

Διαχωρισμός των συστατικών μαύρης μελάνης με (ανερχόμενη) χρωματογραφία χάρτη

Εργαστηριακή Άσκηση 3η

Σκοπός

Να είσθε σε θέση:

- να διαπιστώσετε ότι πολλά χρώματα είναι μίγματα άλλων χρωμάτων.
- να υλοποιήσετε τις βασικές αρχές της χρωματογραφίας χαρτιού διακρίνοντας τη στατική και την κινητή φάση.
- να εξοικειωθείτε με την πειραματική έρευνα, με τη μεταβολή παραγόντων και συνθηκών, εδώ π.χ. του pH, και αξιολογώντας τα αποτελέσματά να αποκτήσετε την αίσθηση πραγματικών δειγμάτων.

Βασικές γνώσεις

Η χρωματογραφία χαρτιού (ή χάρτη), όπως και όλες οι χρωματογραφικές μέθοδοι χρησιμοποιεί για το διαχωρισμό ενός μείγματος στα συστατικά του μια στατική φάση και μια κινητή. Εδώ στατική φάση είναι το νερό που απορροφάται από την κυτταρίνη του χαρτιού. Κινητή φάση είναι ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη. Ο διαλύτης ανερχόμενος (μια και εφαρμόζεται η ανερχόμενη χρωματογραφία) με τη βοήθεια των τριχοειδών δυνάμεων, μεταφέρει τα διάφορα συστατικά τα οποία διαχωρίζονται ανάλογα με τη «συγγένεια» που παρουσιάζουν με τη στατική φάση. Το μείγμα που χρησιμοποιείται είναι ένα υδατοδιαλυτό μελάνι από κάποιο μαρκαδόρο (όχι από τους λεγόμενους μόνιμους αλλά από εκείνους που "σβήνουν" με νερό).

Απαραίτητα αντιδραστήρια και όργανα

1. 4 δοχεία γυάλινα με ύψος ανάλογο της λωρίδας χαρτιού. Μπορεί να είναι ογκομετρικοί κύλινδροι των 250 mL ή ποτήρια ζέσης των 400 ή 600 mL.
2. 4 γυάλινα ραβδιά ή 4 μολύβια που θα στηρίξουν τις λωρίδες.
3. διηθητικό χαρτί ή χάρτινα φίλτρα του καφέ.
4. 1 ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL .
5. ισοπροπανόλη (είναι αλκοόλη που χρησιμοποιούν στο λουστράρισμα, rubbing) ή δοκιμάστε με αιθανόλη 95 % (καθαρό οινόπνευμα).
6. αμμωνία και οξικό οξύ (ή τα αντίστοιχα εμπορικά προϊόντα όπως οικιακή αμμωνία και ξίδι).
7. μαρκαδόρους (που σβήνουν με νερό) σε διάφορα χρώματα και χαρτοπετσέτες.

Πορεία ανάλυσης

1. Κόψτε μερικές λωρίδες χαρτί από το διηθητικό ή τα φίλτρα του καφέ . Το πλάτος τους να είναι 1-2 cm και το μήκος όσο το ύψος του γυάλινου δοχείου ή κυλίνδρου. Κόψτε τις στρογγυλεμένες άκρες ώστε να έχετε παραλληλόγραμμες λωρίδες. Με ένα μολύβι χαράξτε μια ίσια γραμμή περίπου 2 cm από την άκρη της λουρίδας. Η άκρη με την γραμμή θα είναι το κάτω άκρο της λωρίδας.
2. Αριθμήστε τα τέσσερα δοχεία από το 1 έως το 4. Προσθέστε στο καθένα από έναν από τους διαλύτες (1)Νερό , (2)αλκοόλη , (3)ξίδι και (4)οικιακή αμμωνία, σε ύψος 1 cm από τον πυθμένα του δοχείου.
3. Με την άκρη του μαρκαδόρου κάντε μια κηλίδα διαμέτρου 1- 2 mm στο κέντρο της λωρίδας πάνω στη γραμμή. Αφήστε την κηλίδα να ξηρανθεί και πάνω στην ίδια ξαναπατήστε με το μαρκαδόρο. Με τον ίδιο τρόπο ετοιμάστε ακόμα τρεις λωρίδες.
4. Ισορροπήστε στην κορυφή του δοχείου (1) ένα μολύβι ή μια γυάλινη ράβδο. Βάλτε τη μαρκαρισμένη λωρίδα στο δοχείο έτσι ώστε το κάτω της άκρο να εμβαπτίζεται στο διαλύτη σε βάθος λίγων χιλιοστών. Προσέξτε η γραμμή και η κηλίδα να μην ακουμπούν την επιφάνεια του διαλύτη. Επίσης η λωρίδα να μην έρχεται σε επαφή με τα τοιχώματα του δοχείου. Στερεώστε τη λωρίδα στο μολύβι ή στη ράβδο με μια κολλητική ταινία. Κάντε τα ίδια και για τα υπόλοιπα δοχεία 2,3 και 4.
5. Όταν ο διαλύτης φτάσει 1-2 cm πριν την κορυφή της λωρίδας, αποσύρετέ την και βάλτε την πάνω σε μια χάρτινη πετσέτα που την αριθμείτε και αυτή με το νούμερο του δοχείου, για να στεγνώσει. Γρήγορα με ένα μολύβι σημειώστε στη λωρίδα με μια γραμμή το μέρος που έφτασε ο διαλύτης. Κάντε το ίδιο για κάθε μια από τις τρεις υπόλοιπες λωρίδες.
6. (Προαιρετικό) Αδειάστε τα δοχεία 1 και 2 στο νεροχύτη και επαναλάβετε το πείραμα χρησιμοποιώντας για διαλύτη στο (1) 50 % αλκοόλη και 50 % αμμωνία και στο (2) ξίδι και αλκοόλη επίσης από 50 % το καθένα.

Υπολογισμοί

Αποτελέσματα. Σε κάθε μια από τις λωρίδες, δηλαδή για κάθε διαλύτη σημειώστε πόσα διαφορετικά χρώματα σχηματίζονται με μορφή έγχρωμων ζωνών. Δώστε τα αποτελέσματα με μορφή πίνακα όπου ο κάθε διαλύτης θα αποτελεί μία στήλη.

Με ένα υποδεκάμετρο μετρήστε την απόσταση που φτάνει ο διαλύτης καθώς και την απόσταση στην οποία φτάνει το κάθε χρώμα. Εκφράστε τις μετρήσεις αυτές με τον συντελεστή ανάσχεσης R_F , κάθε συστατικού.

