

המעבדה לכימיה אנליטית מכשורית

בית הספר לכימיה אוניברסיטת ת"א

פברואר 2014

מבוא

המעבדה לכימיה אנליטית מכשורית מבוססת על ציוד משוכלל ויקר. מטרת המעבדה הינה להכיר באופן מעשי ולתרגל תפעול ציוד מדידה אנליטי המשמש בפועל באופן שוטף בתעשייה ובמחקר בישראל ובעולם. המעבדה כוללת ארבעה מערכים:

1. כרומטוגרפיה גזית Gas Chromatography עמודים 2-20
2. כרומטוגרפיה גזית – ספקטרומטרית מסות GC-MS עמודים 21-49
3. כרומטוגרפיה נוזלית Liquid Chromatography עמודים 50-67
4. בליעה אטומית Flame Atomic Absorption עמודים 68-111

הלימוד במעבדה מתבצע בזוגות או שלשות כאשר לכל מערך יוקדשו 12 שעות לימוד בשלוש פגישות בנות 4 שעות כל אחת. שאיפתנו היא שכל סטודנט יבצע כל ארבעת המערכים הרשומים.

כל מערך שיעור מחולק לקטע מקדמי איכותי של הכרת המכשור, התחום והפרמטרים החולשים על הניסיון, חלק שני של אנליזה כמותית וחלק שלישי של אנליזה מתקדמת.

תשומת לב מיוחדת צריכה להינתן להיבטי בטיחות, במיוחד בטיחות אישית, אולם גם כדי להימנע מגרימת נזק לציוד היקר.

אלמנט מרכזי בבטיחות, הן האישית והן לתפעול המכשור, הינה ידיעה מוקדמת של מהלך הניסיון ומתן תחזית מוערכת לתוצאות כל ניסיון לפני עריכתו. תחזית זאת תהיה חצי כמותית ומבוססת על ידע כללי ו-”ניחוש אינטליגנטי” או חומר ספרותי.

המדריכים הממונים גם על הבטיחות יוודאו ידיעה מוקדמת כנ”ל ותשאלו שאלות בהתאם.

המכשור, מערכי השיעור והתדריך מעודכנים כל שנה, הצעות לשיפור ולשינוי יתקבלו בברכה.

אביב עמירב
פרופסור לכימיה

Gas Chromatography

מבוא:

גז כרומטוגרפיה (GC) הנה הטכניקה האנליטית הנפוצה ביותר המשלבת גילוי זיהוי וכימות של חומרים נדיפים או הניתנים לנדוף. GC משמש במגוון רחב ביותר של תעשיות כימיות, פטרוכימיות, מזון, אנליזה סביבתית, אנליזה פורנזית, בקרת תהליכים ומחקר.

מטרות הניסיון:

- א. הכרת השיטה והמכשור של גז כרומטוגרפיה – GC עם גלאי FID.
- ב. מדידת פרמטרים כרומטוגרפיים בסיסיים החשובים ל-GC.
- ג. זיהוי איכותי של מרכיבי תערובת.
- ד. קביעה כמותית של מרכיב עיקרי בתערובת מורכבת, כדלק מכוניות.
- ה. הכרת שיטת SPME.
- ו. הכרת גלאי סלקטיבי PFPD ואנליזה סלקטיבית של תרכובות גופרית בדלק.

דרישות לעריכת דו"ח מכין:

המעבדה הינה קורס המשך לקורס "שיטות מתקדמות בכימיה אנליטית", על כן יש לדעת ולהבין את החומר הרלוונטי מהקורס.

א. על הסטודנטים לבוא מוכנים לניסיון הן מבחינת ידע הרקע התאורטי, (אין צורך בכתיבת רקע תאורטי) והן מבחינת ידע על תפעול המכשיר. הדו"ח המכין יכלול רק את פרטי המהלכים הטכניים, סיבותיהם ו**תוצאות הניסיון הצפויות**. יש לקרוא ולהבין את מערך המעבדה על כל חלקיו לפני התחלת המעבדה.

ב. לכל שלב ושלב של הניסוי פרטו את:

- סדר הפעולות במהלך הניסוי - תוצאות להן אתם מצפים ומדוע. הדגישו את השוני מהניסיון הקודם.
- ציירו כרומטוגרמות באופן ידני להן אתם מצפים עם צירי זמן ועוצמה חצי כמותיים.

דרישות לעריכת דו"ח מסכם:

- א. רשמו את מהלך החישובים.
- ב. הגישו כרומטוגרמות בצורה מסודרת, כולל הנתונים הרשומים על גביהן.
- ג. לכל ניסיון יש לרשום מסקנות סופיות לגבי השגת המטרה.

הוראות כלליות לעבודה בגז-כרומטוגרפיה

1. המזרק להזרקת הדוגמאות לתוך הגז-כרומטוגרף ובמיוחד מזרק ה- SPME הינם מכשירים עדינים, אך גם מסוכנים. יש לטפל בהם בעדינות ולהניחם בקופסא כשאינן מזריקים. חשוב מאוד ללמוד מהמדריך כיצד בדיוק משתמשים בו:
 - א. נהגו בעדינות במזרק. אל תפעילו עליו לחץ מיותר.
 - ב. ההזרקה חייבת להיות מהירה והמזרק חייב להיות במצב מאונך מרגע הכנסתו עד לאחר יציאתו מה injector.
2. לפני תחילת העבודה יש לשטוף את המזרק מספר פעמים באתנול. לפני כל הזרקה יש לשטוף אותו בתמיסה המוזרקת. השתמשו בבקבוקון לאיסוף פסולת התמיסות.
3. אין להזריק תמיסה חדשה לתוך קולונה לפני שיצאו כל מרכיבי התמיסה הנבדקת (מדוע?)
4. אין להכניס פיפטות מכל סוג שהוא לבקבוקים המכילים את תמיסות האם.
5. עקב נדיפות התמיסות, יש לסגור היטב את הכלים המכילים אותם.
6. על כל כרומטוגרמה ירשמו כל הנתונים הניסיוניים המשתנים.
7. בסוף המעבדה -יש לשטוף את המזרקים מספר פעמים באתנול ולהחזירם למקומם.
8. במקרה של שריפה במעבדה, יש לסגור מייד ברז המימן על הלוח. וודאו שהנכם יודעים היכן הוא נמצא.
9. חובה להרכיב משקפי מגן. סטודנט ללא משקפיים לא יורשה לבצע את הניסוי.

תאור כללי של מערכת GC:

- אנחנו נעבוד עם שתי מערכות GC מסוג 6890N המיוצרות ע"י Agilent . כפי שנלמד בקורס המערכות כוללות מספר חלקים:
- א. מערכת הכנסת דוגמה : injector מטיפוס split/splitless.
 - ב. תנור בעל אפשרות לתיכנות טמפרטורה.
 - ג. קולונת הפרדה : קולונה באורך 30m מסוג HP-5, קוטר פנימי 0.32mmID, ציפוי 5% Phenylmethylsiloxane בעובי $0.25\mu\text{m}$.
 - ד. גלאים:
- בשני המכשירים מותקן גלאי FID (ודאו שהנכם מבינים את דרך פעולתו).
 - במכשיר הקרוב לדלת הכניסה של המעבדה מותקן גלאי PFPD במקביל.
- ה. מערכת בקרה ממוחשבת ע"י תוכנת chemstation.

הפעלת המחשב ותוכנת chemstation

בכדי לעלות את התוכנה יש ללחוץ פעמיים על האייקון instrument 1 online_ הנמצא על ה-desktop יפתח מסך הנקרא Method and run control :instrument 1 (online).

Method and Run Control

NIGHT.M DEF_GC.S Run Method

Start Stop

Back: Name: Comment

Front: Name: decane 10k ppm Comment SnifProbe -

6890 Status

Idle Ready

| | Actual | Setpt |
|-----------------------|--------|-------|
| Oven Temperature* | 50 | 50 |
| Front Det Makeup Flow | 0.0 | Off |
| Back Det Makeup Flow | | |
| Front Det H2 Flow | 0.0 | Off |
| Front Det Air Flow | 0.0 | Off |
| Current Run Time | 0.00 | |

ChemStation Status

Ready

| Last Data File | Last Run |
|----------------|----------|
| 1: | 0.0 |
| 2: | minutes |

[F1=Help] [F3=Recall] [F5=StartRun] [F6=StartSeqRun] [F8=Stop] [F11=NextWindow]

Show/Hide current online Logbook

start Instrument 1 (o... 15:06

שיטת הרצה:

שיטת ההרצה (method) איתה מבוצעת האנליזה מאופיינת על ידי שם עד שמונה תוויים, בעל הסיומת M. המאפשרת לזהותו כקובץ שיטה. כל שיטה מכילה ארבעה חלקים:

- תיאור השיטה.
- בקרה על המכשיר- הגדרת הפרמטרים ששולטים על המכשיר למשל: טמפרטורת ולחץ ה-inlet, קצב זרימה דרך הקולונה ועוד.
- ניתוח תוצאות- הגדרת הפרמטרים ששולטים על הליך עיבוד הנתונים
- פרמטרים לבדיקה בזמן ההרצה.

בחירת שיטה ומאפייני הרצה:

אנו נשתמש בשיטה הנקראת STUDENT.M. על מנת להטעינה יש ללחוץ על File→Load→Method ולבחור בה. בכדי לראות כיצד היא בנויה ולהכניס פרמטרים רצויים לכל הרצה יש ללחוץ על Instrument→Edit parameters ייפתח חלון שינוי פרמטרי מכשיר, כמו כן לחיצה על כל אחד מהאיקונים (oven, columns וכו') בחלון הראשי תראה את מאפייניו.

- Inlet : שולט על מאפייני ה injector, כגון טמפרטורה, מצב split/splitless, לחץ הגז וקצב הזרימה שלו. הטמפרטורה תקבע ל- 250°C, Split 50.
- Column : שולט על קצב זרימת הגז הנושא לאורך ההרצה ומאפשר פיקוח על הלחץ בקולונה. קצב זרימת הגז (flow) יקבע ל 1ml/min.
- Oven : מאפשר לתכנן את טמפרטורת התנור לאורך ההרצה. ניתן לקבוע טמפרטורה התחלתית, קצב עלייה ואת זמן ההמתנה בטמפרטורה הסופית. הזמן הכולל של ההרצה מחושב ומופיע בתחתית החלון.
- Detectors : שולט על מאפייני הגלאי כגון : טמפרטורה וקצב זרימת הגזים. בכדי להפעיל את הגלאי (FID) הנמצא בעמדת front, יש לספק לו את התנאים הבאים:
Heater: 250°C
H₂: 40mL/min
Air: 400mL/min
Make up Gas (He): 45mL/min

- Signals : מאפשר לבחור בין הגלאים השונים. עבור 1 signal יש לסמן Det ולבחור front detector. עבור 2 signal ניתן לבחור (PFPD) back detector או לסמן Temp ע"מ למדוד את טמפרטורת התנור.

לאחר שבחנתם והכנסתם את הפרמטרים (טמפרטורת תנור, split, flow וכ"ו) המתאימים לכל הרצה לחצו על Apply ו-OK. קצב זרימת הגזים יתייבב, ותשמע ההצתה של הגלאי [ניתן לודא הדלקה ע"י בחינת הסיגנל- על מכשיר הגז כרומטוגרף ליחצו על מקש 1 signal וראו אם ערך הסיגנל (value) עלה].


הכנה להרצה:


בתפריט העליון לחצו על RunControl→Sample info. ייפתח חלון:

בחלון זה יש לשנות את operator name ואת subdirectory לשם שאותו תזכרו לאורך כל המעבדה. ב sample parameters חובה להכניס ב comment את כל מאפייני הניסוי, כפי שניתן לראות בדוגמה, לבסוף יש ללחוץ על OK.

כאשר בחלון ChemStation status יש אור ירוק המראה על מצב ready ניתן להתחיל בהרצה. לחיצה על כפתור ה- Start הירוק (או על מקש F5) תשנה את צבעו לורוד ויופיע הכיתוב waiting for injection, יש להזריק דוגמה ומייד ללחוץ על כפתור ה Start במכשיר.

במהלך ההרצה תוכלו לעקוב אחר הסיגנל בחלון ה-online plot. כאשר חלון זה סגור ניתן לפתוח אותו ע"י לחיצה על 1 signal → On line signals →view. אם ברצונכם לראות רק

את חלון הגרף ללא חלונות נוספים יש ללחוץ על  (האייקון השישי מימין בשורת התפריטים). בעזרת החיצים השחורים בתחתית הגרף ניתן לבחור את הרגישות הרצויה. כמו כן בעזרת העכבר ניתן לסמן קטע ספציפי (שימו לב שלאחר בחירת קטע ספציפי החיצים השחורים לא פעילים עוד).

חלון נוסף שניפתח הוא ה-6890 status שמראה לכם פרמטרים נבחרים במכשיר ה-GC בזמן ההרצה. אם ברצונכם לשנותם כנסו ל- `instrument` → `setup actual`. אם ברצונכם לסיים את ההרצה לפני גמר התוכנית יש ללחוץ על מקש ה-STOP במחשב או במכשיר [לחיצה על האייקון  (השביעי מימין) תחזיר אתכם למסך בו נימצא מקש זה].

ניתן לעבד ולהדפיס את התוצאות ע"י לחיצה על `View` → `Data analysis`. ייפתח מסך המכיל את הכרומטוגרמה שהתקבלה עם זמני יציאה של החומרים, וטבלה הכוללת נתונים על הפיקים עצמם (גובה, זמן עיכוב, רוחב, שטח ועוד). ניתן לשנות את פרמטרי האינטגרציה ע"מ לקבל ערכים טובים ביותר.

בין ההזרקות

שימו לב לקצב הזרימה של הגז הנושא על ידי תשומת לב ללחץ וזמן יציאת הממס. חוסר יציבות בקצב הזרימה מעיד על כך שיש להחליף את הספטום. אם נחוץ, עשה זאת בנוכחות המדריך. חזרו על ההוראות הכלליות בתחילת הניסיון, וודאו בעזרת המדריך שכללי ההפעלה של המערכת ברורים לכם היטב.

חלק ראשון

תמיסת עבודה לחלק ראשון: תערובת המכילה benzene, toluene, o-, m-, p-xylene, mesitylene בתוך מתנול בריכוז 10^{-3} V/V כל אחד.

א. הכרות עם גלאי ה-FID

חקירת השפעת קצב זרימת מימן ו- make up gas על הרגישות.

1. מטרת הניסוי- קביעת השפעת קצב זרימת ה- make up gas על הכרומטוגרמה המתקבלת. לאחר שתעלו את התוכנית STUDENT.M בידקו שכל פרמטרי ההרצה נכונים (inlet split, column flow וכו') וטמפרטורת התנור 80°C למשך 10 דקות. לאחר גמר ההכנות להרצה (ראו עמ' 6-7) הזריקו $1\mu\text{l}$ של התמיסה הנבדקת. לאחר גמר ההרצה והדפסת התוצאות בצעו הרצה שנייה, הפעם ללא make-up gas. בחלון שינוי פרמטרי מכשיר הכנסו ל detectors ו הורידו את סימן ה- $\sqrt{\quad}$ ליד ה- make up gas. לאחר גמר ההכנות להרצה הזריקו $1\mu\text{l}$ של התמיסה. בסיום ההרצה יש להפעיל מחדש את זרימת הגז.

• הדפיסו את התוצאות של שתי ההרצות והתייחסו להבדלים בין זמני היציאה, רוחב הפיקים, גובהם והשטח. האם יש הבדל ניכר? מהו תפקיד ה make up gas בגלאי?

2. מטרת הניסוי-קביעת השפעת קצב זרימת מימן על הכרומטוגרמה המתקבלת. בחלון שינוי פרמטרי מכשיר שנו את קצב זרימת המימן ל $25\text{mL}/\text{min}$. לאחר גמר ההכנות להרצה הזריקו $1\mu\text{l}$ של התמיסה. בסיום ההרצה החזירו את קצב זרימת המימן ל $40\text{mL}/\text{min}$.

• השוו את הכרומטוגרמה שהתקבלה לכרומטוגרמות מהניסוי הקודם. מה ההבדלים ברוחב הפיקים, בזמני היציאה הגובה והשטח? מניין נובעים, לדעתכם הבדלים אלו?!

ב. אלוציות איזותרמיות: חקר פרמטרים כרומטוגרפיים ומשוואות ון-דימטר

1. מטרת הניסוי – לחשב נתונים כרומטוגרפיים בסיסיים: מספר פלטות תאורטיות, מספר פלטות אפקטיביות, ורזולוציה. לחלץ נתונים תרמודינמיים (אנתלפיה ΔH_{des} של תהליך הנדוף ממשטח).

בצעו ארבע הרצות בטמפרטורות של $60, 70, 80, 90^\circ\text{C}$. שימו לב שכבר יש לכם תוצאות להרצה בטמפרטורה של 80°C . הדפיסו את הכרומטוגרמות.

- בחרו אחד ממרכיבי התערובת וחשבו עבורו את מספר פלטות ההפרדה התיאורטיות ומספר פלטות ההפרדה האפקטיביות בכל טמפרטורה. מדוע בחרתם דווקא במרכיב זה? מה הפרמטרים שעליו לעמוד בהם? על מנת לחשב את מספר הפלטות השתמשו בנוסחאות:

$$N_{effective} = 5.54 \left(\frac{t'_R}{W_h} \right)^2 \qquad N_{theory} = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2$$

כאשר t_R הנו זמן יציאת החומר ו- w_h רוחב הפיק בחצי הגובה. t'_R מוגדר כזמן היציאה של החומר פחות זמן היציאה של הממס, בהנחה שהממס אינו מעוכב בקולונה (t'_R - adjusted retention time). אם הממס מתעכב בקולונה איך תוכלו לחשב את t'_R ? רכזו את התוצאות בטבלה. מה מסקנותכם?

- בחרו שתי פיקים וחשבו עבורם את הרזולוציה בכל טמפרטורה. מדוע בחרתם דווקא בפיקים אלו? את הרזולוציה ניתן לחשב לפי נוסחה:

$$Rs = 1.18 \frac{(t_{R_2} - T_{R_1})}{(W_{h_1} + W_{h_2})}$$

כאשר $t_{R(j)}$ הנו זמן היציאה של פיק (j) ו- $w_{h(j)}$ הנו רוחב הפיק בחצי הגובה. בהנחה שפיקים כרומטוגרפיים בעלי צורה גאוסיאנית, רזולוציה שווה ל-1 נותנת הפרדה 98% בין שני פיקים שווי שטח, אם הרזולוציה שווה 1.5 אז הפרדה היא 99.7% וזה מהווה base line separation. כיצד משתנה הרזולוציה עם העלייה בטמפרטורה? מדוע?

- זמן היציאה היחסי של חומר מהקולונה פרופורציוני נפוץ ללחץ האדים שלו. לכן, ממשוואת Clausius-Clapeyron:

$$\ln \left(\frac{P}{P_0} \right) = - \frac{\Delta H_{vap}}{RT} + C$$

ניתן לחלץ את אנתלפיה הנידוף ממשטח ΔH_{des} . כאשר P° הנו לחץ אדים חלקי בתנאים סטנדרטיים, P – לחץ אדים חלקי בטמפרטורה נתונה, C – קבוע. חשבו את ΔH_{des} עבור כל אחד מהחומרים בתערובת והשוו אותו לערך התיאורטי של ΔH_{vap} מהספרות. מהם מקורות שגיאה אפשריים?

2. מטרת הניסוי - חישוב מקדמים B ו-C במשוואת Van Deemter. בחלון שינוי פרמטרי מכשיר שנו את קצב זרימת הגז הנושא מ 1ml/min ל-2ml/min. לאחר גמר ההכנות להרצה הזריקו 1 μ L מהתמיסה. בצעו את הניסוי בטמפרטורה נוספת והדפיסו את הכרומטוגרמות המתקבלות.

- עבור אחד מהחומרים בתערובת חשבו את השפעת קצב הזרימה על מספר הפלטות התיאורטיות והאפקטיביות בהתאם לנוסחה מהחלק הקודם. מה מסקנותיכם?
- חשבו את מקדמים B ו-C של משוואת ון-דימטר: $H = A + B/u + C u$. זיכרו, עבור קולונות קפילריות המקדם A ניתן להזנחה.

ג. תכנות טמפרטורות

מטרת הניסוי – לימוד שיטה לקיצור זמן הכרומטוגרפיה ושיפור רגישות. בחלון שינוי פרמטרי מכשיר הכניסו את פרמטרי ההרצה הבאים:

- יחס Split 50.
- קצב זרימת גז נושא: 1 mL/min.
- תכנות טמפרטורה: טמפרטורה התחלתית - 50°C למשך 0.2 דקה ולאחר מכן עלייה בקצב של 20 °C /min עד טמפרטורה של 120 °C, למשך חמש דקות.

לאחר גמר ההכנות להרצה הזריקו 1 μ L של תמיסת העבודה. לאחר סיום ההרצה הדפיסו את הכרומטוגרמה המתקבלת.

- מה ההבדל בין התוצאות שקיבלתם בחלק זה לתוצאות מהניסויים האיזותרמיים בחלק הקודם? התייחסו לזמני היציאה, רוחב הפיקים, גובהם והשטח שלהם. מה מסקנותיכם?

ד. הכרות עם שיטת הזרקה splitless-split

בניסוי זה נשתמש בתערובת בריכוז 10^{-5} V/V. הכנסו לחלון שינוי פרמטרי מכשיר ובדקו שתנאי ההרצה זהים לתנאים בחלק הקודם (תכנות טמפרטורה).

הכנסו לחלון שינוי פרמטרי מכשיר ושנו ב inlets את שיטת ההזרקה מ split ל splitless. קבעו את זמן split purge flow ל 0.2 min (מצב זה משמעותו פתיחת ה-Split 0.2 דקות מתחילת ההרצה). שימו לב שערך ה-Flow לאחר ה-Splitless יעמוד על ערכו הקודם. לחצו על כפתור ה-Prep Run הנמצא על פנל מכשיר ה-GC (שימו לב שה GC אכן נכנס למצב Prep Run), המתינו ל Ready והזריקו $1\mu\text{l}$ של התערובת. (מדוע צריך להמתין 0.2 דקה בטמפרטורה נמוכה?).

החזירו את מצב ה injector ל split והזריקו שנית את התמיסה בריכוז 10^{-5} V/V.

- הדפיסו את הכרומטוגרמות המתקבלות והשוו הרצת splitless להרצה במצב Split. התייחסו לזמן היציאה של הפיקים, רזולוציה ורגישות. ניתן לשנות פרמטרים ולחזור על הניסוי שנית ע"מ לקבל רגישות ורזולוציה טובה יותר. אילו פרמטרים משפיעים על כך?

ה. חקר עלית טמפרטורת הרתיחה עם גודל השלד הפחמימני:

תמיסת עבודה: תערובת כהלים $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{OH}$, כאשר $n=3-9$, בריכוז 1% נפחי ב-hexane.

ידוע שעם כל פחמן בשלד הפחמימני עולה טמפרטורת רתיחה של החומר בממוצע ב-

$20^\circ\text{C}-30^\circ\text{C}$. כמו כן, כל שינוי של 10°C בקרוב מהווה פקטור של 2 בזמן יציאת החומר.

בחלון שינוי פרמטרי מכשיר שנו את הפרמטרים הבאים:

- יחס Split 50.
- קצב זרימת גז נושא: $1\text{mL}/\text{min}$.
- תכנות טמפרטורה: 110°C למשך 15 דקות (במכשיר עם גלאי PFPD תכנות הטמפרטורה יהיה 100°C למשך 15 דקות).

לאחר גמר הכנות להרצה הזריקו $1\mu\text{L}$ מתערבות הכהלים. בצעו את הניסוי שנית בתכנות טמפרטורה: 45°C ועלייה בקצב של $20^\circ\text{C}/\text{min}$ עד לטמפרטורה של 180°C עם זמן המתנה של דקה.

- הדפיסו את הכרומטוגרמות המתקבלות. שרטטו גרפים של t'_R ו $\text{Log}(t'_R)$ כנגד מספר הפחמנים בכוהל.
- עבור איזותרמה, אילו תוצאות קיבלתם? מה המשמעות שלהן?
- עבור תכנות טמפרטורה, אילו תוצאות קיבלתם? האם נשמר ההבדל בטמפרטורת הנידוף של החומרים השונים?

חלק שני

א. אנליזה כמותית: בדיקת ריכוז בנזן, טולואן, קסילן (אורתו, מטה, פרה), מזיטילן בדלק 95 אוקטן נטול עופרת:

- יצירת גרף כיול ל Toluene. הכינו 4 תמיסות עם ריכוזים שונים של Toluene במתנול בתחום 0-10%. עבור כל תמיסה הריצו כרומטוגרמה בתנאים הבאים:
 - יחס Split 50.
 - קצב זרימת גז נושא: 1 mL/min.
 - תכנות טמפרטורה: טמפרטורה התחלתית 60°C למשך דקה אחת, קצב עלייה של 20 °C /min עד לטמפרטורה של 270°C וחמש דקות המתנה בסוף.ע"מ לכייל כראוי יש להזריק בצורה כמותית והדירה. שיטה אחת להזרקה הדירה היא שיטת "סנדוויץ": הוציאו בעדינות את ה-plunger של המזרק ויבשו את המזרק. החזירו את ה-plunger למזרק. שאבו אוויר (בערך 2 µl). הכניסו את מחט המזרק לתמיסה ושאבו 0.4 µl של תמיסה. הוציאו את המחט מהתמיסה ושאבו אוויר פעם נוספת (בערך 2 µl). וודאו ששאתם 0.4 µl. הזריקו את התמיסה ל-injector בעדינות, כך שהמחט מוכנסת לinjector ורק לאחר סיום הכנסתה ה-plunger לחוץ.
- הריצו את תמיסת העבודה מהחלק הראשון באותם תנאים ע"מ למצוא את זמני היציאה של כל החומרים.
- הריצו תמיסת דלק והשתמשו בנתונים מגרף הכיול ע"מ לחשב את ריכוזי המרכיבים.
 - שרטטו גרף של שטח הפיק של Toluene כנגד ריכוזו. חשבו את ריכוז ה-Toluene. שאלה: מדוע יש להתחשב בשטח הפיק ולא בגובהו?
 - לפי כיול ב-Toluene חשבו את ריכוזי שאר המרכיבים. העריכו שגיאה וגורמיה.

ניסויים מתקדמים:

א. תכנות טמפרטורות דו-שלבי עבור דלק:

לפעמים יש צורך בתכנות טמפרטורות רב שלבי ע"מ לזרז את הכורמטוגרמה באזורים מסויימים ועם זאת לשמור על הרזולוציה באזורים אחרים. נסו לזרז את זמן כרומטוגרפיה של הדלק, אך גם לשמור על הרזולוציה של החומרים Benzene, Toluene, Xylene על ידי תכנות טמפרטורות דו שלבי עם שני קצבי עלית טמפרטורה.

הכנסו לשינוי פרמטרי מכשיר, הכניסו את תכנות הטמפרטורה שעליה חשבתם טרם המעבדה הכוללת שני קצבי העלאת טמפרטורה. ע"מ לבדוק אם תוכנית הטמפרטורה שלכם אכן משפרת את הכרומטוגרמה, הזריקו את התמיסה מהחלק הראשון של הניסוי (בריכוז 10^{-3} M) קודם ורק לאחר מכן הזריקו דלק.

ב. הזרקה headspace של דלק/תמיסת אם:

בצעו אנליזה של הרכב אדי הדלק מעל הנוזל. השתמשו במזרק המיועד להזרקת גזים מטיפוס Gas Tight Syringe. חדרו עם מחט של מזרק דרך septum שנמצא בפקק הבקבוקון עם דלק ושאו 0.5 מ"ל של אדי דלק. יש לעשות זאת בזהירות כדי לא לגעת בדלק נוזלי. הזריקו את אדי הדלק למכשיר ובצעו אנליזה.

