



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

# Ενόργανη Ανάλυση II

Ενότητα 1: Φροντιστήριο εργαστηριακών  
ασκήσεων Ενόργανης Ανάλυσης II

Θωμαΐδης Νικόλαος  
Τμήμα Χημείας  
Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας

# ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ II

## A. Μοριακή και Ατομική Φασματομετρία

## B. Τεχνικές Διαχωρισμού

Διδάσκων: Επικ. Καθ. Νικ. Θωμαΐδης

Διαλέξεις (ΦΜ3)

- Δευτέρα 9 – 11 πμ : Τεχνικές Διαχωρισμού
- Τετάρτη 11 πμ – 1 μμ : Τεχνικές Φασματομετρίας
- Πέμπτη 11 πμ – 12 μμ : Τεχνικές Φασματομετρίας

Διαδίκτυο:

[www.chem.uoa.gr/courses/instrumental/instrumental2.htm](http://www.chem.uoa.gr/courses/instrumental/instrumental2.htm)

- Διαφάνειες παραδόσεων
- Παλαιά θέματα εξετάσεων (ασκήσεις)
- Ασκήσεις
- Ανακοινώσεις
- Επικοινωνία:

E-mail: [ntno@chem.uoa.gr](mailto:ntno@chem.uoa.gr)

Γραφείο για ερωτήσεις: Τετάρτη 1 – 2 μμ



# ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ

## ΕΝΟΡΓΑΝΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ II

### **A. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ & ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

#### **ΑΣΚΗΣΗ 8:**

ΚΙΝΗΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΗΣ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΟ

#### **ΑΣΚΗΣΗ 9:**

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΛΓΗΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

### **B. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

#### **ΑΣΚΗΣΗ 10:**

ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ ΣΕ ΧΑΛΥΒΕΣ

#### **ΑΣΚΗΣΗ 11:**

ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΙΝΙΝΗΣ

#### **ΑΣΚΗΣΗ 12:**

ΦΛΟΓΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ

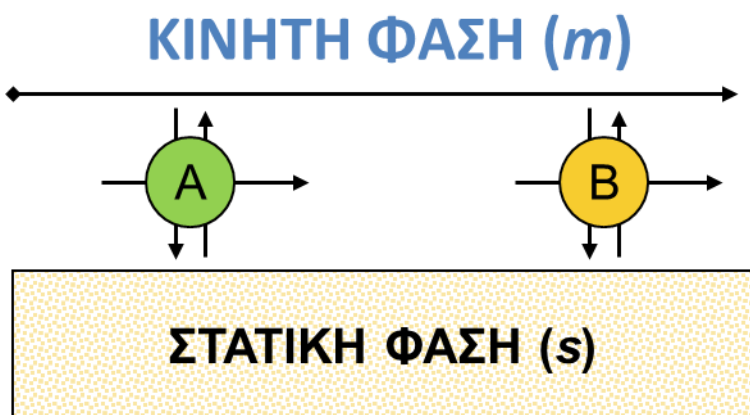
#### **ΑΣΚΗΣΗ 13:**

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΕ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ



# ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ (GC, HPLC)

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΟΥΜΕ ΤΟ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΜΙΑΣ  
ΟΥΣΙΑΣ ΑΠΟ ΤΟΥΣ «ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ»  
ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΕΣ Ή ΆΛΛΕΣ ΟΥΣΙΕΣ



$$K = \frac{C_s}{C_M}$$



# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Η χρωματογραφική ανάλυση γνωστή ως ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ περιλαμβάνει σειρά τεχνικών διαχωρισμού και προσδιορισμού μίγματος ανόργανων και οργανικών ουσιών.

## ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ

α) Επιτυγχάνεται με ΔΙΑΣΠΟΡΑ των συστατικών μεταξύ δύο φάσεων, μιας ΚΙΝΗΤΗΣ και μιας ΣΤΑΤΙΚΗΣ.

β) Βασίζεται σε διαφορές στις φυσικοχημικές ιδιότητες των συστατικών του μίγματος (πολικότητα, μέγεθος μορίων, κ.λ.π.).

γ) Η κινητή φάση διερχόμενη μέσα από τη στατική προκαλεί διαφορετική μετατόπιση πάνω σε αυτήν των συστατικών του μίγματος τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους εξερχόμενα από τη στήλη σε διαφορετικές χρονικές στιγμές.

## ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Κατά την έξοδο από τη στήλη υπάρχει σύστημα ανίχνευσης.

## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

### **1. Ποιοτικός προσδιορισμός (ταυτοποίηση)**

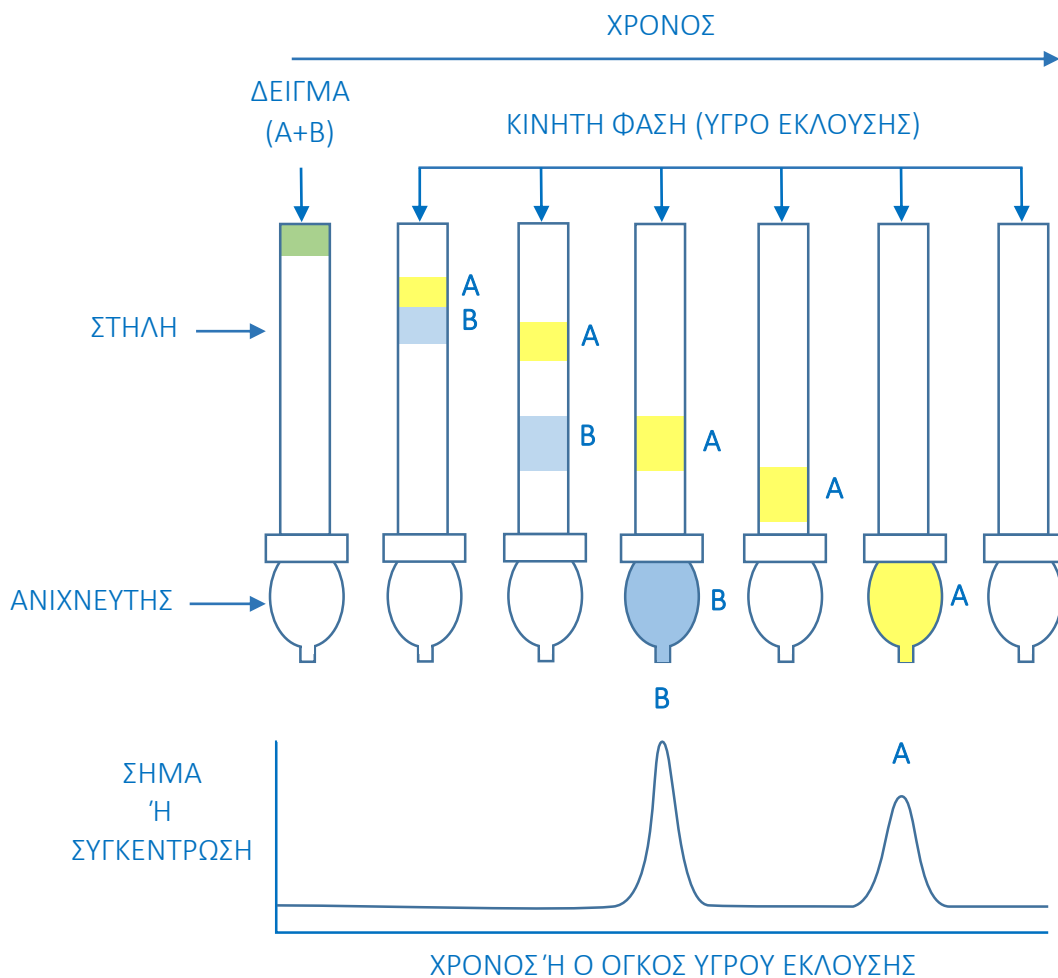
Επιτυγχάνεται με κριτήριο το χρόνο ανασχέσεως ή συγκρατήσεως (Rt)

### **1. Ποσοτικός προσδιορισμός**

Επιτυγχάνεται με κριτήριο το ύψος ή το εμβαδόν των κορυφών που καταγράφονται στο χρωματογράφημα με τη βοήθεια καταγραφικού οργάνου.



# ΑΡΧΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ



Σχηματική παράσταση διαχωρισμού με χρωματογραφία έκλουσης

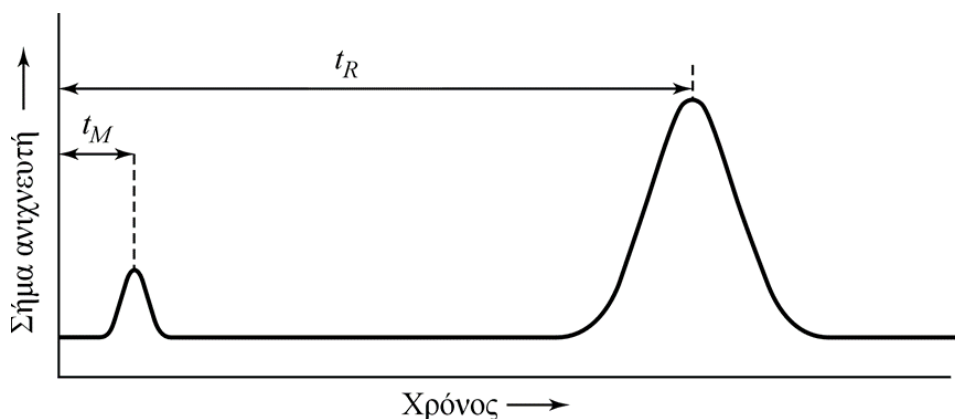


# ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

- Με βάση τη φύση της κινητής και της στατικής φάσης  
υγροχρωματογραφία  
αεριοχρωματογραφία ...
- Με βάση το μηχανισμό διαχωρισμού  
προσρόφηση, κατανομή, ιονανταλλαγή, μοριακός αποκλεισμός...
- Με βάση τη φυσική μορφή της στατικής φάσης  
χρωματογραφία στήλης ή επίπεδη
- Με βάση τον τρόπο εισαγωγής και κινήσεως του δείγματος  
μετωπική, εκτοπίσεως, εκλούσεως...



# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ



**ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ ή ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ ( $t_R$ ):** ο χρόνος που χρειάζεται από τη στιγμή εισαγωγής του δείγματος μέχρι τη στιγμή που η κορυφή της ουσίας φτάνει στον ανιχνευτή

**ΝΕΚΡΟΣ ΧΡΟΝΟΣ ( $t_M$ ):** ο χρόνος που χρειάζεται μια μη κατακρατούμενη ουσία για να φτάσει στον ανιχνευτή

**ΑΝΗΓΜΕΝΟΣ ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ ( $t'_R$ ):**

$$t'_R = t_R - t_M$$

**ΌΓΚΟΣ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ ( $V_R$ ):**  $V_R = t_R F$

**ΝΕΚΡΟΣ ΌΓΚΟΣ ( $V_M$ ):**  $V_M = t_M F$

**ΑΝΗΓΜΕΝΟΣ ΌΓΚΟΣ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ ( $V'_R$ ):**  $V'_R = t'_R F$

Όπου  $F$ : η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης (mL/min)

$V_R$ : όγκος της κινητής φάσης που χρειάζεται να διέλθει από τη στατική φάση για να εκλουστεί μια ουσία

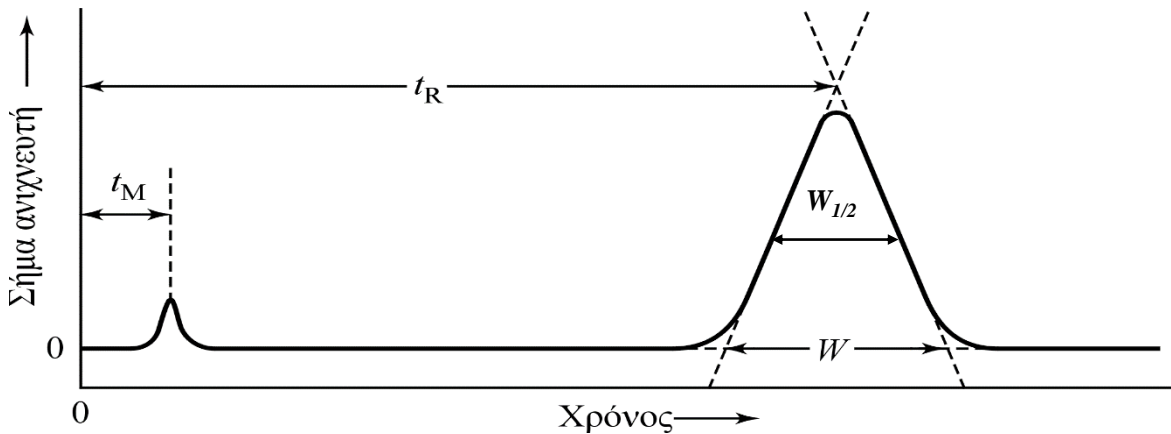
$V_M$ : όγκος της κινητής φάσης στη στατική φάση (στήλη)

(SKOOG σελ. 785-790)





# ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ – ΘΕΩΡΙΑ ΠΛΑΚΩΝ



**W: ΕΥΡΟΣ (ΤΗΣ ΒΑΣΗΣ) ΤΗΣ ΚΟΡΥΦΗΣ**

**$W_{1/2}$ : ΕΥΡΟΣ ΤΗΣ ΚΟΡΥΦΗΣ ΣΤΟ ΜΙΣΟ ΤΟΥ ΥΨΟΥΣ ΤΗΣ**

**ΘΕΩΡΙΑ ΠΛΑΚΩΝ:** Μια χρωματογραφική στήλη διαιρείται κατά μήκος αυτής σε διαχωριζόμενες ζώνες, κάθε δε ζώνη έχει τέτοιο μήκος ώστε εντός αυτής να υπάρχει ισορροπία (κατανομή) μεταξύ στατικής και κινητής φάσης. Η ζώνη αυτή καλείται **ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΠΛΑΚΑ** και το μήκος αυτής **ΥΨΟΣ ΙΣΟΔΥΝΑΜΟ ΠΡΟΣ ΜΙΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΠΛΑΚΑ (ΥΙΘΠ)**

$$\text{ΥΙΘΠ} = H - \frac{L}{N}$$

Όπου

**L:** το μήκος της στήλης (m) και

**N:** ο αριθμός των θεωρητικών πλακών

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 = 5,54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)$$

**ΓΙΑ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΟ ΜΗΚΟΣ ΣΤΗΛΗΣ (L), Ο ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΟΣΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΕΡΟΣ ΟΣΟ ΜΙΚΡΟΤΕΡΟ ΕΙΝΑΙ ΤΟ ΥΙΘΠ (H)**

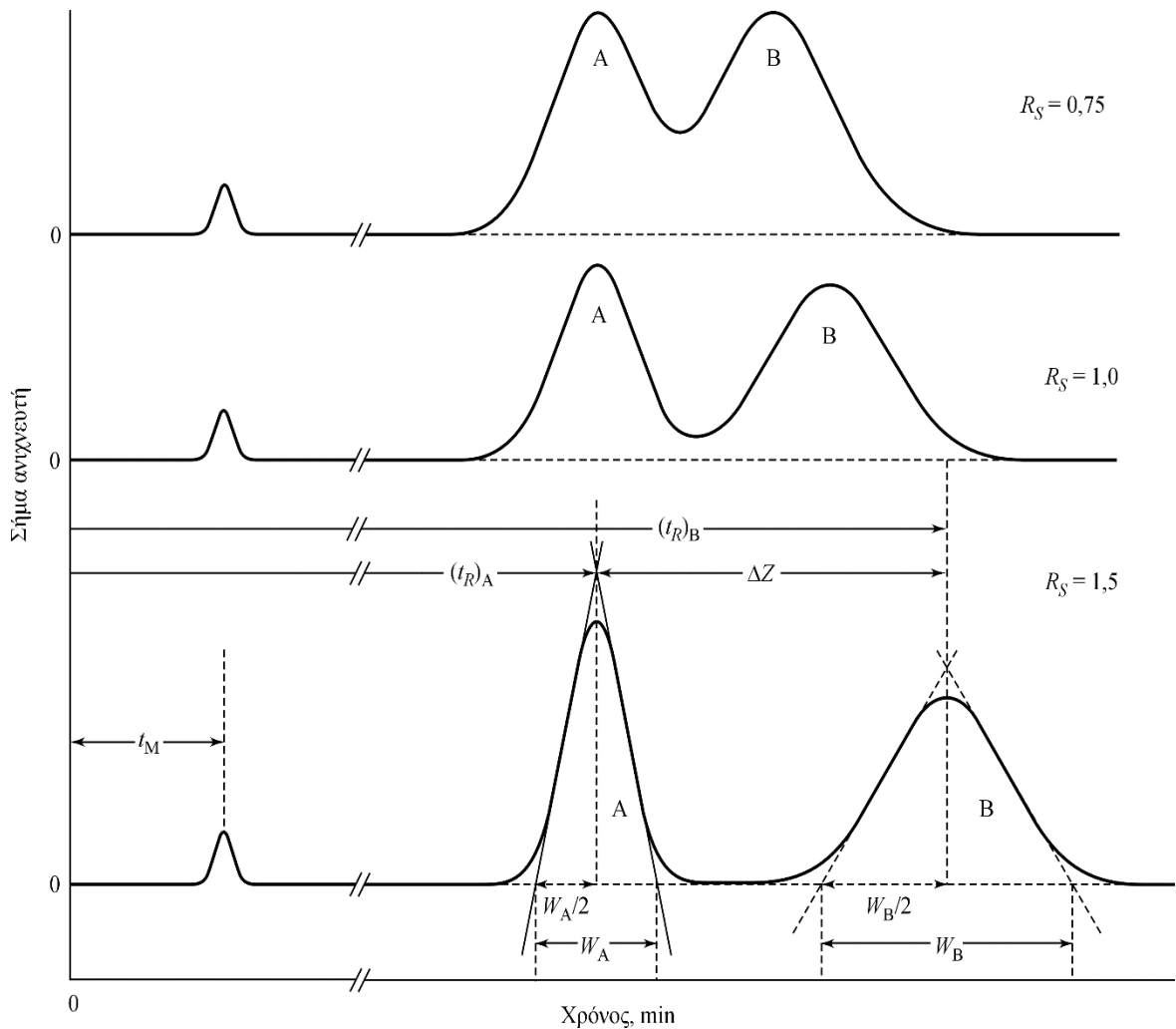
**(ΣΚΟΟΓ σελ. 792-796)**



# ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ Ή ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ

$$R = \frac{2(t_{R,B} - t_{R,A})}{(W_A + W_B)}$$

ΠΛΗΡΗΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ:  $R \geq 1,5$



# ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (LC)

**ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ:** Υγρό

**ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ:** Υγρό που κατακρατείται σε σωματίδια στερεού υλικού πληρώσεως πολύ μικρής διαμέτρου και επομένως μεγάλης αντίστασης

**ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ Η ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ ΠΕΡΝΑ ΜΕΣΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΤΑΤΙΚΗ**

**ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑ:**

Υψηλή διαχωριστική απόδοση, με κορυφές μικρού εύρους και μεγάλου ύψους, κατάλληλες για **ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**



## (HPLC)

### 1. Σύστημα παροχής κινητής φάσης και αντλία

Απαραίτητη η απαέρωση των διαλυτών με διήθηση υπό κενό και με χρήση ειδικών φίλτρων.