Παρατηρήσεις

Τα αποτελέσματα ποικίλλουν. Κι' αυτό διότι εξαρτώνται από το είδος του χαρτιού που χρησιμοποιήθηκε καθώς και το είδος (μάρκα) του μαρκαδόρου. Αν χρησιμοποιηθεί φίλτρο του καφέ και μαύρος μαρκαδόρος τα χρώματα που αναμένονται φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

νερό	ξίδι	διάλ. αμμωνίας	αλκοόλη
κίτρινο	πράσινο	πράσινο	σκοτεινό μπλε
πράσινο	πορτοκαλί	ανοικτό ροζ	πορτοκαλί
ανοικτό ροζ	έντονο ιώδες	ιώδες	σκοτεινό ροζ
μοβ (purple)	--	--	--

Στην περίπτωση που δεν υπάρχει αλκοόλη είναι δυνατόν σαν διαλύτης να χρησιμοποιηθεί διάλυμα οξικού οξέος (CH_3COOH) 1M και οξικού νατρίου, (CH_3COONa) 1M, που είναι διάλυμα με $\text{pH} \approx 5$.

Ερωτήσεις

1. Ποια είναι η στατική και ποια η κινητή φάση στο πείραμα; Πως είναι δυνατόν να βελτιωθεί ο διαχωρισμός των συστατικών;
2. Ποια διατύπωση σας φαίνεται ορθότερη: "το μελάνι αποτελείται από 4 συστατικά " ή "το μελάνι αποτελείται τουλάχιστον από 4 συστατικά ";
3. Μπορείτε να εξηγήσετε τη διαφορετική συμπεριφορά του νερού σαν διαλύτη με την παρουσία οξέος (ξίδι) ή βάσης (αμμωνία) ;
4. Σε κάποιο σημείο της περιγραφής αναφέρεται " γρήγορα σημειώστε το σημείο που έφτασε ο διαλύτης ". Γιατί το "γρήγορα";
5. Αν χρησιμοποιηθεί μαρκαδόρος μόνιμος, (που δεν σβήνει) με νερό τι περιμένετε σαν χρωματογράφημα;

Χρωματογραφία στήλης Διαχωρισμός μπλε του μεθυλενίου και ηλιανθίνης

Εργαστηριακή Άσκηση 4η

Σκοπός

Να είστε σε θέση:

- να υλοποιείτε τις βασικές αρχές της χρωματογραφίας στην περίπτωση της στήλης διακρίνοντας τη στατική και την κινητή φάση.
- να κατασκευάζετε στήλες για το διαχωρισμό μειγμάτων

Βασικές γνώσεις

Η χρωματογραφία στήλης, όπως και όλες οι χρωματογραφικές μέθοδοι χρησιμοποιεί για τον διαχωρισμό ενός μίγματος στα συστατικά του μια στατική φάση και μια κινητή. Εδώ μάλιστα πρόκειται για την κλασική και ιστορική χρωματογραφία, μια και στατική φάση είναι στερεό σε λεπτό διαμερισμό με το οποίο πληρώνεται μια γυάλινη στήλη. Η κινητή φάση είναι ο διαλύτης με τον οποίο εκλούεται (διαποτίζεται) συνεχώς η στήλη. Από άποψη μηχανισμού γίνεται προσρόφηση των συστατικών από τους κόκκους της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό το καθένα ανάλογα με τη δομή του. Ο διαλύτης που εκλούει τη στήλη, διαβρέχοντάς τη, αντικαθιστά και μετατοπίζει το κάθε συστατικό μέχρι την οριστική έξοδό του από τη στήλη. Η κινητή φάση κινείται με την επίδραση της βαρύτητας πράγμα που σημαίνει ότι η μέθοδος είναι χρονοβόρα.

Απαραίτητα αντιδραστήρια και όργανα

1. προχοΐδα των 25 mL που θα παίξει τον ρόλο της στήλης. Βάλτε λίγο υαλοβάμβακα στο άκρο πάνω από την στρόφιγγα.
2. 4 κωνικές των 100 mL ή αντίστοιχοι δοκιμαστικοί σωλήνες.
3. 10,0 g silica gel με διάμετρο κόκκων τέτοια ώστε να κυμαίνεται από 60 έως 200 mesh.
4. Το μείγμα για το διαχωρισμό παρασκευάζεται με διάλυση 0,050 g μπλε του μεθυλενίου και 0,050 g ηλιανθίνης (πορτοκαλί του μεθυλενίου) σε 50 mL αιθανόλη (οινόπνευμα) 95 % V/V.
5. Οινόπνευμα καθαρό (95 % V/V ή 95°).

Πορεία ανάλυσης

1. Ετοιμάστε πρώτα τη χρωματογραφική στήλη βάζοντας την ποσότητα του silica gel με προσοχή στην προχοΐδα. Χρησιμοποιήστε χωνί. Η πλήρωση να

μην αφήνει κενά μέσα από τα οποία ο διαλύτης θα περνά χωρίς να εκλούει το δείγμα.

2. Στο πάνω άκρο της στήλης βάλτε με μικροσιφώνιο 0,5 mL ή 10 σταγόνες από το διάλυμα των δύο χρωστικών το οποίο έχει μπλε χρώμα.
3. Αρχίστε να εκλούετε τη στήλη με οινόπνευμα των 95° ανοίγοντας την στρόφιγγα της προχοΐδας και προσθέτοντας ποσότητες από αυτό με χωνί. Μην αφήνετε τη στήλη χωρίς διαλύτη. Επειδή η έκλουση αργεί, με ένα ποίρε πιέξετε στο πάνω άκρο της στήλης για κάποια επιτάχυνση. Προσοχή μην γίνει αναρρόφηση του υλικού.
4. Συλλέξτε το πρώτο κλάσμα που πρέπει να έχει κίτρινο χρώμα σε κωνική των 100 mL.
5. Αλλάξτε την φιάλη συλλογής όταν το κλάσμα αρχίσει να γίνεται πράσινο και συλλέξτε αυτό (το πράσινο κλάσμα). Συνεχίστε τη συλλογή του κλάσματος μέχρις ότου αρχίσει το χρώμα να αλλάζει προς το μπλε. Σταματήστε σε αυτό το σημείο.
6. Μεταφέρατε το πληρωτικό υλικό της στήλης σε μια μεγάλη κάψα και ξεπλύνετε το με λίγο οινόπνευμα των 95° μέχρις ότου να καθαρίσει από την χρωστική. Αφήστε το να ξηρανθεί σε πυριατήριο ώστε να μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί.

