



Εργαστήριο Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης

ΑΣΚΗΣΗ 1

ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ

Το φως, φυσικό ή τεχνητό, είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με κυματική και σωματιδιακή φύση. Η αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας αυτής με την ύλη και οι εφαρμογές της συνιστούν τις **φασματοσκοπικές μεθόδους ανάλυσης**.

Τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματα των φασματοσκοπικών μεθόδων ανάλυσης είναι η μεγάλη ευαισθησία, η εκλεκτικότητα, η ταχύτητα, η εύκολη αυτοματοποίηση και η δυνατότητα της μη καταστροφής του αναλυόμενου δείγματος.

Στις φασματοσκοπικές μεθόδους περιλαμβάνεται και η **φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού UV-VIS**. Οφείλεται στις διεγέρσεις των ηλεκτρονίων σθένους με απορρόφηση μονοχρωματικής ακτινοβολίας (ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος) στην περιοχή του υπεριώδους 190-400 nm ή στην περιοχή του ορατού 400-780 nm.

Τα όργανα μέτρησης που χρησιμοποιούνται είναι τα **φασματοφωτόμετρα** και τα **φωτόμετρα**. Τα πρώτα μετράνε την απορρόφηση της ακτινοβολίας στην υπεριώδη και την ορατή περιοχή ενώ τα φωτόμετρα λειτουργούν μόνο στην ορατή περιοχή του φάσματος.

Νόμος Beer-Lambert

Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία διέρχεται από διάλυμα η ισχύς της ακτινοβολίας ελαττώνεται προοδευτικά κατά μήκος της διαδρομής λόγω της απορρόφησής της από την ουσία. Η μείωση της ισχύος εξαρτάται από τη συγκέντρωση του διαλύματος της απορροφούσας ουσίας, από τη φύση της και από την απόσταση που διανύει μέσα στο διάλυμα η προσπίπτουσα ακτινοβολία.

$$A = -\log T = -\log I/I_0 = \epsilon b C$$

T: διαπερατότητα

A: απορρόφηση

I: ένταση εξερχόμενης ακτινοβολίας

I₀: ένταση προσπίπτουσας ακτινοβολίας

b: το μήκος της διαδρομής προσπίπτουσας ακτινοβολίας ή εσωτερικό πάχος κυψελίδας σε cm

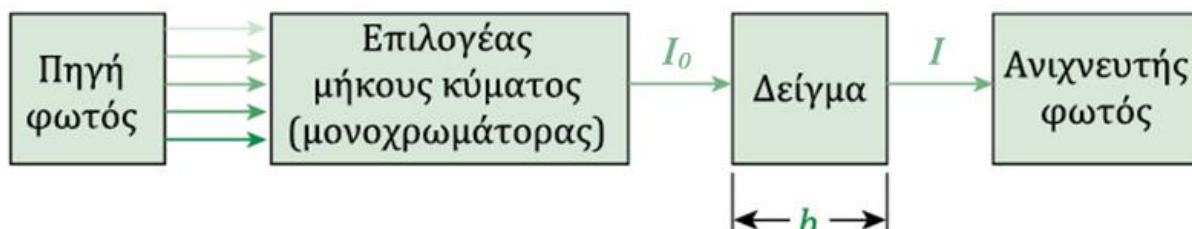
C: η συγκέντρωση του διαλύματος σε mol/l

ε: μοριακός συντελεστής απορρόφησης ή απόσβεσης, χαρακτηριστικός της απορροφούσας ουσίας σε συγκεκριμένο διαλύτη και μήκος κύματος ακτινοβολίας, ανεξάρτητος της συγκέντρωσης του διαλύματος και της διαδρομής της ακτινοβολίας, μετριέται σε cm^2/mol .

Από την παραπάνω σχέση προκύπτει ότι η απορρόφηση είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης της ουσίας σε συγκεκριμένο διαλύτη, μήκος κύματος και πάχος κυψελίδας. Ο μηδενισμός του οργάνου γίνεται με τυφλό διάλυμα το διαλύτη και ρύθμιση του οργάνου σε 100% T.