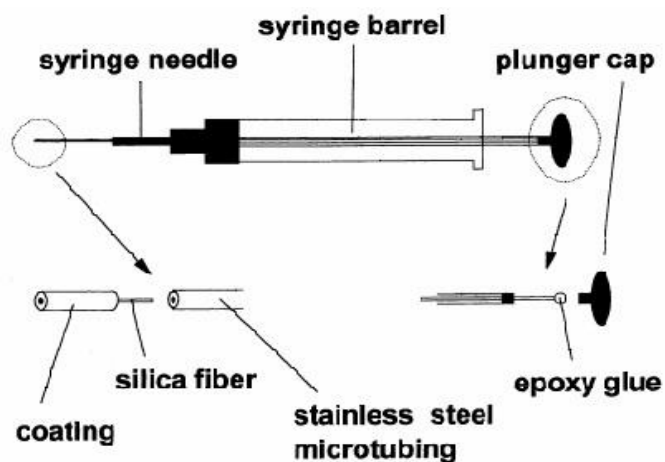
- מה ההבדלים בין כרומטוגרמה של אדי דלק ובין זאת של דלק נוזלי ומה מקורם?

חלק שלישי

Solid Phase Micro Extraction

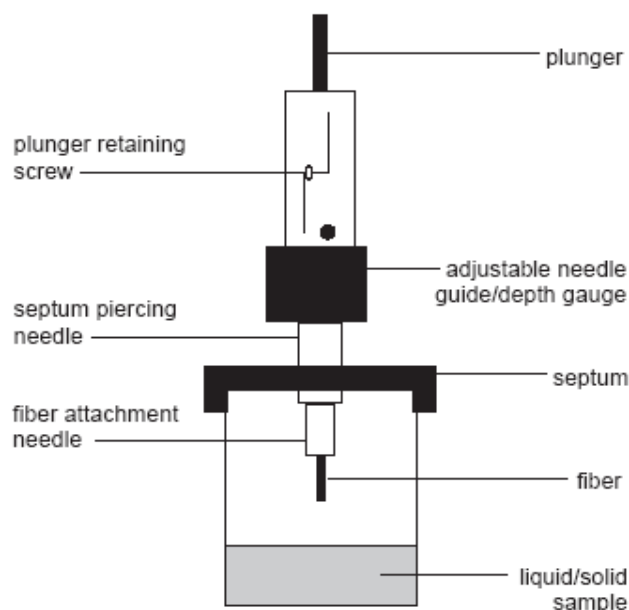
כדי להתכונן לחלק זה של הניסוי עליכם לחפש חומר על השיטה באתרי אינטרנט למשל באתר : <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spme.html> באתר זה בחרו ב SPME. שימו לב במיוחד לאנימציה של דרך הפעולה של השיטה. תוכלו גם לבחור ב SPME applications ולראות תנאי עבודה למטריצות שונות. אנליזה של מזהמים סביבתיים, חומרי טעם וריח כמו גם דוגמאות אורגניות רבות נדיפות ונדיפות למחצה, מתחילה בריכוז האנליט. שיטות רבות משתמשות בסולבנטים רבים ודורשות לרוב זמן יקר, ציוד רב ושימוש מסיבי בממיסים אורגנים שיכולים להכיל מזהמים בעצמם.

בשנות ה-80 פותחה על ידי פרופ' יאנוש פאוליצין שיטה חדשה בשם SPME בכדי לענות על הצורך בהכנת דוגמא מהירה, ללא ממסים המתאימה לביצוע בתנאי שטח. שיטה זו יושמה למגוון רחב של יישומים כולל: כימיה סביבתית, כימיה פורנזית, אנליזה מזון, סמים ועוד. בשיטה זו משתמשים בסיב מצופה בחומר סופח (קיימים מספר סוגים) בכדי לבודד ולרכז את האנליט מתוך המטריצה בה הוא נימצא. לאחר המיצוי, הסיב מוכנס לתוך מכשיר ה-GC במזרק מיוחד ראו איור מספר 1 לצורך נידוף דוגמא תרמי בתוך injector.



איור 1: מזרק SPME

- ישנם שני סוגים של מיצויים שניתן לעשות על ידי SPME :
1. דגימה ישירה- בה המזרק מוכנס לתוך תמיסה נוזלית.
 2. Headspace - בה דוגמים את אדי הדוגמא.
- במעבדה נתמקד בדגימה בשיטת ה-HeadSpace (HS-SPME). ראו איור מספר 2.



איור 2: סכמה של ציוד ה- HeadSpace SPME

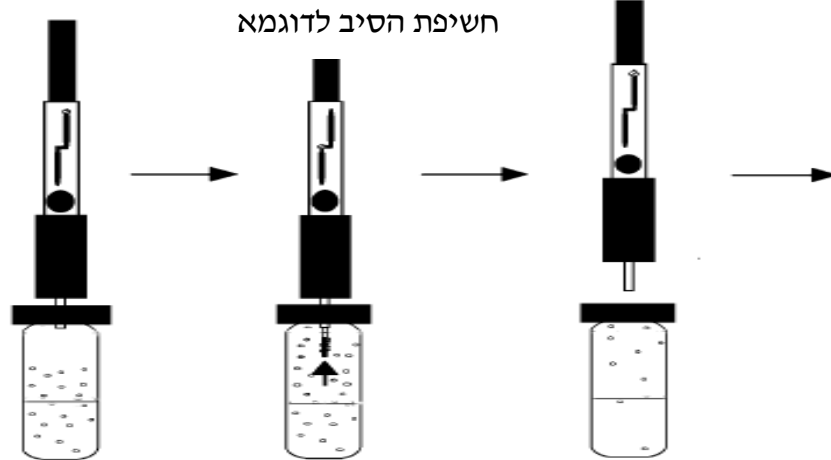
שם השיטה נגזר מהעובדה שכמות האנליט הממוצה מהדוגמא קטן בהרבה מנפח הדוגמא. כתוצאה מכך רוב האנליט לא מגיע לפאזה הממוצה מהדוגמא אלא שווי משקל מושג בין מטריצת הדוגמא והפאזה הממוצה. התהליך עצמו מודגם באיור מספר 3.

סיב של סיליקה באורך של כ-1 סנטימטר, המצופה בפולימר Phenylmethylsiloxane, מוחזק במזרק הנראה כמו מזרק GC רגיל. בכדי להשתמש ביחידת ההזרקה, מושכים את הסיב לתוך מחט המזרק, מחדירים את המזרק דרך ספטה האוטמת את מבחנת האנליט ושוב לוחצים על המזרק וחושפים את הסיב לדוגמא. מולקולות האנליט עוברות ספיחה על הסיב המצופה. מושכים את הסיב לתוך המחט, ומושכים את המזרק ממבחנת הדוגמא. לבסוף, המזרק מוכנס לתוך מערכת ההזרקה של הגז כרומטוגרף בה האנליט הספוח עובר נידוף תרמי וזורם לתוך קולנת ה-GC.

שלב הספיחה

החדרת המזרק דרך הספטה
כאשר הסיב חבוי

משיכת הסיב לתוך המחט
והוצאתה מהמבחנה

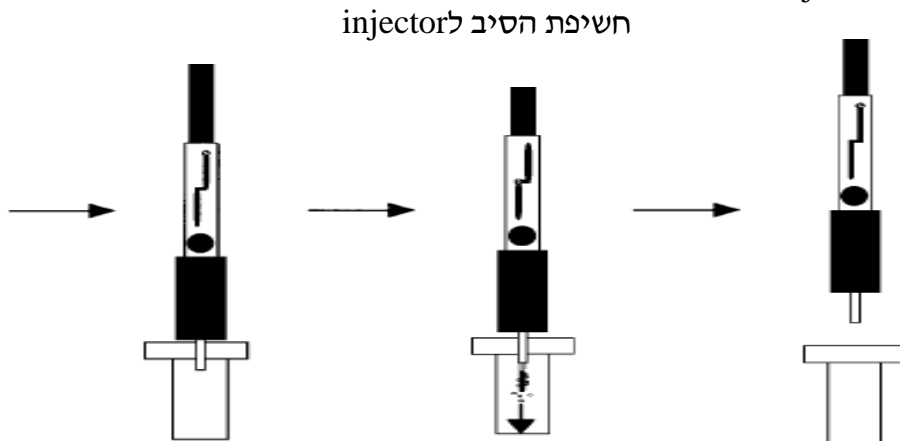


חשיפת הסיב לדוגמא

שלב הנידוף

הזרקה לתוך injector
כאשר הסיב חבוי

משיכת הסיב לתוך המחט
והוצאתה מהinjector



חשיפת הסיב לinjector

GC- Injector

איור 3: תיאור תהליך הספיחה והנידוף ב- SPME

אזהרה: ניסיון להכניס או להוציא את הסיב הגלוי דרך הספטום ישבור את הסיב היקר!
(מחירו כ- 100\$).

זמן הדגימה תלוי בקינטיקה של העברת המסה במערכת. האנליט בתוך מטריצת הדוגמא עובר סידרה של תהליכי העברה ממטריצת הדוגמא לתוך הפאזה הגזית ומשם לציפוי שעל הסיב.

שיטה זו מבוססת כאמור על שיווי משקל המושג בין הסיב לדוגמא בשלוש פאזות:
1. בין ציפוי הסיב לפאזת הדוגמא.

2. בין פאזת הדוגמא לפאזה הגזית שמעליה (HeadSpace)

3. בין ציפוי הסיב לפאזה הגזית שמעל הדוגמא.

המטרה ב- SPME היא להגיע לש"מ בתוך המערכת כדי שלא תהיה שונות הודות למעבר מסה שונה בין ניסוי לניסוי. בעזרת קביעת טמפרטורה נכונה ניתן להוריד את הזמן בו המערכת מגיעה לש"מ, אבל צריך לזכור שכך אנו מקטינים את הרגישות של הסיב עקב ירידה בקבוע החלוקה לפי המשואה הבאה :

$$K_{fs} = K_0 e^{\left(\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T} \right) \right)}$$

K_{fs} - קבוע החלוקה בן הסיב למטריצה.

K_0 - קבוע החלוקה.

T_0 - טמפרטורה במעלות קלווין.

ΔH - שינוי באנטלפיה.

R - קבוע הגזים.

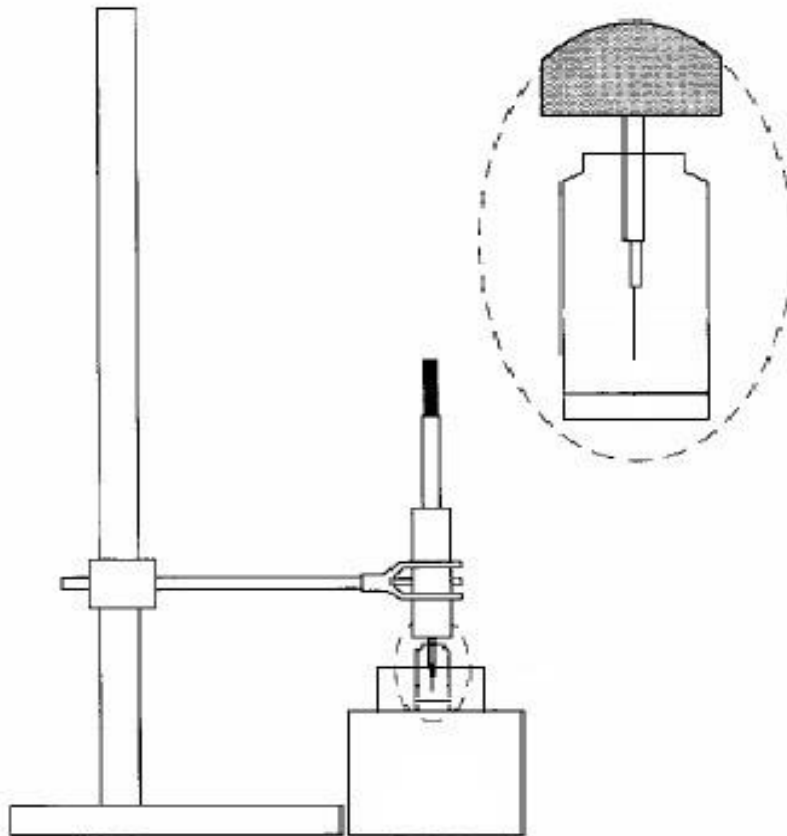
אם הערך K_{fs} שמתקבל עבור אנליט גדול מ- 1 זאת אומרת שלאנליט יש אנרגיה פוטנציאלית נמוכה יותר בסיב מאשר בדוגמא, ולכן כדי שהוא יספח לסיב תגובה אקזותרמית צריכה להתבצע כלומר ΔH גדול מאפס. ולכן משוואה זו מראה כי קבוע החלוקה של הדוגמא/מטריצה יקטן.

כאשר מפתחים שיטה ל SPME ישנם פרמטרים רבים עליהם צריך לדון : בחירת הסיב, בחירת אופן הדגימה, בחירת אופן הגילוי, קביעת זמן המיצוי, אופטימיזציה של תנאי המטריצה, קביעת זמן הנידוף ועוד.

הוראות כלליות לשימוש במזרק ה- SPME : הסיב עימו נשתמש הינו סיב עדין מאוד אנא בחנו את צעדכם לפני תחילת השימוש במיוחד לפני כל החדרה והוצאה של מחט ה- SPME לספטה.

הציוד המונח לפניכם כולל : מזרק SPME המחזיק את הסיב אליו נספחות המולקולות, מבחנת דוגמא אטומה על ידי ספטה ומעמד חימום. ראו ציור מספר 4. מזרק הסיב מוכנס לתוך מבחנת הדוגמא דרך הספטה. לאחר מכן (**ורק לאחר מכן!**) הסיב נחשף ע"י לחיצה על המזרק. חומרים נדיפים יספחו על הסיב. לאחר זמן ספיחה רצוי, מושכים את הסיב חזרה לתוך המזרק ואת המזרק מוציאים ממבחנת הדוגמא.

מזרק הסיב מוזרק לתוך injector של ה- GC. לאחר מכן (**ורק לאחר מכן!**) חושפים את הסיב על ידי לחיצה על המזרק. ה injector מחומם לטמפרטורה גבוהה מה שגורם לפליטה של החומרים הספוחים מהסיב ולכניסה שלהם לקולונת ה- GC לצורך הפרדה.



איור מספר 4: אופן החזקת מבחנת

מהלך העבודה:

במהלך המעבדה נבצע ארבע אנליזות איכותיות שונות-

1. אנליזת HS-SPME. למבחנת SPME נקייה הכניסו כ- 1ml תמיסה שעמה השתמשנו בשבוע הראשון של הניסוי. החדירו את מחזיק הסיב למבחנה כפי שתואר והמתינו 2 דקות לספיחה בצעו נידוף תרמי בinjector. (אין צורך להשתמש באמבט החימום). חיזרו על התהליך בזמני ספיחה נוספים של 10 שניות, 5 דקות ו 10 דקות.

- השוו את העוצמה היחסית בין הכרומטוגרמות של SPME. מה מסקנותיכם.
- השוו את התוצאות שקיבלתם בשיטה זו לתוצאות שקיבלתם בשבוע הראשון. התייחסו לעוצמת הפיקים, זמני יציאה וכו'.

2. השוואת יעילות SPME לדגימת HeadSpace רגילה: שאבו דוגמא של 0.5ml מהפאזה הגזית אשר מעל התמיסה שבה השתמשנו בשבוע הראשון ע"י מזרק עם סגירה אטומה לגזים והזריקו ל-GC.

- נסו להעריך בכמה יעילה יותר שיטת ה-SPME. כלומר, להזרקת כמה מיליליטר של HeadSpace שקולה הזרקת SPME.

3. אנליזה כמותית של נעלם

לרשותכם ארבע תמיסות של decane בריכוזים שונים בתוך מתנול.

- עליכם לתכנן אנליזה שתאפשר לכם לצייר גרף כיול ל decane. התחשבו בפרמטרים כמו זמן הספיחה, זמן האנליזה, קצב הזרימה של הגז הנושא, תכנון טמפרטורה בתנור וכו'.
 - ל decane יש מקדם העשרה יחסית לממס. העריכו את גודלו של מקדם ההעשרה הניסיוני והסבירו ממה הוא נובע.
- לאחר שתסיימו להריץ את כל התמיסות תקבלו תמיסת נעלם. בתמיסה זו מספר חומרים לא ידועים.
- עליכם לתכנן אנליזה שתאפשר לכם לגלות מה מספר החומרים בתמיסה, וריכוזו של Decane בהם. נסו להעריך את ריכוז החומרים האחרים בתמיסה לפי גרף הכיול של decane.

4. השוואה איכותית בין סוגי קפה שונים.

- לרשותכם מבחנות המותאמות למזרק ה-SPME, בתחתית כל מבחנה שכבה דקה של אבקת קפה. הפעילו את חימום אמבט המים (מה תפקידו?) החדירו את מחזיק הסיב למבחנה כפי שתואר ולפי שיקולכם המבוססים על שני הניסויים הראשונים החליטו על זמן ספיחה מתאים. מקמו את המבחנה באמבט המים. בצעו נידוף תרמי בinjector למשך דקה. בצעו הזרקה לכל סוג קפה, תוך שימוש בגלאי FID.
- השוו איכותית בין ארומת שני סוגי קפה וראו את "טביעת האצבעות" המיוחדת כל סוג.

5. אנליזה נוספת לבחירת הסטודנטים (מסטיק, שמפו, בושם, שקית תה) שתבוצע בעזרת הגלאי FID. הקריטריונים לבחירת האנליט הוא: ריח חזק, נדיף, לא עובר קורוזיה ויכול להיות מסופק בכמות מתאימה לכמה ניסויים עוקבים. מסטיק למשל יחתך לריבועים קטנים ובערך חצי גרם יועבר למבחנה אטומה. בערך 200 μl של שמפו או בושם יועברו גם הם למבחנות SPME אטומות. גם בניסוי זה המתינו 2 דקות לספיחה ודקה לנידוף התרמי. (אין צורך להשתמש באמבט החימום) הזריקו שתי הזרקות ובדקו את הדירות ההזרקות. תנאי ה-GC לכל ההרצות :

- הזרקה : ערך 20 split.
- קצב זרימת הגז בקולונה יקבע ל- 1.5 ml/min.

- תנור ה-GC: טמפרטורה התחלתית תקבע ל- 60°C למשך דקה ולאחרי בקצב של $10\text{deg}/\text{min}$ נעלה את הטמפרטורה עד 270°C . (חישבו לגבי כל הרצה אם אלו הם התנאים האופטימלים).

גז כרומטוגרף ספקטרומטר מסות (GC-MS)

מבוא

GC-MS, הנה הטכניקה האנליטית האולטימטיבית לגילוי, זיהוי וכימות של חומרים נדיפים או הניתנים לנידוף. בדיקת GC-MS מהווה הוכחה קבילה משפטית, ומשמשת במגוון רחב ביותר של תעשיות כימיות, פטרוכימיות, מזון, בדיקות סביבתיות בדיקות רפואיות, אנליזה פורנסית, בקרת תהליכים כימיים ומחקר.

דרישות הכנה למעבדה

- חובה לחזור על החומר הרלוונטי לניסוי כפי שנלמד בקורס המקדים. יש לפנות לספרות נוספת ולמידע באינטרנט לצורך הבנה מלאה של אופן פעולת מכשירי GCMS, הניסויים והתוצאות הצפויות.
- יש לקרוא ולהבין את מהלך הניסוי והנספחים השונים (הזרקה נכונה, ספקטרומים ו ChromatoProbe) וכן לדעת לענות על השאלות.
- במקרה שאתם מתבקשים להציע הצעה לתנאי אנליזה יש לצרף את ההצעה לדו"ח המכין בתוספת הסבר קצר מדוע נבחרו התנאים.
- לפני כל אנליזה, עליכם להכין מראש את הכרומטוגרמה הצפויה והספקטרום הצפוי. יש לשרטט ספקטרומים או כרומטוגרמות גסות בתוספת מערכת צירים מתאימה, וזאת בהתאם לאנליזה ולצדף אותם לדו"ח המכין בתוספת הסבר קצר
- אין לכתוב רקע תאורטי בדו"חות.

דרישות לדו"ח

- מהלך הניסוי- כולל תוכניות לתנאי אנליזה מנומקים. (סוג הזרקה, תוכנית טמפי להזרקה, ספליט, קצב זרימת גז, תוכנית טמפי תנור, בחירת קולונה, תוכנית סריקת מסות, אנרגית יינון, MSMS, CI)
- תשובות לשאלות מהחוברת
- תוצאות צפויות- כרומטוגרמה, ספקטרום צפוי

הוראות בטיחות

אנו רוצים שתצאו מהמעבדה שלמים ובריאים, כפי שנכנסתם. בנוסף אנו עוסקים בצידוד יקר מאוד ורגיש, ומעוניינים לשמור על כשירותו. נזקים שיגרמו למערכת עלולים לגרום לכך שלא נוכל לבצע ניסויים בהמשך הסמסטר עקב עלויות וזמן התיקון.

מהסיבות המוזכרות יש לחשוב ולשקול כל פעולה לפני ביצועה ולצפות את תוצאותיה, ובמקרה הצורך כאשר קיימת חוסר וודאות כלשהי יש להתייעץ במדריך !

- יש להזהר לא לגעת ב injector הוא חם מאוד !
- אין לפתוח תנור ללא נוכחות מדריך !
- מקסימום טמפרטורה ב ChromatoProbe 200°C אלא באישור מדריך !
- אין לפתוח פנל MS ללא נוכחות מדריך !
- אין לגעת בברזים מתחת לפנל ה MS ובמיוחד לא ב Air Purge (הידית האדומה)!
- אין לפתוח ChromatoProbe לפני שמקבלים הסבר מוקדם מהמדריך, ויש להקפיד לפתוח את החלק העליון בלבד !
- הוצאת והכנסת ChromatoProbe בזהירות ובמאונך בלבד! יש להיזהר לא לעקם את הקצה!
- פתיחת ChromatoProbe תעשה בטמפרטורה מתחת ל 100 מעלות בלבד ! ובנוסף יש לוודא זרימת גז של 1 ml/min לערך.
- סגירת ChromatoProbe עד סיום הסיבוב בצורה חלשה. אין להפעיל כוח בסגירה!
- בכל שינוי של תוכנית עבודה יש להקפיד ולעבור על כל הפרמטרים ולוודא שהם תואמים את הערכים הדרושים לכם !

תאור כללי של מערכת GC-MS

מערכת ה GC-MS כשמה בנויה משני חלקים עיקריים. GC – גז כרומטוגרף ו MS מכשיר המבצע אנליזת מסות. המערכת נשלטת ע"י מחשב בעזרתו אנו מבקרים ושולטים בכל הפרמטרים של שתי המערכות. המחשב משמש גם לצורך איסוף הנתונים המתקבלים :

סופר את מספר היונים בכל מסה ומסה בפרק זמן נתון ולאחר מכן מחשב ומציג גם את מס' היונים הכללי (Total Ion Count) כפונקציה של הזמן (אנליזה תלת מימדית).

אנו משתמשים במערכת GC-MS של חברת GC VARIAN מודל 3800 ו MS מודל Saturn 2000 , מטיפוס מלכודת יונים (Ion Trap) עם ינון פנימי (internal ionization).

ה Gas Chromatograph (GC)

ה GC (כפי שנלמד בקורס) בנוי ממספר חלקים :

א. מערכת הכנסת דוגמא הכוללת במקרה שלנו :

- injector מודל 1079 - דומה לנלמד בכיתה בעל אפשרות לתכנות טמפרטורה, תכנות זרימה ואפשרות split/splitless.
- ChromatoProbe - מותקן על גבי injector מודל 1079 נוסף, מהווה אמצעי הכנסת דוגמא מוצקה או נוזלית ע"י מבחנות קטנות. כמו ב injector הרגיל קיימת אפשרות לתכנות טמפרטורה ואפשרות split/splitless.

ב. תנור

ג. קולונות הפרדה (בתוך התנור) :

- קולונה המחוברת ל injector באורך 30 מטר, קוטר פנימי 250μ , ציפוי מסוג DB-5-MS המכיל: 95% dimethyl polysiloxane ו 5% diphenyl polysiloxane הציפוי בעובי 1μ .
- קולונה באורך 2 מ' המחוברת ל ChromatoProbe (קוטר פנימי 100μ , ציפוי מסוג DB-1 המכיל 100% dimethyl polysiloxane, בעובי 0.1μ).

מאחורי המכשיר קיימים :

- חיבורי הגז הנושא (He - במקרה שלנו). בין מכשיר ה GC-MS למחשב קיים ברז עגול ירוק. ברז זה שולט על אספקת ההליום למכשיר ה GC-MS. המכשיר מקבל אספקה קבועה ובלתי פוסקת של הליום. אין לגעת בברז זה !
- חיבור לאוויר דחוס לקרור ה injectors .

⊗ במעבדה שתי מערכות GC-MS. על אחת המערכות אין גלאים נוספים מלבד ה MS ועל המערכת השנייה גלאי PFPD בנוסף לגלאי ה MS. כל מערכת יכולה להגיע שהיא

מצויידת בעד שלושה מכלולים להכנסת דוגמא ועד שלושה גלאים שונים במקביל, כולל ה MS.

Mass Spectrometer (MS) ה

על מכשיר ה MS עצמו (שלא כמו ה GC) אין כפתורי שליטה והוא נשלט באמצעות המחשב בלבד.

בקדמת המכשיר נמצא פנל נפתח המכיל:

- נוזל לכיול מסות perfluorotributylamine (PFTBA). מצורף ספקטרום + מבנה בנספח בסוף המערך.
- ברז המאפשר שליטה על כמות חומר הכיול הנכנס למערכת.
- ברז המאפשר שליטה על כמות המתנול הנכנסת למערכת בינון כימי (CI).

בגב המכשיר:

- בקבוקון מתנול (methanol) המשמש לינון כימי (CI).

המערכת נשאבת ע"י משאבת טורבו 70 L/sec המורידה את הלחץ ל 10^{-5} torr ומחוברת למשאבה רוטורית חיצונית השואבת 90 L/min ושומרת על לחץ של 0.05 torr. למה לדעתכם יש לנו צורך במשאבה הרוטורית?

נוהל תחילת עבודה עם מכשיר ה GC-MS

מערכת המחשב

המחשב ממוקם לצד מערכת ה GC-MS. נגיעה בעכבר או במקלדת תסגור את שומר המסך ותציג על הצג את המסך הראשי של התוכנה. בראש הצג תופיע שורה ועליה ציורים מייצגים תוכנות עזר שונות. אין ללחוץ על כפתורים אלו.

הפעלת התוכנה

בשורה התחתונה במסך ליד הכפתור start מופיע לחצן עליו רשום system control - וודאו שהוא לחוץ. במידה והכפתור לא מופיע קראו למדריך. במהלך הניסוי אין לצאת מהתוכנה ולכן אין ללחוץ על כפתור ה X בפינה הימנית העליונה.

בתחתית החלון שלושה ריבועים המייצגים את המודולים השונים, מודול ה GC הנקרא 3800.44, מודול ה MS הנקרא 2000.40 ומודול נוסף הנקרא status (אין לגעת במודול זה). לחיצה על כפתור מודול תגרום לפתיחתו כחלון גדול בקדמת המסך. מעבר בין המודולים מתאפשר גם ע"י בחירה ב windows בסרגל העליון, ובחירת המודול הרצוי לכם (אחת משתי האופציות האחרונות בתפריט). לחיצה על כפתור ה " – " בפינה הימנית העליונה תצמצם את המודול לכפתור בתחתית המסך. שימו לב והבחינו בין מסגרת התוכנה למסגרת המודול הנמצאת בתוך מסגרת התוכנה .