Υπολογισμοί

Αποτελέσματα. Για να πιστοποιηθεί ο διαχωρισμός των δύο χρωστικών μπορούμε να συγκρίνουμε το χρώμα του κάθε κλάσματος με το χρώμα που έχει η κάθε μια από τις δύο χρωστικές στο διαλύτη, εδώ στο οινόπνευμα των 95°. Διαλύστε ελάχιστη ποσότητα ηλιανθίνης στο οινόπνευμα (0,1 % w/v) και συγκρίνατε το χρώμα με εκείνο του πρώτου και δεύτερου κλάσματος. Με ποιο συμφωνεί; Όμοια για το μπλε του μεθυλενίου.

Παρατηρήσεις

Αν έχετε μάθει τη χρήση του φασματοφωτόμετρου, είναι πολύ πιο αξιόπιστο να ελέγξετε το διαχωρισμό παίρνοντας τα φάσματα των καθαρών ουσιών (π.χ. ηλιανθίνης σε οινόπνευμα) και των κλασμάτων. Βεβαιώστε τον διαχωρισμό, αν π.χ. το κίτρινο κλάσμα έχει την ίδια καμπύλη απορρόφησης με την ηλιανθίνη.

Ερωτήσεις

1. Ποια είναι η στατική και ποια η κινητή φάση στο πείραμα;
2. Πως θα ήταν δυνατό να επιταχυνθεί το πείραμα;
3. Αν χρησιμοποιηθεί silica gel πιο χονδρόκοκκο από τα 200 mesh, τι αλλαγές θα περιμένατε στο πείραμα;

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας Διαχωρισμός των χρωστικών φύλλων

Εργαστηριακή Άσκηση 5η

Σκοπός

Να είσθε σε θέση:

- να μελετήσετε ένα φυσικό προϊόν όπως είναι οι χρωστικές των φυτών
- να διαπιστώσετε ότι το χρώμα αυτό είναι μίγμα χρωστικών
- να εφαρμόσετε την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των χρωστικών αυτών, όπως η χλωροφύλλη.

Βασικές γνώσεις

Όλοι γνωρίζουμε τη μεγάλη ποικιλία χρωμάτων και ομορφιά των φύλλων των διαφόρων φυτών. Ήδη μέσα από την χρωματογραφία χαρτιού έχουμε διαπιστώσει, πειραματικά πια, ότι τις περισσότερες φορές ένα χρώμα μπορεί να είναι μίγμα διαφόρων άλλων χρωστικών. Έτσι και στην περίπτωση των φυτών το χρώμα των φύλλων τους είναι μίγμα διαφόρων χρωστικών από τις οποίες η πιο γνωστή είναι η *χλωροφύλλη* μέσω της οποίας γίνεται η *φωτοσύνθεση*. Υπάρχουν όμως και άλλες χρωστικές ουσίες η παρουσία και αναλογία των οποίων κάνει ένα φύλλο κόκκινο ή καφέ ή ό,τιδήποτε άλλο. Οι μεταβολές αυτές μπορεί να παρουσιάζονται και στο ίδιο φύλλο, ανάλογα με την εποχή.

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) είναι μια χρωματογραφική τεχνική που πολύ συχνά χρησιμοποιείται από τους αναλυτικούς χημικούς για το *διαχωρισμό* των συστατικών ενός μίγματος. Όντας απλή και σχετικά γρήγορη, συχνά χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αριθμού και της ταυτότητας των συστατικών ενός μίγματος.

Στην περίπτωση των χρωστικών των φυτών η TLC είναι ιδανική μέθοδος επειδή τα διαχωριζόμενα συστατικά είναι έγχρωμα και συνεπώς ορατά στο φως της ημέρας, και το χρωματογράφημα δεν χρειάζεται εμφάνιση. Σαν τεχνική στο πείραμα θα εφαρμοστεί η ανερχόμενη TLC.

Απαραίτητα αντιδραστήρια και όργανα

1. γουδί με τον ύπερό του (γουδοχέρι)
2. σιφώνιο των 10 mL βαθμολογημένο
3. κοφτερό μαχαίρι
4. ευρύστομο βάζο με καπάκι για θάλαμο ανάπτυξης

5. έτοιμη από το εμπόριο πλάκα TLC (π.χ. Merck 557 με μικροκρυσταλλική κυτταρίνη ως στατική φάση, διαστάσεων 11 x 8 cm)
6. σταγονόμετρο
7. ακετόνη καθαρή
8. δείγμα φύλλων πλατύφυλλων ή χλόη

Πορεία ανάλυσης

1. Κόψτε τα φύλλα όσο πιο λεπτά μπορείτε και βάλτε τα στο γουδί κάνοντας μια ποσότητα ύψους περίπου 2 cm.
2. Προσθέστε μια κουταλιά θαλασσινής άμμου, καθαρής και καλύψτε τα με ακετόνη που προστίθεται με το σιφώνιο.
3. Ανακατέψτε, τρίβοντας για 5 min. Ο διαλύτης πρέπει να πάρει ένα σκούρο χρώμα.
4. Πάρτε την προετοιμασμένη πλάκα της TLC και με ένα ελαφρό μολύβι χαράξτε μια γραμμή σε ύψος 2 cm από το κάτω, πια, άκρο. Πάνω στην γραμμή αυτή με ένα σταγονόμετρο στάξτε μια σταγόνα από το υγρό που επιπλέει στο γουδί.
5. Περιμένετε να εξατμιστεί ο διαλύτης και προσθέστε πάνω στην κηλίδα άλλη μια σταγόνα. Επαναλάβετε το ίδιο μέχρις ότου η κηλίδα να έχει ένα σκούρο πράσινο χρώμα.
6. Ενώ περιμένετε να εξατμιστεί ο διαλύτης, βάλτε στο δοχείο που παίζει ρόλο του θαλάμου ανάπτυξης ακετόνη σε ύψος 1- 2 cm. Σκεπάστε το θάλαμο ώστε ο χώρος μέσα να κορεσθεί σε ατμούς διαλύτη.
7. Τοποθετήστε τώρα την πλάκα μέσα στο δοχείο προσέχοντας το ύψος του διαλύτη να μην φτάνει την κηλίδα. Σκεπάστε και αφήστε το διαλύτη να ανέχεται στην πλάκα.
8. Όταν ο διαλύτης φτάσει κοντά στο πάνω άκρο της πλάκας διακόψτε και αποσύρατε την πλάκα. Αμέσως σημειώστε με μολύβι μια γραμμή στο μέτωπο του διαλύτη.
9. Αφήστε την πλάκα να ξηρανθεί στον αέρα και εξετάστε τη στο φως της ημέρας.