Τα βασικά μέρη ενός φασματοφωτόμετρου φαίνονται στο σχήμα 1 και είναι τα εξής:

1. Η πηγή της ακτινοβολίας, η οποία, ανάλογα με την περιοχή λ, είναι λυχνία πυράκτωσης βολφραμίου (ορατό) ή λυχνία εκκένωσης υδρογόνου (υπεριώδες).
2. Ένας μονοχρωμάτορας (πρίσμα ή φράγμα) που απομονώνει μια μονοχρωματική ακτινοβολία από την συνεχή ακτινοβολία που εκπέμπει η πηγή, οπότε επιτρέπει τη διέλευση από το διάλυμα της απορροφούσας ουσίας ακτινοβολίας I_0 .
3. Ο θάλαμος με την κυψελίδα που περιέχει το διάλυμα της απορροφούσας ουσίας. Η κυψελίδα για την ορατή περιοχή είναι από γυαλί ενώ για την υπεριώδη από χαλαζία.
4. Ο ανιχνευτής του σήματος (π.χ φωτοπολλαπλασιαστής) η λειτουργία του οποίου βασίζεται στην παραγωγή ηλεκτρικού ρεύματος ανάλογο με την ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας I.



Σχήμα 1

Αν μετρήσουμε την απορρόφηση μιας ουσίας σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε κάθε μήκος κύματος ξεχωριστά τότε μπορούμε να σχεδιάσουμε το διάγραμμα της απορρόφησης A της ουσίας σε σχέση με το μήκος κύματος λ της ακτινοβολίας. Το διάγραμμα αυτό αποτελεί **το φάσμα της ουσίας στο UV-Vis**. Το μήκος κύματος της ακτινοβολίας όπου έχουμε τη μέγιστη απορρόφηση της ουσίας μας ονομάζεται λ_{max} και είναι το μήκος κύματος που χρησιμοποιούμε για να κάνουμε τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας με το φασματοφωτόμετρο-UV-Vis.

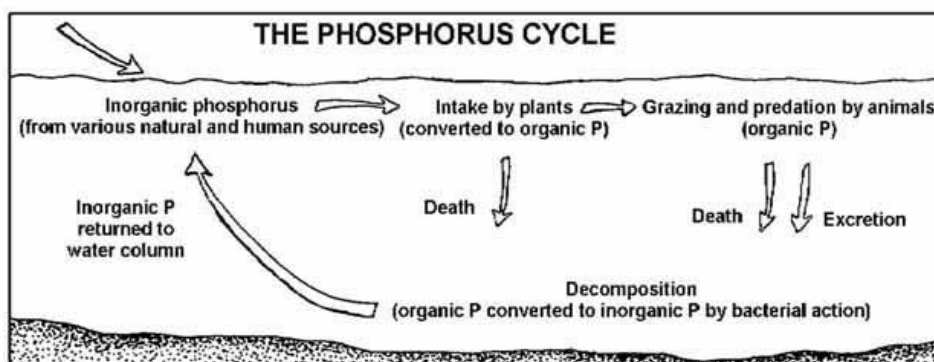
Βαθμονόμηση είναι η διαδικασία προσδιορισμού της σχέσης μεταξύ ενός μετρούμενου σήματος και της συγκέντρωσης του αναλύτη, που προκαλεί αυτό το σήμα. Συγκεκριμένα σε μια ανάλυση στο φασματοφωτόμετρο για να προσδιορίσουμε το συντελεστή αναλογίας ανάμεσα στην

απορροφούμενη ακτινοβολία και τη συγκέντρωση της ουσίας που μας ενδιαφέρει κατασκευάζουμε το αντίστοιχο διάγραμμα βαθμονόμησης, με την συγκέντρωση στον άξονα x και την απορρόφηση στον άξονα y. Βάζοντας τα σημεία που αντιστοιχούν στις μετρήσεις μας και εφόσον βλέπουμε μια γραμμική τάση, υπολογίζουμε με κατάλληλη στατιστική επεξεργασία το συντελεστή συσχέτισης και την ευθεία παλινδρόμησης. Έτσι έχουμε την σχέση που συνδέει τη συγκέντρωση με την απορρόφηση και μπορούμε να υπολογίσουμε την άγνωστη συγκέντρωση διαλύματος ουσίας, με μέτρηση της απορρόφησης στο βέλτιστο μήκος κύματος, το λ_{max} όπου έχουμε τη μέγιστη απορρόφησης.

