κηλίδων να είναι παράλληλη προς την επιφάνεια του υγρού, και οπωσδήποτε πάνω από αυτήν.

Αφήνουμε το εκλουστικό διάλυμα να προχωρήσει κατά τα τέσσερα πέμπτα περίπου ως προς το ύψος της πλάκας και σημειώνουμε με μολύβι το μέτωπο του διαλύτη τη στιγμή που απομακρύνουμε την πλάκα από το δοχείο.

Το χρωματογράφημα τελείωσε, η πλάκα αφήνεται 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (για εξάχνωση των διαλυτών) και μεταφέρεται για ανάγνωση.

Η ανάγνωση γίνεται είτε με τη βοήθεια λάμπας υπεριώδους, όπου (παίρνοντας όλες τις προφυλάξεις) σημειώνονται με μολύβι οι θέσεις των κηλίδων, όπως φαίνονται στην υπεριώδη έκθεση της πλάκας, είτε μετά από εμφάνιση με Ιώδιο, όπου η πλάκα τοποθετείτε σε υάλινο δοχείο κεκορεσμένο με ατμούς ιωδίου.

Ερωτήσεις

Ποια είναι τα R_f των προτύπων διαλυμάτων για κάθε διάλυμα ανάπτυξης;

Από τι εξαρτάται το R_f ;

Ποιες ουσίες περιέχει το άγνωστο διάλυμα;

8_n ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ :
ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ .

Η πειραματική αυτή άσκηση έχει ως σκοπό την εξοικείωση των ασκούμενων φοιτητών με την τεχνική της χρωματογραφίας στήλης (LC). Η εφαρμογή αφορά το διαχωρισμό τριών αρωματικών ενώσεων σε στήλη με υπόστρωμα γέλης οξειδίου του πυριτίου (silica), την απομόνωσή τους και την ταυτοποίησή τους.

1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Όργανα :

Γυάλινες στήλες χρωματογραφίας, Δοκιμαστικοί σωλήνες (20), Πιπέτες Pasteur, ποτήρι ζέσεως,

Θάλαμος ανάπτυξης για χρωματογραφικές πλάκες,

Τριχοειδείς σωλήνες για φόρτιση,

Χρωματογραφικές πλάκες (Silica gel),

Λάμπα ανάγνωσης στο υπεριώδες ή Θάλαμος εμφάνισης I₂ (υάλινο δοχείο ερμητικά κλειστό που περιέχει I₂),

Περιστροφικός εξατμιστήρας,

Συσκευή μέτρησης σ.τ..

Αντιδραστήρια:

Silica gel για χρωματογραφία στήλης,

Οξικός Αιθυλεστέρας (EtAc),

Εξάνιο (Hx),

Θειικό μαγνήσιο ή νάτριο,

Άγνωστο διάλυμα αρωματικών ενώσεων (1%) σε EtAc,

Διάλυμα ανάπτυξης I: (EtAc / Hx , 50/50),

Διάλυμα ανάπτυξης II: (EtAc / Hx , 10/90),

Πρότυπα διαλύματα αρωματικών ενώσεων (1%) σε Οξικό Αιθυλεστέρα,

Αρωματικές ενώσεις: trans-Στιλβένιο, 1,2 διμεθοξυ-βενζένιο και ακετανιλίδη.

Εκτέλεση

- **Προετοιμασία της χρωματογραφικής στήλης**

Με τη βοήθεια υάλινης ράβδου βάλτε λίγο βαμβάκι στο κάτω άκρο της γυάλινης στήλης (μπορεί να είναι και προχοϊδα) και τοποθετείστε την σε μεταλλικό στήριγμα με τη στρόφιγγα κλειστή.

Κάτω από την στρόφιγγα τοποθετείστε ένα ποτήρι ζέσεως ή μία κωνική φιάλη.

Παρασκευάστε ένα αιώρημα Silica gel - κινητής φάσης, ρίξτε το προσεχτικά στη χρωματογραφική στήλη και αφήστε το να καθιζάνει. Ανοίξτε και κρατείστε ανοιχτή τη στρόφιγγα μέχρι ότου η στήλη να καλύπτεται από 1cm περίπου από κινητή φάση (προσοχή το προσροφητικό υλικό πρέπει να είναι πάντοτε υγρό).

Συνεχίστε την ανωτέρω διαδικασία έως ότου το μήκος του αιωρήματος να είναι 15-18cm. Αν αιώρημα έχει κολλήσει στα τοιχώματα της στήλης περιβρέξτε εσωτερικά τη στήλη με λίγη κινητή φάση.

Με τη βοήθεια σπάτουλας καλύψτε την πάνω επιφάνεια του αιωρήματος ρίχνοντας περίπου 1cm θειικού μαγνησίου ή θειικού νατρίου και ανοίξτε τη στρόφιγγα μέχρι ο μηνίσκος της κινητής φάσης να αγγίξει το θειικό μαγνήσιο.

Η στήλη είναι έτοιμη προς χρήση. Πρέπει να προσέχουμε ώστε να είναι πάντοτε υγρή.

- **Διαχωρισμός, Συλλογή και Ανίχνευση**

Χρησιμοποιώντας μια πιππέτα Pasteur τοποθετήστε προσεκτικά, αγγίζοντας ελαφρά το πάνω μέρος της στήλης ώστε να μην έχουμε ανατάραξη της, 2ml από το μίγμα των οργανικών ουσιών.