Υπολογισμοί

Αποτελέσματα. Μελετήστε την πλάκα και βρείτε σε πρώτη φάση το πόσα συστατικά έχει η αρχική πράσινη χρωστική των φύλλων που εξετάσατε. Κάθε διαφορετικού χρώματος κηλίδα είναι και ένα συστατικό. Ταυτοποιήστε τώρα ποιο είναι το καθένα από αυτά χρησιμοποιώντας τον παρακάτω πίνακα:

Χρωστική	Χρώμα	Δείγμα
Χλωροφύλλη Α	πράσινομπλε
Χλωροφύλλη Β	πράσινο της ελιάς
Καροτένιο Β	κίτρινο πορτοκαλί
Ξανθοφύλλη	κίτρινο καφέ
Φυτοερυθρίνη	κόκκινο
Φυτοκυανίνη	μπλε
Φαιοφυτίνη	κίτρινο γκρι

Στην τελευταία στήλη βάλτε ένα ναι ή όχι ανάλογα με τις παρατηρήσεις σας. Καλόν είναι για την πληρότητα των αποτελεσμάτων να αναφέρετε το είδος του φύλλου που χρησιμοποιήσατε και τον τόπο που το συλλέξατε.

Μετρήστε με υποδεκάμετρο την απόσταση του μετώπου του διαλύτη και τις αποστάσεις των κηλίδων δίνοντας έτσι τον συντελεστή ανάσχεσης, R_F , για το κάθε συστατικό. Βέβαια η τιμή αφορά τη συγκεκριμένη πλάκα και διαλύτη (ακετόνη). Στο σχήμα 4.32 στο τέλος δίνεται μια πλάκα μετά την ανάπτυξη όπου φαίνονται τα διάφορα χρώματα και συστατικά

Παρατηρήσεις

Στη φάση της εκχύλισης είναι δυνατόν αντί του γουδιού να χρησιμοποιηθεί, αν υπάρχει, ένας αναμίκτης (blender) για το κόψιμο και λειοτρίβηση των φύλλων. Κανονικά η ακετόνη για να εκχυλίσει τις χρωστικές θέλει περισσότερο χρόνο. Είναι από τα πειράματα που θέλουν παραμονή «μια νύχτα». Μπορεί ο καθηγητής να έχει προετοιμάσει το δείγμα από την προηγούμενη και στο πείραμα να γίνει μόνο η χρωματογράφιση.

Ερωτήσεις

1. Ποια είναι η στατική και ποια η κινητή φάση στο πείραμα που κάνατε; (συμβουλευτείτε το prospectus που δίνει ο προμηθευτής για την πλάκα).
2. Ποιο από τα συστατικά πιστεύετε ότι διαλύεται περισσότερο στην ακετόνη;
3. Ποιο από τα παραπάνω συστατικά που δίνονται στον πίνακα περιμένετε να είναι κοινό για τα περισσότερα είδη φυτών; ποιος είναι ο ρόλος του;
4. Ποια άλλη χρωματογραφία θα μπορούσατε να χρησιμοποιήσετε για την ανάλυση των χρωστικών των φυτών;
5. Η TLC είναι υγρή ή αέρια χρωματογραφία; Είναι υγρή - στερεή ή όχι;
6. Το χρώμα των φύλλων καθορίζεται από κάποια από τις χρωστικές που βρήκατε;



καροτένια α και β

φαιοφυλλίνη

χλωροφύλλη α

χλωροφύλλη β

α. Ξανθοφυλλίνη

Σχήμα 4.32: Χρωματογράφημα TLC χρωστικής φυτών

Προσδιορισμός αιθανόλης σε φωτιστικό οινόπνευμα

Εργαστηριακή Άσκηση 6η

Σκοπός

Να είσθε σε θέση:

- να ασκηθείτε στη χρήση του αέριου χρωματογράφου
- να προσδιορίσετε το βασικό συστατικό ενός εμπορικού προϊόντος
- να εφαρμόσετε τη μέθοδο εμβολιασμού για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό

Βασικές γνώσεις

Ήδη γνωρίζουμε ότι η χρωματογραφία είναι μία μέθοδος διαχωρισμού μειγμάτων. Με τη βοήθεια κατάλληλου ανιχνευτή είναι δυνατόν να γίνεται ποιοτική ανάλυση με το χρόνο ανάσχεσης, t_R , το χρόνο δηλαδή που μεσολαβεί από την εισαγωγή του δείγματος μέχρι την εμφάνιση μιας κορυφής στο χρωματογράφημα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με καμπύλη αναφοράς όπου στον άξονα x εισάγονται οι ποσότητες του γνωστού και στο άξονα y τα εμβαδά των κορυφών ή, υπό προϋποθέσεις, το ύψος των κορυφών.

Ορισμένες φορές, κυρίως αν οι χρόνοι ανάσχεσης δεν είναι γνωστοί και αν αναζητούμε μια γνωστή ένωση στο δείγμα, εφαρμόζεται η μέθοδος εμβολιασμού – του spiking-. Σύμφωνα με αυτή αρχικά γίνεται ένεση με το δείγμα και λαμβάνεται το χρωματογράφημά της. Στη συνέχεια στο δείγμα εισάγεται ποσότητα (μL) από την ένωση της οποίας, αναζητούμε την παρουσία και την ποσότητα (εμβολιασμός του δείγματος). Στις ίδιες ακριβώς συνθήκες λαμβάνεται το χρωματογράφημα του εμβολιασμένου δείγματος και ελέγχουμε το ποια κορυφή ενισχύθηκε. Αυτό ταυτοποιεί την προηγούμενα άγνωστη κορυφή. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό είναι δυνατόν να χρησιμοποιήσουμε τα δύο ύψη των κορυφών πριν και μετά τον εμβολιασμό. Τότε είναι: $h_1/h_2 = x/x + c$ όπου x η αρχική άγνωστη ποσότητα και c η ποσότητα που προστέθηκε στο δείγμα.

Από την άλλη πλευρά το φωτιστικό ή μετουσιωμένο οινόπνευμα είναι μίγμα που περιέχει αιθανόλη, νερό και συνήθως μεθανόλη που προστίθεται για να το κάνει ακατάλληλο για παρασκευή οινοπνευματωδών ποτών. Περιέχει επίσης μία χρωστική, όπως μπλε του μεθυλενίου, που δεν είναι πτητική. Άρα το δείγμα θα εμβολιαστεί με καθαρή αιθανόλη της οποίας την παρουσία και ποσότητα αναζητάμε.