Η περιεκτικότητα του νερού σε **φωσφορικά ιόντα** θα μελετηθεί στη συγκεκριμένη άσκηση. Αρχικά θα μετρηθεί το φάσμα των φωσφορικών ιόντων, στη συνέχεια θα παρασκευαστούν τα πρότυπα διαλύματα, διαφορετικών συγκεντρώσεων, κατόπιν με μια διαδικασία, που περιγράφεται στο πειραματικό μέρος, τα φωσφορικά ιόντα μετατρέπονται σε μπλε του μολυβδαινίου. Ακολουθώντας, μετρώντας την απορρόφηση των διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων, θα κατασκευαστεί το διάγραμμα βαθμονόμησης.

Τέλος για να γίνει προσδιορισμός της άγνωστης συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων σε διάλυμα, μετράτε την απορρόφησης του (αφού γίνουν πρώτα οι κατάλληλες χημικές αντιδράσεις για μετατροπή των φωσφορικών ιόντων που περιέχονται σε αυτό σε μπλε του μολυβδαινίου) και με γραμμική παρεμβολή στο διάγραμμα βαθμονόμησης προσδιορίζεται η συγκέντρωση.

Οι ενώσεις του φωσφόρου υπάρχουν στα λιπάσματα και στα απορρυπαντικά. Μεταφέρονται στο έδαφος και στα επιφανειακά νερά με τα λύματα, βιομηχανικά απόβλητα και τα εκ πλύματα. Ακόμα και μια πολύ μικρή αύξηση στις συγκεντρώσεις του μπορεί να προκαλέσει πολλά προβλήματα στα ποτάμια, όπως υπέρμετρη ανάπτυξη των φυτών, ανάπτυξη φυτοπλαγκτόν, μείωση του διαλυμένου οξυγόνου και ίσως το θάνατο κάποιων ψαριών, ασπόνδυλων ή άλλων υδρόβιων οργανισμών (φαινόμενο βιοσυσσώρευσης).



Σχήμα 2. Ο κύκλος του φωσφόρου

Ο φώσφορος αλλάζει μορφές καθώς ανακυκλώνεται στο υδατικό περιβάλλον. Στο σύστημα του ποταμού, ο κύκλος τείνει να μεταφέρει το φώσφορο προς την κατεύθυνση που κινείται το ρεύμα, καθώς μεταφέρονται φυτικοί και ζωικοί ιστοί αλλά και διαλυμένος φώσφορος. Γίνεται στατικός μόνο όταν προσλαμβάνεται από τα φυτά ή όταν προσκολλάται σε σωματίδια που καθιζάνουν.

Η μέτρηση του φωσφόρου είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη γιατί αφορά πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξης του 0,01 mg/l ή ακόμα μικρότερες. Ακόμα και σε τόσο χαμηλές συγκεντρώσεις ο φώσφορος μπορεί να έχει δραματικές επιπτώσεις στα ρέματα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Απαιτούμενα όργανα/σκεύη

- Ογκομετρικές φιάλες 100ml
- Σιφώνια 1ml, 5ml, 10ml
- Κυψελίδες χαλαζία, 3ml
- Αντιδραστήρια P1, P2
- Γυάλινα φιαλίδια των 10ml
- Φασματοφωτόμετρο

Πειραματική διαδικασία

A. Φάσμα PO_4^{3-} και προσδιορισμός μήκους κύματος

Θα μετρήσετε στο φασματοφωτόμετρο την απορρόφηση του πρότυπου διαλύματος PO_4^{3-} συγκέντρωσης 100 ppm, σε εύρος μήκους κύματος **400-780nm** και εύρος απορρόφησης **0,2-4A**. Από το φάσμα αυτό θα προσδιορίσετε το **λ_{max}** στο οποίο θα μετρηθούν τα πρότυπα διαλύματα.

B. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Από το αρχικό πρότυπο διάλυμα, που θα σας δοθεί, συγκέντρωσης **200 ppm PO_4^{3-}** , κάνετε τις κατάλληλες αραιώσεις και παρασκευάζετε τα πρότυπα διαλύματα **1,5,10 και 15 ppm PO_4^{3-}** σε ογκομετρικές φιάλες των 100ml.