Ανοίξτε τη στρόφιγγα μέχρι ο μηνίσκος του μίγματος να αγγίξει το θειικό μαγνήσιο.

Με τη βοήθεια πιππέτας και χωρίς να διαταράξετε τη στήλη προσθέστε προσεχτικά 15-20ml κινητής φάσης.

Χρησιμοποιώντας μια πιππέτα Pasteur τοποθετήστε προσεκτικά, αγγίζοντας ελαφρά το πάνω μέρος της στήλης ώστε να μην έχουμε ανατάραξη της, 2ml από το μίγμα των οργανικών ουσιών.

Ανοίξτε τη στρόφιγγα μέχρι ο μηνίσκος του μίγματος να αγγίξει το θειικό μαγνήσιο.

Με τη βοήθεια πιππέτας και χωρίς να διαταράξετε τη στήλη προσθέστε προσεχτικά 15-20ml κινητής φάσης.

Ετοιμάστε 20-30 αριθμημένους δοκιμαστικούς σωλήνες για συλλογή κλασμάτων

σημειώνοντας τους με μια γραμμή για μέτρηση όγκου 1ml και τοποθετείστε τους έτσι ώστε ο σωλήνας No1 να βρίσκεται κάτω από τη διαχωριστική στήλη.

Ρυθμίζοντας τη στρόφιγγα για χαμηλή, σχεδόν στάγδην ροή, συλλέξτε 1ml στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα. Αφού συλλεχθεί το πρώτο κλάσμα αλλάξτε σωλήνα και συνεχίστε τη συλλογή.

Όταν το εκλουστικό διάλυμα (κινητή φάση) φτάσει στη κορυφή της στήλης προσθέστε προσεκτικά άλλα 10-20ml κινητής φάσης.

Για να ελέγξουμε την ύπαρξη αρωματικής ένωσης στα κλάσματα που πήραμε, κόβουμε ένα η δύο κομμάτια 2X10cm χρωματογραφικής πλάκας και αριθμούμε όπως και τους δοκιμαστικούς σωλήνες.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	21

Με τη βοήθεια τριχοειδή σωλήνα παίρνουμε διάλυμα από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και το εφαρμόζουμε (3 φορές) στο αντίστοιχο αριθμό της χρωματογραφικής πλάκας. Η εφαρμογή γίνεται με μεγάλη προσοχή (προσπαθώντας να έχουμε όσο το δυνατόν γίνεται μικρότερες κηλίδες ~0,2cm) και σε τρεις δόσεις, αφήνοντας να ξεραθεί καλά μεταξύ των δόσεων το σημείο εφαρμογής.

Μεταφέρουμε τη πλάκα στον θάλαμο υπεριώδους, όπου (παίρνοντας όλες τις προφυλάξεις) σημειώνονται με μολύβι οι θέσεις των κηλίδων, άρα και των δοκιμαστικών σωληνίων που περιέχουν κάποια από τις ενώσεις.

Στη συνέχεια για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει κάποια από τις ενώσεις κάνουμε ποιοτική ανάλυση με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (βλέπε 5^η εργαστηριακή άσκηση) ώστε να αναγνωρίσουμε ποια ένωση περιέχει κάθε δοκιμαστικός σωλήνας.

• **Απομόνωση, ταυτοποίηση οργανικών ουσιών**

Τέλος συγκεντρώνουμε σε ξεχωριστές σφαιρικές φιάλες το περιεχόμενο όλων των δοκιμαστικών σωληνίων που περιέχουν την ίδια ένωση και απομακρύνουμε τον διαλύτη χρησιμοποιώντας περιστροφικό εξατμιστήρα (Rotavapor).

Ελέγχουμε την καθαρότητα του απομονωθέντος προϊόντος και επιβεβαιώνουμε την ανίχνευση με μέτρηση του σ. τ. .

2. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Ποια τα συμπεράσματά σας για το διαχωρισμό και για την ποιότητα διαχωρισμού που επιτεύχθηκε;
2. Τι θα πρέπει να κάνουμε έτσι ώστε και οι 3 ενώσεις να εκλουστούν πιο γρήγορα.
3. Τι θα πρέπει να κάνουμε έτσι ώστε και οι 3 ενώσεις να εκλουστούν πιο αργά
4. Ποια τα συμπεράσματά σας για την καθαρότητα των διαχωρισθέντων προϊόντων;
5. Ποια τα συμπεράσματά σας για την καθαρότητα των απομονωθέντων ουσιών;
6. Είστε βέβαιοι για την ταυτοποίησή τους; Δικαιολογείστε αν ναι. Προτείνεται δοκιμασίες αν όχι.
7. Ποια ένωση είναι πιο πολική από αυτές που έχουμε στο μίγμα μας; Παρουσιάστε και σχολιάστε γενικά τις φυσικοχημικές ιδιότητες αυτών των ενώσεων;
8. Μπορείτε να αιτιολογήσετε τη σειρά έκλουσης τους με βάση τις ιδιότητες τους, τη στατική φάση (silica) και την κινητή φάση.
9. Το εξάνιο ή ο οξικός αιθυλεστέρας είναι πιο πολικός.
10. Για ποιο λόγο χρησιμοποιήθηκε το βαμβάκι στο κάτω μέρος της στήλης;
11. Για ποιο λόγο χρησιμοποιήθηκε το Θεικό Μαγνήσιο στην κορυφή της στήλης;