Απαραίτητα αντιδραστήρια και όργανα

1. 2 ογκομετρικές φιάλες των 250 mL

2. σιφόνιο των 20 mL
3. απόλυτη αιθανόλη ή καθαρό οινόπνευμα 95 °
4. δείγμα φωτιστικού οινόπνευματος. Αραιώστε 10 g από αυτό σε τελικό όγκο 250 mL
5. σύριγγες Hamilton για εισαγωγή δείγματος
6. χρωματογράφος και το καταγραφικό του.

Πορεία ανάλυσης

Ο επιβλέπων την εκτέλεση του πειράματος ελέγχει τις παραμέτρους του οργάνου σύμφωνα με τις οδηγίες του φυλλαδίου του οργάνου. Για τον προσδιορισμό της αιθανόλης στο φωτιστικό οινόπνευμα μια σειρά παραμέτρων μπορεί να είναι η εξής:

θερμοκρασία σημείου εισαγωγής δείγματος 130 ° C

θερμοκρασία στήλης – φούρνου 150 °C (σε περίπτωση θερμοπρογραμματιζόμενου φούρνου ένα πρόγραμμα θερμοκρασιών μπορεί να είναι: 35 °C για 5 min και μετά με ρυθμό 30 °C/ min μέχρι τους 150 °C όπου και παραμονή για 10 min)

θερμοκρασία ανιχνευτή 150°C

ροή φέροντος αερίου 20 mL/min

Το όργανο πρέπει να έχει ετοιμαστεί, και προθερμανθεί από τον επιβλέποντα 1-2 ώρες πριν την εκτέλεση του πειράματος μέχρι να δίνει ομαλή γραμμή βάσης.

Με τη σύριγγα εισάγονται στο σημείο εισαγωγής 5 μ L από το αραιωμένο διάλυμα, ενώ ταυτόχρονα ξεκινά η λειτουργία του καταγραφικού. Λαμβάνεται έτσι το χρωματογράφημα του αγνώστου δείγματος.

Σε άλλο δείγμα φωτιστικού οινόπνευματος βάρους 10,00 g προστίθενται 5,00 g απόλυτης αιθανόλης και το νέο διάλυμα αραιώνεται με απιονισμένο νερό στα 250 mL. Από το νέο αυτό διάλυμα λαμβάνονται 5 μ L και εισάγονται στο χρωματογράφο. Δε γίνεται καμιά αλλαγή στις συνθήκες. Λαμβάνεται έτσι το νέο χρωματογράφημα.

Υπολογισμοί

Συγκρίνονται τα δυο χρωματογραφήματα και ελέγχεται το αν κάποια κορυφή ενισχύθηκε. Αν ναι, αυτή είναι η απόδειξη της παρουσίας αιθανόλης στο αρχικό άγνωστο δείγμα (ποιοτική ανάλυση). Στη συνέχεια μετρούνται τα ύψη των δυο κορυφών πριν και μετά την προσθήκη της καθαρής αιθανόλης. Αν στα αρχικά 10,00 g του φωτιστικού οινόπνευματος υπάρχουν x g καθαρής αιθανόλης, h_1 και h_2 είναι τα ύψη των δυο κορυφών, θα είναι: $h_1/h_2 = x/(x+5)$.

Εκφράστε το αποτέλεσμα σε % w/w ή αν γνωρίζετε την πυκνότητα του φωτιστικού οινόπνευματος που χρησιμοποιήθηκε σε % V/V (ρ αιθανόλης 0,816 g/mL).

Ελεύθερο Ανάγνωσμα Ι.

Χρώμα και χρωστικές.

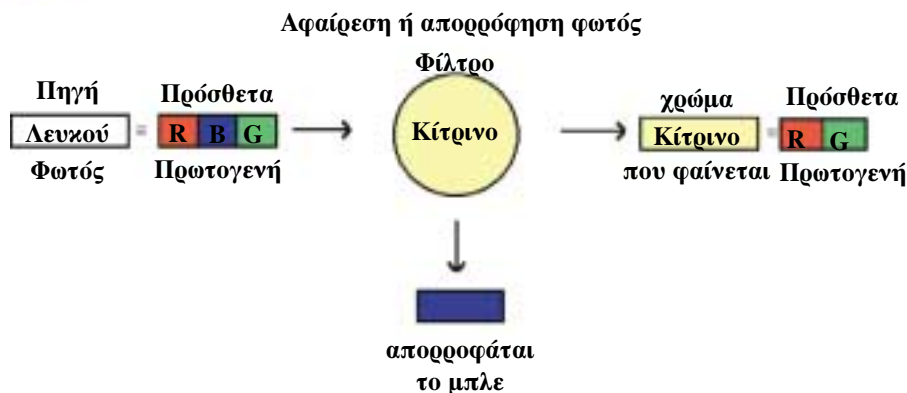
Μιά χρήσιμη προσέγγιση είναι να θεωρούμε το ηλιακό αλλά και όποιο άλλο λευκό φως ή και λευκό χρώμα, ως μείγμα μερικών άλλων χρωμάτων. Ειδικότερα είναι δυνατόν να δημιουργηθεί λευκό χρώμα από ανάμιξη ή καλύτερα επικάλυψη τριών χρωμάτων που είναι το πράσινο, το κόκκινο και το μπλε. Αυτά λέγονται *πρωτογενή πρόσθετα* (additive primaries) και με την επικάλυψή τους δημιουργείται λευκό χρώμα. Αυτό φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



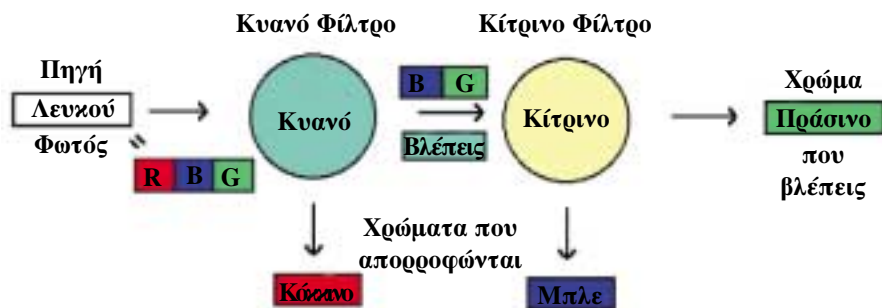
Προσέξτε στην εικόνα αριστερά το τμήμα που και οι τρεις κύκλοι επικαλύπτονται δίνοντας λευκό χρώμα. Επιπλέον όμως παρατηρήστε ότι στα σημεία που δύο από τα χρώματα επικαλύπτονται δημιουργούνται νέα χρώματα γνωστά σαν *αφαιρετικά πρωτογενή* (subtractive primaries). Έτσι το κίτρινο προέρχεται από πράσινο και κόκκινο, το γαλάζιο από πράσινο και μπλε και το φούξια ή μοβ (magenta, φούξια από την φουξίνη...), από κόκκινο και μπλε.