Γ. Διαδικασία μετατροπής των PO_4^{3-} σε μπλε του μολυβδαινίου

- Μεταφέρετε 5ml από το αραιωμένο διάλυμα σε ένα γυάλινο φιαλίδιο.
- Προσθέτετε 5 σταγόνες από το αντιδραστήριο P-1, κλείνετε καλά το φιαλίδιο και ανακινείτε.
- Προσθέτετε 1 κουταλιά από το αντιδραστήριο P-2, κλείνετε καλά το φιαλίδιο και ανακινείτε ζυγηρά μέχρι το αντιδραστήριο να διαλυθεί πλήρως.
- Αφήνετε 5 λεπτά σε ηρεμία.

Δ. Μέτρηση στο λ_{max} των απορροφήσεων των διαλυμάτων, με την διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω. Γίνονται 3 μετρήσεις για κάθε διάλυμα.

Ε. Μέτρηση απορρόφησης άγνωστου δείγματος

Στο διάλυμα άγνωστης συγκέντρωσης, αφού κάνετε πρώτα τις κατάλληλες χημικές αντιδράσεις για μετατροπή των φωσφορικών ιόντων που περιέχονται σε αυτό σε μπλε του μολυβδαινίου, μετράτε την απορρόφηση και με γραμμική παρεμβολή στο διάγραμμα βαθμονόμησης προσδιορίζετε τη συγκέντρωση.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΣΤΟ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ

Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιούμε είναι το UVmini της Shimadzu.

Η κυψελίδα που χρησιμοποιείται κάθε φορά για τη μέτρηση της απορρόφησης πρέπει να είναι καθαρή πριν τοποθετηθεί στην υποδοχή του φασματοφωτόμετρου, γι' αυτό την σκουπίζουμε προσεκτικά πριν από κάθε χρήση. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί ώστε να την κρατάμε πάντα από το στόμιο και όχι από τη βάση της κυψελίδας. Βρώμικη επιφάνεια της κυψελίδας έχει σαν αποτέλεσμα τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και την ψευδή αύξηση της απορρόφησης. Για τις μετρήσεις στην άσκηση μας χρησιμοποιούμε κυψελίδες χαλαζία.

Για να πάρουμε το φάσμα της ουσίας χρησιμοποιούμε την λειτουργία *Spectrum* (πλήκτρο 2). Ρυθμίζουμε το εύρος του λ (λ range) με το πλήκτρο 2 και βάζουμε αρχική και τελική τιμή πατώντας ENTER κάθε φορά. Παρομοίως ρυθμίζουμε το εύρος των τιμών απορρόφησης (rec.range) με το πλήκτρο 3.

Τοποθετούμε το διάλυμα στην κυψελίδα και την κυψελίδα στην υποδοχή. Πατώντας το START ξεκινάει η μέτρηση των τιμών και εμφανίζεται σταδιακά το φάσμα. Η λειτουργία *Peak* (πλήκτρο F2) μας δίνει τις τιμές λ με τις απορροφήσεις τους.

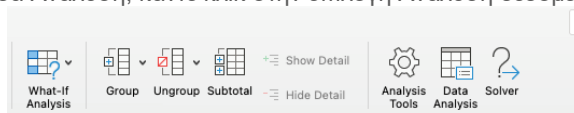
Για να πάρουμε τις τιμές απορρόφησης σε συγκεκριμένο μήκος κύματος χρησιμοποιούμε την λειτουργία *Photometric Mode* (πλήκτρο 1). Πατάμε το πλήκτρο GOTO WL και ρυθμίζουμε το μήκος κύματος στο οποίο θα γίνει η φασματοφωτομέτρηση. Πατάμε ENTER.

Αρχικά τοποθετούμε στην κυψελίδα το τυφλό, ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε, το βάζουμε στην υποδοχή, πατάμε AUTOZERO και περιμένουμε να μηδενιστεί η ένδειξη της απορρόφησης.

Σε μια άλλη κυψελίδα προσθέτουμε το δείγμα και την τοποθετούμε στην υποδοχή. Αυτόματα εμφανίζεται η μέτρηση της απορρόφησης.

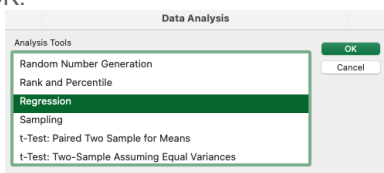
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Ανάλυση παλινδρόμησης στο Excel

Στην καρτέλα Δεδομένα, στην ομάδα Ανάλυση, κάντε κλικ στην επιλογή Ανάλυση δεδομένων.