בדיקת משאבות

לפני תחילת הניסוי עליכם לבדוק את הלחץ ב MS. עבודה תקינה של מערכת ה MS דורשת וואקום בלחץ של כ 10^{-5} Torr תנאי הוואקום דרושים ממספר סיבות :

1. למנוע את שריפת הפילמנט
2. למנוע (Self Chemical Ionization (CI.
3. הקטנת רקע MS.
4. למנוע פריצת גלאי היונים
5. הקטנת אפקט space charge.

עליכם להבין את משמעות המושגים ומדוע הם תלויים בקיום וואקום.

עוד לפני בדיקת הלחץ עצמה עליכם לבדוק ששתי המשאבות השואבות את מערכת ה MS עובדות.

1. בדיקת משאבה רוטורית – המשאבה ממוקמת בחדר שמשמאל למערכת ה GC-MS (החדר בו נמצא ה AA) או מתחת לשולחן (תלוי במערכת עליה אתם עובדים). יש להקשיב לרעש הרוטורית על מנת לוודא שהיא פועלת. במידה וקיים ספק לגעת בזהירות ולהרגיש רעידות של המשאבה אשר מעידות על כך שהינה פועלת .

2. בדיקת המשאבה הטורבו מולקולרית ע"י התוכנה ע"פ הנוהל הבא :

פיתחו את מודול ה MS ע"י לחיצה כפולה על הכפתור המסומן 2000.40. בתחתית המסך או ע"י לחיצה על windows בסרגל העליון ובחירה במודול 2000.40. האופציה לפני האחרונה בתפריט.

עכשיו בחרו ב Diagnostic (שלישי מימין בשורת הלחצנים)
בצד שמאל במסגרת Vacuum System ניתן לראות את הפרמטרים הבאים:
Pump Status צריך להתקבל הערך Ready.
Turbo Speed צריך להתקבל הערך 100%. לא ניתן לעבוד כאשר מתחת ל 92%.
Turbo Current צריך להתקבל הערך 250mA לערך. במידה והערך הינו מעל 300mA יש לקרוא למדריך.

בדיקת הלחץ ב MS

1. בפינה הימנית עליונה מסגרת Ion Gauge On/Off וודאו שמסומן עיגול שחור קטן ליד פילמנט מס 1 ואז סמנו $\sqrt{\text{ליד Ion Gauge}}$.
2. קריאת הלחץ מתקבלת בפינה הימנית תחתונה מסגרת Ion Gauge System.
3. **כבו את ה Ion Gauge לאחר מספר שניות** (הורידו את ה $\sqrt{\text{ליד Ion Gauge}}$)!

- לחץ מתאים לעבודה הנו בתחום : $8-20 \times 10^{-6}$ torr
- כאשר הלחץ הנו מעל 25×10^{-6} torr אין לעבוד **ללא אישור המדריך!**

בדיקת נוכחות אוויר ומים

עליכם לוודא שאין כניסה או נוכחות של אוויר ומים במערכת ה MS.
מים במערכת יגרמו ל Self CI, נוכחות של אוויר תצביע על אפשרות של דליפה ובנוסף נוכחות החמצן אשר באוויר עלולה לגרום לשריפת הפילמנט.

בדיקה זו תבוצע בנוכחות מדריך בלבד

במודול ה MS בחרו ב Auto Tune. במסגרת במרכז בחרו ב Method, סמנו $\sqrt{\text{ב}}$
Air/Water check ולאחר מכן לחצו על Start Auto Tune.
בצד ימין במסגרת Air/Water check operating conditions יופיעו שני שעוני אינדיקציה, ודאו שמתקבלת התוצאה OK בשני שעוני האינדיקציה, אחרת לא ניתן לעבוד עם המכשיר! נא להמתין עד לסיום הבדיקה.

☀ שאלות לגבי חלק זה :

מה משמעות הערכים הנוספים שמתקבלים :

1. Mass 28 Peak Width

2. היחס 19/18

3. Ion Count

צפו בספקטרום המתקבל בחלונית התחתונה. מה ניתן ללמוד ממנו ?

נוהל סיום עבודה עם מכשיר ה GC-MS

במטרה לשמור על הציוד עליו עבדתם במצב תקין ושמיש יש, לבצע סיום עבודה מסודר. לחצו על כפתור ה reset בלוח המקשים של ה GC . וודאו שטמפרטורת התנור מתחילה לרדת ל 120 וטמפרטורת ה injector יורדת ל 100 מעלות .

הוציאו מהמכשיר את ה ChromatoProbe וסגרו עם הפקק המתאים.

זכרו שאין להוציא את ה ChromatoProbe בטמפרטורה מעל 100 מעלות.

וודאו שהלחץ והזרימה בקולונה חוזרים לערכים ההתחלתיים (למה?) (במודול ה GC בחלון הימני ע"י בחירה ב rear or middle flow/pressure status)

שנו את שיטת העבודה ל night . שיטה זאת מתחילה בחימום מערכת ההזרקה והתנור ל 200 מעלות ו 240 מעלות, בהתאמה, למשך 5 דקות לצורך ניקוי המערכת מחומרים שנשארו בה ואז מקררת את כל חלקי המערכת, סוגרת split ל 2 , לחיסכון בגזים ומכבה את ה MS.

לאחר שינוי שיטת העבודה והופעת night בכפתור הארוך בתוכנה הראשית לחצו על כפתור ה start הירוק במכשיר ה GC ועקבו אחרי עליית הטמפרטורות במהלך פעולת הניקוי. נקו את אזור העבודה, וזרקו מבחנות משומשות לאחר אישור המדריך.

שבוע ראשון - MS והכנסת דוגמא בעזרת ChromatoProbe

הניסוי בשבוע זה מורכב משני חלקים :

- א. הכרות ולימוד ספקטרומטרית מסות ומערכת GC-MS.
- ב. אנליזת GC-MS ושימוש בזיהוי ספרייטי ואנליזה כמותית.

ניסוי מס' 1: בדיקת ספקטרום מסות של גזים שיוריים

המטרה בחלק זה הנה לבדוק את הימצאותם של גזים וחומרים שונים בתוך תא הוואקום בו נמצא מכשור אנליזת המסות.

שאלות הכנה (ענו עליהם בדו"ח המכין)

1. הציעו תחום מסות מתאים לאנליזה למציאת הגזים הבאים: חנקן, חמצן, אדי מים, דו תחמוצת הפחמן, חד תחמוצת הפחמן (במעבדה): התייעצו עם המדריך וקבלו אישור לתחום זה.
2. אילו חומרים קיימים באויר החדר ואיזה אחוז מהווה כל חומר ?
3. ציירו את הספקטרום שאתם מצפים לקבל בניסוי תוך התחשבות באחוז אותו מהווה כל חומר. האם היחס בוואקום תואם ליחס בלחץ אטמוספרי ?
4. האם אתם צופים פיקים נוספים בספקטרום ? אם כן אילו?
5. מה משמעות היחס בין גבהי המסות 32amu ו 28amu ?

קביעת תוכנית עבודה (שיטה , method):

1. לחצו על file בשורה העליונה ובחרו ב Activate method
2. מהרשימה שתיפתח בחרו בשיטה W&A לאחר מכן לחצו על open (צד ימין למטה)
3. במידה ואינכם מוצאים תוכנית עבודה זאת:
 - א. לחצו שלוש פעמים על הכפתור הצהוב עליו מצויר חץ כלפי מעלה.
 - ב. בחרו ב"desktop" ולאחר מכן ב methods
 - ג. עכשיו אמורה להיות לכם האפשרות לבחור ב W&A ע"י לחיצה כפולה (שתי לחיצות מהירות על העכבר) או לחיצה רגילה ולחיצה על open.
 - ד. במידה ואינכם מצליחים עליכם לקרוא למדריך !
4. וודאו שהתוכנית הרשומה בכפתור הארוך בשורה השניה מלמעלה הפכה ל W_A.

שלבי אנליזה:

1. וודאו שאתם במודול ה MS והמודול פעיל, כלומר שקיים חלון פתוח המסומן 2000.40.
2. בחרו ב Manual Control (ראשון משמאל בשורת הכפתורים)
3. בלי ללחוץ על כפתור ה Method, בחרו את לשונית ה Method במרכז המסך (מתוך הבחירה של Method, Set Point, Adjustments). אם לחצתם על כפתור ה Method בטעות, קראו למדריך.
4. בחלון הקטן שמופיע במרכז Segment # הזיזו את הערך 1, ל 2.
 - א. משמעות של הזזה זאת הנה מעבר מסגמנט 1 המוגדר כמערכת כבויה, למצב 2 המאפשר הדלקה של כל מערכות ה MS.
 - ב. הכיתובים ישתנו מ Fil/Mul Delay ל שם התוכנית (W_A) ה Range ישתנה מ 0-0 ל 10-50, Scan Mode ישתנה מ None ל EI-auto.
 - ג. ציור המלכודת בצד שמאל יהפוך ירוק- יש להמתין מספר שניות. במידה והציור לא משתנה לירוק, יש ללחוץ על מרכז ציור המלכודת. אין ללחוץ על אזורים אחרים בציור המלכודת, לחיצה על אזורים אחרים עלולה להכניס גז CI או גז כיול (PFTBA) לתוך המערכת ולא תאפשר לכם לקבל תוצאות.
5. הדפיסו את הספקטרום המתקבל, באמצעות לחצן ימני ו print spectrum. ציינו מהוא לדעתכם החומר מאחורי כל פיק המופיע בספקטרום. ניתן להתאים הגדרות הדפסה ב report preferences.
6. נסו להגדיל את ההגברה ולגלות פיקים קטנים (הדפסה נוספת)
7. הספקטרום ניתן לצפייה בשני אופנים האחד הנקרא Profile בו מתקבלים פיקים בצורה אנלוגית בהתאם לקריאת גלאי היונים אשר הינם בעלי רוחב התלוי ברזולוציה המס-ספקטרומטרית. השני הנקרא Centroid בו מתקבלים קווים ישרים בלבד מתכונתיים לגובה הפיק. השליטה על המצבים השונים הנה ע"י החלונית הקטנה בחלק המרכזי שמאלי של המסך. נסו להחליף בין שני המצבים. מה היתרונות והחסרונות של כל מצב?
8. שליטה על גודל המסך הנראה ניתן לקבל ע"י לחיצה על כפתור ה Hide Keypad. לחצו וצפו בספקטרום לכל אורך המסך. לחיצה על Show Keypad תחזיר את המצב לקדמותו.

9. לסיום העבירו את הערך 2 חזרה ל 1 (בלשונית ה METHOD). ציור המלכודת חוזר להיות אדום או שחור.

✱ בדוח המסכם:

- 1) תארו את פרטי הניסוי (לא את השלבים הטכניים בעבודה עם התוכנה).
- 2) הציגו את הספקטרומים שהתקבלו.
- 3) זהו את כל היונים שנצפו בספקטרומים, תוך השוואה (הן מבחינת נוכחות והן מבחינת עוצמה יחסית) עם היונים אותם ציפיתם לקבל (בדו"ח המכין).
- 4) דונו בתוצאות.

ניסוי מס' 2: ספקטרום מסות של קפאין ושימוש ב ChromatoProbe

המטרה בחלק זה הנה לצפות בספקטרום מסות אופייני של קפאין בשתי שיטות ינון שונות EI ו CI. להבחין בפרגמנטציה בשיטת ה EI ובינון הרך שיוצר ה CI. תוך שימוש והכרות בסיסית עם ה ChromatoProbe ויכולתיו.

קראו את נספח ה ChromatoProben, ואת הוראות הבטיחות שבתחילת מערך ה GC-MS.

✱ שאלות הכנה (לדו"ח המכין)

1. הציגו תוכנית משלכם אשר תתאים לדעתך לביצוע אנליזה זאת. (תחום מסות, טמפרטורות, split וכו'). במעבדה התייעצו עם המדריך וקבלו אישור לערכים.
2. ציירו את תוכנית הטמפרטורה המוצעת ל GC (מערכת הזרקה ותנור) (בחרו במערכת צירים מתאימה)?
3. ציירו **כרומטוגרמה** צפויה על פי התוכנית שלכם. כמה פיקים אתם צופים לקבל? מה צורת הפיק הכרומטוגרפי?
4. נסו להסביר את הפרגמנטים הדומיננטיים **בספקטרום הקפאין**. (ראו ניספח)
5. מדוע לדעתכם אין לגעת ביד במבחנת הדוגמא ?
6. מדוע לדעתכם אין לגעת בתושבת המבחנה ובמוט ה ChromatoProbe ?

קביעת תוכנית עבודה:

1. לחצו על file בשורה העליונה ובחרו ב Activate method .

2. מהרשימה שתיפתח בחרו בשיטה caffeine לאחר מכן לחצו על open (צד ימין למטה) או לחצו לחיצה כפולה . (לא לבחור בשיטה Caffeine-ms-ms).
3. וודאו שהתוכנית הרשומה בכפתור הארוך בשורה השניה הפכה ל caffeine.
4. עברו למודול ה GC ע"י בחירה ב windows ואז במודול ה 3800.44. וודאו שכל הטמפרטורות הגיעו לערך שתוכנת וכל הנקודות הפכו לירוקות.

תוכנית העבודה בנויה כך ש :

- ◆ בשתי הדקות הראשונות ה MS אינו עובד (נידוף הממס ב בטמפרטורה של 80°C).
- ◆ במשך 6 דקות נוספות יופיע ספקטרום ה EI וזאת תוך כדי עליה בטמפרטורה ב ChromatoProbe ובתנור במקביל (לפני תחילת העבודה תוכלו לצפות בתוכנית הטמפרטורות בלווית המדריך).
- ◆ במשך 6 הדקות הבאות יופיע ספקטרום CI ו EI לחילופין כל דקה.
- ◆ במשך 6 דקות נוספות יופיע ספקטרום CI בלבד.

הכנת הדוגמא:

קיראו עד הסוף לפני תחילת הביצוע !

1. הוצא/י בעזרת פינצטה מבחנה מבקבוקון המבחנות הזעירות (2.5mm O.D (15mm length
2. הנח/י בתושבת המרובעת הנמצאת בתבנית הפלסטיק שעל מכשיר ה GC-MS – אין לגעת בידיים!
3. הכנס/י בעזרת מזרק $2\mu\text{L}$ ~ תמיסת קפאין במתנול (methanol) בריכוז 10^{-4} w/w לתוך מבחנה. יש להקפיד שכל הדוגמא תכנס לתוך המבחנה ולא תשפך מחוצה לה.
4. פתח/י את ה ChromatoProbe, הנמצא בתושבת הלבנה ע"י סיבוב החלק העליון נגד כיוון השעון תוך כדי החזקת החלק שמתחתיו ללא תנועה. יש להרים בצורה ממורכזת ובעדינות. אין לגעת בחלקים פנימיים של ה ChromatoProbe. יתכן ומתאם ה ChromatoProbe סגור בפקק בלבד ולא ע"י ה probe נושא המבחנה. במקרה כזה הנח את הפקק בתושבת הלבנה שעל מכשיר ה GC והוצא מהתושבת את ה probe (שוב תוך כדי סיבוב בעדינות ובצורה מאונכת). על מנת לשמור את המערכת פתוחה למינימום זמן, סגרו באמצעות הפקק במהלך ההטענה.

5. הוצא/י את מבחנת הדוגמא הכוללת את הדוגמה מהתושבת המרובעת בתבנית הפלסטיק בעזרת פינצטה בעוד ה ChromatoProbe מוחזק מוטה כלפי מטה ב 20 מעלות. והכנס/י את המבחנה לתוך התושבת המתאימה בתחתית ה ChromatoProbe, ללא הפעלת לחץ. יש להזהר שהחומר בתוך המבחנה לא ישפך על ה probe עצמו. בשלב זה ניתן להכניס את ChromatoProben לתושבת החיצונית עד למוכנות מלאה של המערכת.

לפני תחילת האנליזה:

- וודאו שוב במודול GC שכל הטמפרטורות מתאימות לערכים שקבעתם וכל הנקודות הפכו לירוקות.
- במודול ה MS בחרו ב Acquisition (ראשון מימין בשורת הכפתורים), המתינו לקבלת נקודות ירוקות וכיתוב READY.

תחילת האנליזה:

6. הכנס/י את ה ChromatoProbe למקומו בתוך ה injector בצורה מאונכת וממורכזת ללא הפעלת לחץ. סובב/י עם כיוון השעון עד להרגשת לחץ האטם.
 7. וודאו במודול ה GC בחלון הימני, שהלחץ והזרימה בקולונה בה אתם משתמשים חוזרים לערכים שנקבעו, לא מופיעות נקודות אדומות (כולן ירוקות) ומתקבלת תצוגה ready ליד הנקודה השמאלית עליונה.
 - לחצו על כפתור ה start (הכפתור הירוק) במכשיר ה GC להתחלת האנליזה.
 8. בחלק הימני מוצגים נתונים לגבי אחד מחלקי מערכת ה GC. מתחת לחלון ניתן לבחור לגבי מי מהחלקים יוצגו הנתונים. ביחרו בנתוני לחץ וזרימה של מערכת ההזרקה והקולונה האמצעית או האחורית rear or middle flow/pressure status בהתאם למערכת.
- בחלון ה Acquisition שני חלונות קטנים יותר. העליון מציג ספקטרום מסות והתחתון מציג TIC (Total Ion Count), כלומר, כרומטוגרמה הנבנית ע"פ ספירת היונים הכללית.

עיבוד תוצאות והדפסה:

לחיצה על הכפתור הימני ביותר (הצבעוני) בחלון ACQUISITION, תיפתח תוכנה נוספת המיועדת לעיבוד תוצאות. בתוכנה זאת תוכלו לראות את הכרומטוגרמה שקיבלתם ולבצע חיפוש ועיבוד של הספקטרומים השונים.

בחרו נקודה מסוימת לאורך הכרומטוגרמה ע"י לחיצה עם העכבר. בחלון העליון תוכלו לראות את הספקטרום בנקודה בה בחרתם. הזיזו את הסמן ימינה או שמאלה עד לנקודה בה התקבל הספקטרום הטוב ביותר לדעתכם. קליק ימני ע"ג הספקטרום או הכרומטוגרמה יפתח תפריט דרכו תוכלו לבצע הדפסה.

הדפיסו את הספקטרומים שקיבלתם אחד ל EI ואחד ל CI ובנוסף הדפיסו את "הכרומטוגרמה".

✱ בדוח המסכם:

1. תארו את תכנית העבודה (טבלאות וגרפי טמפרטורה).
2. תארו את פרטי הניסוי (לא את שלבי העבודה עם המחשב).
3. הציגו את הכרומטוגרמה שהתקבלה ואת הספקטרומים השונים (EI ו CI).
4. מתי (זמן וטמפרטורה), ניתן להבחין בספקטרום מסות של קפאין? האם זמן וטמפרטורה אלו תואמים את הציפיות שלכם?
5. נתחו את הספקטרומים ע"פ ערכי מסות הפיקים הגדולים, במהלך ההרצה עם התקדמות הטמפרטורה.
6. נסו לזהות את הפרגמנטים שקיבלתם (לא את כולם אלה את אלה עם השכיחויות הגבוהות)? במה שונה הספקטרום מהספקטרום שציפיתם לקבל?

במידה ואינכם ממשיכים לשלב הבא, בצעו סיום עבודה בצורה מסודרת לפי ההוראות

המופיעות בתחילת מערך ה GC-MS

ניסוי מספר 3: ניסיון MS-MS

מטרת הניסוי הנה ללמוד על השימוש בשיטת ה MS-MS ללימוד מבנה הקפאין ע"פ הספקטרום המתקבל. שיטת ה MS-MS מאפשרת גם זיהוי קפאין בתערובות בהן הפרדת ה GC אינה מספקת.

שאלות הכנה (לא לדו"ח המכין): ✨

1. עליכם לחזור על החומר התאורטי בנוגע ל MS-MS כפי שנלמד בקורס.
2. מה ההבדלים בין ביצוע MS-MS במלכודת יונים (Ion Trap) לעומת קוודרופול (quadrupole).
3. מהו גז ההפעלה (activation gas) בניסוי שלנו? ומהיכן הוא מגיע?
4. כיצד עוזרת אנליזת MS-MS לזיהוי כאשר אין הפרדת GC טובה?

בצוע האנליזה:

בניסוי זה תבודדו את יונים שונים הנוצרים כתוצאה מהינן הראשוני של קפאין (בשיטת EI) ולאחר מכן תבצעו על חלקם אנליזה נוספת (MS-MS).

1. הפעילו את תכנית העבודה 'caffeine-ms-ms' בדומה להפעלת התכניות בניסויים הקודמים. וודאו כי אכן התוכנית הוזנה ע"פ ההודעה המופיעה בשורה השניה מלמטה.
2. הכינו את הדוגמא להכנסה בעזרת ה ChromatoProbe בדומה לדרך בה בצעתם זאת בניסוי 2.
3. הריצו את האנליזה (בדומה לדרך ההרצה בניסוי 2).

המכשיר יבצע אנליזת MS-MS :

במשך הדקה וחצי הראשונות יבוצע נידוף הממס כאשר טמפרטורת ה injector הנה 80°C מעלות ובמקביל עולה הטמפרטורה בתנור ל 160°C . ה MS כבוי במטרה לשמור ולהגן על הפילמנט. בשתי הדקות הבאות עולה הטמפרטורה ב injector ל 160°C מעלות ובמקביל יוצג ספקטרום EI. במשך הדקה העוקבת תוכלו להבחין בבידוד יון בעל מסה 194amu לאחר מכן תוכלו להבחין בספקטרום השבירה של ה יון שבודד במשך דקה נוספת, תוכלו לראות גם יונים אחרים בצורה דומה, דקה יון מבודד ובהמשך שבירה של ה יון במשך דקה.

✳ בדוח המסכם:

1. תארו את תכנית העבודה (טבלאות וגרפי טמפרטורה). ואת פרטי הניסוי (לא את שלבי העבודה עם המחשב!).
2. לגבי כל יון שבודד לאנליזת MS-MS, רשמו לאיזה יונים חדשים נשבר ובאיזה כמות יחסית.
3. הוציאו תדפיס לספקטרום הבידוד והשבירה של הפרגמנטים השונים. התיחסו לעד כמה יון מבודד הוא באמת מבודד.
4. מה המידע שניתן לקבל מניסוי זה על מבנה המולקולה וצורת השבירה ב MS.

במידה ואינכם ממשיכים לשלב הבא, בצעו סיום עבודה בצורה מסודרת לפי ההוראות

המופיעות בתחילת מערך ה GC-MS

ניסוי מספר 4: ניסוי מתקדם – חקר היווצרות ספקטרום MS-MS

בניסוי זה תבודדו את יון 194 של הקפאין, לאחר מכן תתחילו לשנות את המתח המאיץ את היונים והגורם לשבירתן עקב התנגשויות אנרגטיות עם גז הרקע (התנגשויות אלו גורמות להעברת אנרגיה קינטית לויברציונית פנים מולקולרית ומכאן לשבירת המולקולה). התבוננו בספקטרום המתקבל עם העלאת המתח.

✳ שאלות הכנה (לדו"ח המכין):

- איזו תלות תהיה בין צורת הספקטרום לבין המתח המסופק?
- האם קיים מקסימום מתח אותו אפשר לספק לשבירה ?
- מה יקרה מעל מתח זה?
- מהו מתח שבירה אופטימלי? כיצד יתבטא?

מהלך העבודה:

מהתוכנה הראשית הפעילו את תוכנית העבודה 'advanced ms-ms'. התוכנית מתוכנת לבצע נידוף של הממס במשך שתי דקות בטמפרטורה של 80 מעלות ב injector ו 120 בתנור כאשר הפילמנט סגור. לאחר מכן להעלות את הטמפרטורה ל 120 מעלות ב injector ו 160 בתנור להציג ספקטרום EI במשך חצי דקה ומכאן והילך לבצע בידוד בלבד של יון 194.

וודאו שאתם במצב של acquisition במודול ה MS.

הכניסו דוגמא למכשיר באמצעות ה ChromatoProbe. לתוך המבחנה הזריקו $3\mu\text{l}$ של קפאין בריכוז 10^{-4} w/w.

הכינו והכניסו את הדוגמא בדומה לאופן בו בוצעו בניסוי 2.

לחצו על אחד הכפתורים שעל המסך המוזכרים לעיל ואז עיברו למודול ה MS ועקבו אחרי התקדמות האנליזה. לאחר שלוש דקות מתחילת האנליזה לחצו על כפתור ה reset במודול ה MS לצורך מעבר לבקרה ידנית על פרמטרי ה MS. פעולה זאת תפסיק את פעולת ה MS אך פעולת ה GC תמשיך ותשמור על טמפרטורה קבועה של 160 מעלות בתנור ו120 מעלות במערכת ההזרקה במשך 25 דקות מתחילת האנליזה. **שימו לב לזמן העובר.**

עכשיו עיברו למצב manual. לחצו על כפתור ה method במרכז המסך. יפתח חלון ה method builder. כנסו להגדרות ה MS, ע"י לחיצה על MS method ולתוך הגדרות סגמנט מספר שלוש (3) אשר מוגדר לביצוע MS/MS. משם כנסו לחלון ה ion preparation **ושנו את מתח השבירה בלבד!!!** (excitation amplitude). סגרו את החלון ע"י לחיצה על ה X העליון ביותר מימין ואשרו את שמירת תוכנית העבודה החדשה והזנתה למכשיר.

חיזרו למצב manual. בחלון הקטן שבמרכז המסך שנו את הערך 1 ב Segment # ל 3. פעולה זאת מזינה את הגדרות הסגמנט השלישי ובכך למעשה מדליקה את ה MS. סגמנט זה מוגדר לביצוע MS/MS ושינוי הערך לערך זה יפעיל את הסגמנט. הכיתובים ישתנו מ Fil/Mul Delay ל שם התוכנית, Range ישתנה מ 0-0 ל 40-250, Scan Mode ישתנה מ None ל EI-auto. יש ללחוץ על מרכז ציור המלכודת. ציור המלכודת בצד ימין יהפוך ירוק - יש להמתין מספר שניות. צפו בספקטרום המתקבל.

חיזרו ושנו את התוכנית כאשר אתם משנים את מתח השבירה בכל פעם, עד שתחליטו שהשבירה היא אופטימלית (מקסימום 100 וולט).

במטרה לראות את הספקטרום בצורה טובה יותר ופחות קופצת ניתן לעבור ממצב centroid למצב profile ע"י לחיצה על החץ הקטן בחלון בצד שמאל במרכז המסך.

חישבו האם יש צורך להמשיך ולהעלות את המתח? מתי כדאי להפסיק? מה מקסימום המתח אותו אפשר לספק ע"פ הניסוי? מה קורה מעל מתח זה? מהו המתח האופטימלי ע"פ הניסוי? הדפיסו את הספקטרום האופטימלי לדעתכם.

✳ (דיון בשאלות הנ"ל והתשובות אליהן – בדו"ח המסכם)

בצעו סיום עבודה בצורה מסודרת לפי ההוראות המופיעות בתחילת מערך ה-GC-MS

ניסוי מספר 5: אנליזה מסות ע"י ינון ב-EI ו ב-CI למתקדמים. (רשות)

מטרת הניסוי הנה לצפות בספקטרום מסות EI של מספר חומרים והשוואתו לספקטרום ה-CI.

לרשותכם מספר בקבוקונים המכילים את החומרים הבאים בריכוז 10^{-3} w/v:

1. Estradiol

2. Testosterone

3. $C_{16}H_{34}$

לגבי כל חומר:

1. הציעו תכנית אשר תתאים לדעתך לביצוע אנליזה זאת (תחום מסות, טמפרטורות) ובעזרת המדריך קבעו את תכנית עבודה זו.
2. הכינו את הדוגמא בצורה דומה להכנת הדוגמא בניסוי הקודם.
3. בצעו את שלבי האנליזה וההדפסה בצורה דומה לזו שבניסוי הקודם.