Πιέσεις που αναπτύσσονται με στήλες μήκους 10-25 cm και διαμέτρου 2-5 mm και ροές 0,5 – 4 ml/min:

**70 – 350 Atm (1000 – 5000 psi)**

### 2. Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Περιστρεφόμενη βαλβίδα με βρόχο συγκεκριμένου όγκου (loop).

### 3. Στήλη

Χαλύβδινοι σωλήνες μήκους 10-25 cm και διαμέτρου 2-5 mm, πληρωμένες με μικροπορώδη σωματίδια διαμέτρου <2 – 5 μm. Η **υγρή στατική φάση συνδέεται χημικά** (ομοιοπολικά) στην επιφάνεια των σωματιδίων.

### 4. Ανιχνευτής

Υπεριώδους – ορατού σταθερού λ (254 nm)

### 5. Καταγραφέας



## ΥΓΡΕΣ ΣΤΑΤΙΚΕΣ ΦΑΣΕΙΣ

R: $(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ,	$(\text{CH}_2)_3\text{CN}$	ΠΟΛΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ
R: $(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ ,	$(\text{CH}_2)_2\text{-C}_6\text{H}_5$	ΜΗ ΠΟΛΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ

## ΚΑΝΟΝΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

(Normal Phase HPLC)

Υγρή Κινητή Φάση: ΜΗ ΠΟΛΙΚΗ

Υγρή Στατική Φάση: ΠΟΛΙΚΗ

Το πιο πολικό συστατικό εκλύεται ΤΕΛΕΥΤΑΙΟ

## ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΥ ΦΑΣΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

(Reversed Phase HPLC)

Υγρή Κινητή Φάση: ΠΟΛΙΚΗ

Υγρή Στατική Φάση: ΜΗ ΠΟΛΙΚΗ (π.χ.  $\text{C}_{18}$ )

Σε αντιστρόφου φάσης χρωματογραφία:

α) Το πιο πολικό συστατικό εκλύεται ΠΡΩΤΟ

β) Όσο αυξάνει το  $\text{H}_2\text{O}$  στην κινητή φάση τόσο αυξάνει η πολικότητά της με αποτέλεσμα να αυξάνει το  $R_t$  (οι κορυφές εμφανίζονται σε μεγαλύτερους χρόνους)



# ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (LC)

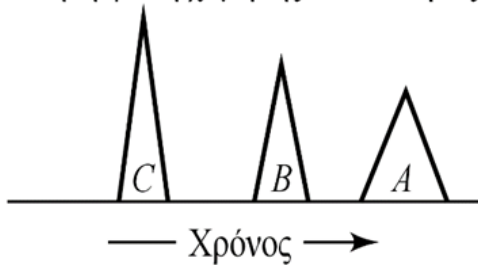
## ΠΟΛΙΚΗ στατική φάση

## ΜΗ ΠΟΛΙΚΗ στατική φάση

(α)

Χρωματογραφία κανονικής φάσης

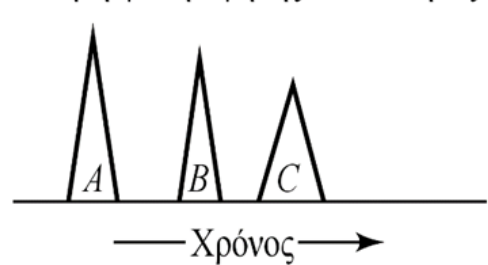
Κινητή φάση χαμηλής πολικότητας



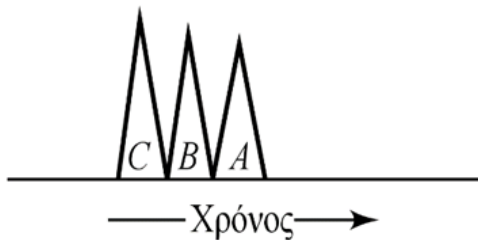
(β)

Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης

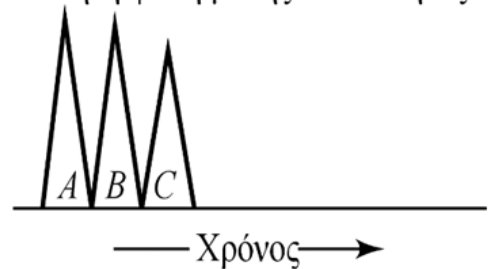
Κινητή φάση υψηλής πολικότητας



Κινητή φάση μέσης πολικότητας



Κινητή φάση μέσης πολικότητας



Πολικότητα διαχωριζόμενων ουσιών:  $A > B > C$



# ΗPLC ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Ο μηχανισμός κατανομής είναι ο συνηθέστερος.

Βασίζεται στις διαφορές πολικότητας των συστατικών. Η διαδικασία της υγρό-υγρό κατανομής είναι ευαίσθητη σε μικρές διαφορές στο μοριακό βάρος των συστατικών και προτιμάται για διαχωρισμό μελών ομόλογης σειράς.

Για φάρμακα μέσου Μ.Β. και ενδιάμεσης πολικότητας ο συνηθέστερος μηχανισμός συγκρατήσεως στη στατική φάση είναι με κατανομή (κανονικής ή αντιστρόφου φάσης χρωματογραφία).

Για Φαρμακευτικές μη ιονικές ουσίες μέσου Μ.Β. και ενδιάμεσης πολικότητας χρησιμοποιείται ΗPLC αντιστρόφου φάσης.

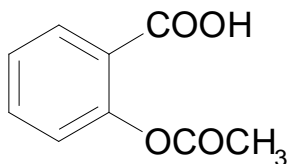
## ΗPLC Κατανομής με σχηματισμό ζεύγους ιόντων

- Για Φαρμακευτικές ουσίες ιονισμένες χρησιμοποιείται ΗPLC Κατανομής ζεύγους ιόντων.
- Προστίθεται στην κινητή φάση μία ιονισμένη ουσία με την οποία τα ιονισμένα συστατικά του μίγματος σχηματίζουν ΖΕΥΓΗ ΙΟΝΤΩΝ μικρής πολικότητας που συγκρατούνται ισχυρότερα στην υγρή στατική φάση ( $C_{18}$ )



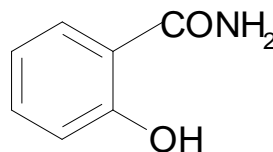
**Ασπιρίνη** (ακετυλοσαλικυλικό οξύ )

$C_9H_8O_4$  - MB = 180,16



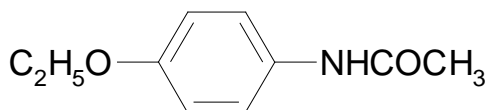
**Σαλικυλαμίδιο** (ο-υδροξυβενζαμίδιο)

$C_7H_7NO_2$  - MB = 137,14



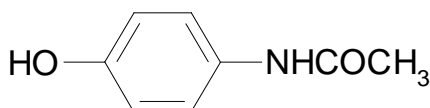
**Φαινακετίνη** (ακετοφαινετιδίνη)

$C_{10}H_{13}NO_2$  - MB = 179,22



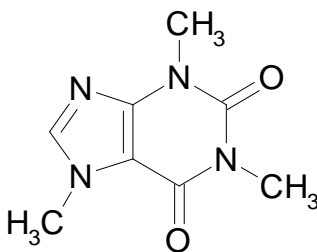
**Παρακεταμόλη** (π-ακεταμινοφαινόλη)

$C_8H_9NO_2$  - MB = 151,16



**Καφεΐνη** (1,3,7-τριμεθυλο-2,6-διοξυπουρίνη)

$C_8H_{10}N_4O_2$  - MB = 194,19



**Δείγματα:** Αναλγητικά δισκία, όπως ασπιρίνη Bayer, BC Powder, Depon, Lonarid.

## Διαλύτες

- Μεθανόλη, χρωματογραφικώς καθαρή (HPLC grade)
- Οξικό οξύ, παγόμορφο
- Απιοντισμένο και απεσταγμένο νερό





# ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (LC)

## ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ:

Η εισαγωγή των φοιτητών στη χρήση και λειτουργία του υγροχρωματογράφου

Η εξοικείωση τους με τις έννοιες του  $t_R$  (ταυτοποίηση ουσιών), διαχωριστικότητα,  $R$ , και  $N$  και ΥΙΘΠ (αποδοτικότητα στήλης)

Η κατανόηση του διαχωρισμού αντίστροφης φάσης και σύμφωνα με την πολικότητα των ενώσεων

Ο ποσοτικός προσδιορισμός ακετυλοσαλικυλικού οξέος (ασπιρίνης) σε φαρμακευτικά σκευάσματα

**ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ: Μεθανόλη:Νερό:Οξικό οξύ (50:49:1)**

**ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΡΟΗΣ: 1 mL/min**

**ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ: Στήλη αντιστρόφου φάσεως C-18**

**ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ: Φασματόμετρο UV 254 nm**

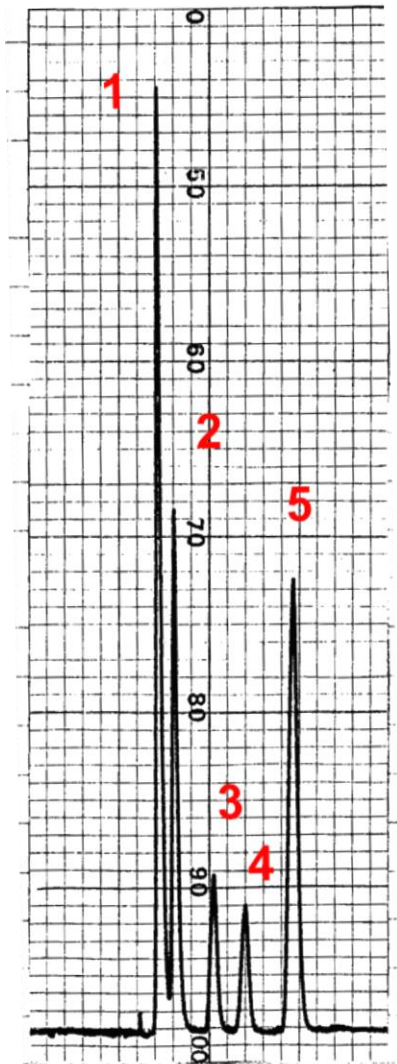
## ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ:

Συγκρίνουμε τους χρόνους ανάσχεσης 5 φαρμακευτικών ουσιών στο συγκεκριμένο υγροχρωματογραφικό σύστημα και υπολογίζουμε τη διαχωριστικότητα,  $R$ , της μιας ένωσης ως προς την επόμενη, ελέγχοντας έτσι την ποιότητα του διαχωρισμού



# ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (LC)

Ενίουμε την κάθε ουσία ξεχωριστά, υπολογίζουμε τον  $t_R$  τους και στη συνέχεια ενίουμε το μίγμα τους και ταυτοποιούμε. Υπολογίζεται η διαχωριστικότητα,  $R$ .



1. p-Ακεταμινοφαινόλη
2. Καφεΐνη
3. Σαλικυλαμίδιο
4. Ασπιρίνη
5. Φαινακετίνη

$$R = \frac{2(t_{R,B} - t_{R,A})}{(W_A + W_B)}$$



# ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΣΠΙΡΙΝΗΣ ΜΕ ΗPLC

## ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

1. Συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης που περιλαμβάνει:
  - A) αντλία
  - B) αυτόματο σύστημα εισαγωγής δείγματος σταθερού όγκου 10  $\mu\text{L}$
  - Γ) ανιχνευτή UV ρυθμισμένο σε σταθερό μήκος κύματος (254 nm)
2. Στήλη αντιστρόφου φάσεως  $\text{C}_{18}$  (250 $\times$ 4,6 nm) με μέγεθος κόκκων 10  $\mu\text{m}$
3. Καταγραφέας και χρονόμετρο

## ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ (έτοιμη και απαερωμένη)

Μεθανόλη/ $\text{H}_2\text{O}$ / $\text{CH}_3\text{COOH}$  (50%, 49%, 1% αντίστοιχα)

Παρασκευάζεται με ανάμιξη:

3 mL παγόμορφου  $\text{CH}_3\text{COOH}$

150 mL Μεθανόλης

147 mL  $\text{H}_2\text{O}$



# ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΣΠΙΡΙΝΗΣ ΜΕ ΗΡΛC

## Παρασκευή προτύπου διαλύματος ακετυλοσαλικυλικού οξέος (350 mg/100 mL)

- Ζύγιση 350 mg αναλυτικώς καθαρού ακετυλοσαλικυλικού οξέος
- Μεταφορά σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL
- Προσθήκη 50 mL μεθανόλης
- Ανάμιξη μέχρι πλήρους διαλυτοποίησεως
- Συμπλήρωση της φιάλης μέχρι τη χαραγή με H<sub>2</sub>O

## Κατεργασία δισκίου ασπιρίνης

- Κονιορτοποίηση ενός δισκίου ασπιρίνης
- Ποσοτική μεταφορά σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL
- Προσθήκη 50 mL μεθανόλης και έντονη ανατάραξη για διαλυτοποίηση του δραστικού συστατικού
- Άφεση της φιάλης ώστε να καθιζήσουν τα έκδοχα
- Συμπλήρωση της φιάλης μέχρι τη χαραγή με H<sub>2</sub>O
- Διήθηση του υπερκείμενου 2 φορές με ηθμό Millipore
- Έγχυση του δείγματος στην συσκευή του υγρού χρωματογράφου

**ΤΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΚΑΙ ΤΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΤΟΥ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ  
ΕΝΙΟΝΤΑΙ ΕΙΣ ΔΙΠΛΟΥΝ**



# ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΣΠΙΡΙΝΗΣ ΜΕ ΗPLC

## Επεξεργασία χρωματογραφημάτων

### 1. Ταυτοποίηση του δραστικού συστατικού του δισκίου ασπιρίνης

Από το χρωματογράφημα (ταχύτητα 1 cm/min):

- Υπολογισμός του χρόνου ανάσχεσης του προτύπου (και για τις δύο εγχύσεις)
- Εξαγωγή του μέσου χρόνου ανάσχεσης του προτύπου
- Υπολογισμός του χρόνου ανάσχεσης του δείγματος
- Σύγκριση χρόνου ανάσχεσης ( $t_R$ ) προτύπου και δείγματος

### 2. Ποσοτικός προσδιορισμός ασπιρίνης

$$m \text{ Ασπιρίνης (mg)/δισκίο} = [\text{Υψος δείγματος (cm)/Υψος προτύπου (cm)}] \times m \text{ (mg) προτύπου}$$

όπου  $m$  προτύπου = 350 mg



# ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Η χρησιμοποιούμενη αντίδραση κατά τη διάρκεια της μετρήσεως βρίσκεται σε εξέλιξη

Μετρούνται οι μεταβολές των συγκεντρώσεων ή ενός φυσικού μεγέθους (π.χ. απορρόφηση) και :

- είτε εξάγονται συμπεράσματα για την κινητική της
- είτε συσχετίζονται με τη συγκέντρωση του αναλύτη

## ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΜΑ

- Ταχείες μέθοδοι
- Εκλεκτικές για ορισμένες χημικές οντότητες στο διάλυμα: Ενζυμικές αντιδράσεις
- Σχετικές και όχι απόλυτες μετρήσεις:  $\Delta A = f(C)$ . Οι μετρήσεις μας είναι ανεπηρέαστες από τους παρεμποδιστές (π.χ. θολερότητα ορού)

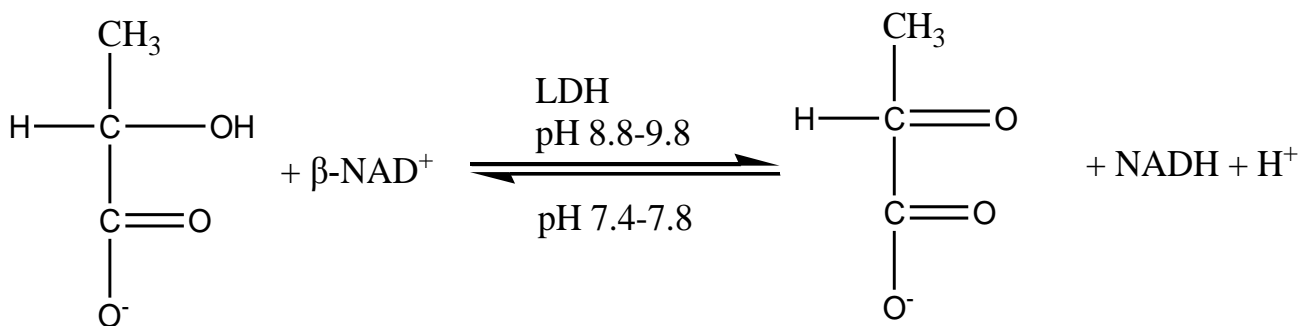
## ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ:

- Η εισαγωγή των φοιτητών στην ενζυμική και κλινική ανάλυση
- Η εξοικείωση τους με τις έννοιες της διεθνούς μονάδας ενεργότητας (IU), των ορών ελέγχου (φυσιολογικός-παθολογικός) και των τιμών αναφοράς διαφόρων βιοχημικών μορίων
- Ο προσδιορισμός της ενζυμικής συγκέντρωσης (ή ενεργότητας) της LDH σε φυσιολογικό και παθολογικό ορό



# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ LDH

Η γαλακτική αφυδρογονάση καταλύει την οξείδωση του γαλακτικού οξέος (L) σε πυροσταφυλικό οξύ (P) με τη συμμετοχή του οξειδοαναγωγικού συστήματος  $\beta\text{-NAD}^+/\text{NADH}$ .



**L-γαλακτικό οξύ (L)**

**Πυροσταφυλικό οξύ (P)**

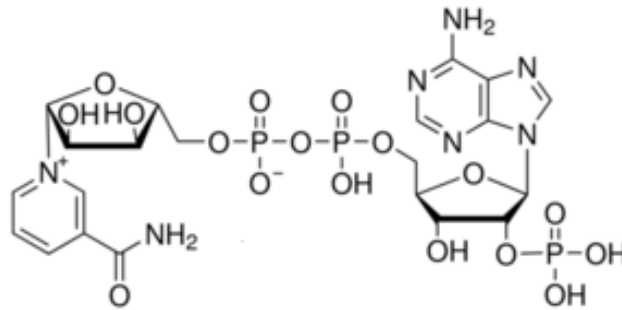
Η αντίδραση είναι αντιστρεπτή και η ισορροπία είναι μετατοπισμένη προς την αναγωγή του P προς L σε pH 7.4-7.8

Ο ορός (ο οποίος περιέχει την LDH) προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα NADH – πυροσταφυλικού οξέος και παρακολουθείται η μείωση της απορρόφησης του NADH στα 340 nm στους 37°C για 3-4 min.