Σημείωση: δεν μπορείτε να βρείτε το κουμπί Ανάλυσης δεδομένων; Κάντε κλικ εδώ για να φορτώσετε το πρόσθετο Tool AnalysisPak.

2. Επιλέξτε Regression και κάντε κλικ στο OK.



3. Επιλέξτε το Y Εύρος. Αυτή είναι η μεταβλητή πρόβλεψης (ονομάζεται επίσης εξαρτημένη μεταβλητή).

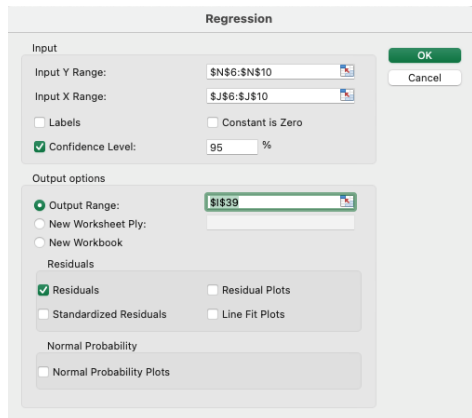
4. Επιλέξτε το X Εύρος. Αυτές είναι οι επεξηγηματικές μεταβλητές (που ονομάζονται επίσης ανεξάρτητες μεταβλητές). Αυτές οι στήλες πρέπει να είναι δίπλα στην άλλη.

5. Ελέγξτε τις ετικέτες.

6. Κάντε κλικ στο πλαίσιο Output Range (Εύρος εξόδου) και επιλέξτε το κελί που θέλετε να εμφανιστούν π.χ. I39.

7. Ελέγξτε τα υπολείμματα.

8. Κάντε κλικ στο OK.



SUMMARY OUTPUT									
Regression Statistics									
Multiple R	0.998176623								
R Square	0.996356572								
Adjusted R Square	0.995142095								
Standard Error	0.030821992								
Observations	5								
ANOVA									
	df	SS	MS	F	Significance F				
Regression	1	0.779376326	0.77937633	820.400286	9.3439E-05				
Residual	3	0.002849986	0.00095						
Total	4	0.782226311							
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%	
Intercept	0.074170898	0.02593461	2.85991952	0.06458123	-0.0083646	0.1567064	-0.0083646	0.1567064	
X Variable 1	1233.782552	43.07504329	28.6426306	9.3439E-05	1096.69854	1370.86656	1096.69854	1370.86656	
RESIDUAL OUTPUT									
Observation	Predicted Y	Residuals							
1	0.197549154	-0.006549154							
2	0.382616536	-0.01994987							
3	0.691062174	0.021604492							
4	0.937818685	0.033514648							
5	1.307953451	-0.028620117							

ΑΝΑΦΟΡΑ

A. Καταγράψτε τις κορυφές που εμφανίζονται στο φάσμα:

.....

Προσδιορίστε το $\lambda_{\max}$:

.....

B. Υπολογισμός των αραιώσεων για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων:

ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	ΟΓΚΟΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ ΑΡΧΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ
1ppm	100ml	
5ppm	100ml	
10ppm	100ml	
15ppm	100ml	

Μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμάτων:

ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΙΣ		
1ppm			
5ppm			
10ppm			
15ppm			

Μέτρηση απορρόφησης του διαλύματος άγνωστης συγκέντρωσης:

ΑΣΚΗΣΕΙΣ

1. Να κατασκευάσετε την καμπύλη βαθμονόμησης και να βρείτε τη γραμμική και δυναμική περιοχή
2. Στο Excel να προσθέσετε τις **γραμμές σφάλματος** (error bars) ως **τυπική απόκλιση** (standard deviation) με χρήση της επιλογής **Προσαρμογή και Καθορισμός τιμής (Custom -> Specify value)**.
3. Στην γραμμική καμπύλη βαθμονόμησης να βρείτε τον **συντελεστή συσχέτισης, R^2** , την **κλίση (m)** και την **τεταγμένη επί την αρχή**.
4. Με χρήση της επιλογής Ανάλυση παλινδρόμησης στο Excel, να υπολογίσετε την **τυπική απόκλιση (s) των μετρήσεων** (Standard Error Intercept).
5. Να υπολογίσετε την συγκέντρωση(ppm) των φωσφορικών ιόντων του άγνωστου δείγματος.