במידה ואינכם ממשיכים לשלב הבא, בצעו סיום עבודה בצורה מסודרת לפי ההוראות

המופיעות בתחילת מערך ה-GC-MS

שבוע שני - אנליזות מלאות לזיהוי חומרים בתערובות

הכנה לשבוע זה תכלול לימוד נושא הכרומטוגרפיה. (במידה וביצעתם מערך GC חיזרו בקצרה על ההכנה למערך הנ"ל) להכנת הדו"ח המכין לשבוע זה נצלו ידע שרכשתם בשבוע הקודם.

בניגוד לשבוע הקודם השבוע תבצעו הכנסת דוגמה ע"י ה injector של ה GC ולא על ידי ה ChromatoProbe. הכנסת הדוגמה ל injector הנה ע"י מזרק מיוחד לכך. קראו את הנספח הזרקה נכונה וראו כיצד מזריק המדריך.

לפני תחילת העבודה יש כמובן לבצע את כל הבדיקות המופיעות בתחילת מערך ה GC-MS.

ניסוי מספר 6: אנליזה לתמיסה פשוטה

מטרת הניסוי לימוד נושא הכרומטוגרפיה ע"י ביצוע הפרדה וזיהוי של תמיסה המכילה מספר חומרים.

ברשותכם תמיסה המכילה מספר חומרים במתאנול בריכוז 10^{-4} :

1. Caffeine
2. Nicotine
3. Anthracene
4. Hexadecane ($C_{16}H_{34}$)
5. Nitrobenzene
6. Methylstearate

שאלות הכנה (לדו"ח המכין): ✨

1. הציעו תוכנית עבודה מתאימה לאנליזת החומרים הנ"ל (כולל כל הפרמטרים הניתנים לשליטה) עליה יש לקבל אישור מהמדריך (ציירו את תכניות הטמפרטורה).
2. ציירו כרומטוגרמה צפויה. איזה חומר יצא מתי? ולמה?
3. לעיתים מתקבל בספקטרום פיק $M+1$ גדול מהמצופה. מהו הגודל לו אנו צופים, ולמה? מה יכול לגרום לפיק להיות גדול מהמצופה?

מהלך הניסוי כולל:

- ביצוע אנליזה ע"פ השיטה שתכננתם בהתאם למהלך העבודה בעמודים הבאים.
- הצעת שיטה חדשה ומשופרת בהתאם לתוצאות שקיבלתם וביצוע אנליזה .
- ביצוע זיהוי ספרייתי לכל החומרים הנ"ל על הספקטרום הטוב ביותר שקיבלתם לכל חומר .
- במידה ונמצאו חומרים נוספים, בצוע זיהוי ספרייתי גם להם.
- השוואת דרגת ההתאמה שהתקבלה עבור כל חומר על פי סוגי ההתאמה השונים תוך הכנסת פרמטרים שונים לחיפוש.
- ביצוע הפחתות רקע כלליות ומקומיות וביצוע חיפוש ספרייתי נוסף לקבלת התאמה טובה יותר.
- שימוש ב RSIM במידת הצורך
- טפול בעיות Self CI והדרך לפתרון חלקי .

יצירת התכנית (Method):

עליכם לבנות את תכנית העבודה ולהפעילה . לשם כך קיימת תוכנית עבודה כללית בשם "week2", אותה תעדכנו בהתאם לניסוי ותשמרו בשם שתבחרו.

לאחר טעינת השיטה (בדרך הרגילה) לחצו על הלחצן עליו כתוב method הלחצן מופיע במודול ה MS תחת acquisition או במודל ה GC. יפתח חלון בשם Method Builder בו תוכלו לעדכן פרמטרים שונים.

עריכת תוכנית ה GC

בחלון שניפתח מופיע תפריט בצד שמאל. בחרו בחלק אותו אתם רוצים לשנות והכניסו את הערך המתאים. שנו רק ערכים מתוך Injector ו Column Oven. ברגע שתבחרו חלק מהמערכת, תיפתח טבלה להזנת נתונים לגבי אותו החלק.

אין לשנות פרמטרים לא ידועים.

השתדלו שלא להיכנס לחלונות לא רלוונטיים.

עריכת תוכנית ה MS

תוכנית ה MS בנויה מסגמנטים כאשר כל סגמנט הנו פרק זמן בו מבצע ה MS פעולה מסוימת על פי המוגדר ב method. עליכם לבחור מהרשימה בצד שמאל ב MS Method Editor. תיפתח טבלה עם אפשרות לשינוי הפרמטרים הבאים (הזינו אותם לפי הסדר הבא):

1. Segment Description - כאן באפשרותכם לתת שם לסגמנט (קטע זמן) אותו אתם מגדירים.
2. Ionization Mode - שיטת היינון בו יפעל המכשיר במהלך הסגמנט (EI, CI בחרו באפשרות האוטומטית, auto, ולא ב fix)
3. End - זמן סיום פעולת הסגמנט.
4. Start - זמן התחלת פעולת הסגמנט. וודאו שהסגמנט הראשון (MS כבוי) הנו בערך המתאים!
5. High Mass - המסה המקסימלית אותה יסרוק ה MS.
6. Low Mass - המסה המינימלית אותה יסרוק ה MS.
7. Ion Preparations - קביעת שיטת הכנת מקדימה של יונים. משמש לצורך MS - MS בלבד. במקרה שלנו יופיע תמיד none ואין לשנות פרמטר זה!

יש להזין את הפרמטרים הדרושים. יש לשים לב שבחלק הראשון של האנליזה יש לשמור על פילמנט סגור, זמן הדלקת הפילמנט נקבע להיות 2 דקות, כלומר לאחר יציאת הממס, אין לשנות ערך זה!

אין להריץ ניסוי ללא אישור המדריך לתוכנית!

בסיום שינוי כל הפרמטרים הרלוונטים לחצו על file, בחרו ב Save as... ותנו שם לתוכנית שלכם. לאחר השמירה סגרו את חלון העורך.

בחלון התוכנה הראשי לחצו על file ובחרו ב activate method, ביחרו בקובץ השיטה שלכם. בדקו ששם השיטה שלכם מופיע על הכפתור הארוך ושיש הודעה שהשיטה הופעלה בתחתית המסך בשורה השניה מלמטה והחשוב ביותר שהערכים המופיעים בחלון המרכזי תואמים את הערכים שהזנתם. בדומה בדקו את הערכים גם בחלון הימני תוך שאתם

מחליפים את חלקי המערכת השונים ע"י התפריט מתחת לחלון הימני ומוודאים התאמת כל חלקי המערכת לתוכנית שבניתם. במידה והנתונים לא עודכנו, בחלון התוכנה יש ללחוץ על המקש הארוך עליו רשומה השיטה, יפתח חלון קטן – יש לבחור ב REACTIVATE. בדקו שוב אם התעדכנו הפרמטרים, במידה ולא יש לקרוא למדריך.

במהלך ניסוי זה אין צורך ללחוץ על כפתור ה start הירוק או כל כפתור אחר במכשיר ה GC-MS או במחשב. המערכת מתחילה לפעול בצורה אוטומטית כתוצאה מהכנסת המזרק. תוך כדי הזרקה מבוצעת לחיצה על מפסק זעיר (micro switch) ה"מודיע" למערכת ה GC-MS על ביצוע הזרקה ומפעיל אותה. מסיבה זאת (ומסיבות נוספות, אלו?) עליכם להכניס את המזרק עד שחלק הזכוכית יגע במשולש המתכת בחלק העליון של ה injector. חלק מתכת זה מחובר למפסק ולוחץ עליו כאשר אתם מפעילים עליו לחץ. כאמור היזהרו לא ללחוץ ללא סיבה על משולש המתכת בראש ה injector. ראשית מאחר ויתכן והוא חם מאוד, ושנית משום שתתחילו בהרצת אנליזה לשוא.

ביצוע האנליזה:

1. הכניסו למודול ה GC (3800.44).
2. המתינו עד לקבלת סימנים ירוקים בכל האינדיקטורים על המסך וקבלת Ready.
3. עברו למודול ה MS (2000.40) ולחצו על Acquisition או וודאו שהו כבר לחוץ (שוב שימו לב שכל הנוריות ירוקות).
4. בצעו הזרקה של 1 µl דוגמא לפי נוהל ההזרקה המופע בנספח.
5. צפו בספקטרום המתקבל.

המערכת שומרת את תוצאות הניסוי בקבצים. שמות הקבצים משתנים בצורה אוטומטית. והם בעלי הפורמט 2000.XXXX כאשר ערכי XXXX משתנים בסדר עולה. רשמו לפניכם את שם הקובץ עליו אתם עובדים בכל חלק של הניסוי. שם הקובץ מופיע בחלק העליון של המסך מחוץ לחלון התוכנה, רשום על הכפתור השני מימין. בהמשך במידת הצורך תוכלו לחזור לקבצים השמורים ולבצע עליהם ניתוח שלאחר הרצה והדפסה.

במידה והכרומוטוגרמה שהתקבלה אינה נקייה חיזרו על הניסוי שנית. יתכן וחלק מהחומרים הנם זיהומים שהצטברו במערכת ההזרקה (ההזרקה השניה תבוצע באותם תנאים לכן אין צורך לשנות שיטת עבודה). לפני ההרצה שימו לב שהמערכת התקררה

והטמפרטורות חזרו לערכים של תחילת אנליזה ! שימו לב שכל הנקודות אכן הפכו ירוקות ולא נשארות אדומות !

ביצוע זיהוי ספרייתי:

אחד היתרונות הגדולים ביותר של מערכת ה MS הנה האפשרות לבצע זיהוי של חומרים ע"פ השוואת הספקטרום המתקבל באנליזה לספקטרום הנמצא בספרייה. לרשותכם עומדת ספרייה בשם NIST בספרייה זו יש כיום כ 200,000 ספקטרומי EI של חומרים שונים הניתנים לזיהוי.

במהלך האנליזה או בסופה :

1. הכנסו למודול ה MS (2000.40)
2. בחלון התחתון בו מופיע הכרומטוגרמה לחצו על הכפתור הימני ביותר עליו מצויירים שני גרפים.
3. תיפתח תוכנה נוספת אשר בה תוכלו לראות את הכרומטוגרמה. במידה ואתם במהלך הרצה תוכלו לראות את הכרומטוגרמה מתקדמת.
4. לחיצה על המקש השמאלי בעכבר כאשר הסמן מצביע על נקודה בכרומטוגרמה תציג את ספקטרום המסות המתאים לנקודה אותה סימן העכבר, בחלון חדש שיפתח. ניתן לזוז ימינה ושמאלה לאורך הכרומטוגרמה ולהציג את הספקטרום המתאים ע"י החיצים במקלדת.
5. לחיצו על הכפתור המסומן במילה NIST לביצוע חיפוש ספרייתי לספקטרום אותו אתם רואים.
6. הסיפרייה בה מבוצע החיפוש הינה תמיד ספריית NIST במערכת שלנו אם כי קיימות מספר ספריות מסחריות
7. ליחצו על כפתור ה GO בחלון כדי להתחיל את החיפוש עצמו.
8. התוצאות מופיעות בחלון העליון השמאלי. כשהן מדורגות בסדר יורד ע"פ מידת ההתאמה. מימין לרשימת החומרים שנמצאו מתאימים מופיעה חלון ובו שלושה ספקטרומי מסות. העליון הנו ספקטרום ה"מטרה", הספקטרום של הנקודה מתוך הניסוי שביצעתם, השני הנו הספקטרום הספרייתי המתאים ביותר שנמצא ע"י המערכת ע"פ השיטה שבחרתם, והשלישי הנו הפחתה של הספקטרום השני מהראשון. באפשרותכם לבחור מהרשימה בחלון השמאלי חומרים שנמצאו מתאימים ולבחון ויזואלית את מידת התאמתם ע"י השוואה של הספקטרום הספרייתי לספקטרום ה"מטרה" ובחינת ספקטרום החיסור שלהם.

9. בצעו הדפסה של ההתאמה הטובה ביותר שקיבלתם ע"פ נתוני המחשב או המתאים ביותר לפי דעתכם על פי השוואה ויזואלית של הפיקים השונים. ההדפסה מבוצעת בדרך הבאה: בסרגל הכלים בחרו ב `file > print auto report`.
10. על מנת לחזור לתוכנת ה GC-MS עליכם לסגור את תוכנת עיבוד הנתונים ע"י לחיצה על "הקטן" בפינה הימנית העליונה ולבחור בתוכנה `system control` בחלק התחתון של המסך.
11. ביצוע הפחתות רקע כלליות ומקומיות וביצוע חיפוש ספרייטי נוסף לקבלת התאמה טובה יותר. בצעו הפחתת רקע כללית על כל הכרומטוגרמה שהתקבלה: בחלון העליון ליחצו על הכפתור עליו מצויר גרף אדום, יפתח חלון קטן בחלון ניתן לבחור ב `auto correction`. לאורך כל הכרומטוגרמה יופיעו פסים אפורים המציגים את הנקודות שנלקחו כנקודות רקע. ספקטרום מופחת רקע יופיע לאחר שתזיזו את סמן הדגל במידה ולא מופיע ספקטרום מופחת רקע יש לגשת ל: `Spectra` ולוודא שה `V` מסומן ליד `Background correct spectra` במידה ולא יש ללחוץ עליו. עכשיו יש לחזור לכרומטוגרמה ולהזיז את הסמן לקבלת ספקטרום מופחת רקע. בצעו חיפוש ספרייטי נוסף על הפיקים השונים.
12. ניתן לבצע בחירת ספקטרום רקע גם באופן ידני ולא אוטומטי. יש ללחוץ על עליו מצויר גרף אדום < בחלון שיפתח לסמן `Delete all` - ימחק ספקטרום הרקע שנקבע באופן אוטומטי ע"י התוכנה. עכשיו בחרו ב `Add` וסמנו על הכרומטוגרמה נקודות אותן יקח המחשב כנקודות רקע. איפה תבחרו את נקודות הרקע? למה דווקא שם? לסיום ליחצו על `Done`. לצורך קבלת ספקטרום מופחת רקע יש להזיז שוב את סמן הדגל בכרומטוגרמה. במידה והספקטרום לא מופיע יש לפעול על פי ההסבר בפיסקה הקודמת. בצעו חיפוש ספרייטי נוסף על הפיקים השונים.
13. שימוש ב `RSIM`. במידה ואחד החומרים אינו ניתן לזיהוי יתכן והוא נמצא מתחת לרקע או מסתתר "קבור" בתוך פיק אחר. נראה כיצד יכול `RSIM` להועיל במקרים אלו? לצורך ביצוע `RSIM` לחצו על שורת `IONS` שמתחת לספקטרום וציינו את מסת היון לו אתם רוצים לקבל `RSIM` ולחצו `ENTER`. ניתן לעשות `RSIM` גם לכמה יונים ע"י כתיבה כגון `145+199` או `45:180` (לתחום גדול). במטרה לבצע `RSIM` ליון נוסף יש לחזור על הפעולות מההתחלה.
14. בעיות `Self CI` והדרך לפתרון חלקי. ניתן לראות במקרים רבים שהפיק המולקולי מלווה בפיק `1+M` גדול יחסית למצופה. (מה גודל הפיק `1+M` המצופה? למה?) מה

גורם לפיק להיות גדול מהמצופה ? פתרון חלקי לבעיה הינו הזזת הסמן ממרכז (שיא) הפיק לצידו (זמן מאוחר יותר) בערך ברבע או פחות משיא הגובה. (במיקרים מסויימים יש לזוז אפילו לתחילת הפיק בו הגובה אחוזים ספורים משיא הפיק) מה שונה בספקטרום המתקבל במצב זה? האם הזיהוי הספרייטי המתקבל טוב יותר ? לפי איזה אלגוריתם? לפי איזו התאמה?

ניסוי מספר 7: אנליזת דלק

המטרה זיהוי מרכיבי הדלק העיקריים בסוג דלק אחד או יותר. לרשותכם :

דלק 95 אוקטן ודלק סילוני JP8

תכננו ניסוי (דו"ח מכין כולל טבלאות, גרפי טמפרטורה, כרומטוגרפיה צפויה) אשר יאפשר לכם לזהות את מרכיבי הדלק: Naphthalene , Xylene, Toluene , Benzene , Octane , האם תהיה בעיה במציאת Thiophene ? (יש לזכור שהדלק מכיל חומרים רבים בעלי נקודות רתיחה שונות ועליכם לדאוג שהמערכת לא תזדהם במהלך האנליזה יש להתחשב בכך בתכנון הניסוי). בנוסף עליכם למצוא את כמות ה mesitylene בדלק.

זכרו שעליכם לקבוע ערך split גבוה ולהזריק נפח דוגמא קטן במטרה למנוע העמסת הקולונה . קבלו אישור המדריך לניסוי ולפרמטרים השונים.

הזינו את הנתונים ע"פ הנוהל בניסוי הקודם (תנו שם חדש לתוכנית) והכינו את המכשיר לאנליזה. לאחר טעינת השיטה בצעו הזרקה, נתחו את התוצאות, גלו וזהו את החומרים ודווחו על מידת ההתאמה שקיבלתם.

בצעו סיום עבודה בצורה מסודרת לפי ההוראות המופיעות בתחילת מערך ה GC-MS

לפני תחילת העבודה יש כמובן לבצע את כל הבדיקות המופיעות בתחילת

מערך ה GC-MS.

ניסוי מספר 8: אנליזה כמותית השוואתית של קפאין בשני סוגי קפה

האנליזה תבוצע באמצעות ChromatoProbe, מדוע אנו משתמשים בשיטה זאת? במה היא עדיפה על הזרקת תמיסת קפה לתוך injector סטנדרטי? מה הבעיות של השימוש ב Probe לצרכים כרומטוגרפיים? (את התשובות בדו"ח המכין).

עליכם להעביר את כל החומר הנבדק מהמבחנה לתחילת הקולונה, לאחר מכן להתחיל ולבצע הפרדה בקולונה ולבסוף לבצע גילוי באמצעות MS.

השיטה הכללית מורכבת מתכנית בעלת מספר שלבים, כאשר בשלב הראשון עלינו לנדף את הממס מהמבחנה (אם קיים), הדבר נעשה ע"י קביעת טמפרטורה מתאימה לממס בו אנו משתמשים ולכמות הממס שהכנסנו. השלב הבא הנו מיצוי תרמי של החומר בו אנו מעוניינים ע"י העלאת הטמפרטורה לכזו המתאימה לנידוף החומר מהמבחנה ובהתאם לכמות החומר המשוערת במבחנה. לאחר מכן יש לוודא שלא יכנס עוד חומר ממערכת ההזרקה ולכן עלינו לקרר את מערכת ההזרקה ולפתוח SPLIT. עכשיו נוכל להתחיל ולחמם את התנור והקולונה בתוכו ע"פ תכנות טמפרטורה בקצב איטי ולקבל הפרדה כרומטוגרפית של החומרים ש"התיישבו" בראש הקולונה.

במקרה שלנו אנו מחפשים קפאין בגרגרי קפה. הציעו תוכנית טמפרטורות וזמני חימום וקירור שתתאים לדעתכם לאנליזה הנ"ל. לפני תחילת הניסוי חשוב להבין כי קיימת בעיה לבצע את הניסוי עקב הניסיונות הקודמים שביצעתם. מהי לדעתכם הבעיה וכיצד ניתן לפתור אותה.

הכנת דוגמאות נס קפה וקפה נטול קפאין לאנליזה

השתמשו בפיסה קטנה של קולונה (או במקל של דגימת melting point) ע"מ לאסוף גרגר קפה קטן ככל האפשר לתוך מבחנה של Chromatoprobe (מדוע חשובה מאוד מזעור הכמות באנליזה זו?)

את המבחנות יש להניח בכלי המתאים, אין לגעת בהן בידיים! (מדוע?)

קבלו אישור המדריך לתוכנית העבודה שבניתם לפני ההרצה!

בצעו אנליזה לכל אחד מהחומרים, ראשית לקפה נמס נטול קפאין לקפה הנמס הרגיל ולבסוף לסטנדרט קפאין (תמיסה), על פי השלבים המפורטים בחלק הקודם. זהו את הקפאין במטריצה והשוו בן הערכים הכמותיים המתקבלים עבור שני סוגי הקפה שונים.

ניסוי מספר 9: אנליזה של חומרים בטבק סיגריות (או אנליזה לבחירתכם)

* במידה ותעלו הצעה לאנליזה שתאושר ע"י המדריך תוכלו לבצעה במקום האנליזה המוזכרת כאן.

בדומה לניסוי הקודם נבצע הפעם ניסוי על עלי הטבק שנוציא בתוך סיגריות שונות. התייעצו עם המדריך לפני המעבדה על הדרך ועל הציוד / חומרים הדרושים למהלך המעבדה. תכננו את הניסוי כפי שתכננתם ניסויי בשבועות הקודמים. יש להתמקד ולבחור את דרך הכנסת הדוגמא.

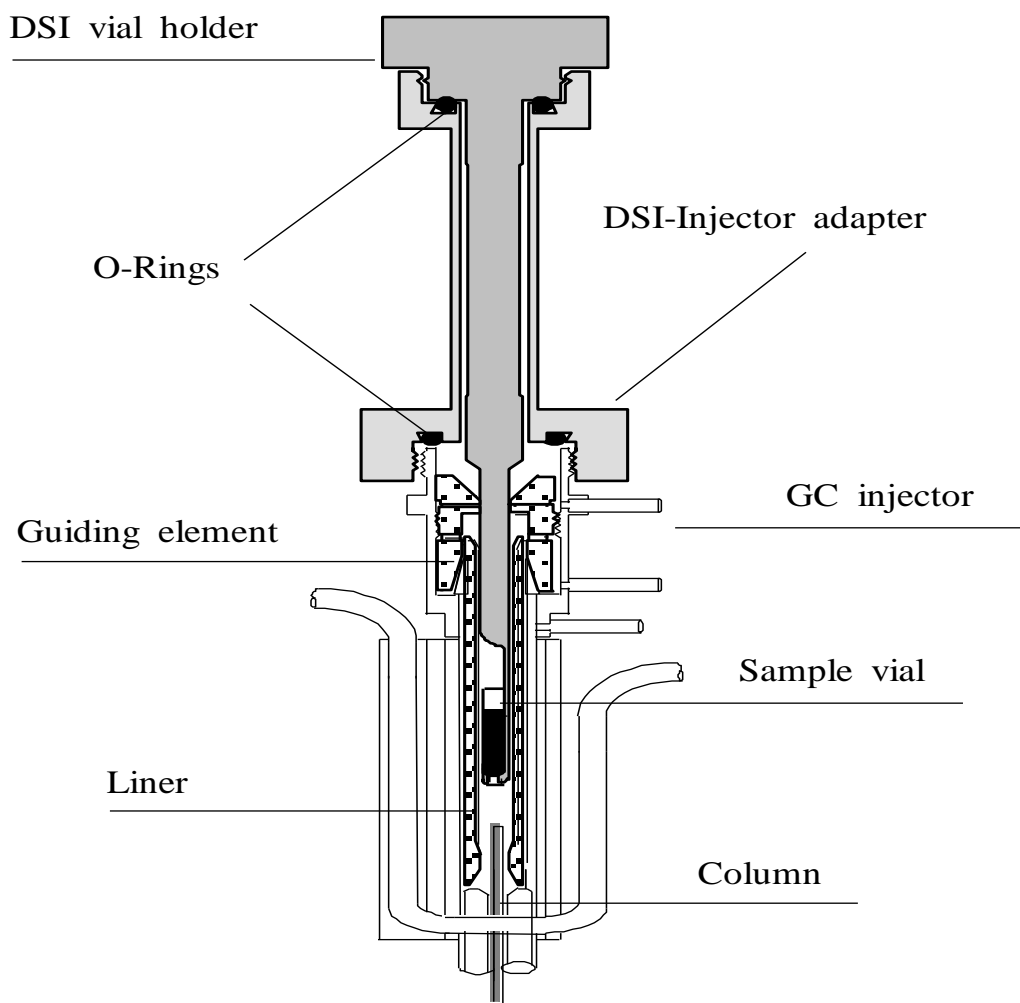
ניסוי מספר 10: אנליזה של חומר לא ידוע

בניסוי זה תקבלו אתגר אנליטי כלשהו, אולי זיהוי של חומר כלשהו בתמיסה. תוך שימוש בנתונים שתקבלו מהמדריך בשבוע שלפני המעבדה עליכם להציע שיטת עבודה מתאימה.

שיטת הזרקה נכונה

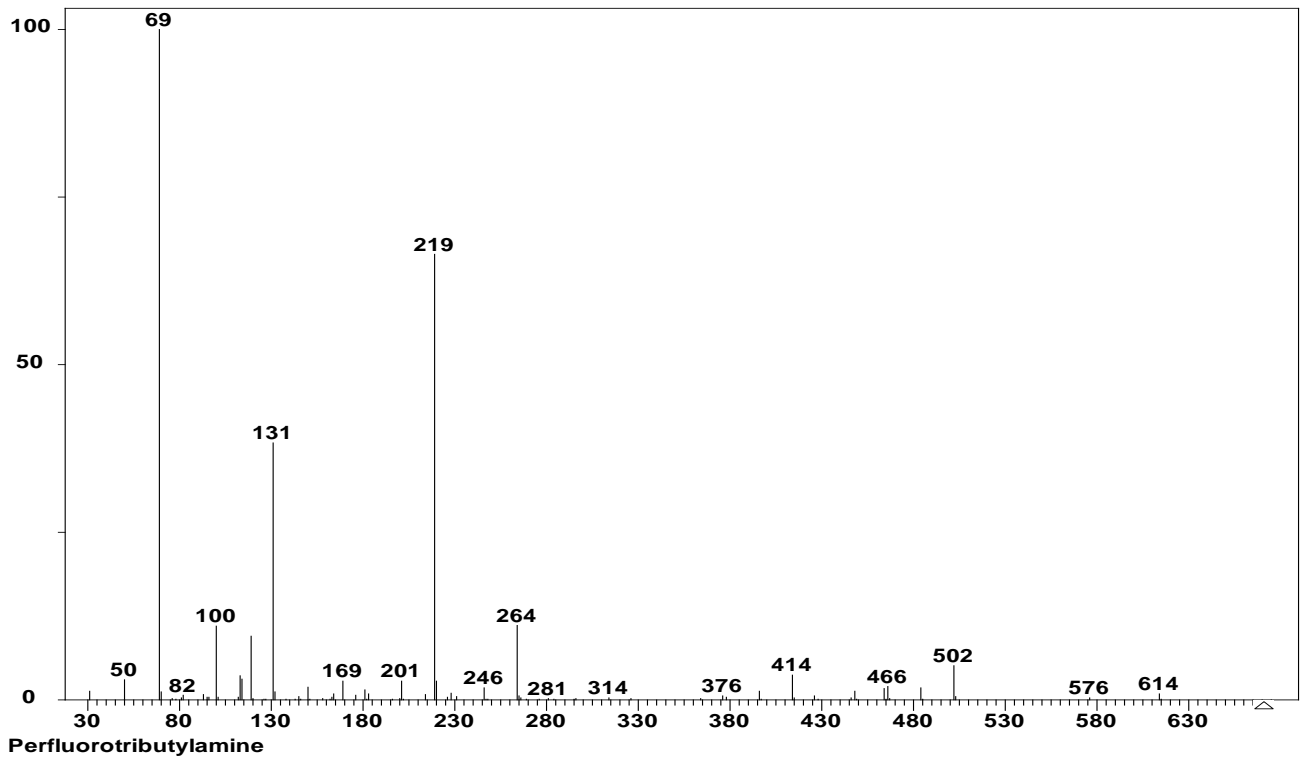
- ניקוי המזרק ע"י שאיבה וריקון של המזרק לתוך כלי המכיל מתנול מספר פעמים, עד להעלמות בועת האוויר.
- יש להוציא plunger מהמזרק וליבש את המזרק בזרימת אוויר. יבשו גם את ה-plunger. לא לשכוח להחזיר plunger למזרק. שאיבת כ-1 μL אוויר. ייבוש המזרק חיוני רק אם נדרשת הזרקת כמות דוגמה קטנה.
- שאיבת דוגמה.
- שאיבת כמות נוספת של אוויר.
- קריאת כמות החומר במזרק.
- הכנסת המזרק ל injector עד הסוף בעדינות ולאט וללא לחיצה על ה plunger.
- הכנסת המזרק עד לנגיעה של זכוכית המזרק במשולש המתכת שעל ה injector תגרום ללחיצה על מפסק הזעיר המפעיל את באופן אוטומטי את הרצת ה GC-MS.
- המתנה של חצי שניה.
- הזרקה מהירה יחסית (שניה עד שתיים) של החומר. זהירות לא לכופף את plunger (בוכנת המזרק).
- המתנה של חצי שניה.
- הוצאת המזרק.
- התבוננו על לוח הכפתורים הראשי של ה GC-MS וודאו שנידלק אור ירוק בנורה המציגה sun (הנורה הימנית בשורת הנורות מתחת לכפתור הירוק והכפתור האדום).
- שאיבת כמות אוויר
- קריאת כמות החומר שנשארה במזרק
- חישוב כמות החומר שהוזרק.