Τι συμβαίνει λοιπόν και βλέπουμε π.χ. ένα διαφανές πλαστικό φύλλο (cellophane) κίτρινο;. Σημαίνει ότι από το λευκό φως (δηλαδή το άθροισμα κόκκινου, μπλε και πράσινου) που πέφτει επάνω του, αυτό απορροφά ή αφαιρεί το μπλε λειτουργώντας σαν φίλτρο, αφήνοντας τα χρώματα του πράσινου και του κόκκινου που συνδυασμένα δίνουν κίτρινο, να περνούν. Η όλη περίπτωση φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

Πολλές χρωστικές που χρησιμοποιούνται στα μελάνια, στις βαφές υφασμάτων κλπ. κατασκευάζονται από ανάμιξη αφαιρετικών πρωτογενών. Έτσι π.χ. μια πράσινη χρωστική μπορεί να παρασκευαστεί από ανάμιξη κίτρινου και γαλάζιου. Κοιτάξτε στην παρακάτω εικόνα για να δείτε πως αυτό συμβαίνει.

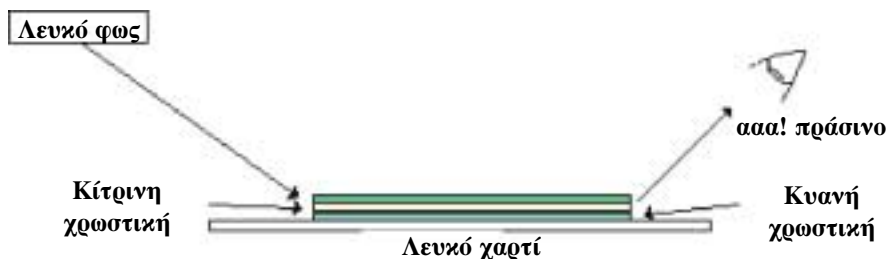


Το λευκό φως (K+Π+Μ) περνώντας από το γαλάζιο φίλτρο χάνει το κόκκινο χρώμα (K) και μετά περνώντας από το κίτρινο φίλτρο χάνει το μπλε (M). Απομένει λοιπόν ένα πράσινο χρώμα το οποίο όμως είναι μείγμα των δύο αρχικών γαλάζιου και κίτρινου.



Όταν λοιπόν αυτές οι χρωστικές αναμιχθούν σε διαλύτη και χρωματίσουν το μελάνι, απλώνονται μαζί με αυτό στο χαρτί π.χ. Από αυτές η γαλάζια απορροφά την κόκκινη ακτινοβολία και η κίτρινη την μπλε αφήνοντας τελικά να έλθει στο μάτι η πράσινη, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.

Τη δυνατότητα της χρωματογραφίας να διαχωρίζει στα συστατικά τους χρώματα που προέρχονται από την ανάμιξη άλλων την βλέπει κανείς στην χρωματογραφία χαρτού αλλά και λεπτής στιβάδας και στήλης (στην υγρή χρωματογραφία γενικά.) Η κινητή φάση (διαλύτης) παρασύρει τα επιμέρους συστατικά- χρωστικές με διαφορετικές ταχύτητες και τα ξεχωρίζει στις ζώνες ή κηλίδες που είδατε.



Ελεύθερο ανάγνωσμα II.

Αντί των πολλών πράγματι εφαρμογών της αέριας χρωματογραφίας σε πολλά πεδία όπως Ιατρική, Εγκληματολογία, Περιβάλλον, Πετρελαιοειδή κλπ, δίνουμε από το βιβλίο των K. και J. Rubinson *Contemporary Instrumental Analysis*, μια προσιτή εφαρμογή. Στο βιβλίο δίνεται σαν Case Study (σελίδα 596) και τα παρακάτω είναι μια προσαρμογή στα καθ' ημάς.

Τα chips και η αέρια χρωματογραφία

Η εμφάνιση, η γεύση αλλά και ο χρόνος ζωής των chips με πατάτες (πατατάκια) εξαρτάται πολύ από την ποιότητα των λαδιών που χρησιμοποιήθηκαν στο τηγάνισμά τους αλλά και τον χρόνο που διαρκεί το τηγάνισμα αυτό. Βέβαια, πέρα από οποιαδήποτε επιστημονική μέτρηση, τελικός κριτής για την ποιότητα των chips είναι αυτός που τα τρώει. Αυτό σημαίνει ότι το όποιο αποτέλεσμα χημικής ανάλυσης πρέπει να συνδυαστεί με λιγότερο ποσοτικές μετρήσεις όπως είναι η γεύση που είναι πολύ υποκειμενικός παράγοντας.

Στην μελέτη που έγινε δημιουργήθηκε μια ομάδα από 15 εκπαιδευμένους σε θέματα γεύσης οι οποίοι βαθμολόγησαν τα chips σε μια κλίμακα από 1 έως 10 (το 10 εξαιρετική ποιότητα). Οι δοκιμαστές επίσης κατέταξαν τα πατατάκια με βάση την μυρωδιά τους σε μια κλίμακα πάλι από 0 έως 10 (0 = όχι οσμή, 10 = έντονη οσμή). Οι δοκιμές έγιναν σε θάλαμο με κόκκινο φως ώστε το χρώμα των chips να μην επηρεάζει την επιτροπή.

Από την άλλη πλευρά έγιναν οι εξής μετρήσεις. Αναλύθηκαν με **αέρια χρωματογραφία** τα πτητικά προϊόντα τα οποία συλλέχτηκαν τόσο κατά την διάρκεια του τηγανίσματος όσο και τα πτητικά που αναδύονται από τα ίδια τα chips είτε όταν είναι φρέσκα είτε μετά από παραμονή 4 μηνών. Προσδιορίστηκαν έτσι τα πτητικά έλαια και κύρια το ελαϊκό και τα άλλα σπορέλαια.

Τα αποτελέσματα των χρωματογραφικών αναλύσεων για επτά διαφορετικά λάδια συνδυαζόμενα με τα αποτελέσματα γεύσης και οσμής έδειξαν ότι υπάρχει μια άριστη (optimum) τιμή περιεκτικότητας για το ελαϊκό οξύ στα λάδια τηγανίσματος (περίπου 70 %). Αντίθετα μεγάλη περιεκτικότητα σε λινολεϊκό οξύ (περίπου 20%) δίνει κακής ποιότητας chips.