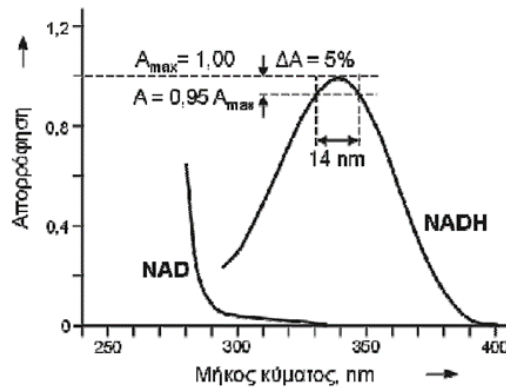
Η ενεργότητα της LDH προσδιορίζεται από την κινητική καμπύλη ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΩΣ – ΧΡΟΝΟΥ:

$$E(\text{IU/L}) = \frac{\Delta A \cdot 10^6 \cdot V_t}{t \cdot \varepsilon \cdot b \cdot V_s}$$

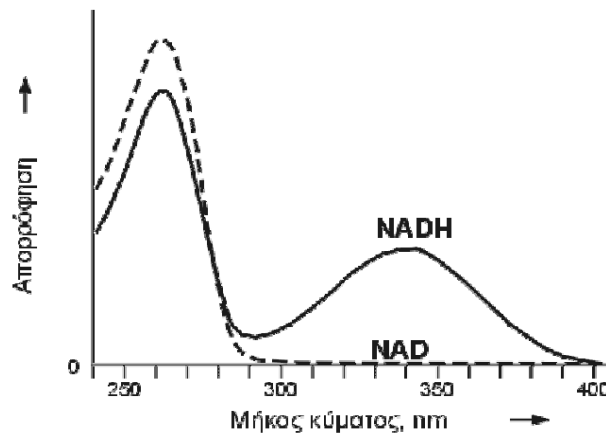




β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate



Φάσμα απορρόφησης των NAD και NADH



Απορρόφηση των NAD και NADP ως προς το μήκος κύματος. Τα NADP και NADPH έχουν ίδιο φάσμα



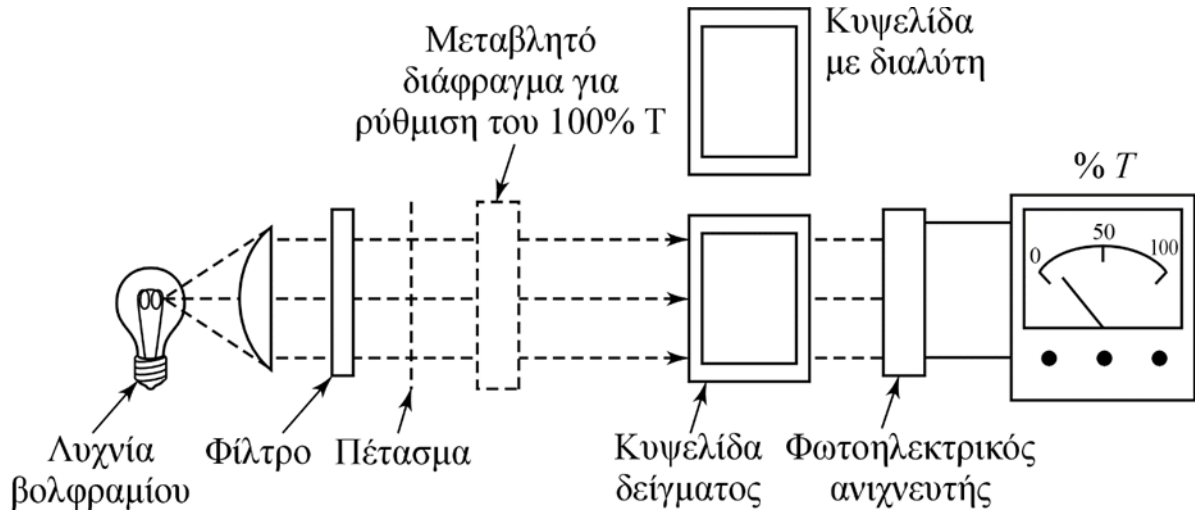


# ΜΟΡΙΑΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ

## Νόμος του Beer:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc$$

## ΒΑΣΙΚΑ ΤΜΗΜΑΤΑ ΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥ



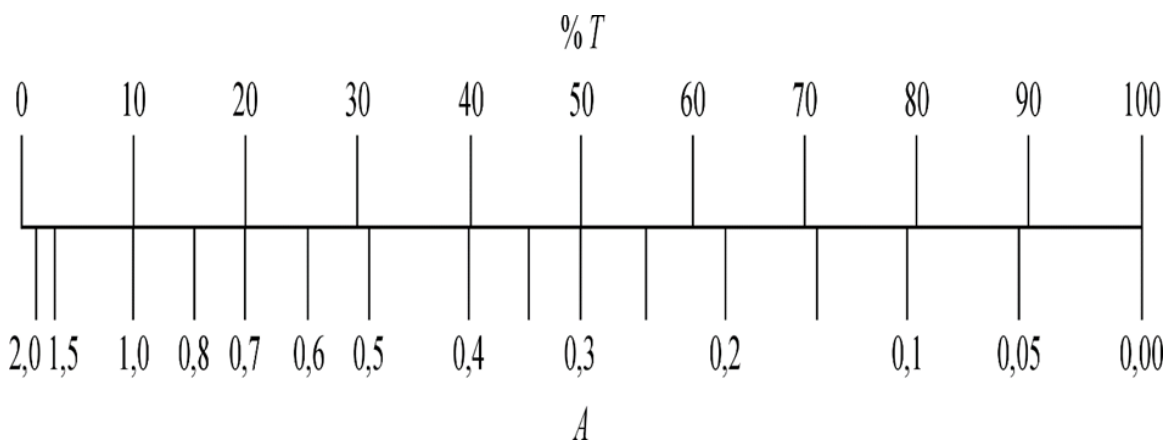
## Μέτρηση Διαπερατότητας:

**Ρύθμιση 0% T:** κενή η κυψελίδα - πέτασμα κλειστό

**Ρύθμιση 100% T:** κυψελίδα με διαλύτη του δείγματος (νερό) και πέτασμα ανοικτό



# ΚΛΙΜΑΚΑ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ ΕΝΟΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥ



**ΔΥΟ ΚΛΙΜΑΚΕΣ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ:**

**Διαπερατότητα (%T):**

**Δεκαδική (αναλογική) κλίμακα**

**Απορρόφηση (A):**

**Λογαριθμική κλίμακα (μεγάλη αβεβαιότητα στην ανάγνωση)**



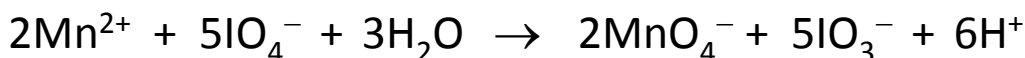
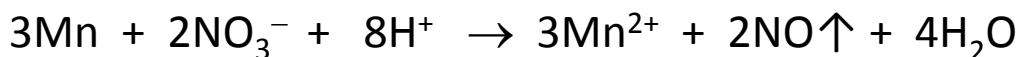
# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Mn σε ΧΑΛΥΒΕΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΟΡΑΤΟΥ

## ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ:

- Η εισαγωγή των φοιτητών στη χρήση και λειτουργία του αναλογικού φασματοφωτομέτρου ορατού - υπεριώδους
- Η εξοικείωσή τους με τις έννοιες **απορρόφηση, διαπερατότητα, νόμος του Beer**
- Η εξοικείωσή τους με την προετοιμασία δειγμάτων για τον προσδιορισμό μετάλλων με οπτικές μεθόδους
- Η εξοικείωση τους με την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων από διάλυμα παρακαταθήκης και ο νόμος της αραιώσης.
- Ο ποσοτικός προσδιορισμός μαγγανίου σε χάλυβες σε % κ.β. και η εξίσωση υπολογισμού του

## ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το δείγμα του χάλυβα διαλύεται σε αραιό νιτρικό οξύ και οξειδώνεται προς **υπερμαγγανικά ιόντα** με υπεριωδικό κάλιο. Η απορρόφηση του διαλύματος μετρείται στα **525 nm** και από την απορρόφηση υπολογίζεται η **% κ.β. περιεκτικότητα του μαγγανίου στον χάλυβα** με τη βοήθεια καμπύλης βαθμονόμησης. Οι αντιδράσεις είναι οι εξής:



# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Mn σε ΧΑΛΥΒΕΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΟΡΑΤΟΥ

## ΠΟΡΕΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

**Υπολογισμός** όγκου διαλ. παρακαταθήκης για την παρασκευή ενδιάμεσου προτύπου διαλύματος και παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων εργασίας

**Ζύγιση και διαλυτοποίηση** δείγματος, πορεία πειραματικής εργασίας: **οξείδωση και άρση παρεμποδίσεων (επεξήγηση κάθε βήματος της προετοιμασίας)**