ChromatoProbe

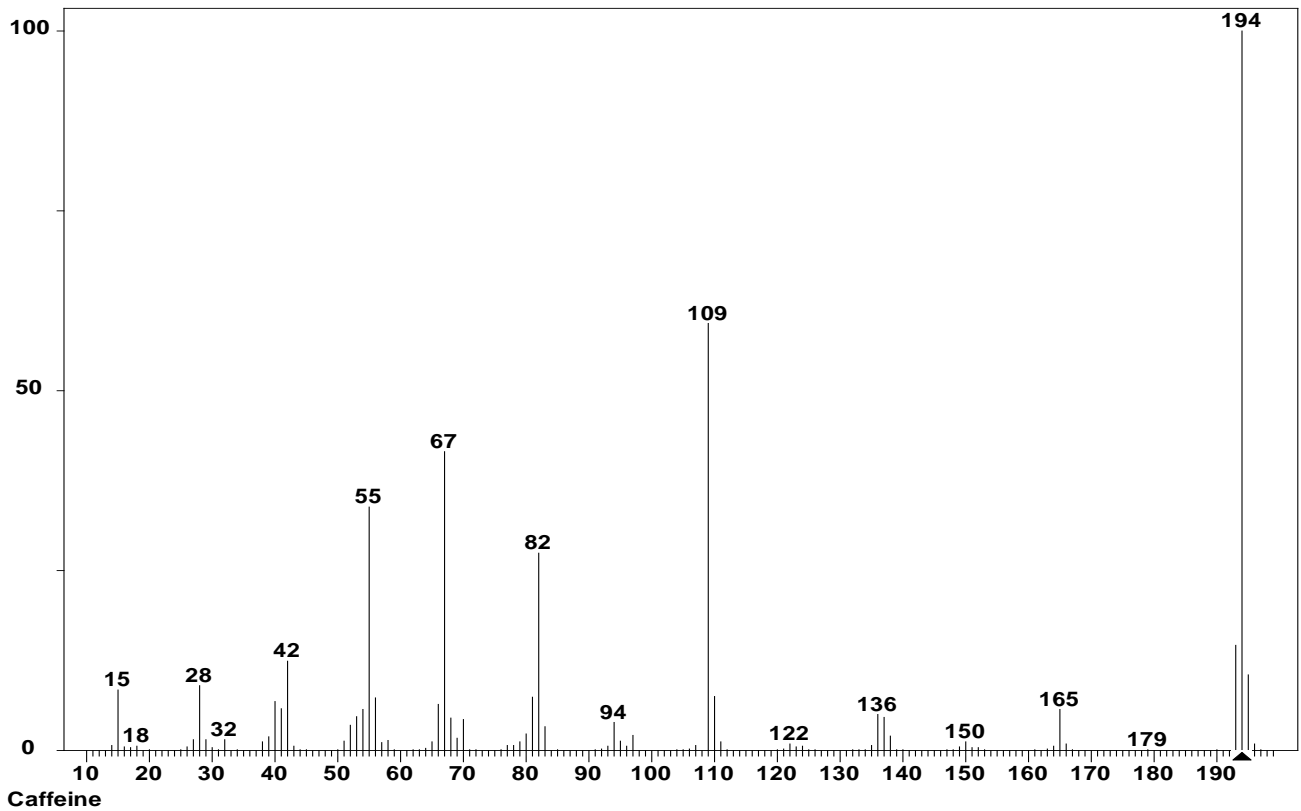


ChromatoProbe- Sample Introduction device (also named DSI) for GC and GC-MS analysis and MS studies. A schematic diagram of the ChromatoProbe inside a Varian temperature programmable injector (1079). The sample is introduced with a syringe into a small vial (2.5mm OD, 1.9 mm ID, 15mm long). It is then introduced with the ChromatoProbe vial holder inside the standard liner and undergoes a cycle of solvent vaporization, injector temperature programming for thermal extraction of the semi volatile organic compounds and then the cryo-focused compounds are analyzed by standard GC oven temperature programming. At the end of the analysis, the disposable test tube/vial with all the dirt and residue is removed and disposed of. The injector and column are at a relatively low temperature at the sampling time and are protected by a purge flow of helium.

ספקטרום מסות אופייני של PFTBA (EI - 70 eV)



ספקטרום מסות של קפאין (EI - 70 eV)



HPLC – High Performance Liquid Chromatography

מבוא

כרומטוגרפיה נוזלית מצויה בשימוש נרחב בתעשייה ובמחקר כימי והינה מכשור אנליטי מרכזי בתעשיית התרופות וביוטכנולוגיה.

מערך המעבדה בנושא מחולק לשלושה קטעים עוקבים :

- א. הכרת המכשור ועקרונות הכרומטוגרפיה הנוזלית, הפרמטרים החולשים על טיבה והכרת גלאי הבליעה האופטית מטיפוס סידרת דיודות.
- ב. שימוש בגלאי סדרת דיודות לצורך קיצור זמן האנליזה.
- ג. אנליזה איכותית וכמותית של מרכיבי טבליה רפואית "רוגען" או קפאין במשקאות שונים.

דרישות לעריכת דו"ח מכין:

- א. על הסטודנטים לבוא מוכנים לניסיון הן מבחינת רקע תאורטי והן מבחינת ידע על תפעול המכשיר, אשר יפורט בדו"ח המכין (אין צורך בכתיבת רקע תאורטי). הדו"ח המכין יכלול רק את פרטי המהלכים הטכניים, סיבותיהם ותוצאות הניסיון הרצויות. יש לקרוא ולהבין את מערך השיעור על שני חלקיו לפני התחלת המעבדה.
- ב. לכל שלב ושלב של הניסוי פרט את:
 - סדר פעולותיך הכרוכות בתפעול המכשיר.
 - תוצאות להן אתה מצפה ומדוע תוך הדגשת השוני מהניסיון הקודם.
 - רשום כרומטוגרמה באופן ידני לה אתה מצפה עם צירי זמן ובליעה חצי כמותיים (יש להפעיל שיקול דעת לגבי יחסי עוצמות הפיקים וסדר היציאה)
 - יש לבוא עם ספקטרום בליעה של החומרים שיופרדו.
 - ענה על השאלות המופיעות במערך הניסוי וצרף את התשובות לדו"ח המכין.

דרישות לעריכת דו"ח מסכם:

- א. לרכז נתונים ותוצאות בטבלאות, היכן שניתן.
- ב. לרשום את מהלך החישובים.
- ג. להגיש את הכרומטוגרמות בצורה מסודרת, כולל הנתונים הרשומים על גביהן.
- ד. תוצאות כמותיות יש לדווח יחד עם מספר מזהה לכל כרומטוגרמה.
- ה. לכל ניסיון יש לרשום את מטרתו ומסקנות סופיות לגבי השגת המטרה.

במידה ובשבוע השלישי תרצו לבצע משהו מקורי יש להביא את התהליך בהקדם.

הוראות כלליות

1. נקיון הממסים ל-HPLC

הממסים חייבים להיות בעלי דרגת ניקיון "HPLC grade" על מנת להבטיח תיפקוד סדיר של כל המערכת ולמנוע בליעת רקע ב-UV. ממס לא נקי יכול לגרום לסתימת המסננים, הצנרת והקולונה. אילו תכונות אנו מחפשים בממס?

2. מים ל-HPLC

יש חשיבות להשתמש להכנת התמיסות במים HPLC grade. המים המשמשים מכילים כמות מסוימת (למשל 10%) מתנול כדי למנוע התפתחות אצות.

3. גזים בפזה המובילית

הפזה המובילית חייבת לעבור טיפול מוקדם להוצאת גזים. פעולה זו נעשית על ידי דיפוזית גז דרך ממברנה לואקום.

4. מזרק ל-HPLC

בעל נפח $100\mu\text{L}$, שונה מזה של GC. הזהר לא להחליף ביניהם. חשוב לשטוף את המזרק לפני תחילת העבודה מספר פעמים באתנול. לפני כל הזרקה יש לשטוף אותו בתמיסה המוזרקת. בסוף המעבדה שטוף את המזרק מספר פעמים באתנול והחזירו למקומו. הכנס את הדוגמא ללולאת ההזרקה ($20\mu\text{L}$) באיטיות (כ- $10\mu\text{L}$ לשנייה) להבטחת דיוק בהזרקה. בפועל יש להזריק כ-80-50 מיקרוליטר במזרק ולוודא כי רואים טיפסוף ל waste המעיד על כך שלולאת ההזרקה אכן מלאה בדוגמא.

5. חשוב להקפיד על דיוק בהכנות התמיסות. שים לב על סימון ברור על בקבוקים.

6. לפני מיהול שטוף את בקבוק המדידה בכמות קטנה של תמיסה המשמשת למיהול (פזה מובילית או מים ל-HPLC). עם זאת, רצוי להשתמש בבקבוקים יבשים כשיש צורך להעביר לתוכם אבקות יבשות. לפני העברת תמיסה לכוסית לשם הזרקה, שטוף את הכוסית בתמיסה עצמה.

7. סמן וציין על כל כרומוטוגרמה את כל הפרמטרים החשובים: שם המבצע/ים, שם

הדוגמה, סוג התמיסה, אורך גל לבליעה, תכנית גרדיאנט, סוג הדוגמה, ותאריך.

הוראות כלליות להפעלת המכשיר:

1. הדלק את כל חלקי המערכת HPLC ע"י לחיצה על כפתור Power בכל קופסה. סדר ההדלקה: קופסת הבקרה: SCL-10A, משאבת ה-LC: LC-10AT, משאבת הואקום לדגזינג: GT-154, תנור לייצוב טמפרטורת הקולונה: CTO-10AS, גלאי סדרת הדיודות: SPD-M10A. כפתור ההדלקה של המכשירים נמצא מצד שמאל למטה מלבד GT-154 בו הוא נמצא מאחור.

2. לחץ לחיצה כפולה (double click) על class-VP5.0 icon לקבלת החלון Shimadzu class – VP. בחר ע"י לחיצה כפולה ב- Student icon. לאחר פעולות אלו המערכת תשמיע ציפצוף וזהו סימן לכך שהמחשב התחבר למערכת ה-HPLC. **אזהרה:** במידה ולא נשמע הציפצוף – סימן שהמחשב לא התחבר למערכת (קרא למדריך).

כעת על מסך המחשב אמור להופיע חלון הנקרא LC Setup Assistant. יש לסגור את החלון ע"י לחיצה על "X" שנמצא בחלק ימני עליון של החלון עצמו. על מסך המחשב יופיע חלון הנקרא HPLC המורכב מארבעה תת חלונות.

3. לצורך בחירת שיטת העבודה פתח file, שנמצא בפינה השמאלית העליונה של המסך. בחר באופציית method - שיטת העבודה. לחיצה או הצבעה על method תפתח תת חלון נוסף בו בחר ב- open. ברגע זה נפתח חלון open method file. ע"י לחיצה כפולה בחר ב- "student.met" – זו היא שיטת העבודה בה תעבוד במשך כל הניסוי. כעת וודא ששמה של השיטה שבחרת מופיע בחלק העליון של חלון העבודה.

4. קביעת פרמטרים ניסיוניים:

לחץ על icon "טלויזיה" (instrument setup) הנמצא בחלק המרכזי של שורת ה-icons. (ניתן לדעת מה תפקידו של כל icon ע"י כך שמצביעים עליו ומחכים מספר שניות עד שתופיע הודעת הסבר). ברגע זה נפתח חלון בו ניתן לבחור ב- 5 סוגים של פרמטרים. האפשרויות הן מ- Pumps עד Time program, כאשר ניתן לעבור מאחד לשניה ע"י לחיצת העכבר על סוג הפרמטר.

"Pumps": בחלון זה תוכל לקבוע את הרכבה של הפזה המובילית ומהירות זרימתה, כאשר ההרכב נקבע ע"י רישום ערך מספרי של אחוז המתנול בשורה B.Conc. את אחוז המים בפזה המובילית המחשב קובע לאחר בחירת אחוז המתנול באופן אוטומטי

(משלים ל- 100%).

מהירות הזרימה נקבעת ע"י רישום ערך מספרי בשורה שנקראת T.Flow.
בסוף תהליך קביעת הפרמטרים לחץ Apply ולאחר מכן Download הנמצאים בחלק
הימני התחתון של המסך (אין צורך לגעת בפרמטרים של SCL-10, CTO-10 ו-
(Status log

- לבחירת קיימים שלושה ממסים: תמיסה A הנה HPLC Grade Water, תמיסה B הנה
מתנול, תמיסה C הנה: מתנול + מים + חומצה אצטית ביחסי נפחים 30: 70: 3 בהתאמה.

"Time Program": שימושי במידה ורוצים לעבוד בתנאים של הרכב פזה מובילית משתנה
בזמן (gradient elution).

לאחר שהכנסת את כל הפרמטרים הרצויים לחץ על Download (הפעולה גורמת למערכת
ה-HPLC להכיר בפרמטרים ה"ל. צא מהמסך של Instrument setup ע"י לחיצה על "X"
שנמצא בחלק ימני עליון של החלון הפנימי. לחיצה על ה-"X" בחלון העליון תזרוק אתכם
מהתוכנה. ראו הוזהרתם!

5. הדלק את הגלאי, המשאבה והתנור ע"י לחיצה על ה- icon הרביעי מימין בשורה השניה
של ה- icons בחלק העליון של המסך (icon-Instrument ON/OFF). וודא שכל
הכתפורים לחוצים או לפחות כפתורים של תנור, גלאי ומשאבה לחוצים. (בדקו את
שמות הכפתורים).

וודא שהפרמטרים שהכנסת אכן מופיעים על המסכים של מערכת ה- HPLC עצמה.
לפני כל הזרקה קרא למדריך על מנת למנוע תקלות מיותרות.

6. הכנס את הדוגמא של התמיסה ($50 \mu\text{L}$ לפחות) לתוך האינג'קטור, המצוי בחלק העליון
בצד שמאל בקופסת הממסים, כאשר הוא נמצא במצב Load (שעה 2). הכנסת הדוגמא
ללולאת ההזרקה (נפחה $20 \mu\text{L}$) מתבצעת בעדינות תוך כדי ווידוא שבועות לא נכנסות
ללולאה ושהמזרק אכן חדר דרך הספטום (מרגישים את התנגדות הספטום לחדירת
המחט). לאחר הכנסת הדוגמא משאירים את המזרק בתוך האינג'קטור.

7. לחץ על icon "חץ כחול" (Single Run), יופיע חלון הנקרא Single Run Aquisition.

8. הכנס את שם הדוגמא ב- Sample ID ושם הקובץ ב- Data file. וודא שבשורה Data
Path רשום C:/Class-VP/StudentData. לחץ על Start.

במידה ויופיע המסך "The Current Method has Changed" לחץ "Yes".

9. חכה לקבלת ההודעה בתחתית המסך: "Waiting for Trigger" ולאחר מכן סובב בבת אחת את האינג'קטור למצב Inject (90 מעלות בכיוון השעון ביחס למצב Load – שעה 4). הכרומטוגרמה תתחיל באופן אוטומטי.
10. חכה לקבלת הכרומטוגרמה.
11. לחץ stop (icon עם סימן עצור אדום) לעצירת ההרצה, אם לא אזי ההרצה תגמר אוטומטית לאחר 20 דקות. אחרי לחיצה על "Stop" יופיע המסך "Abort Current Run?" אם ברצונך לעצור את ההרצה לחץ "Yes".
12. עיבוד תוצאות:
- א. מספר את הפיקים ע"י לחיצה על הכפתור הימני של העכבר כאשר הינו בחלון הכרומטוגרמה (חלון שמאלי תחתון) ובבחירה ב- Annotations. בחלון הנפתח (Trace Annotation Properties) בחר ב- PK# (מספור פיקים) ע"י לחיצה על חץ ירוק. אשר את הבחירה ע"י לחיצה על OK. האישיור גורם למספור לאחר האינטגרציה.
- ב. בצע אינטגרציה ע"י לחיצה על icon של Analyze (המחשבון הירוק). במידה ובוצעה אינטגרציה על פיקים הלא רצויים ניתן לבטל אותה באמצעות לחיצה על ה- icon הרביעי מצד שמאל בשורת ה- icons הנמצאים בחלק בתחתון של המסך.
- ג. בחר ב- Custom Report מתוך Method על מנת לקבוע את הפרמטרים שיופיעו בתדפיס. בחירת הפרמטרים הרצויים תעשה ע"י לחיצה על הכפתור הימני של העכבר באיזור של הטבלה ובחירה ב- Properties.
- ד. לחץ: Reports (בשורה העליונה של המסך) ← View ← Method Custom Reports לקבלת הפורמט שיתקבל בהדפסה. וודא כי הדו"ח מכיל את כל האינפורמציה הרצויה על הפיקים הרלוונטיים.
- ה. לחץ על הכפתור הימני של העכבר במרכז המסך ואחר כך בחר ב- Print על מנת לקבל את התדפיס.
13. למעבר לניסיון חדש סגור את המסך הפנימי ע"י לחיצה על "X" התחתון בצד ימין עליון.

חלק 1: עקרונות הכרומטוגרפיה הנוזלית. הכרת המכשור, הפרמטרים החולשים על כרומטוגרפיה נוזלית וגלאי בליעה אופטית מטיפוס סידרת

דיודות.

שאלות כלליות:

- 1) באילו מקרים נעדיף להשתמש בכרומטוגרפיה הנוזלית על פני כרומטוגרפיה גז?
- 2) תאר את המערכת על כל חלקיה והסבר בקצרה על כל חלק ותפקידו.
- 3) איזו תכונה חשובה לכל החלקים שבאים במגע עם הפאזה המובילית?
- 4) אילו פקטורים יכולים להשפיע על רוחב הפיק? נא להתייחס גם ל Van Deemter
- 5) האם מדידה ב HPLC היא כמותית, חצי כמותית, נמק את בחירתך ותאר את התוצאות הצפויות במדידה בחלק א'.

נתונה תמיסת עבודה המכילה את החומרים הבאים:

| | |
|-------------|----------------------|
| Benzene | 10^{-3} (v/v) |
| Mesitylene | 10^{-3} (v/v) |
| Naphthalene | 4×10^{-5} M |
| Anthracene | 3×10^{-5} M |

מטרות הניסוי:

- א. הכרת השיטה והמיכשור של HPLC.
 - ב. תרגול בטכניקת העבודה.
 - ג. מציאת תנאים מתאימים לניסיון.
 - ד. זיהוי איכותי של מרכיבי התערובת.
 - ה. מדידת פרמטרים בסיסיים בכרומטוגרפיה.
- הערה: לפני כל הזרקה יש לוודא האם הפרמטרים הניסיוניים מתאימים

ניסיונות לביצוע:

העזר בהוראות כלליות להפעלת המכשיר ובצע את הניסיונות הבאים:

1. קבע את הרכב הפזה המובילית ל- 65% אחוז מתנול ו- 35% מים עם קצב זרימה של 1 ml/min (isocratic elution) והזרק את התמיסה. מדידה זאת נועדה לחילוץ פרמטרים כרומטוגרפיים כגון: מספר פלטות תאורטיות בקולונה, גובה פלטה תאורטית, רזולוציה וכו'.
2. הוצא ספקטרום בליעה נפרד לכל אחד מארבעת החומרים מכרומטוגרמה 1' וזהה לפיו את החומר. הדפס בעזרת כפתור ימני של העכבר, Print, Utilities, כדי לפתוח קובץ קיים

לחץ File בתוכו Data ובחר ב- Open.

3. השג כרומטוגרמה סלקטיבית לאנטרצן (כרומטוגרמה שבה רואים בעיקר אנטרצן)
4. חזור על הסעיף הקודם, כאשר הפזה המובילית היא 100% מתנול (יש לחכות לפחות 5 דקות לאחר שינוי שיטה ליצוב קו בסיס וספקטרום רקע, (מדוע?)) מה ניתן ללמוד מניסוי זה?
5. חזור על הסעיף 2' בקצב זרימה של 0.3 ml/min, כאשר הרכב הפזה המובילית הוא 100% מתנול טהור. מה ניתן ללמוד מניסוי זה?
6. עבור ניסיונות ב- Gradient elution – קבע הרכב התחלתי של פזה מובילית ל- 65% מתנול והמשך ב- gradient elution למשך 4 דקות עד 100% מתנול. לכתובת התוכנית התחל במסך Pumps מתוך Instrument setup ("טלוויזיה") בו תקבעו את ריכוז המתנול ההתחלתי. עבור למסך Time program : במשבצת Time הכנס את הזמן הקובע את הזמן הסופי לפעולה, ב- Module הכנס את האלמנט שמתוכנת בזמן ז.א. Pump, ב- Events הכנס את הממס שקצב זרימתו מתוכנת בזמן - B.Conc, ב- Value רשום את הערך הסופי של ריכוז B בסוף זמן התכנות.
7. נסה לשנות את איכות הכרומטוגרמה על ידי שינוי התוכנית הנ"ל. (זמן הגרדיאנט, קצב זרימה...).
8. הזרק את תמיסת העבודה המהולה פי 100 על מנת לבדוק את רגישות השיטה. מה סף הגילוי למרכיבי הדוגמה השונים?
9. העלה את טמפרטורת התנור של הקולונה ב 20C והזרק את תמיסת העבודה בתנאי ניסוי זהים לאלה בהם עבדת בניסוי מס' 1. מה ניתן ללמוד מניסוי זה?

עיבוד תוצאות

חלק 1

מכרומטוגרמה שקיבלת בסעיף 1' חשב את:

(א) מספר הפלטות התאורטיות של הקולונה עבור כל אחד מהחומרים. לחישוב מספר

הפלטות השתמש בנוסחה: $N = 5.54 \left(\frac{t_r}{W_{h/2}} \right)^2$ כאשר t_r ו- $W_{h/2}$ הם זמן האלוציה

ורוחב הפיק בחצי הגובה בהתאמה. הסבר גורמים אפשריים להבדלים בין מספר הפלטות עבור החומרים השונים. מדוד את רוחב הפיק בצורה מדויקת תוך שימוש ב- zoom. מצאו לבד איך עושים zoom ומבטלים אותו.

(ב) גובה פלטה תיאורטית.

ג) השווה בין הכרומטוגרמות הבאות :

-- 1 ו- 2

-- 2 ו- 3

מה הם הגורמים להבדלים?

התייחס למושגים הבאים : סדר האלוציה, זמן האלוציה, רגישות, רוחב הפיק וכו'.

ד) מה ניתן ללמוד מניסיון מס' 6 – עבודה עם gradient elution? מה הם היתרונות והחסרונות היחסיים של השיטה?

ה) איזה שינויים ביצעת בסעיף 7? מה ניתן ללמוד מהם?

ו) מה סף הרגישות בריכוז החומרים? מהם הפרמטרים הקובעים אותו?

חלק 2: שימוש בתכונות הגלאי מטיפוס סידרת דיודות

אילו סוגי גלאים קיימים? (הכוונה ל-2 סוגים עיקריים) איזה סוג גלאי הוא גלאי מטיפוס סדרת הדיודות? מה היתרונות/חסרונות לעומת גלאי בליעה רגיל? מהם העקרונות האופטיים של הגלאים השונים (גלאים שונים מאשר סידרת דיודות) ופרטו עליהם **בקצרה** (לדוגמא גלאי פיזור, גלאי שבירה וכו') הסבר בקצרה את עקרון פעולת הגלאי. הצע דרך לחישוב הריכוזים, הוסף אותו לדו"ח. (הכוונה לכתוב בפירוט את כל המשוואות).

מטרה:

הכרות עם גלאי מטיפוס סדרת דיודות ושימוש בו לצורך מדידה כמותית של פיקים לא מופרדים. בעזרת גלאי סידרת דיודות ניתן לקבל מפה דו מימדית של עוצמת הסיגנל כנגד זמן ואורך הגל. תכונה זו מאפשרת להפריד פיקים חופפים (אומנם לא פיזית בזמן, אלא בעזרת תוכנה) כרומטוגרפית ואף לחשב כמותית ריכוזי החומרים בפיקים חופפים.

לרשותכם תמיסות הבאות :

- Dimethylphthalate 10^{-3} (v/v) in MeOH
- Diethylphthalate 10^{-3} (v/v) in MeOH
- Ethylparaben 10^{-3} (w/v) in MeOH
- Butylparaben 10^{-3} (w/v) in MeOH
- תערובת של 4 חומרים הנ"ל בריכוזים לא ידועים בתחום של 10^{-5} – 10^{-4} g/ml במתנול

ניסיונות לביצוע:

1. הזינו שיטה: STUDENT מתוך Student Data/Methods. על מנת להפריד את התערובת יש ליצור שיטת gradient elution הבאה: יש לקבוע מהירות זרימה ל 1 מ"ל/דקה, ריכוז התחלתי של מתנול 10% אשר מגיע לריכוז של 100% תוך 15 דקות. את שאר הממס מושלם עם מים. אחרי שינוי השיטה יש להמתין לפחות 5 דקות. הזריקו את התערובת בתנאים אלו. התבוננו בספקטרומי בליעה של החומרים ובחרו אורך גל אופטימלי עבור כל קבוצה של חומרים (פתלאטים ופאראבנים). הדפיסו כרומטוגרמות באורכי גל אלו.
2. כעת עברו לשיטה של isocratic elution הבאה: קצב זרימה כללי: 1.2 מ"ל לדקה, כאשר ריכוז של מתנול הינו 70% והשאר – מים. קבלו כרומטוגרמות באורכי גל שבחרתם בסעיף קודם.
3. שימוש בתכונת Peak Purity: באחד מהחלונות לחצו על כפתור ימני של עכבר ובחרו ב Gallery ומתוכו ב Mixed View. אחרי שלחצתם על כפתור Analyze ווידאתם כי בוצעה אינטגרציה, ניתן ללחוץ אל אחד מהפיקים כאשר כפתור Ctrl לחוץ. בחלון ימני תחתון אמורה להופיע כרומטוגרמות של אותו פיק המצוירות באורכי גל שונים. העזרו במדריך על מנת לעבור על תכונות שונות של חלון זה. איזה מסקנות ניתן להסיק על סמך מה שראיתם בחלון זה? על מנת להדפיס גרף של Peak Purity Control בתוך REPORT יש להגדיר שמות לפיקים. יש להזין אורכי גל שבחרתם לתוך PDA SETUP (העזרו במדריך). בחלון כרומטוגרמה יש ללחוץ על כפתור ימני של עכבר ולבחור ב Graphical Programming ומתוכו ב DEFINE PEAKS. יש לעקוב אחרי ההוראות בתחתית המסך ולהצביע על תחילת תחום הזמן בו נמצאים הפיקים ועל סופו. בחלון הנפתח יש ללחוץ OK.
- יש לבחור ב PEAK/GROUPS מתוך METHOD ובטבלה הנפתחת לתת שמות לפיקים. כעת כנסו ל CUSTOM REPORT מתוך METHOD. במקום פנוי לחצו על כפתור ימני של עכבר ובחרו ב INSERT GRAPH ומתוכו ב PEAK PURITY CONTROL. בתוך חלון CUSTOM בחרו בשם הפיק עבורו יוצג הגרף. הדפיסו כרומטוגרמה שקיבלת באורכי גל שונים כולל גרף של PEAK PURITY ותוצאות האינטגרציה הכוללות זמני היציאה, גבהי הפיקים ושטחיהם.
4. הכינו תערובת של פאראבנים (paraben) לחוד (בריכוז בין 10^{-4} – 10^{-5} g/ml) ותערובת

נוספת של פתאלאטים (phthalate) לחוד (בריכוז בין 10^{-4} – 10^{-5} g/ml). הריצו את שתי התערובות באותם תנאים.