Η μελέτη έδειξε επίσης ότι η οσμή τους μεταβάλλεται και εξαρτάται από το πότε αυτά τηγανίστηκαν. Επίσης λάδια που χρησιμοποιήθηκαν για 3- 6 ώρες δίνουν πατατάκια καλύτερης ποιότητας από άποψη οσμής παρά εκείνα που είναι φρέσκα ή έχουν χρησιμοποιηθεί πολύ. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ίδια, είτε μελετώντας τα αέρια του τηγανίσματος είτε τα πτητικά προϊόντα που παράγονται μετά από τα ίδια τα chips.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η **χρωματογραφία** είναι ένας ευρύς τομέας φυσικών, ενόργανων τεχνικών που χρησιμοποιούνται για το **διαχωρισμό** των συστατικών, οργανικών αλλά και ανόργανων, ενός πολύπλοκου μείγματος. Τα συστατικά τα οποία θα διαχωριστούν κατανέμονται μεταξύ δύο **φάσεων**. Η μία είναι η **στατική φάση** και η άλλη η **κινητή φάση**. Η στατική φάση μπορεί να είναι ένα στερεό σε πολύ μικρούς κόκκους - σε λεπτό **διαμερισμό**- ή ένα υγρό καθηλωμένο σε ένα στερεό που απλά είναι ένας αδρανής φορέας. Η κινητή φάση μπορεί να είναι ένα υγρό ή ένα αέριο. Η κινητή αυτή φάση **εκλούει** τη στατική παρασύροντας με διαφορετικές ταχύτητες τα διάφορα συστατικά, πετυχαίνοντας έτσι τον διαχωρισμό τους.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορα κριτήρια. Έτσι αν η κινητή φάση είναι ένα υγρό, τότε μιλάμε για **υγρή χρωματογραφία (LC)**. Αν είναι αέριο, τότε η μέθοδος ανήκει στην **αέρια χρωματογραφία (GC)**. Στην υγρή χρωματογραφία ανάλογα με την φύση και τη μορφή της στατικής φάσης διακρίνονται η **Χρωματογραφία χάρτη, η Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)** και η **Χρωματογραφία στήλης** που είναι και η πιο κλασική και ιστορική μορφή της χρωματογραφίας.

Στην αέρια χρωματογραφία ένα **φέρων**, αδρανές, **αέριο** μεταφέρει το δείγμα που και αυτό έχει εξαερωθεί με κατάλληλη θέρμανση μέσα από μια **χρωματογραφική στήλη** που περιέχει έναν στερεό αδρανή φορέα πάνω στον οποίο έχει καθηλωθεί ένα υγρό. Τα συστατικά διαχωρίζονται και παρασύρονται από το φέρον αέριο προς την έξοδο της στήλης. Εκεί ένας κατάλληλος **ανιχνευτής** μετρά μια φυσική ιδιότητα των εξερχόμενων αερίων και το **σήμα** μεταφέρεται σε ένα σύστημα **καταγραφής**. Η τελική αυτή καταγραφή είναι ένα **χρωματογράφημα** μέσα από το οποίο γίνονται ποιοτικές και ποσοτικές εκτιμήσεις.

ΓΛΩΣΣΑΡΙ

Φέρον αέριο: Αδρανές αέριο, συνήθως Ήλιο, το οποίο μεταφέρει το μείγμα που διαχωρίζεται, μέσα από τη στήλη ενός αερίου χρωματογράφου.

Χρωματογραφία: Ενόργανη μέθοδος ανάλυσης που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των συστατικών μειγμάτων με βάση την **κατανομή** τους σε δύο φάσεις.

Χρωματογράφημα: Είναι το τελικό αποτέλεσμα μιας χρωματογραφικής διαδικασίας. Σε αυτό αποτυπώνονται πληροφορίες για τη σύσταση του μείγματος δηλαδή τον αριθμό και τη φύση των συστατικών αυτών.

Ανιχνευτής: Το τμήμα εκείνο, κυρίως του αερίου χρωματογράφου, το οποίο μετρώντας μια ιδιότητα σηματοδοτεί την αλλαγή στη σύσταση του μείγματος που περνά μέσα από αυτόν.

Αέρια χρωματογραφία: Μία πολύ αποτελεσματική μέθοδος για το διαχωρισμό μειγμάτων από αέρια ή πτητικά υγρά. Δίνει ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα με μεγάλη ευαισθησία.

Κινητή φάση: Ένας διαλύτης (ή αέριο στην αέρια χρωματογραφία) που μεταφέρει το μείγμα που διαχωρίζεται μέσα από τη στατική φάση και γενικά την χρωματογραφική διάταξη.

Χρωματογραφία χάρτη: Χρωματογραφική μέθοδος που διαχωρίζει υγρά μείγματα χρησιμοποιώντας για στατική φάση προσροφητικό χαρτί.

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας: Υγρή χρωματογραφία στην οποία η στατική φάση είναι απλωμένη πάνω σε μια πλάκα π.χ. από γυαλί

Χρόνος ανάσχεσης t_R : Ο χρόνος, συνήθως σε min, που μεσολαβεί ώστε κάθε συστατικό του μείγματος να «ταξιδέψει» από το σημείο εισαγωγής του δείγματος μέσω της στήλης, μέχρι τον ανιχνευτή. Αποτελεί, υπό κανονικές συνθήκες, μια σταθερά και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση ενός συστατικού.

Στατική φάση (ή στάσιμη φάση): Ένα στερεό «πακεταρισμένο» σε μια στήλη ή ένα υγρό καθηλωμένο σε ένα αδρανές στερεό. Μέσα από αυτήν θα περάσει η κινητή φάση. Κάθε συστατικό του μείγματος προσροφάται ή κατανέμεται ή διαλύεται διαφορετικά πάνω σε αυτήν.

Συντελεστής ανάσχεσης, R_F : Στην υγρή χρωματογραφία ο λόγος της απόστασης που διανύει ένα συστατικό προς την απόσταση που διένυσε ο διαλύτης.

Χρωματογραφική στήλη: Ένας σωλήνας γεμάτος με πληρωτικό υλικό που παίζει το ρόλο της στατικής φάσης.

Προσρόφηση: Η δέσμευση ουσιών από την επιφάνεια ενός στερεού από ένα υγρό ή αέριο μείγμα με το οποίο έρχεται σε επαφή.