**Βαθμονόμηση** φασματοφωτομέτρου και μέτρηση της διαπερατότητας των άγνωστων διαλυμάτων

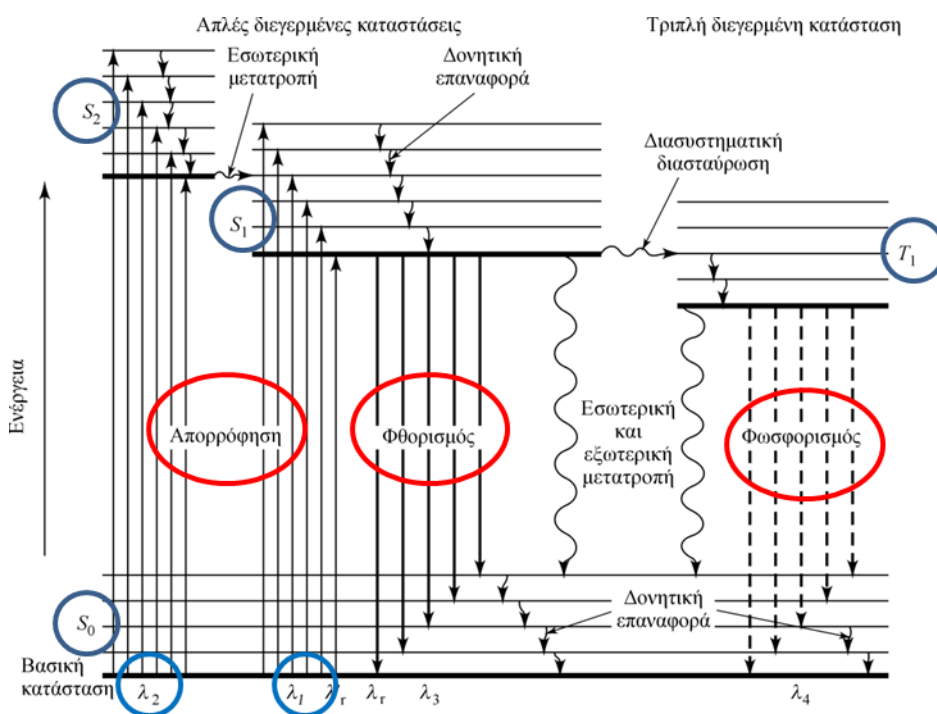
**Υπολογισμός της % κ.β. περιεκτικότητας Mn** στο δείγμα χάλυβα

## **ΠΡΟΣΟΧΗ:**

**Η εξίσωση υπολογισμού της περιεκτικότητας, όπως και οι αρχικοί υπολογισμοί των όγκων και των συγκεντρώσεων είναι παραδοτέα της άσκησης**



# ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ



**Μοριακή Απορρόφηση:** Πολύπλοκα φάσματα τα οποία οφείλονται κυρίως στην ύπαρξη πολλών ενεργειακών καταστάσεων τόσο ηλεκτρονικών όσο δονητικών και περιστροφικών

**Αποδιέγερση με εκπομπή ακτινοβολίας**

**Φθορισμός:** Αποδιέγερση του μορίου σε χρόνο μέχρι  $10^{-5}$  s

**Φωσφορισμός:** Αποδιέγερση του μορίου μέσω μιας μετασταθούς κατάστασης (τριπλή κατάσταση) με μεγάλο χρόνο ζωής  $>10^{-5}$  s

$$F = 2,303K' \epsilon b C P_0 = K'' C$$



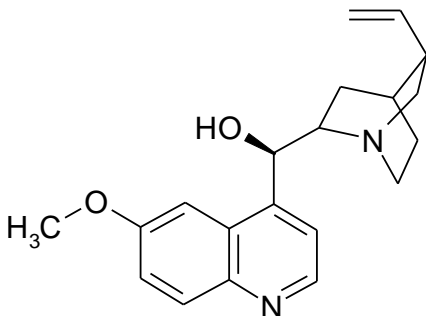
# ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΙΝΙΝΗΣ

## ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ:

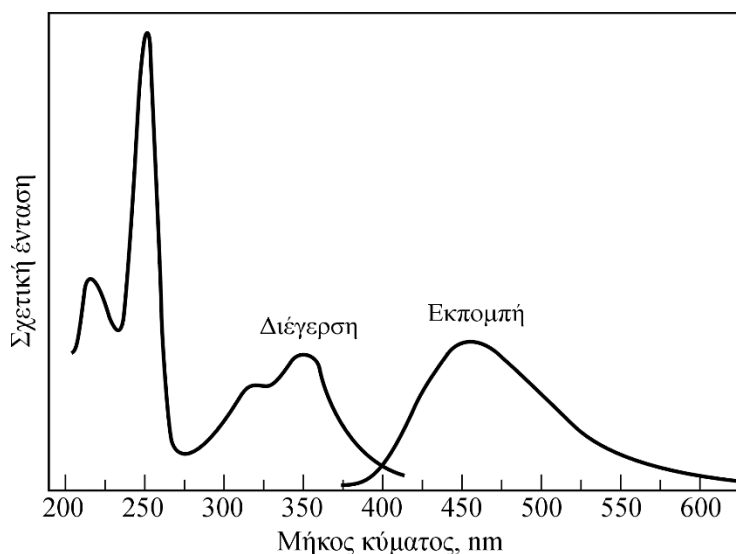
- Η εισαγωγή των φοιτητών στη χρήση και λειτουργία του φθορισμομέτρου
- Η εξοικείωσή τους με τις έννοιες μοριακή φωταύγεια, φθορισμός, κβαντική απόδοση και **φθορισμός και δομή**.
- Η εξοικείωσή τους με την προετοιμασία δειγμάτων για τον προσδιορισμό οργανικών ενώσεων με φθορισμομετρία.
- Ο ποσοτικός προσδιορισμός κινίνης σε φαρμακευτικά σκευάσματα και ποτά.



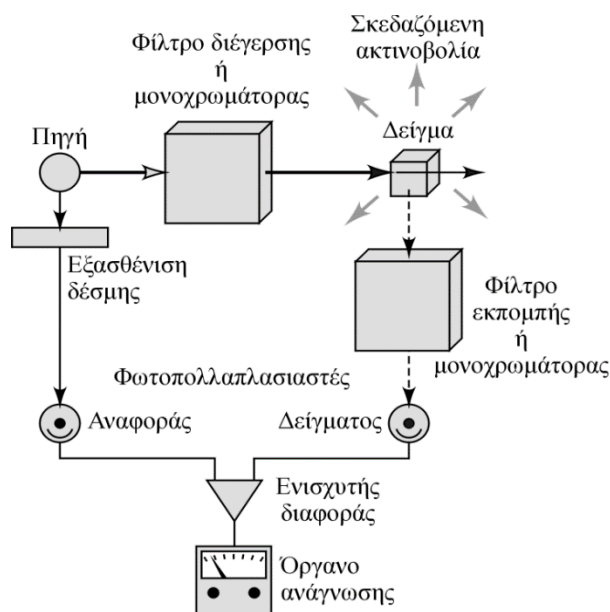
# ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΙΝΙΝΗΣ



**Επίδραση δομής στο φθορισμό  
(θειικά άλατα κινίνης)**



**Οργανολογία:**  
**Ο ανιχνευτής είναι πάντοτε  
σε γωνία 90° με τη δέσμη  
ακτινοβολίας από τη λυχνία Xe**



# ΑΤΟΜΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ

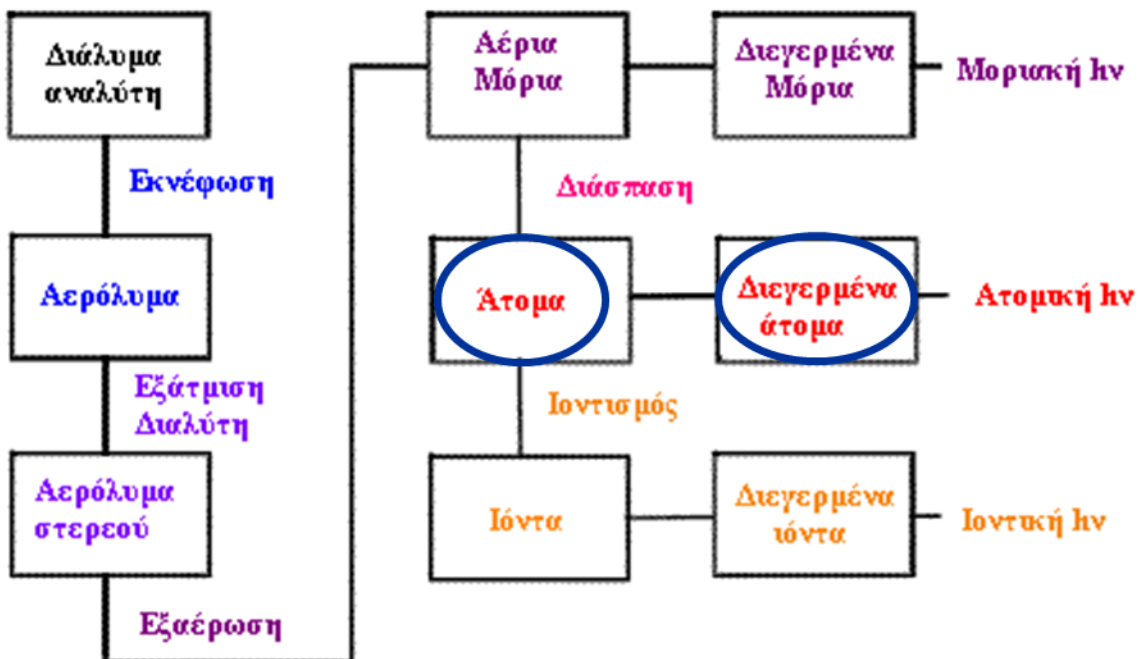
Αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με **άτομα**  
(στην αέρια φάση) →

## ΣΤΟΙΧΕΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ:

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης σε διάλυμα ή  
περιεκτικότητας σε στερεό δείγμα στοιχείων

Το δείγμα εκτίθεται σε **θερμική** ή **ηλεκτρική** ενέργεια:

1. **Εξαέρωση**
2. **Ατομοποίηση**





# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΌΣ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΕ ΕΝΕΣΙΜΟ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ

## ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ:

- Η εισαγωγή των φοιτητών στη χρήση και λειτουργία του **φασματομέτρου ατομικής απορρόφησης**
- Η εξοικείωσή τους με τις έννοιες ατομική απορρόφηση, νόμος του Beer στη ΦΑΑ, **φυσικές παρεμποδίσεις** και τη **μέθοδο προσθήκης γνωστής ποσότητας**
- Η εξοικείωσή τους με την **προετοιμασία δειγμάτων** για τον προσδιορισμό μετάλλων με οπτικές μεθόδους, και συγκεκριμένα της φασματομετρίας ατομικής απορρόφησης και ατομικής εκπομπής
- Η εξοικείωσή τους με τεχνικές φυσικού διαχωρισμού, όπως η φυγοκέντριση

## **Ο ΝΟΜΟΣ ΤΟΥ BEER ΣΤΗΝ AAS**

$$A = -\log T = -\log(P/P_0) = 0,434knb = k' bN = k''c$$

Σχετικές μετρήσεις – Καμπύλη αναφοράς



# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΌΣ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΕ ΕΝΕΣΙΜΟ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ

## Διάταξη οργάνων AAS



## ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗΝ AAS

1. Λυχνία κοίλης καθόδου
2. Καυστήρας προανάμιξης
3. Μονοχρωμάτορας
4. Φωτοπολλαπλασιαστής
5. Αέρια: Φλόγα αέρα – ακετυλενίου

Προσδιορισμός ελεύθερου και ολικού Zn σε σκεύασμα ινσουλίνης, μετά από **φυγοκέντριση**

Ο **ολικός Zn** θα προσδιοριστεί με 2 μεθόδους:

- Μέθοδο καμπύλης αναφοράς
- Μέθοδο προσθήκης γνωστής ποσότητας

➤ Σύγκριση των δύο αποτελεσμάτων



# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΌΣ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΕ ΕΝΕΣΙΜΟ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ

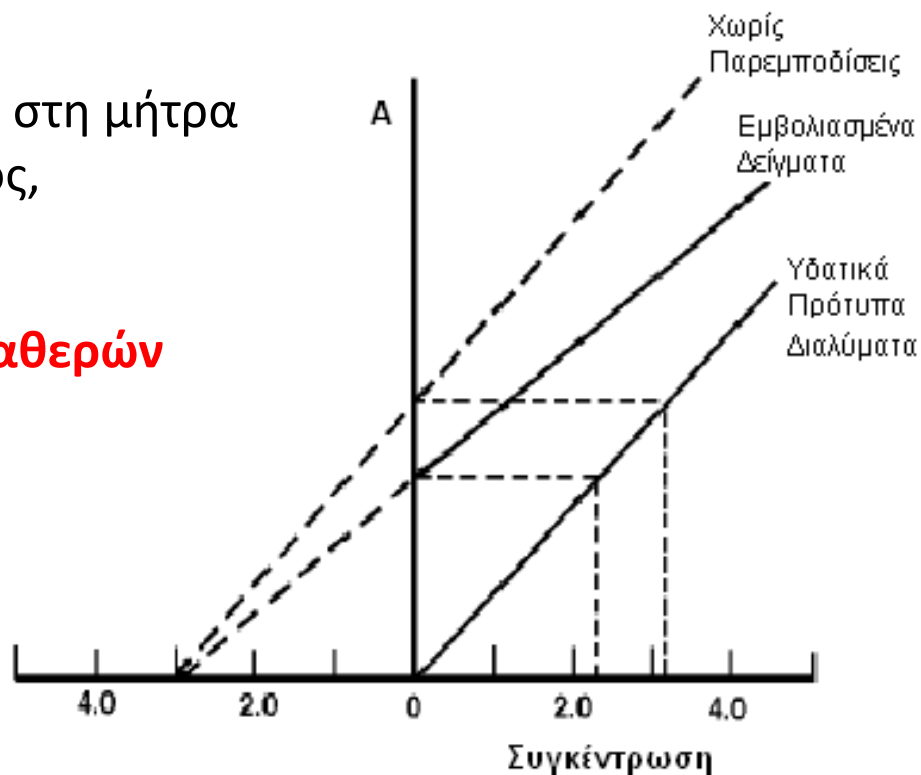
## Φυσικές παρεμποδίσσεις στη FAAS:

- Αλλαγή των φυσικών ιδιοτήτων του διαλύματος (ιξώδες, επιφανειακή τάση, πυκνότητα)
- Άλατα ή οργανικοί διαλύτες
- Μεταβολή στην ταχύτητα εκνέφωσης και στη διάμετρο των σωματιδίων του αερολύματος.

➤ Προσαρμογή στη μήτρα του δείγματος,

ή

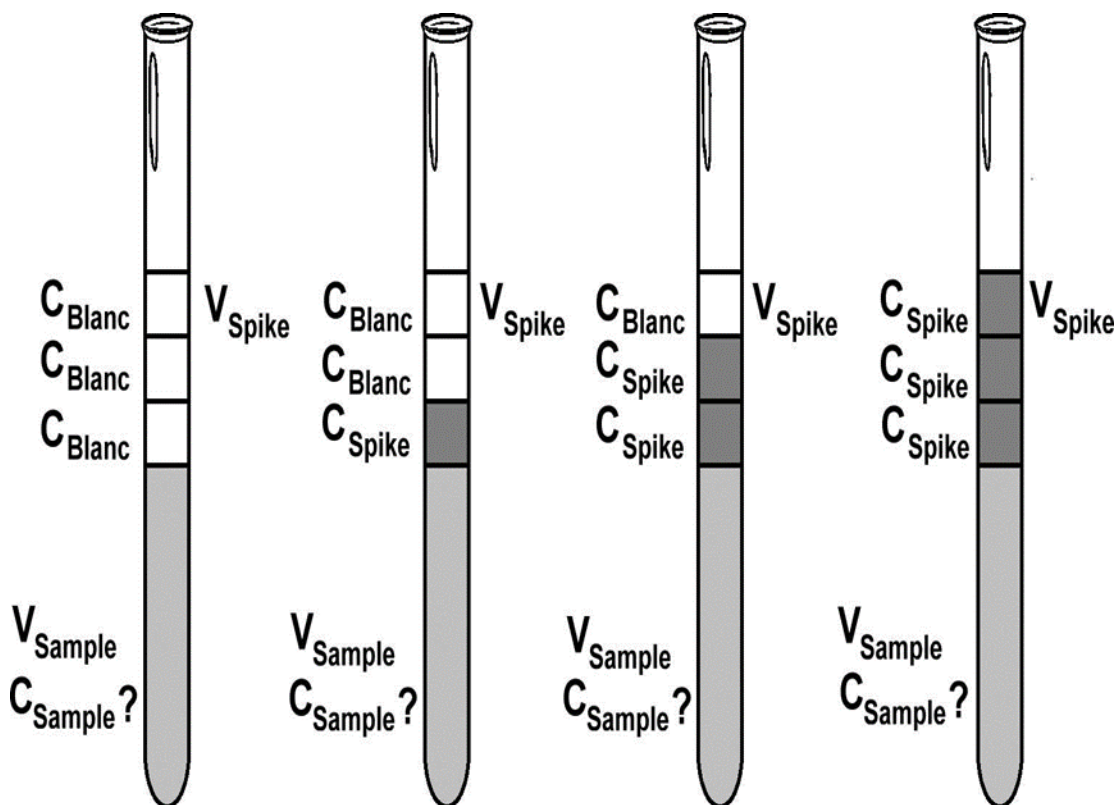
➤ **Μέθοδος σταθερών προσθηκών**



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΌΣ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΕ ΕΝΕΣΙΜΟ  
ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ  
ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ

Μέθοδος προσθήκης γνωστής ποσότητας  
(standard addition method):