5. הציעו פתרון איך עדיין ניתן לחשב ריכוז של חומרים בתערובת, אף על פי שהפיקים לא מופרדים כרומטוגרפית. השתמשו בתמיסות שלרשותכם. חישבו ריכוזים של שני פאראבנים מתוך תערובת הנעלמים.

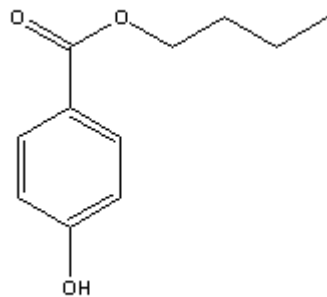
עיבוד תוצאות:

6. התייחסו להבדלים בין כרומטוגרמות באורכי גל שונים אשר קיבלתם בשיטת Isocratic Elution.

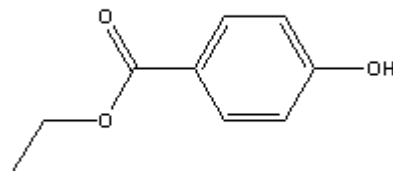
7. חישבו ריכוזים של שני פאראבנים מתוך תערובת הנעלמים. האם עדיף לבצע חישוב לפי גובה הפיקים או לפי שטח? מה מקורות לשגיאות?

8. מה הרווח בשיפור מהירות האנליזה בין שתי השיטות?

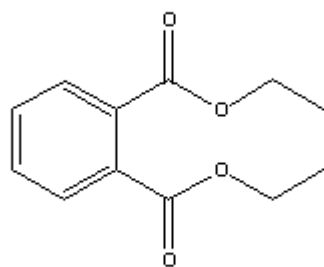
מרכיבי התערובת



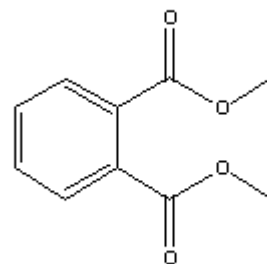
Butylparaben



Ethylparaben



Diethylphthalate



Dimethylphthalate

חלק 3: אנליזה כמותית - אנליזה כרומטוגרפית של טבלית "רוגען"

בחלק זה זוג אחד יבצע אנליזה כרומטוגרפית של טבלית "רוגען" זוג שני יבצע אנליזה כרומטוגרפית של קפאין. על כל זוג לברר איזה חלק הוא מבצע.

לדו"ח המכין:

יש לבצע חישובי ריכוזים ומהלך הכנת התמיסות הסטנדרטיות מראש בדו"ח מכין. ראו דוגמה להכנת התמיסה הסטנדרטית בעמוד הבא. יש להביא את אורך הגל בו הבליעה המקסימלית עבור כל אחד מהחומרים (אינטרנט).

מטרת הניסוי:

קביעה כמותית של חלק ממרכיבי הטבלייה בעזרת גרף כיוול. נתונים לכם הנתונים הבאים:

1. טבליות רוגען - הרכב טבלית "רוגען" (באדיבות חברת "טבע")¹

| | | |
|--------------|---------------|--------------------------------|
| 4.5% | 30 mg | D-Propoxyphene Hydrochloride |
| 17.9% | 120 mg | Paracetamol |
| 37.3% | 250 mg | Acetylsalicylic Acid (Aspirin) |
| 4.5% | 30 mg | Caffeine |
| <u>35.8%</u> | <u>240 mg</u> | חומרי עזר |
| 100.0% | 670 mg | משקל ממוצע של טבלייה אחת כ- |

2. אספירין.

3. קפאין.

4. חומצה סליצילית

5. פרצטמול

6. מים ל-HPLC.

7. פזה מובילית: מתנול + מים + חומצה אצטית ביחסי נפחים 30:70:3. Flow Rate

של הפזה המובילית צריך להיות 1 ml/min

שים לב: שנה את הרכב הפזה המובילית בחלון Pumps כאשר C.conc:100%

8. תערובת מתנול + חומצה אצטית ביחס 5:95 (עליכם להכין לבד).

¹ התקן האמריקאי למרכיביה העיקריים של התרופה מופיע בפרמקופיאה האמריקאית:

"According to USP (1995) (U.S. Pharmacopeia), the content of Acetaminophen and Aspirin in the tablets is not less than 90.0% and not more than 11.0% of the labeled amounts".

תמיסת טבלית רוגען מרוכזת R (conc)

בבדיקה כמותית של הרכב טבלייה מקובל לכתוש כ- 20 טבליות על מנת לקבל מדגם סטטיסטי מייצג. כדי לחסוך בחומר, השתמש באבקה המוכנה שהכינו חבריך.

הכנת אבקה מטבליות

שקול 10 טבליות של רוגען במדוייק. חשב משקל ממוצע לטבלייה. כתוש את הטבליות במטחנה. פתיחת הכוס לאחר הטחינה תיעשה במינדף. אכסן את האבקה בצינצנת קטנה. רשום את שם התרופה, תאריך הכנת האבקה ומשקל של טבלייה בודדה.

המסת האבקה

שקול בערך חצי טבלייה מהאבקה שקיבלת (שקילה מדוייקת) והעבר לבקבוק מדידה של 50 מ"ל. הוסף כ-40 מ"ל של תערובת "מתנול + חומצה אצטית", נער להמסה חלקית. הנח את הבקבוק בסוניקטור ל- 5 דקות. השלם עם אותה התמיסה. האבקה לא תימס לחלוטין היות וחומרי העזר של הטבלייה לא מסיסים בממס זה. הם ישארו כמשקע. הנח לשקיעה עד שהתמיסה תהיה צלולה. (10 דקות לערך).

תמיסת טבלית רוגען מהולה R (dil)

העבר בעזרת פיפטה כ- 10 מ"ל מהחלק העליון הצלול של התמיסה המרוכזת לתוך כוסית. סן את התמיסה הנ"ל דרך מסנן $0.2\mu\text{m}$. העבר 5 מ"ל מהתמיסה המסוננת לבקבוק מדידה של 25 מ"ל, השלם עם מים בדרגת ניקיון HPLC. (גררי דוגמה לא מסוננים יכולים לקלקל את הקולונה – כיצד-מה האפקט הכרומוטוגרפי)

תמיסות סטנדרטיות לקביעה כמותית

הכינו 4 תמיסות סטנדרטיות אשר מכילות: aspirin, paracetamol, caffeine, salicylic acid בריכוזים שונים הנמצאים בתחום הריכוזים של מרכיבי הטבליה בתמיסה המהולה (אבל השתמשו בהגיון – שהטווח יהיה לפחות +1- 50 אחוז). תמיסות אלו ישמשו לבניית גרף כיוול. ראו דוגמה להכנת התמיסה הסטנדרטית בטבלה הבאה: יש לבצע חישובי ריכוזים ומהלך הכנת התמיסות הסטנדרטיות מראש בדו"ח מכין. עם זאת, יהיה עליכם להכניס לתוכנה את הריכוזים האמיתיים כפי שיחושבו לאחר השקילה.

| שם התמיסה | מרכיבים ² | נפח (mL) בקבוק המדידה | ממס | פרטי הכנה |
|-----------|--------------------------------------|-----------------------|--------------------|--|
| C | 250 mg aspirin 120 mg paracetamol | 100 | MeOH + HAc 95:5 | המס ראשית בכ- 10mL ממס, השלם בממס |
| D | 18 mg salicylic acid | 50 | מים | המס ראשית בכ- 10mL Methanol, השלם בממס |
| E | 5 ml C + 1 ml D | 25 | מים | |

הערה: ניסוי זה תוכנן תוך ניסיון להיצמד ככל האפשר לשיטה הנהוגה ב-USP (United States Pharmacopea). USP כולל שיטות ספציפיות לתרופות הניבדקות ומהווה סמכות לשיטה המומלצת לבדיקה בתעשיית התרופות. עם זאת, משיקולים שונים לא היה ניתן לבצע את השיטה לגמרי באותו אופן הרשום שם. (ראה USP 1995, תחת "Acetaminophen, Aspirin & Caffeine Tablets").

קביעה כמותית של אספירין ופרצטמול בטבלייה

- הזינו שיטה ROGAN CALIBRATION מתוך Student Data/Methods. עברו על פרמטרי השיטה וודאו כי הינם נכונים. בחלון TIME PROGRAM יש לבחור בעמודת MODULE : SCL-10Avp בתוך עמודה STOP : EVENT, ובתוך עמודה TIME : 20. זה יבטיח כי המכשיר יעצור לאחר 20 דקות מתחילת ההרצה. כמו כן, יש לבדוק כי ב PDA SETUP מוגדר זמן של 20 דקות.

1. בדיקת הדירות המערכת בתנאי העבודה הנתונים.

הזרק אחת מתמיסות הכיול E 3 פעמים. בדוק:

(א) הדירות זמן האלוציה ;

(ב) האם הסטייה הסטנדרטית היחסית של שטחי הפיקים היא קטנה מ- 2%?

(ג) בחר אורך גל אופטימלי לעבודה.

2. הזינו אורך גל שבחרתם לתוך PDA SETUP (יש להגדיר channel, בדומה לחלק 2).

- שימרו את השיטה.

² שיטת השקילה האנליטית: שקול כמות מומלצת על נייר שקילה. העבר את נייר השקילה עם החומר לכלי המיועד לשמירת הדוגמא מחוץ למאזניים. שקול את בקבוק המדידה ועשה "Tara". העבר את החומר השקול לבקבוק המדידה שנמצא מחוץ למאזניים. **שים לב!** יש למנוע פיזור החומר. שקול שנית את הבקבוק עם החומר ורשום את המשקל המדויק.

- כעת יש לתת שמות לפיקים ולהגדיר ריכוזים של תמיסות סטנדרטיות שתזריקו בהמשך. אחרי לחיצה על כפתור Analyze, בחלון הכרומטוגרמה לחצו על כפתור ימני של עכבר ובחרו ב DEFINE PEAKS מתוך GRAPHICAL PROGRAMMING. הצביעו על תחילת תחום הפיקים ועל סיומו בהתאם להוראות בתחתית המסך. בחלון הנפתח בחרו ב REPLACE EXISTING PEAKS IN TABLE ולחצו OK.

- כנסו לתוך טבלת GROUP/PEAK מתוך METHOD והזינו שמות החומרים. בתוך עמודות LEVEL יש להזין ריכוזים של תמיסות סטנדרטיות עבור כל חומר, כאשר 1 LEVEL הינו תמיסה סטנדרטית ראשונה, 2 LEVEL – תמיסה 2 וכו'.

- שימרו את השיטה שבניתם.

- כעת נתכונן להזרקת תמיסות סטנדרטיות. לצורך כך ניצור רצף של הזרקות: SEQUENCE RUN. המכשיר יבצע רצף אנליזות אחת אחרי השניה: תתבקשו להזריק תמיסה סטנדרטית ראשונה, המכשיר יבצע אנליזה, יעצור בזמן שהגדרתם (ניתן להקטין את הזמן) ויעבור לאנליזה של תמיסה סטנדרטית שניה וכו'.

- להגדרת SEQUENCE יש ללחוץ על כפתור NEW ולבחור ב SEQUENCE. בחלון הנפתח יש לתת שם הדוגמה, למשל, (01) SAMPLE, מספר בסוגריים מאפשר למחשב להגדיל את שם של דוגמה הבאה באופן אוטומטי. כמו כן, יש לתת שם הקובץ, לדוגמה: FILE (001). יש לציין שם השיטה ומקום בו יישמרו הקבצים (STUDENT DATA). יש לציין מספר הזרקות שתבצעו (4). לחצו OK.

- במסך שיפתח שימו לב כי מופיעים שמות הדוגמאות שנתתם ושמות הקבצים העתידיים. בעמודה LEVEL יש להזין מספרים מ-1 עד 4 (ע"פ מה שהוגדר ב-peaks table).

- בעמודה RUN TYPE לחצו על UNKNOWN עבור הדוגמה הסטנדרטית הראשונה. במסך שיפתח בחרו ב CLEAR ALL CALIBRATION וגם ב BEGIN CALIBRATION ולחצו OK.

- כעת לחצו על RUN TYPE עבור דוגמה אחרונה ובחרו ב END CALIBRATION. לחצו OK.

- וודאו כי עבור דוגמה ראשונה RUN TYPE השתנה וכעת הוא CAL CAB CCA, עבור שתי דוגמאות הבאות רשום CALIBRATION ועבור דוגמה אחרונה רשום CAL CAE.

- כעת שימרו את ה SEQUENCE. יש לשמור בתוך תיקיה: Student Data/Sequence.
- עכשיו אתם מוכנים לתחילת האנליזה: לחצו על כפתור "חץ ירוק כפול" (SEQUENCE)

ACQUISITION) ובמסך שייפתח הזינו שם ה SEQUENCE שבניתם. לחצו על START. עקבו לאחר הוראות בתחתית המסך. בדומה להזרקות רגילות תופיע ההודעה WAITING FOR TRIGGER, יש להזריק דוגמה ולסובב אינגיקטור.

- לאחר סיום הרצת התמיסות הסטנדרטיות כנסו לתוך CALIBRATION REVIEW בתוך METHOD. במסך שייפתח אמור להיות מוצג גרף כיול עבור כל חומר בתמיסה סטנדרטית. עברו עם המדריך על אפשרויות שבמסך.

- השג כרומטוגרמה של דוגמת הרוגען R.

- בעזרת מחשבון שבמסך CALIBRATION REVIEW ניתן לקבל ריכוז החומר על פי שטח של פיק שבטבליית רוגען.

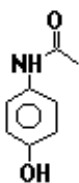
- כנסו לתוך CUSTOM REPORT מתוך METHOD ועברו על REPORT. וודאו כי בטבלה מופיע עמודה בשם: ESTD CONCENTRATION – זה בעצם הריכוז של הנעלם שהמחשב חישב בהתאם לגרף הכיול. כמו כן, ניתן להוסיף ל REPORT עקומות כיול לכל חומר.

עיבוד תוצאות חלק 2

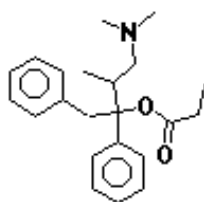
א. חשב את הכמות של אספירין והפרצטמול בטבלייה של רוגען מתוך כרומטגרמות R, E. מהו מקדם אי הוודאות?

ב. חשב את הכמות האבסולוטית של חומצה סליצילית בטבלייה ואת אחוז הפרוק של אספירין מתוך הכרומטגרמות של תמיסות E ו-R. האם זה עומד באחוז המותר שהינו 5%?

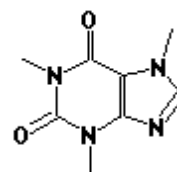
Organic Components in the "Rogan" Tab



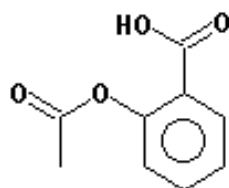
Acetaminophen
(Paracetamol)



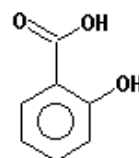
D-Propoxyphene
hydrochloride



Caffeine



Acetylsalicylic
acid (Aspirin)



Salicylic Acid

אנליזה כרומטוגרפית של קפאין

פאזה נעה: 50/50 V/V methanol/water

כלים: 5 בקבוקי כיול בנפח 10 מ"ל

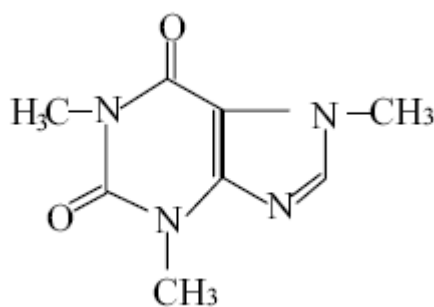
מזרק בנפח 20 מ"ל

כוסות כימיות

חומרים: קפאין

קפה, תה, קולה, משקה אנרגיה, קפה/תה נטול קפאין.

רקע: HPLC בפאזה הפוכה משמשת לקביעת הריכוז של קפאין בקפה, תה וקולה. השיטה המסורתית לקביעת קפאין היא מיצוי וקביעה כמותית בשיטה ספקטרופוטומטרית. שימוש בכרומטוגרפיה נוזלית מאפשר הפרדה מהירה ופשוטה של קפאין מחומרים אחרים, כמו tannic acid, caffeic acid וסוכרוז, הנמצאים במשקאות אלה. יש להכין 5 תמיסות סטנדרטיות של קפאין ולהזריק ל-HPLC לצורך הכנת גרף כיול. בנוסף, יש להכין את משקאות הקפה והתה כפי שיוסבר בהמשך, ולהזריקם ל-HPLC. מתוך הכרומטוגרמות מקבלים את זמן השהיה, t_r , ושטחי הפיקים. בהנחה שבמהלך הניסוי קצב הזרימה ולחץ המשאבה נשארים קבועים, t_r יכול לשמש כמדד איכותי, ושיטחי הפיקים למדד כמותי. ניתן לצייר גרף כיול (שטח הפיק כנגד ריכוז הקפאין) עבור תמיסות הסטנדרט, ולהשתמש בו לקביעת ריכוז הקפאין במשקאות השונים.



caffeine

מהלך הניסוי :

קבעו את הפאזה הנעה ליחס ריכוזים 50/50 V/V methanol/water וקצב הזרימה ל-
1ml/min.

המתינו להגעת המערכת לשיווי משקל כך שקו הבסיס ישר, בטרם תזריקו את התמיסות.

א. קפאין במשקאות

הכינו את דוגמאות המשקה בדרך הבאה :

קפה, קפה נטול קפאין: שקלו בדייקנות (או במדידה מדויקת) כ- 1 גר' מדוגמאת הקפה לכוס בנפח 100 מ"ל. הוסיפו כ 50 מ"ל מים מזוקקים, כסו בזכוכית שעון והרתיחו עד להמסה מלאה. קררו את הכוס לטמפרטורת החדר, העבירו כמותית לבקבוק כיול בנפח 100 מ"ל והשלימו במים מזוקקים.

תה, תה נטול קפאין: שקלו בדייקנות עלי תה משקיק אחד (לא כולל השקיק) לכוס בנפח 100 מ"ל, הוסיפו כ 50 מ"ל מים מזוקקים, כסו בזכוכית שעון והרתיחו כ 20 דקות עד למיצוי הקפאין. קררו את הכוס לטמפרטורת החדר, העבירו כמותית לבקבוק כיול בנפח 100 מ"ל והשלימו במים מזוקקים.

לתוך בקבוקי כיול בנפח 50 מ"ל העבירו בפיפטה 5.0 מ"ל מתמיסת הקפה ו 5.0 מ"ל מהתה. דוגמאות נטולות הקפאין. אין צורך למהול.

סננו את הדוגמאות (קפה, תה מהולים ונטולי קפאין לא מהולים) דרך פילטר מיקרוני מסומן.

קולה, משקה אנרגיה: העבירו מעט קולה לכוס מתאימה, כסו בזכוכית שעון, הרתיחו בעדינות להרחקת CO_2 . קררו לטמפרטורת החדר. מהלו פי 2 לבקבוק מדידה. סננו דרך פילטר מיקרוני מסומן.

ב. הכנת תמיסת סטנדרת של קפאין (25mg/100ml)

1. לתוך 5 בקבוקי כיול בנפח 10.0 מ"ל העבירו את הנפחים הבאים מתמיסת האם של הקפאין :

1,2,3,4,5 מ"ל. השלימו עד לקו במים מזוקקים. חשבו את ריכוז הקפאין בכל בקבוק.
2. לפני הזרקת התמיסות הסטנדרטיות לקולונה, הזרימו את הפאזה הנעה דרך לקולונה למשך חמש דקות. שימו לב לתגובת הגלאי וודאו שלא נשארו בעמודה שאריות חומרים מניסויים קודמים.

3. הזריקו כל אחת מהתמיסה הסטנדרטית ושמרו את הכרומוטוגרמות (גם כאן כל הזרקה הינה בנפח של $50-80\mu\text{l}$ ויש לוודא כי בועות לא נכנסות ללולאה).
לאחר שמצאתם את אורך הגל האופטימלי לקפאין בצעו ממוצע וסטיית תקן עבור t_r ובצעו גרף כיוול, גם באקסל.

ג. הזריקו כל אחת מהתמיסות שאתם מעוניינים לבדוק והדפיסו את הכרומוטוגרמות.

טיפול בנתונים:

מתוך זמן ההשהיה של הקפאין קבעו איזה שיא בכרומוטוגרמות המשקאות שייך לקפאין. חשבו את שיטחי הפיקים של קפאין בדוגמאות שנבדקו.
חשבו את כמות הקפאין ביחידות mg/gr לקפה ותה וביחידות mg/ml לשאר ההרצות.

שאלות הכנה:

1. מהם אורכי הגל לבליעה האופטימיים לקפאין?
2. מדוע משתמשים בקולונת פאזה הפוכה לקביעת קפאין?
3. האם בניית עקומת עקום כיוול מתוך גובה השיא של קפאין (ולא מתוך שטחו) הייתה נותנת תוצאות מדוייקות בניסויי זה?
4. האם ניתן להשתמש בקולונת מחליף יונים לקביעת קפאין? הסבירו.

Atomic Absorption

מבוא:

בליעה אטומית הנה טכניקה בסיסית לקביעה כמותית ואיכותית של הרכב אלמנטרי או אלמנטים במגוון מטריצות. המכשיר משמש באופן נרחב בתעשייה הכימית, תעשיית המזון, בדיקות רפואיות ומחקר.

מטרות הניסיון:

א. הכרות המכשיר של בליעה אטומית – Atomic Absorption

ב. בדיקות איכותיות

ג. בדיקות כמותיות

דרישות לעריכת דו"ח מכין:

1. על הסטודנטים לבוא מוכנים לניסיון מבחינת ידע על תפעול המכשיר. הדו"ח המכין יכול את פרטי המהלכים הטכניים, סיבותיהם ותוצאות הניסיון הרצויות (ספקטרא חצי כמותיים).

2. יש לפרט את מהלך הכנת התמיסות.

3. לכל שלב ושלב של הניסיון פרט את:

- תוצאות להן אתה מצפה ומדוע.

- תשובות לשאלות המופיעות בתיאור של הניסיון.

דרישות לעריכת דו"ח מסכם:

1. לרשום את מהלך החישובים ותוצאות הניסויים.

2. לכל התוצאות יש להוסיף את גורמי השגיאה הנסיוניים, מה גודלם וכיצד ניתן לצמצמם.

3. לכל ניסיון יש לרשום מסקנות סופיות לגבי השגת המטרה.

4. יש לכתוב דיון שיכיל יתרונות וחסרונות, ובנוסף תחזיות מול תוצאות.

חלק א' – בדיקות איכותיות והכרת המכשור

א. קבלת ספקטרום פליטה של המנורה האטומית

ב. קבלת ספקטרום פליטה של אלמנטים בלהבה

ג. השפעת יון פוספט על קביעת הסידן

ד. הכנת גרף כיוול

בניסיון תשתמש בלהבת אוויר/אצטילן. וודא את מיקום בלון האצטילן ומיקום ברז הצינור שמביא אצטילן אל המכשיר (ברז תחתון מתחת לחלון). הדלק את שאיבת גזי הלהבה מעל המכשיר (כפתור על הקיר ליד החלון).

א. קבלת ספקטרום פליטה של המנורה האטומית.

לצורך הכרת מקור האור והמונוכרומטור במכשיר נבצע מדידה של ספקטרום פליטה של המנורה האטומית, אשר נותנת קווי פליטה של אלמנטים הבאים: Fe, Co, Ni, Mn, Cu, Cr. יש לבוא לניסוי עם שרטוט של המערכת הנסיונית, של מנורת הקתודה החלולה ועם ספקטרא צפויים חצי כמותיים.

זהה שלושה קווי פליטה של אלמנט אחד (לבחירתך) מתוך ששת האלמנטים הנ"ל ועבור חמשת האלמנטים האחרים זהה את קו הפליטה המרכזי, אחד לכל אלמנט, המצוי ב-Cookbook (זו הספרייה המכילה שיטות העבודה) כקו עבודה מרכזי (אפשר להגדיל את תחום מסוים של הספקטרום). דפים רלוונטים מה-Cookbook בסוף החוברת. לאילו שינויים אתה מצפה אם תשנה רוחב הסדק? מה רזולוציית המונוכרומטור? האם היא מספיקה? מהם הגורמים לקווים הנוספים?

הוראות כלליות להפעלת המכשיר:

1. הפעל את המכשיר על ידי לחיצה על כפתור ההפעלה שלו (כפתור שחור מצד שמאל על המכשיר ליד המנורה הירוקה) והמתן לצפצוף מזמר. יש לוודא הפעלת שאיבת גזי הלהבה. - המכשיר מכיל בזיכרונו ספרייה עם שיטות העבודה המוכנות וגם קיימת אפשרות ליצור שיטת עבודה חדשה. בניסיון תשתמש בשיטות מוכנות.
2. כנס במחשב לתוכנה ע"י לחיצה Double Click על "SpectrAA"
3. לחץ על "worksheet", בתוכו "new", ובמסך שיפתח תן שם לקובץ (Worksheet) (במשבצת "Name") ומספר הדוגמאות שברצונך לבצע (משבצת "Samples"). למשל, אם יש לך 10 דוגמאות של נחושת במים מעשרה מקומות שונים אז זהו מספר הדוגמאות שלך. לחץ OK. (ניתן להוסיף או להוריד את מספר הדוגמאות בהמשך ולכן כדאי להשאיר את הערך מקסימלי).

4. לחץ על "Add methods" ובחר באחד האלמנטים הבאים : Fe, Co, Ni, Mn, Cu, Cr
ולחץ OK. פעולה זו בוחרת מספריה של המחשב את השיטה המתאימה לביצוע אנליזה של
האלמנט שבחרת. עכשיו עליך לבצע שינויים בה.

5. לחץ על "Edit methods" ותוך מעבר בין דפים (ע"י לחיצה על Next) עשה שינויים
נדרשים בפרמטרים שונים כגון :

Page "Type/Mode":

- a) "Sampling Mode" – Manual
- b) "Instrument Mode" – Absorbance
- c) "Flame Type" – Air/Acetylene

Page "Measurement":

- a) "Measurement Mode" – Integration. The Measurement Mode group determines how the AA signal is measured. Integration – the Absorbance or Emission signal is averaged over the selected measurement time.
- b) "Calibration Mode" – Concentration. The calibration uses a plot of Absorbance or Emission versus concentration.

Page "Optical":

- a) "Lamp Position" - 2 according to the available lamp position
- b) "Lamp Current" - according to recommended current written on the lamp base
- את מצב המנורה ניתן לראות ע"י פתיחת הדלת השחורה מפלסטיק במכשיר על מנת לוודא
מה כתוב על המנורות. בחר במנורה המכילה את האלמנט שבחרת. יחד עם זאת תעביר את
הידיית בפינה שמאלית עליונה כך שהיא תצביע על המנורה שבחרת על מנת לאפשר מסלול
אופטי לאור המנורה.