Κατανομή: Γενικός όρος που περιγράφει κατανομή μιας ουσίας ανάμεσα σε δύο φάσεις που έρχονται σε επαφή. Ειδικότερα περιγράφει την κατανομή μιας ουσίας ανάμεσα σε δύο υγρά που δεν αναμειγνύονται και δημιουργούν δύο φάσεις.

Γραμμή βάσης: Το σήμα που δίνει ο ανιχνευτής στην GC όταν από την στήλη περνά μόνο το φέρον αέριο.

Ερωτήσεις

1. Εκτός της χρωματογραφίας ποιες άλλες μεθόδους διαχωρισμού μειγμάτων γνωρίζετε;
2. Μια χρωματογραφική μέθοδος αναφέρεται με το πλήρες όνομα *υγρή - στερεά χρωματογραφία*. Μπορείτε να περιγράψετε την κινητή, στατική φάση και τη συσκευή;
3. Μέσα σε μια κωνική φιάλη εισάγονται 10 g διοξειδίου του πυριτίου σαν silica gel και 40 mL ενός διαλύτη ο οποίος περιέχει σε διάλυση 100 mg από μια μη πτητική, στερεή ένωση. Το silica gel είναι η στερεή φάση και το διάλυμα η υγρή. Το μείγμα αναδεύεται τώρα επί 10 min και στη συνέχεια αφήνεται να ηρεμήσει, οπότε διαχωρίζονται οι δύο φάσεις. Από το υπερκείμενο διάλυμα λαμβάνονται 10 mL και σε αυτά με μια μέθοδο βρίσκονται 12 mg από τη διαλυμένη ένωση. Ποια είναι τα ποσοστά με τα οποία *κατανεμήθηκε* η διαλυμένη ουσία στις δυο φάσεις; [52% στη στερεά]
4. Για τον έλεγχο της *χημικής* διέγερσης (ντοπάρισμα) των αθλητών ποια από τις μεθόδους που γνωρίζατε θα χρησιμοποιούσατε;
5. Συμπληρώστε τα κενά με όρους που θα διαλέξετε από την παρακάτω λίστα:

χρόνος ανάσχεσης

φέρων αέριο

σημείο εισαγωγής

ύψος κορυφής

στήλη

κινητή φάση

στατική φάση

πληρωτικό υλικό

ανιχνευτής

α) Δύο όρους που περιγράφουν την χρήση του Ήλιου στην αέρια χρωματογραφία:

είναι και

β) Εκείνο που μετρά κανείς στην ποιοτική ανάλυση ενός μίγματος στην αέρια χρωματογραφία είναι

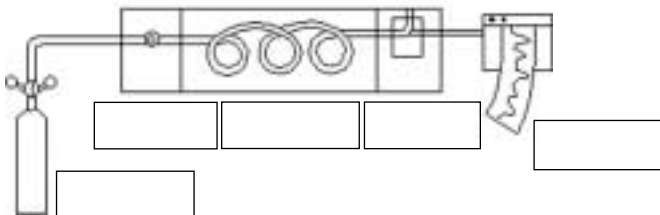
γ) Στον αέριο χρωματογράφο τα τρία μέρη που θερμαίνονται είναι:

το, η και ο.....

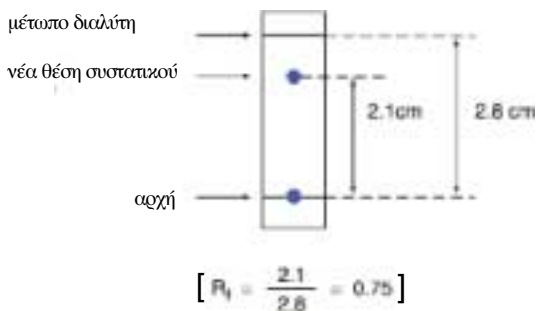
δ) Το υλικό με το οποίο γεμίζει η στήλη ενός αέριου χρωματογράφου λέγεται και παίζει ρόλο

6. Για μια επιταγή 60.000 δραχμών υπάρχει υποψία ότι έχει αλλοιωθεί το αρχικό 6 που ήταν 1 (πλαστογραφία). Μπορείτε να προτείνετε ένα τρόπο ελέγχου της πλαστογράφησης αυτής;

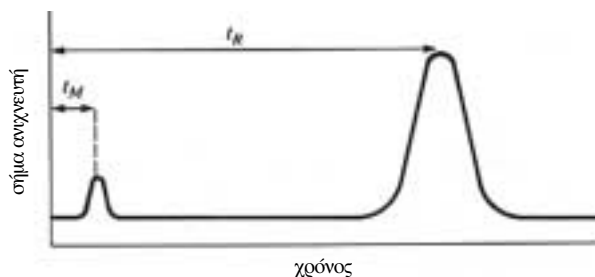
7. Γιατί το σημείο εισαγωγής του δείγματος θερμαίνεται στον αέριο χρωματογράφο;



8. Σημειώστε στο παραπάνω σχήμα ενός αέριου χρωματογράφου τα ονόματα των τμημάτων του.
9. Μερικά συστατικά του μελανιού ενός μαρκαδόρου ελάχιστα δεσμεύονται από τη στατική φάση ενώ διαλύονται πολύ στην κινητή φάση. Σε ποια θέση περιμένετε να τα βρείτε πάνω στο χρωματογραφικό χαρτί; Θα έχουν μικρή ή μεγάλη τιμή του R_F ;
10. Στο παρακάτω σχήμα ο συντελεστής ανάσχεσης, R_F , είναι:
 α. 2,8 β. 2,1 γ. 0,75 δ. 1,25



11. Στο παρακάτω σχήμα ο χρόνος t_M τι παριστά; Ο t_R ;



12. Συμπληρώστε τα κενά στον παραπάνω πίνακα.

Κινητή φάση	Στατική φάση	Όνομα μεθόδου
Αέριο	-----	Αέρια -υγρή χρωματογραφία
-----	Υγρό	Υγρή - υγρή χρωματογραφία
Αέριο	Στερεό	-----

13. Ήδη έχετε γνωρίσει το διαχωρισμό μειγμάτων. Στηρίζεται στη χρήση των διαφορετικών φυσικών ιδιοτήτων των συστατικών. Παρακάτω δίνονται διάφοροι τρόποι διαχωρισμού μειγμάτων. Να αναφέρετε την ιδιότητα στην οποία στηρίζονται. Αν μπορείτε δώστε ένα παράδειγμα στην στήλη παρατηρήσεις.

Μέθοδος

Ιδιότητα

Παρατηρήσεις

Κοσκίνισμα

Απόσταξη

Διήθηση

Μαγνήτιση

Φυγοκέντρωση

Χρωματογραφία