Προσθήκη αναλύτη κατ' αύξουσα ποσότητα  
σε σταθερό τελικό όγκο



$$V_{\text{Sample}} \gg V_{\text{Spike}}$$

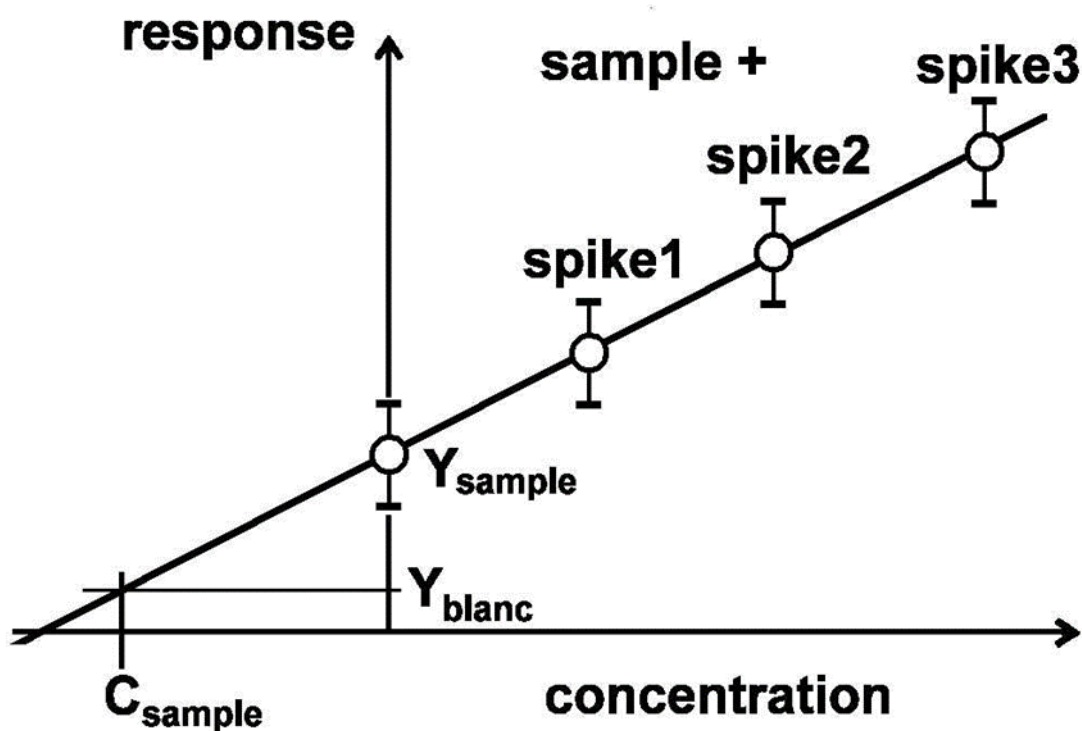
$$C_{\text{Sample}}? \ll C_{\text{Spike}}$$

$$V_{\text{total}} = \text{constant}$$



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΌΣ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΕ ΕΝΕΣΙΜΟ  
ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ  
ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ

Μέθοδος προσθήκης γνωστής ποσότητας  
(standard addition method):



Η συγκέντρωση στο άγνωστο δείγμα προκύπτει από την προέκταση της καμπύλης σταθερών προσθηκών:

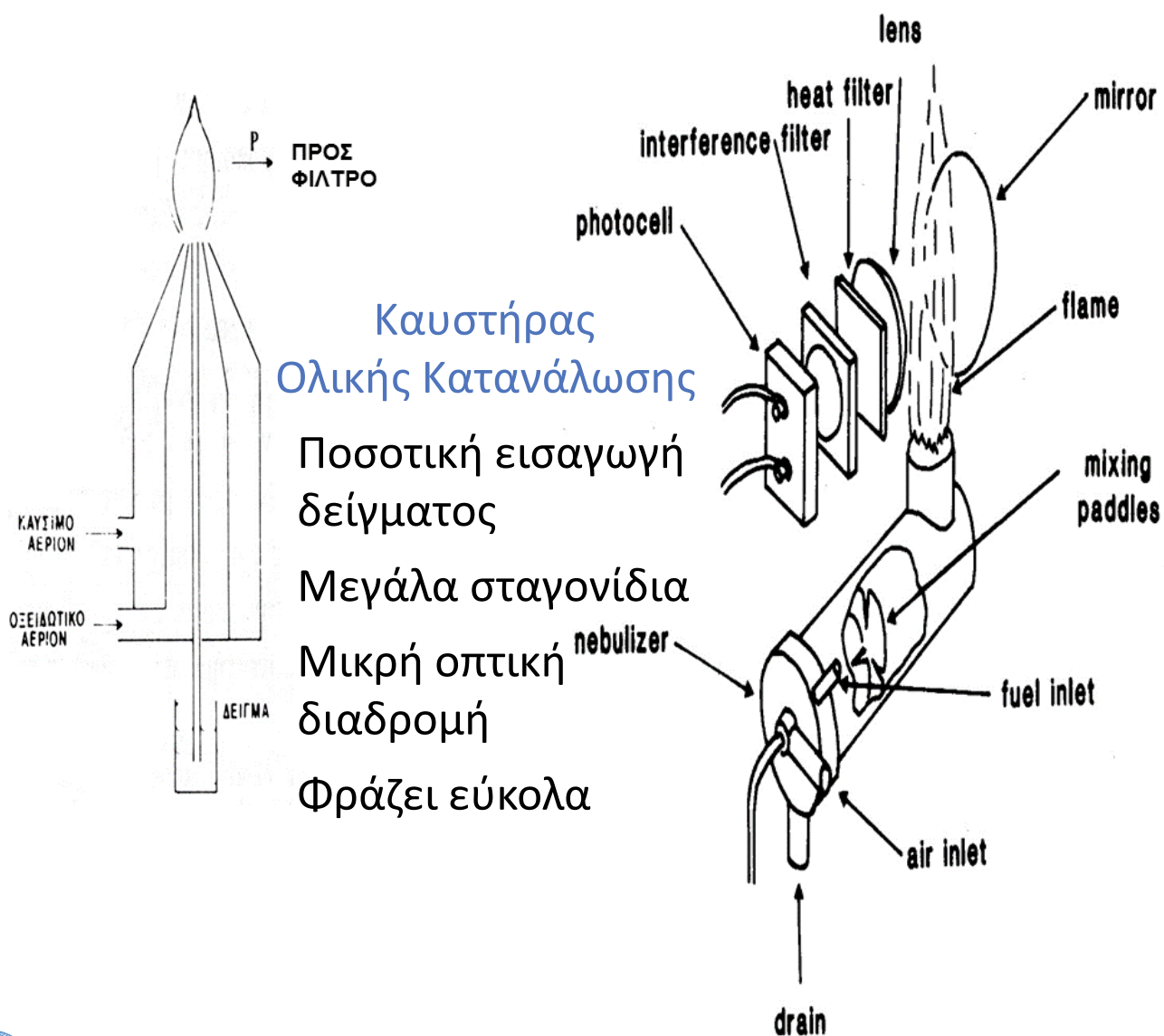
Αν  $Y = A + BX$  και  $Y=0$ , τότε η άγνωστη

$$C_{\text{sample}} = |-A|/B$$



# ΦΛΟΓΟΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΕΚΠΟΜΠΗΣ

- Το σήμα είναι ανάλογο των διεγερμένων ατόμων
- Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό **K, Na, Li και Ca**
- Φλόγα χαμηλής θερμοκρασίας (**προπάνιο-αέρας**)
- Φίλτρα αντί για μονοχρωμάτορες
- Χαμηλού κόστους



# ΦΛΟΓΟ(ΦΩΤΟ)ΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ

## ΣΚΟΠΟΣ ΑΣΚΗΣΗΣ:

1. Η εισαγωγή των φοιτητών στη χρήση και λειτουργία του φλογοφασματομέτρου ατομικής εκπομπής
2. Η εξοικείωσή τους με τις έννοιες **ατομική εκπομπή, νόμος του Boltzman**
3. Η **μελέτη παρεμπόδισης των φωσφορικών** ιόντων στον προσδιορισμό του ασβεστίου
4. Ο **προσδιορισμός του ασβεστίου** (αλλά και άλλων αλκαλίων και αλκαλικών γαιών) σε υδατικά δείγματα

## **Κατανομή Boltzmann:**

$$\frac{N_j}{N_0} = \frac{g_j}{g_0} \exp\left(-\frac{\Delta E_j}{kT}\right)$$

## **ΠΟΡΕΙΑ ΆΣΚΗΣΗΣ:**

- Κατασκευή καμπύλης αναφοράς
- Προσδιορισμός Ca σε άγνωστα υδατικά δείγματα
- Μελέτη παρεμπόδισης φωσφορικών και υπολογισμός του ποσοστού ατομοποίησης του Ca παρουσία φωσφορικών.
- Συζήτηση για την άρση της παρεμπόδισης



# Τέλος





# Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στο πλαίσιο του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Πανεπιστήμιο Αθηνών**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο την αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



# Σημειώματα



# Σημείωμα Ιστορικού Εκδόσεων Έργου

Το παρόν έργο αποτελεί την έκδοση 1.0.

Έχουν προηγηθεί οι κάτωθι εκδόσεις:

- Έκδοση διαθέσιμη [εδώ](#).



# Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Εθνικών και Καποδιστριακών Πανεπιστημίων  
Αθηνών, Νικόλαος Θωμαΐδης 2015. Νικόλαος Θωμαΐδης.  
«Ενόργανη Ανάλυση II». Έκδοση: 1.0. Αθήνα 2015.

Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση:

<http://opencourses.uoa.gr/courses/CHEM104>.



# Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά, Μη Εμπορική Χρήση Παρόμοια Διανομή 4.0 [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



- [1] <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>
- Ως **Μη Εμπορική** ορίζεται η χρήση:
  - που δεν περιλαμβάνει άμεσο ή έμμεσο οικονομικό όφελος από την χρήση του έργου, για το διανομέα του έργου και αδειοδόχο
  - που δεν περιλαμβάνει οικονομική συναλλαγή ως προϋπόθεση για τη χρήση ή πρόσβαση στο έργο
  - που δεν προσπορίζει στο διανομέα του έργου και αδειοδόχο έμμεσο οικονομικό όφελος (π.χ. διαφημίσεις) από την προβολή του έργου σε διαδικτυακό τόπο
- Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.



# Διατήρηση Σημειωμάτων

Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- το Σημείωμα Αναφοράς
- το Σημείωμα Αδειοδότησης
- τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων
- το Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (εφόσον υπάρχει)

μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.