6. בתוך דף "Cookbook" תוכל לראות קווי בליעה/פליטה (ב- "Notes") ועקומת כיוול
שאתה אמור לקבל (ב- "Graph"). רשום במחברת את קווי הפליטה של אלמנט שבחרת
להמשך הניסיון.

7. אחרי שנתת פרמטרים נדרשים קרא למדריך לבדיקה ולחץ OK.

8. לחץ על הtab המסומן כ: "Analysis" - יפתח מסך העבודה. המתן כמה שניות להדלקת
המנורה. וודא שמנורה נדלקה לפי פליטת אור.

9. א. לחץ על "Optimize" במחשב – יפתח מסך שבו הינך מתבקש לבחור שיטה (קריא –
אלמנט) שברצונך לעשות לה אופטימיזציה. לחץ OK (קיימת רק שיטה אחת).

ב. במידה ויופיע מסך שבו הנך מתבקש לשנות את מצב הידית השולטת על המנורות למצב "2" (כבר ביצעת פעולה זו כאשר העברת ידית כך שהיא תצביע על המנורה) ולקבוע זרימות של גזים אל המבער, לחץ OK במחשב (אין אפשרות לשלוט מהמחשב על זרימות הגזים).

ג. המתן להופעת קריאה ועמוד ירוק על המסך, פתח דלת שחורה, עשה אופטימיזציה של המנורה האטומית על ידי סיבוב של שני הכפתורים שחורים בתחתית המנורה (ניתן לסובב בשני כיוונים), כך שתקבל קריאה מקסימלית במחשב. במידה והעמוד הירוק יוצא מהתחום לחץ "Rescale" והמשך לעשות אופטימיזציה.

ד. לחץ OK. במסך "Optimize" לחץ "Cancel".

ה. לאחר וידוא שהלהבה כבויה, בנוכחות המדריך הורד מכסה של תא המבער וכוון את המבער באמצעות הכרטיס. מקם את הכרטיס שבו מצויר עיגול עם קווים מצולבים (הנמצא במגירה העליונה) באמצע המבער. יש למקם את הכרטיס ישירות על המבער כשהקו בכרטיס חופף עם הסדק של המבער. על ידי סיבוב של שני כפתורים (הנמצאים על לוח הבקרה של המכשיר מצד שמאל, כפתור אחד בתוך השני) וידית סיבוב נסה למקם את קרן אור המנורה בתא הבעירה כך שכתם אור יהיה במרכז העיגול עם קווים מצולבים: "Target Area" לכל אורך המבער. החזר את המכסה למקומו.

10. א. לצורך ביצוע ניסיון קבלת ספקטרום פליטה של המנורה נסרוק את התחום המכסימאלי: לחץ על "Instrument" בשורה העליונה על המסך ובחר ב "Wavelength Scan". תן פרמטרים הנדרשים (תחום הסריקה ומהירות הסריקה), לחץ OK.

ב. יופיע מסך "Analysis Checklist" שבו הנך מתבקש לכבות את זרימת הגזים אל המבער – לחץ OK (מכיוון שלא הדלקת להבה אין צורך לכבות אותה).

11. א. המתן לקבלת ספקטרום (1 – 3 דקות) בחלון בצד ימין עליון של המסך.

ב. ניתן להגדיל חלון זה ע"י לחיצה Double Click עליו (באותה פעולה ניתן לחזור לקונפיגורציה הקודמת).

ג. ניתן להגדיל תחום מסוים של החלון ע"י לחיצה על כפתור שמאלי של עכבר ומשיכה (בזמן המשיכה כפתור לחוץ). לבטל הגדלה ניתן ע"י לחיצה על כפתור "Zoom" מצד ימין מתחת לציור.

ד. אפשר ללחוץ על "Autoscale" (מצד שמאל מתחת לציור) על מנת לקבל ספקטרום בצורה יותר טובה (פעולה זו תתבצע רק אחרי שהמכשיר יסיים את הסריקה, אך רצוי להדפיס ספקטרום בצורה רגילה ולא במצב "Autoscale").

ה. אם תצביע עם עכבר בנקודה כלשהי בחלון הספקטרום אפשר לראות את אורך הגל בנקודה זו.

12. חזור לדף "Analysis". קבל הדפס של ספקטרום ע"י לחיצה בחלון הספקטרום על כפתור ימני של עכבר ובחירה ב- Print. רשום על ההדפסים את אורכי גל של קווי הפליטה של המנורה האטומית. הדפס אזורים מוגדלים של הספקטרום על מנת לראות את קווי הפליטה של המנורה יותר טוב. (שים לב שאורכי הגל אינם מודפסים, יש להשלים ידנית).

13. לחץ על "Filing" בשורה שניה מלמעלה ובמסך שנפתח שמור את Worksheet שלך על ידי לחיצה על "Save" אחרי זה לחץ "Close" - עכשיו הנך מוכן לבצע את הניסוי הבא.

ב. קבלת ספקטרום פליטה של אלמנטים בלהבה

- הכן תערובת אחת המכילה K, Na, Li בריכוז 2 ppm כל אחד ו Ca בריכוז 6 ppm (כאשר 1 ppm הנו 1 mg של אלמנט ל- 1 liter של תמיסה). לרשותך תמיסות Stock של כל אחד מהאלמנטים בריכוז 1000 ppm.

- סדר הפעולות דומה לסעיף הקודם, אך יש לבצע כמה שינויים.

1. לחץ על "worksheet", בתוכו "new", ובמסך שיפתח תן שם לקובץ (במשבצת "Name") ומספר הדוגמאות שברצונך לבצע (משבצת "Samples").

2. לחץ על "Add methods" ובחר באלמנט.

3. לחץ על "Edit methods" ותוך מעבר בין דפים (ע"י לחיצה על Next) עשה שינויים נדרשים בפרמטרים שונים כגון:

Page "Type/Mode":

- a) "Sampling Mode" – Manual
- b) "Instrument Mode" – Emission
- c) "Flame Type" – Air/Acetylene

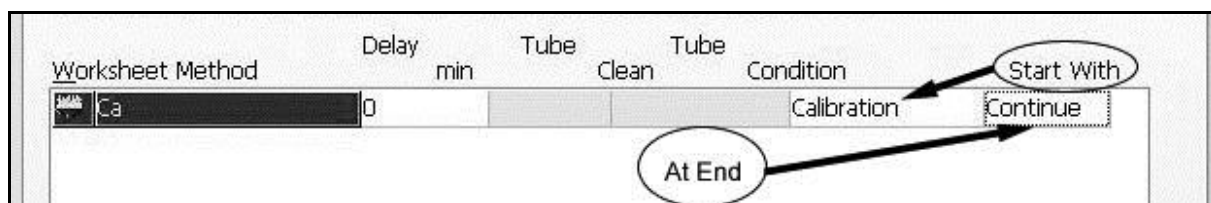
Page "Measurement":

- a) "Measurement Mode" – Integration
- b) "Calibration Mode" – Concentration

4. בתוך דף "Cookbook" תוכל לראות קווי בליעה (ב- "Notes") ועקומת כיוול שאתה אמור לקבל (ב- "Graph").

5. אחרי שנתת פרמטרים נדרשים לחץ OK.

6. א. לחץ על כפתור "Edit Sequence Paramtrs..." וכנס לדף "Control".



ב. במסך שנפתח לחץ לחיצה על שורה מתחת ל- "Start with", ברשימה שתופיע בחר ב- "Solution". לחץ OK.

- פעולה Start with קובעת סדר פעולות המכשיר לפני תחילת מדידת הדוגמאות. קיימות ארבע אפשרויות:

א) Calibration - בהתחלה יבצע המכשיר איפוס (סיגנל שנותנת שאיבת אוויר, פעולה זו נקראת "Instrument Zero"), יבקש למדוד תמיסת איפוס (לעתים קרובות זה מים מזוקקים), המכשיר יבנה בעצמו עקומת כיוול (מתוך תמיסות סטנדרטיות שהכנת) ורק אחרי זה יבקש ממך להכניס תמיסות דוגמאות לצורך המדידה.

ב) Cal Zero (Calibration Zero) - במקרה זה תחילה יבצע המכשיר איפוס קריאה ע"י שאיבת אוויר, יבקש למדוד תמיסת האיפוס ויעבור ישירות למדידות של דוגמאות.

ג) Reslope - אם קיימת כבר עקומת כיוול מוכנה וברצונך למדוד מחדש את אחת מתמיסות הסטנדרטיות אפשר להשתמש באופציה זו. גם כאן יתחיל המכשיר מאיפוס הקריאה - Instrument Zero, ימדוד תמיסת איפוס, יבקש להכניס את אחת מהתמיסות הסטנדרטיות לצורך מדידה חדשה ואחרי זה יעבור למדידות של דוגמאות.

ד) Solution - במקרה זה לא יבנה המחשב עקומת כיוול אלא יאפס קריאה ע"י שאיבת אוויר ויעבור ישירות למדידת דוגמאות.

7. לחץ על ה-tab המסומן כ: "Analysis" - יפתח מסך העבודה. פתח ברזים של אצטילן ואוויר וקרא למדריך להדלקת להבה ע"י לחיצה ארוכה של 3 – 5 שניות על כפתור שחור מצד שמאל של המכשיר שלידו מצוירת להבה. וודא שאיבת מים מזוקקים כל זמן שהלהבה עובדת.

8. א. לחץ על כפתור "Optimize" - מופיע מסך שבו הנך מתבקש לבחור שיטה שברצונך לבצע לה אופטימיזציה - לחץ OK (מכיוון שקימת רק שיטה אחת אין צורך לבחור).

ב. במידה ויופיע מסך "Analysis Checklist" שבו הנך מתבקש לקבוע זרימות הגזים אל המבער ו/או להעביר ידית השולטת על המנורות למצב 1 או מצב 2 - לחץ OK (מכיוון שאין אפשרות לקבוע זרימות הגזים מהמחשב וגם כן לא תצטרך מנורה בניסוי זה).

9. א. במסך שנפתח ("Flame Optimization") לחץ כפתור "Optimize Signal".

ב. המתן לקבלת קריאה על המסך (קריאה צריכה להיות בסביבות אפס).

ג. הוצא את הצינור שמביא תמיסה אל המבער מבקבוק התמיסה והשאר אותו פתוח לאויר.

במסך המחשב לחץ "Inst. Zero", המתן כמה שניות לאיפוס הקריאה. (Instrument Zero) תמיד נעשה עם צינור פתוח לאוויר).

10. א. לחץ על "Emission Setup" - יופיע המסך "Present Top Standard for..." - עליך להכניס את הצינור לתוך בקבוק עם תמיסה שהכנת. לחץ OK. המתן להופעת קריאה ועמוד כחול על המסך. שים לב לשורת הסטטוס בחלק הימני תחתון של המסך.
ב. נסה לסובב ידית הממוקמת מתחת לצינור שמביא תמיסה אל המבער בשני כיוונים (היא שולטת על קצב השאיבה של תמיסה) כדי לקבל קריאה מקסימלית.
יש להקפיד לסובב ידית זו בעדינות מירבית כדי לא לשבור צינורית זכוכית המחוברת אליה בנבולייזר. לחץ OK.

ג. במסך "Optimize" שיופיע, לחץ "Cancel".

11. א. לצורך ביצוע הניסיון לחץ "Instrument" בשורה העליונה במסך, בתוכו בחר "Wavelength Scan" – במסך שיופיע תן פרמטרים נדרשים (תחום הסריקה ומהירות הסריקה). לחץ OK.

ב. במסך "Analysis Checklist" - בדוק נתונים תואמים ולחץ OK.

ב. יופיע המסך "Prepare for Instrument Zero" – עליך להשאיר צינורית פתוחה לאוויר. לחץ OK.

ג. אחרי זה יופיע המסך "Present Solution Sample 001" – הכנס את הצינור לתוך תמיסה שהכנת ולחץ "Read". המתן לקבלת ספקטרום הפליטה.

12. חזור על סעיף 12 של הניסוי הקודם כדי לראות את הערכים הספרותיים של קווי הפליטה של כל האלמנטים (קבלת ספקטרום פליטה של המנורה האטומית). וודא שהנך מזהה כל פיק בספקטרום הפליטה הניסיוני.

13. קבל הדפס של ספקטרום הפליטה.

14. לחץ על "Filing" בשורה שניה מלמעלה ובמסך שנפתח שמור את Worksheet שלך על ידי לחיצה על "Save" אחרי זה לחץ "Close" - עכשו הנך מוכן לבצע את הניסוי הבא.

15. התייחס לעוצמות קווי הפליטה של האלמנטים. הסבר איזה אלמנטים יותר טוב לבדוק בשיטת הפליטה ואלו בשיטת הבליעה.

ג. השפעת יון פוספט על קביעת הסיידן:

Atomic spectrometric methods are relative methods. The signal produced by the sample solutions are compared to the signal caused by the reference solutions. If the samples and references are behaving differently during the measurements, interferences will be seen. Interferences in the flame AA techniques may be

divided into chemical, ionization, physical, and background absorption interferences.

Chemical Interferences. The interference mechanism may be divided into the two groups: 1) The atomization of the analyte element is not completed either in the solid phase or in the liquid (condensed) phase; 2) The vaporized atoms react with other atoms or radicals present in the gas phase.

The interference becomes greater with increasing difference in the dissociation temperatures of the original and new compounds.

Among the most common chemical interferences in flame spectrometric methods is the signal depression of alkaline earth metals in the presence of phosphate. The interference effect is due to the formation of solid alkaline earth metal pyrophosphates which are difficult to vaporize. Calcium phosphate does not form in the flame, but at an earlier stage of the process. It is known that the addition of certain cations to a solution which contains an interfering anion will remove the interference. Organic chelating agents which form stable complexes with the analyte, can also be used for counteracting chemical interferences of various anions. For example, EDTA or glycerol may be used to eliminate interference caused by phosphate and sulfate in the determination of aluminum.

- לרשותך תמיסות סטוק של 5% La, Ca- 1000ppm, PO_4^{-3} 200ppm - בהתאמה.
לרשותך כלים:

(א) פיפטורים של $10\mu l$ - $5000\mu l$. (ב) בקבוקי מדידה של 50ml.

- הכן התמיסות הבאות (יש להכין טבלת מיהולים מלאה בדו"ח מכין):

(1) איפוס - מים מזוקקים

(2) קריאה - Ca^{2+} 4ppm

(3) קריאה - Ca^{2+} 4ppm + PO_4^{-3} 20ppm

(4) איפוס - La 0.1% + PO_4^{-3} 20ppm

(5) קריאה - La 0.1% + PO_4^{-3} 20ppm + Ca^{2+} 4ppm

(6) קריאה - La 0.1% + Ca^{2+} 4ppm

- סדר הפעולות עם המכשיר והמחשב דומה לניסוי הקודם, אך גם כן מופיעים שינויים:
1. לחץ על "worksheet", בתוכו "new", ובמסך שיפתח תן שם לקובץ (במשבצת "Name") ומספר הדוגמאות שברצונך לבצע (מספר דוגמאות צריך להיות עכשיו לפחות 5 – כדאי לבחור מספר גדול יותר) (משבצת "Samples"). לחץ OK.
 2. לחץ על "Add methods" ובחר ב-Ca. לחץ OK.
 3. לחץ על "Edit methods" ותוך מעבר בין דפים (ע"י לחיצה על Next) עשה שינויים נדרשים בפרמטרים שונים כגון:

Page "Type/Mode":

- a) "Sampling Mode" – Manual
- b) "Instrument Mode" – Absorbance
- c) "Flame Type" – Air/Acetylene

Page "Measurement":

- a) "Measurement Mode" – Integration
- b) "Calibration Mode" – Concentration

Page "Optical":

- a) "Lamp Position" – 1 according to the available lamp position.
 - b) "Lamp Current" - according to recommended current written on the lamp base
- אל תשכח להעביר ידית כך שהיא תצביע על מנורת הסיידן
4. בתוך דף "Cookbook" תוכל לראות קווי בליעה/פליטה (ב- "Notes") ועקומת כיוול שאתה אמור לקבל (ב- "Graph").
 5. אחרי שנתת פרמטרים נדרשים לחץ OK.
 6. א. לחץ "Edit Sequence Parameters..." ובתוך דף "Control" לחץ לחיצה על שורה מתחת ל- Start with בתוך הרשימה שתופיע בחר ב- "Cal Zero".
 - ב. לאחר מכן, לחץ לחיצה על שורה מתחת ל- At End ובחר ב- Stop.
 - פעולה זו קובעת מה יבצע המכשיר כשיסיים בדיקה. קיימות שלוש אפשרויות, (א) Continue – ימשיך המכשיר בבדיקות הבאות, (ב) Pause – הפסקה, (ג) Stop.

| Worksheet Method | Delay min | Tube Clean | Tube Condition | Start With |
|------------------|-----------|------------|----------------|------------|
| Ca | 0 | | Calibration | Continu: |
| | | | Calibration | Continue |
| | | | Reslope | Pause |
| | | | Cal Zero | Stop |
| | | | Solution | |

ג. עבור לדף הבא – “Options” ע”י לחיצה על “Next” (או “Options”). בתוך “Sequence Completion” סמן “V” על “Leave Flame On” זה קובע למכשיר לא לכבות להבה בסוף המדידות. כמו כן סמן באותו הדף שבסוף הבדיקה ישאיר המכשיר מנורה דולקת ויצפצף. לחץ OK.

7. לחץ על הtab: “Labels” - הזן שמות לדוגמאות ללא מים מזוקקים (נמדד כCAL ZERO). שמות חוקיים הם באנגלית, כולל רווחים ובלי תווים מיוחדים.

8. לחץ על הtab: “Analysis” - יופיע מסך העבודה.

9. א. לחץ “Optimize” - במסך שבו הנך מתבקש לבחור שיטה לחץ OK.

ב. במידה ויופיע המסך Analysis checklist שבו הנך מתבקש לסובב ידית השולטת על המנורות למצב “1” ולבדוק זרימות הגזים אל המבער - לחץ OK (פעולות אלו כבר נעשו: סיבת ידית קודם ולהבה נשארה דולקת מהניסוי הקודם).

ג. המתן להופעת קריאה ועמוד ירוק על המסך. (בזמן ההמתנה המכשיר סורק במונוכרומטור לקראת אורך הגל של סידן). לחץ “Optimize Lamp” ועשה אופטימיזציה של המנורה האטומית (ע”י סיבוב של שני כפתורים שחורים בתחתית המנורה).

ד. הדלק את הלהבה בנוכחות המדריך.

ה. אחרי זה לחץ “Optimize Signal” והמתן להופעת קריאה על המסך. הוצא את הצינור שמביא תמיסה אל המבער מתוך המים המזוקקים ולחץ “Inst. Zero”. המתן לאיפוס הקריאה.

ו. הכנס את הצינור לתוך בקבוק עם תמיסת סידן 4 ppm ונסה לקבל קריאה מקסימלית ע”י סיבוב כפתור האצטילן במכשיר (בפעם הראשונה בנוכחות מדריך) ועל ידי הידית (מתחת לצינור) השולטת על קצב שאיבת התמיסה.

10. א. לחץ OK, הוצא את הצינורית מהתמיסה והכנס אותה למים מזוקקים.

ב. במסך “Optimize” לחץ “Cancel”.

11. אם הדוגמאות לא צבועות בחום, לחץ על כפתור “Select” ובמסך שיופיע בחר עם “מרקר” (Marker) את הדוגמאות שלך (לחיצה עם כפתור שמאלי של עכבר על משבצת של דוגמא), כך שמשבצות של דוגמאות שבחרת יהיו בצבע חום ושאר המשבצות בצבע לבן (פעולה זו קובעת שאחרי שיסיים המכשיר למדוד את הדוגמאות המסומנות יבצע פעולה “Stop” (כלומר, יעצור ויצפצף).

- חזרה לקונפיגורציה הקודמת של המסכים ניתן ע”י לחיצה שניה של כפתור “Select”.

12. א. לצורך התחלת הניסוי לחץ “Start”. במסך “Analysis Checklist” בדוק נתונים תואמים ולחץ OK. המתן לקבלת מסך “Prepare for Instrument Zero” – עליך להוציא

את הצינור מתוך מים מזוקקים ולהשאיר אותו פתוח לאוויר (לצורך איפוס קריאת המכשיר) – לחץ OK. ותהיה מוכן ל-CAL ZERO. כשהתוכנה מתחילה לספור אחורה ל-CAL ZERO בשורת המצב למטה, יש להכניס את הצינורית למים מזוקקים.

ב. המתן לסיום האיפוס והכנס את הצינור לתוך בקבוק עם התמיסה הראשונה שלך (מים מזוקקים – לכיול אפס) לצורך המדידה.

ג. אחרי זה יבקש המחשב להכניס את שאר התמיסות – “Present Solution Sample 001” (תמיסה זו הנה תמיסת סידן 4 ppm) - עליך לפעול בצורה דומה.

- התבונן במסך הנתונים המתקבלים. במשבצות של הדוגמאות שכבר עברו את הבדיקה יהיה כתוב “UNCAL”.

13. בסיום המדידה יופיע המסך “Autorun Completed” והמכשיר יצפצף – לחץ OK.

14. כדי לראות את ערכי הבליעה במשבצות של הדוגמאות לחץ על “Options” בשורה העליונה על המסך וברשימה שתופיע בחר ב- Worksheet וב- Show in ABS/Intensity.

15. אחרי ששמרת וסגרת את ה- Worksheet שלך לחץ על כפתור “Reports” ובחר ב- Worksheet שלך מתוך הרשימה. לחץ Next פעמיים. בתוך דף “Settings” קבע פרמטרים שיופיעו בהדפסה. לחץ Next עוד הפעם ואחרי זה לחץ “Print Report” אחרי שקיבלת הדפס לחץ “Close” ועבור לניסוי הבא.

- במידה ואינכם מרוצים מהתוצאות, אנא הציעו ניסיון נוסף לשיפורם.

ענה על השאלות הבאות:

- 1) כיצד משפיע הפוספט על קביעת ריכוז הסידן ומדוע?
- 2) מה תפקיד הלנתנום?
- 3) כיצד ניתן לצמצם הפרעות של אניונים לקביעת מתכות כמו סידן למשל, מבלי להיעזר בשיטות כימיות?
- 4) האם הפתרון שהצעתם בסעיף 3 מתאים גם במקרה של מתכות אלקליות? מדוע?

ד. קביעת ריכוז יון הנחושת במים:

- לרשותך תמיסת Stock של נחושת בריכוז 1000 ppm. עליך להכין תמיסות הבאות:

(1) איפוס – מים מזוקקים

(2) ארבע תמיסות בריכוז ידוע Cu 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 ppm

(3) תמיסת נעלם (יוכן על ידי המדריך)

1. לחץ על "worksheet", בתוכו "new", ובמסך שיפתח תן שם לקובץ (במשבצת "Name")

ומספר הדוגמאות שברצונך לבצע (עדיף לבחור 3 – 4 דוגמאות כדי לבדוק את הדירות

המכשיר) (משבצת "Samples"). לחץ OK. (מדידות לגרף כיול אינן נכללות ב Samples).

2. לחץ על "Add methods" ובחר ב-Cu. לחץ OK.

3. לחץ על "Edit methods" ותוך מעבר בין דפים (ע"י לחיצה על Next) עשה שינויים

נדרשים בפרמטרים שונים כגון:

Page "Type/Mode":

a) "Sampling Mode" – Manual

b) "Instrument Mode" – Absorbance

c) "Flame Type" – Air/Acetylene

Page "Measurement":

a) "Measurement Mode" – Integration

b) "Calibration Mode" – Concentration

Page "Optical":

a) "Lamp Position" –2 according to the available lamp position.

b) "Lamp Current" - according to recommended current written on the lamp base

- סובב את הידית כך שהיא תצביע על מנורת נחושת

Page "Standards":

a) "Standards" – Enter Standard Concentrations

- עכשיו עליך להכניס ריכוזים של הסטנדרטים שהכנת. לשנות (להכניס) ריכוזים של

סטנדרטים ניתן ע"י לחיצה Double Click על ערך של סטנדרט והכנסת ערך חדש. יש

להכניס ערכי ריכוזים בסדר עולה.

b) "Upper valid concentration": Enter top standard + 1

4. בתוך דף "Cookbook" תוכל לראות קווי בליעה/פליטה (ב- "Notes") ועקומת כיול

שאתה אמור לקבל (ב- "Graph").

5. אחרי שנתת פרמטרים נדרשים לחץ OK. וקרא למדריך לבדיקה.

6. **א.** לחץ "Edit Sequence Parameters..." ובתוך דף "Control" לחץ לחיצה על שורה מתחת ל- Start with בתוך הרשימה שתופיע בחר ב- Calibration.
- ב.** כמו כן לחץ לחיצה על שורה מתחת ל- At End ובחר ב- Stop.
- ג.** עבור לדף הבא ע"י לחיצה על "Next" ובתוך "Sequence Completion" סמן "V" על "Leave Flame On". לחץ OK.
7. לחץ על tab : "Labels" ותן שמות לדוגמאות (unknown Cu 1, unknown Cu 2..).
8. לחץ על "Analysis" - יפתח מסך העבודה.
9. **א.** לחץ "Optimize". במסך שבו הנך מתבקש לבחור שיטה, לחץ OK.
- ב.** במידה ויופיע המסך Analysis checklist שבו הנך מתבקש לסובב ידית השולטת על המנורות למצב "2" ולבדוק זרימות הגזים אל המבער – לחץ OK.
- ג.** המתן להופעת קריאה ועמוד ירוק על המסך. לחץ "Optimize Lamp" ועשה אופטימיזציה של המנורה האטומית ע"י סיבוב של שני כפתורים שחורים בתחתית המנורה. (אלא אם כן אופטימיזציה כבר בוצעה לאלמנט אחר הכלול במנורה זאת).
- ד.** לאחר וידוא שהלהבה כבויה, בנוכחות המדריך הורד מכסה של תא המבער וכוון את המבער באמצעות הכרטיס. החזר את המכסה למקומו והדלק את הלהבה בנוכחות המדריך.
- ה.** אחרי זה לחץ "Optimize Signal" – המתן להופעת הקריאה על המסך. הוצא את הצינור שמביא תמיסה אל המבער מתוך מים מזוקקים ולחץ "Inst. Zero". המתן לאיפוס.
- ו.** הכנס את הצינור לתוך בקבוק עם תמיסת נחושת 4 ppm נסה לקבל קריאה מקסימלית ע"י סיבוב כפתור אצטילן במכשיר והידית מתחת לצינור השולטת על קצב שאיבת התמיסה.
10. לחץ OK. במסך "Optimize" שייפתח, לחץ "Cancel".
11. אם הדוגמאות שלך לא צבועות בחום, לחץ על כפתור "Select" ובמסך שיופיע בחר עם "מרקר" את הדוגמאות שברצונך למדוד (לחיצה עם כפתור שמאלי של עכבר על משבצת של דוגמא), כך שמשבצות של דוגמאות שבחרת יהיו בצבע חום ושאר המשבצות בצבע לבן.
- לחזור לקונפיגורציה הקודמת של המסכים ניתן ע"י לחיצה שניה על כפתור "Select".
12. **א.** לצורך תחילת הניסוי לחץ "Start". במסך "Analysis Checklist" בדוק נתונים תואמים ולחץ OK. המתן לקבלת מסך "Prepare for Instrument Zero" – עליך להוציא את הצינור מתוך מים מזוקקים ולהשאיר אותו פתוח לאוויר – לחץ OK. ותהיה מוכן ל-CAL ZERO.

ב. המתן לסיום האיפוס הכנס את הצינור לתוך בקבוק עם מים מזוקקים.

ג. אחרי זה יבקש המחשב להכניס תמיסת סטנדרט ראשונה – בטבלה מימין למטה ניתן לראות את שמות הסטנדרטים והריכוזים שהזנת. (יש להכניס תמיסות סטנדרטים בסדר עולה של ריכוז). אחרי שסיים המכשיר למדוד סטנדרטים ישרטט המחשב במסך האמצעי מצד ימין עקומת כיוול. יש לוודא שאכן בוצעה התאמה לעקומת הכיוול ואין להמשיך ללא פתרון הבעיה.

ד. אחרי זה יבקש המכשיר להכניס את הדוגמא שלך: "Present Solution unknown Cu" – עליך להכניס תמיסת נעלם שלך וללחוץ "Read".

- מכיוון שסימנת כמה דוגמאות יבדקו ימשיך המחשב לבקש דוגמאות נוספות – עליך להכניס את תמיסת נעלם מספר הפעמים שבקשת (כדי לבדוק את הדירות המכשיר).
- במשבצות של הדוגמאות שכבר עברו את הבדיקה יהיה כתוב ערך של ריכוז נחושת בנעלם אשר המחשב חישב מתוך עקומת כיוול. אם רשום לידך: "UNCAL" סימן שהמכשיר לא מצליח להתאים את הקריאה שלהן לכיוול שנעשה, ואין להמשיך ללא פתרון הבעיה.

13. בסיום המדידה יופיע המסך "Autorun Completed" והמכשיר יצפצף – לחץ OK.

14. אחרי ששמרת וסגרת את ה- Worksheet שלך לחץ על כפתור "Reports" ובחר ב- Worksheet שלך מתוך הרשימה. לחץ Next פעמיים. בתוך דף "Settings" קבע פרמטרים שיופיעו בהדפסה:

Tab "Settings": "Solution Data": Mean Absorbance, Concentration, %RSD

"Report Content": Standards ; "Calibration Graphs": Report

לחץ Next עוד הפעם ואחרי זה לחץ "Print Report" אחרי שקיבלת הדפס לחץ "Close" ועבור לניסוי הבא.

דווח את ריכוז הנחושת בתמיסת נעלם. הערך שגיאת המדידה. האם גרף הכיוול לינארי? נסה להעריך את סף המדידה של המכשיר לנחושת (detection limit). הצע דרך למדוד זאת.

בסוף יום העבודה:

1. אחרי שסיימת ניסיון כבה את הלהבה ע"י לחיצה על כפתור אדום מצד שמאל של המכשיר שלידו מצויר קו).

2. סגור ברז של אצטילן.

3. לחץ "Exit" במחשב.

4. כבה את המכשיר ע"י לחיצה על כפתור הפעלתו

5. כבה את השאיבה מעל המכשיר.

חלק ב-

- א. השפעת יחס מחמצן/מחזור על בליעה של סידן ונחושת בלהבה
- ב. בדיקות אנליטיות כמותיות
- קביעת ריכוז הסידן במי ברז (קשיות המים) על ידי גרף כיוול
 - קביעת ריכוז אשלגן במי עדן בשיטת Standard Addition
 - קביעת כמות הסידן בטבליות Centrum Multi-Vitamins

השפעת יחס מחמצן/מחזור על בליעה של סידן ונחושת בלהבה

הכן את התמיסות הבאות:

מים מזוקקים

תמיסת סידן 5ppm.

תמיסת נחושת 5ppm.

- סדר הפעולות עם המכשיר והמחשב דומה לניסוי הקודם, אך גם כאן מופיעים שינויים:

1. לחץ על "worksheet", בתוכו "new", ובמסך שיפתח תן שם לקובץ (במשבצת "Name") ומספר הדוגמאות שברצונך לבצע (מספר דוגמאות צריך להיות עכשיו לפחות 6) (משבצת "Samples"). לחץ OK.

2. לחץ על "Add methods" ובחר ב-Ca. לחץ OK.

3. לחץ על "Edit methods" ותוך מעבר בין דפים (ע"י לחיצה על Next) עשה שינויים נדרשים בפרמטרים שונים כגון:

Page "Type/Mode":

- a) "Sampling Mode" – Manual
- b) "Instrument Mode" – Absorbance
- c) "Flame Type" – Air/Acetylene

Page "Measurement":

- a) "Measurement Mode" – Integration
- b) "Calibration Mode" – Concentration

Page "Optical":

- a) "Lamp Position" – 1 according to the available lamp position.
 - b) "Lamp Current" - according to recommended current written on the lamp base
- אל תשכח להעביר ידית כך שהיא תצביע על מנורת הסידן

4. בתוך דף "Cookbook" תוכל לראות קווי בליעה/פליטה (ב- "Notes") ועקומת כיוול שאתה אמור לקבל (ב- "Graph").

5. אחרי שנתת פרמטרים נדרשים לחץ OK.
6. א. לחץ "Edit Sequence Parameters..." ובתוך דף "Control" לחץ לחיצה על שורה מתחת ל- Start with בתוך הרשימה שתופיע בחר ב- "solution".
- ב. לאחר מכן, לחץ לחיצה על שורה מתחת ל- At End ובחר ב- Stop.
- פעולה זו קובעת מה יבצע המכשיר כשיסיים בדיקה. קיימות שלוש אפשרויות, (א) Continue – ימשיך המכשיר בבדיקות הבאות, (ב) Pause – הפסקה, (ג) Stop.
- ג. עבור לדף הבא – "Options" ע"י לחיצה על "Next" (או "Options"). בתוך "Sequence Completion" סמן "V" על "Leave Flame On" זה קובע למכשיר לא לכבות להבה בסוף המדידות. כמו כן סמן באותו הדף שבסוף הבדיקה ישאיר המכשיר מנורה דולקת ויצפצף. לחץ OK.
7. לחץ על ה-tab: ("Analysis" - יופיע מסך העבודה).
8. א. לחץ "Optimize" - במסך שבו הנך מתבקש לבחור שיטה לחץ OK.
- ב. יופיע המסך "Analysis checklist" בדוק נתונים תואמים ולחץ OK.
- ג. המתן להופעת קריאה ועמוד ירוק על המסך. (בזמן ההמתנה המכשיר סורק במונוכרומטור לקראת אורך הגל של סידן). לחץ "Optimize Lamp" ועשה אופטימיזציה של המנורה האטומית (ע"י סיבוב של שני כפתורים שחורים בתחתית המנורה).
- ד. לאחר וידוא שהלהבה כבויה, בנוכחות המדריך הורד מכסה של תא המבער וכוון את המבער באמצעות הכרטיס. החזר את המכסה למקומו והדלק את הלהבה בנוכחות המדריך. הוסף אצטילן ללהבה על ידי סיבוב עדין של ברז האצטילן שנמצא בחזית המכשיר. יש לבצע זאת במקביל לצפייה בלהבה (יש להרים את מכסה תא הלהבה לשם כך). אזהרה: יש להרכיב משקפי מגן בעת הצפייה בלהבה. טמפרטורת הלהבה מגיעה ל-2400 מעלות. אין להכניס ללהבה חפצים ואברי גוף. הוסף אצטילן עד לקבלת להבה צהובה. יש לבצע שלב זה בנוכחות המדריך.
- ה. לחץ על: "Optimize Signal" והמתן להופעת קריאה על המסך. הוצא את הצינור שמביא תמיסה אל המבער מתוך מים מזוקקים, לחץ "Inst. Zero" והמתן לאיפוס הקריאה.
- ו. הכנס את הצינור לתוך בקבוק עם תמיסת סידן 5ppm ונסה לקבל קריאה מכסימלית ע"י סיבוב הידית (מתחת לצינור) השולטת על קצב שאיבת התמיסה.
9. לחץ OK. במסך "Optimize" שנפתח שוב לחץ "Cancel".
10. אם הדוגמאות צבועות לבן, יש ללחוץ על כפתור "Select" ובמסך שיופיע בחר עם "מרקר" (Marker) לפחות 4 דוגמאות ראשונות (לחיצה עם כפתור שמאלי של עכבר על

משבצת של דוגמא) כך שמשבצות של דוגמאות שבחרת יהיו בצבע חום ושאר המשבצות בצבע לבן (פעולה זו קובעת שאחרי שיסיים המכשיר למדוד את ארבע הדוגמאות המסומנות יבצע פעולה "Stop" (כלומר, במקרה שלך יצפץ).

11. הכנס שמות לדוגמאות בtab : "Labels" בין כל מדידה למדידה יש להכניס מדידת מים מזוקקים.

12. לפני תחילת הנסיון יש לקבל הסבר מן המדריך על כמות אצטילן מינימלית ומכסימלית וקריאת מדיד לחץ האצטילן. תכנן חמש מדידות בין הערך המינימלי למכסימלי. לאחר כל שינוי של ברז האצטילן יש לבצע מדידת בליעת רקע חדשה.

13. א. לצורך התחלת הנסיון לחץ "Start". במסך "Analysis Checklist" בדוק נתונים תואמים ולחץ OK. המתן לקבלת מסך "Prepare for Instrument Zero" – עליך להוציא את הצינור מתוך מים מזוקקים ולהשאיר אותו פתוח לאוויר (לצורך איפוס קריאת המכשיר) – לחץ OK.

ב. אחרי זה יבקש המחשב להכניס את התמיסות – "Present Solution Ca 1 water". כתמיסה ראשונה יש להכניס מים מזוקקים – כדי שישמשו לבדיקת בליעת הרקע. ג. אחרי מדידת התמיסה הראשונה (מים מזוקקים), תתבקש להכניס תמיסה שנייה. עתה יש להכניס את תמיסת הסידן 5ppm שהכנת.

14. שנה את זרימת האצטילן ומדוד שוב מים מזוקקים ולאחר מכן את תמיסת הסידן. המשך באותה השיטה עד לסיום המדידות.

15. בסיום המדידה יופיע המסך "Autorun Completed" והמכשיר יצפץ – לחץ OK. - התבונן במסך הנתונים המתקבלים. במשבצות של הדוגמאות שכבר עברו את הבדיקה יהיה כתוב "UNCAL".

16. כדי לראות את ערכי הבליעה במשבצות של הדוגמאות לחץ על "Options" בשורה העליונה על המסך וברשימה שתופיע בחר ב- Worksheet וב- Show in ABS/Intensity. ניתן לביצוע גם על ידי לחצן ימני על UNCAL תוך כדי המדידה.

17. אחרי שמרת וסגרת את ה- Worksheet שלך לחץ על כפתור "Reports" ובחר ב- Worksheet שלך מתוך הרשימה. לחץ Next פעמיים. בתוך דף "Settings" קבע פרמטרים שיופיעו בהדפסה :

Tab "Settings": "Solution Data": Mean Absorbance, %RSD

לחץ Next עוד הפעם ואחרי זה לחץ "Print Report" אחרי שקיבלת הדפס לחץ "Close" ועבור לניסוי הבא.

יש להציג בצורה גראפית את השינויים בבליעה בעקבות השינוי ביחס המחזר/מחמצן בלהבה, ולרשום מסקנותיך.
יש לחזור על ניסוי זה עם נחושת, להשוות את התוצאות שקיבלת עם הסידן ולדון בתוצאות.

בדיקות אנליטיות כמותיות

לחלק זה של הניסוי יש להכיר את שיטות הכיול על ידי גרף כיול ותוספות סטנדרטיות. מהם יתרונות וחסרונות כל שיטה ומתי נעדיף שיטה אחת על פני השניה. ניתן להביא מים מהבית למדידת ריכוז הסידן באזורים שונים.

א. קביעת ריכוז הסידן במי ברז (קשיות המים) על ידי גרף כיול:

לרשותך תמיסת Stock של סידן בריכוז 1000 ppm. עליך להכין תמיסות הבאות:

(1) איפוס – מים מזוקקים

(2) Ca 2.0 ppm

(3) Ca 4.0 ppm

(4) Ca 6.0 ppm

(5) Ca 8.0 ppm

(6) תמיסת נעלם – מי ברז מהולים פי 5.

1. לחץ על "worksheet", בתוכו "new", ובמסך שיפתח תן שם לקובץ (במשבצת "Name") ומספר הדוגמאות שברצונך לבצע (תן 3 – 4 דוגמאות כדי לבדוק את הדירות המכשיר) (משבצת "Samples"). לחץ OK.

2. לחץ על "Add methods" ובחר ב-Ca. לחץ OK.

3. לחץ על "Edit methods" ותוך מעבר בין דפים (ע"י לחיצה על Next) עשה שינויים נדרשים בפרמטרים שונים כגון:

Page "Type/Mode":

- a) "Sampling Mode" – Manual
- b) "Instrument Mode" – Absorbance
- c) "Flame Type" – Air/Acetylene

Page "Measurement":

- a) "Measurement Mode" – Integration
- b) "Calibration Mode" – Concentration

Page "Optical":

- a) "Lamp Position" – 1 according to the available lamp position.
b) "Lamp Current" - according to recommended current written on the lamp base
- סובב את הידית כך שהיא תצביע על מנורת הסידן

Page "Standards":

- a) "Standards" – Enter Standard Concentrations
- עכשיו עליך להכניס ריכוזים של סטנדרטים שהכנת. ניתן לשנות (להכניס) ריכוזים של סטנדרטים ע"י לחיצה על ערך של סטנדרט והכנסת ערך חדש. יש להכניס ערכי ריכוזים בסדר עולה (אין צורך להכניס ריכוז 0 עבור מים מזוקקים – יש להתחיל מריכוזי הסטנדרטים).
- b) "Upper valid concentration": Enter top standard + 2
4. בתוך דף "Cookbook" תוכל לראות קווי בליעה/פליטה (ב- "Notes") ועקומת כיוול שאתה אמור לקבל (ב- "Graph").
5. אחרי שהזנת את הפרמטרים הנדרשים לחץ OK.
6. א. לחץ על "Edit Sequence Parameters..." ובתוך תפריט "Controls" לחץ לחיצה על שורה מתחת ל- Start with בתוך הרשימה שתופיע בחר ב- Calibration.
ב. כמו כן לחץ לחיצה על שורה מתחת ל- At End ובחר ב- Stop.
ג. עבור לדף הבא ע"י לחיצה על "Next" ובתוך "Sequence Completion" סמן "V" על "Leave Flame On". לחץ OK.
7. לחץ על tab: "Labels" ותן שמות לדוגמאות (tap 1, tap 2,...) ולא לגרף הכיול.
8. לחץ Analysis - יפתח מסך העבודה.
9. א. לחץ על "Optimize". במסך שיפתח לחץ OK.
ב. במסך "Analysis checklist" וודא נתונים תואמים – לחץ OK.
ג. המתן להופעת קריאה ועמוד ירוק על המסך. לחץ "Optimize Lamp" ועשה אופטימיזציה של המנורה האטומית (ע"י סיבוב של שני כפתורים שחורים בתחתית המנורה).
- ד. לאחר וידוא שהלהבה כבויה, בנוכחות המדריך הורד מכסה של תא המבער וכוון את המבער באמצעות הכרטיס. חזור את המכסה למקומו והדלק את הלהבה בנוכחות המדריך.
- ה. אחרי זה לחץ "Optimize Signal" – המתן להופעת הקריאה על המסך. הוצא את הצינור שמביא תמיסה אל המבער מתוך מים מזוקקים ולחץ "Inst. Zero". המתן לאיפוס הקריאה.

1. הכנס את הצינור לתוך בקבוק עם תמיסת סידן 6 ppm נסה לקבל קריאה מקסימלית ע"י סיבוב הידית מתחת לצינור השולטת על קצב שאיבת התמיסה ועל ידי שימוש בידע שצברת בחלקיו הקודמים של הניסוי. (רמז- להבה מחמצנת/ מחזרת).

10. לחץ OK. הוצא את הצינורית מהתמיסה והכנס למים מזוקקים.

במסך "Optimize" לחץ "Cancel".

11. אם הדוגמאות שלך לא צבועות בחום, לחץ על כפתור "Select" ובמסך שיופיע בחר עם ה"מרקר" את דוגמאות שברצונך למדוד (לחיצה עם כפתור שמאלי של עכבר על משבצת של דוגמא) כך שמשבצות של דוגמאות שבחרת יהיו בצבע חום ושאר המשבצות בצבע לבן.

- לחזור לקונפיגורציה הקודמת של המסכים ניתן ע"י לחיצה שניה על כפתור "Select".

12. א. לצורך תחילת הניסוי לחץ "Start". במסך "Analysis Checklist" בדוק נתונים תואמים ולחץ OK. המתן לקבלת מסך "Prepare for Instrument Zero" – עליך להוציא את הצינור מתוך מים מזוקקים ולהשאיר אותו פתוח לאוויר – לחץ OK. ותהיה מוכן ל-CAL ZERO.

ב. המתן לסיום האיפוס והכנס את הצינור לתוך בקבוק עם מים מזוקקים.

ג. אחרי זה יבקש המחשב להכניס תמיסת סטנדרט ראשונה – עליך לפעול בצורה דומה. (יש להכניס תמיסות סטנדרטים בסדר עולה של ריכוז, כפי שהכנסתם בדף התמיסות הסטנדרטיות). שמות וריכוזים בטבלה למטה מימין.

ד. אחרי שסיים המכשיר למדוד סטנדרטים ישרטט המחשב במסך האמצעי מצד ימין עקומת כיוול.

ה. אחרי זה יבקש המכשיר להכניס את הדוגמא שלך: "Present Solution tap 1" – עליך להכניס תמיסת נעלם שלך וללחוץ "Read".

- מכיוון שסימנת מספר דוגמאות ימשיך המחשב לבקש דוגמאות נוספות – עליך להכניס את תמיסת נעלם (כדי לבדוק הדירות המכשיר).

- במשבצות של הדוגמאות שכבר עברו את הבדיקה יהיה כתוב ערך של ריכוז הסידן בנעלם אשר המחשב חישב מתוך עקומת כיוול.

אם מופיע ליד הדוגמאות שלך: "UNCAL", המכשיר לא מצליח להתאים את הבליעה של הדוגמא לגרף הכיוול ואין להמשיך בניסוי ללא פתרון בעיה זו.

13. בסיום המדידה יופיע המסך "Autorun Completed" והמכשיר יצפצף. לחץ OK.

14. אחרי ששמרת וסגרת את ה- Worksheet שלך לחץ על כפתור "Reports" ובחר ב-

Worksheet שלך מתוך הרשימה. לחץ Next פעמיים. בתוך דף "Settings" קבע פרמטרים

שיופיעו בהדפסה:

Tab "Settings": "Solution Data": Mean Absorbance, Concentration, %RSD

"Report Content": Standards ; "Calibration Graphs": Report

לחץ Next עוד הפעם ואחרי זה לחץ "Print Report" אחרי שקיבלת הדפס לחץ "Close" ועבור לניסוי הבא.

- דווח את ריכוז הסידן בתמיסת נעלם. הערך שגיאת המדידה. מה דרגת "קושיות" המים?

ב. קביעת ריכוז אשלגן במי עדן בשיטת Standard Addition

מה שיטת המדידה (בליעה או פליטה) המועדפת עליך? מדוע?
עליך להכין תמיסות הבאות (בבקבוקים של 50 מ"ל):

(1) תמיסת איפוס – מים מזוקקים

(2) מי עדן

(3) מי עדן + K^+ 1ppm

(4) מי עדן + K^+ 2ppm

(5) מי עדן + K^+ 3ppm

1. לחץ על "worksheet", בתוכו "new", ובמסך שיפתח תן שם לקובץ (במשבצת "Name") ומספר הדוגמאות שברצונך לבצע (לפחות 4 - במשבצת "Samples"). לחץ OK.

2. לחץ על "Add methods" ובחר ב-K. לחץ OK.

3. לחץ על "Edit methods" ותוך מעבר בין דפים (ע"י לחיצה על Next) עשה שינויים נדרשים בפרמטרים שונים כגון:

Page "Type/Mode":

a) "Sampling Mode" – Manual

b) "Instrument Mode" – Emission

c) "Flame Type" – Air/Acetylene

Page "Measurement":

a) "Measurement Mode" – Integration

b) "Calibration Mode" – Concentration

- בניסיון זה אין צורך לשנות ריכוזים של תמיסות סטנדרטיות, לכן השאר אותם ללא שינוי.

4. בתוך "Cookbook" תוכל לראות קווי בליעה/פליטה (ב-"Notes") ועקומת כיוול שאתה

אמור לקבל (ב-"Graph").

5. אחרי שנתת פרמטרים נדרשים לחץ OK.
6. א. לחץ "Edit Sequence Parameters..." ובתוך דף "Controls" לחץ לחיצה על שורה מתחת ל- Start with בתוך הרשימה שתופיע בחר ב- "Cal Zero" (מכיוון שהניסיון הנו בשיטת Standard Addition אין אפשרות להשתמש ב- "Calibration").
- ב. כמו כן לחץ לחיצה על שורה מתחת ל- At End ובחר ב- Stop.
- ג. עבור לדף הבא "Options" ע"י לחיצה על Next. בתוך "Sequence Completion" סמן "V" ליד "Leave Flame On". לחץ OK.
7. לחץ על tab ה: "Analysis" - הלהבה צריכה להישאר דולקת מהניסיון הקודם, אם לא - הדלק להבה ע"י לחיצה ארוכה של 3 – 5 שניות על כפתור שחור מצד שמאל של המכשיר שלידו מצוירת להבה.
8. א. לחץ "Optimize" - במסך שבו הנך מתבקש לבחור שיטה לחץ OK.
- ב. במידה ויופיע המסך "Analysis Checklist" וודא נתונים תואמים ולחץ OK.
- ג. המתן להופעת קריאה בסביבות אפס על המסך. אחרי זה הוצא את הצינור שמביא תמיסה אל המבער מתוך מים מזוקקים ולחץ "Inst. Zero". המתן לאיפוס הקריאה.
- ד. לחץ "Emission Setup" – יופיע המסך "Present Top Standard for...", הכנס את הצינור לתוך בקבוק עם תמיסת אשלגן עם הריכוז הגבוה ביותר ולחץ OK. נסה לקבל קריאה מקסימלית ע"י סיבוב הידית מתחת לצינור השולטת על קצב שאיבת התמיסה, וכפתור אצטילן.
9. לחץ OK. הוצא את הצינורית מהתמיסה והכנס אותה למים מזוקקים. במסך "Optimize" לחץ "Cancel".
10. אם הדוגמאות שלך לא צבועות בחום, לחץ על כפתור "Select" ובמסך שיופיע בחר עם ה"מרקר" את הדוגמאות אותן אתה רוצה למדוד. (לחיצה עם כפתור שמאלי של עכבר על משבצת של דוגמא) כך שמשבצות של דוגמאות שבחרת יהיו בצבע חום ושאר המשבצות בצבע לבן.
- לחזור לקונפיגורציה הקודמת של המסכים ניתן ע"י לחיצה שניה על כפתור "Select".
11. א. לחץ "Start". במסך "Analysis Checklist" בדוק נתונים תואמים ולחץ OK. המתן לקבלת מסך "Present Top Standard for..." - הכנס את הצינור לתוך בקבוק שבו ריכוז האשלגן גבוה ביותר. לחץ OK.

ב. אחרי זה יופיע המסך "Remove Standard" – הוצא את הצינור מתוך הבקבוק עם תמיסת סטנדרט והשאר אותו פתוח לאוויר, לחץ OK. אחרי שלחצת OK המכשיר יבצע פעולת "Instrument Zero" באופן אוטומטי.

ג. הצג תמיסת "Calibration Zero" (מים מזוקקים) – הכנס את הצינור לתוך מים מזוקקים ולחץ "Read".

ד. המתן להופעת המסך "Present Solution Sample 001" – עליך להכניס תמיסת מי עדן וללחוץ "Read". אחרי זה יבקש המחשב להכניס את שאר הדוגמאות – עליך לפעול בצורה דומה.

12. א. במשבצות של דוגמאות שכבר עברו את המדידה יהיה כתוב "Uncal".

ב. בסיום המדידה יופיע המסך "Autorun Completed" והמכשיר יצפץ – לחץ OK.

ג. כדי לראות את ערכי הפליטה של התמיסות עליך ללחוץ "Options" בשורה העליונה על המסך, בתוך הרשימה לבחור ב- Worksheet ובתוכו – "Show in ABS/Intensity".

13. אחרי ששמרת וסגרת את ה- Worksheet שלך לחץ על כפתור "Reports" ובחר ב- Worksheet שלך מתוך הרשימה. לחץ Next פעמיים. בתוך דף "Settings" קבע פרמטרים שיופיעו בהדפסה:

Tab "Settings": "Solution Data": Mean Absorbance, %RSD

לחץ Next עוד הפעם ואחרי זה לחץ "Print Report" אחרי שקיבלת הדפס לחץ "Close" ועבור לניסוי הבא.

- בנה גרף של פליטה כפונקציה של ריכוז נוסף של אשלגן וחשב ממנו את ריכוז הנעלם. האם הריכוז שחישבתם תואם את הרשום על הבקבוק? האם הייתם רוצים להשוות את שיטת ה- Standard Addition עם גרף כיוול רגיל? מה חסרונותיה ויתרונותיה?

ג. קביעת כמות הסיזן בטבליות Centrum Multi-Vitamins

לרשותך אבקת טבליות. (משקל הטבליה בערך 1.5g). הטבליות מכילות את הסיזן בצורת Calcium Phosphate.

1. הכנת תמיסת נעלם:

- שקול בערך 0.5g של אבקת הטבליה לתוך בקבוק מדידה של 100ml
- הוסיף 20ml של חומצה HCl מרוכזת 32% ו 10ml תמיסת La 5% ומהול עד הקו עם מים מזוקקים. יש לעבוד עם חומצה מרוכזת אך ורק במנדף (הנמצא ליד מכשיר HPLC) ועם ציוד מגן מלא, ובצע סוניקציה.

- סנן 5 מ"ל של התמיסה בעזרת פילטר ומזרק.
באפשרותך קיימות שתי שיטות מדידה: שיטת תוספות סטנדרטיות ושיטת עקומת כיוול.
עליך לבחור באחת השיטות הנ"ל למדידה. איזה שיטה מועדפת בניסיון זה?

2. שיטת עקומת כיוול:

- הכן 4 תמיסות של סידן בתחום ריכוזים 1-6 ppm בתוך בקבוקי מדידה של 50 ml לכל בקבוק הוסיף 5 ml של תמיסה La-5% וחומצה HCl כך שריכוזה יהיה 0.032%, כמו כן הכן תמיסה של לנתנום בריכוז 0.5% וחומצה בריכוז 0.032% במים מזוקקים (תמיסה זו תשמש תמיסת איפוס).

- בצע מדידות. עליך לפעול באותה צורה כמו שעשית במדידת נחושת במים.

1. לחץ על "worksheet", בתוכו "new", ובמסך שיפתח תן שם לקובץ (במשבצת "Name") ומספר הדוגמאות שברצונך לבצע (משבצת "Samples"). לחץ OK.

2. לחץ על "Add methods" ובחר ב-Ca. לחץ OK.

3. לחץ על "Edit methods" ותוך מעבר בין דפים (ע"י לחיצה על Next) עשה שינויים נדרשים בפרמטרים שונים כגון:

Page "Type/Mode":

- a) "Sampling Mode" – Manual
- b) "Instrument Mode" – Absorbance
- c) "Flame Type" – Air/Acetylene

Page "Measurement":

- a) "Measurement Mode" – Integration
- b) "Calibration Mode" – Concentration

Page "Optical":

- a) "Lamp Position" – 1 according to the available lamp position.
 - b) "Lamp Current" - according to recommended current written on the lamp base
- לא לשכוח לסובב את הידית כך שהיא תצביע על מנורת הסיידן.

Page "Standards":

- a) "Standards" – Enter Standard Concentrations (check "upper valid conc.")
- עכשיו עליך להכניס ריכוזים של סטנדרטים שהכנת. לשנות (להכניס) ריכוזים של סטנדרטים ניתן ע"י לחיצה על ערך של סטנדרט והכנסת ערך חדש. יש להכניס סטנדרטים בסדר עולה של ריכוז.

- b) "Upper valid concentration": Enter top standard + 2

4. בתוך "Cookbook" תוכל לראות קווי בליעה/פליטה (ב- "Notes") ועקומת כיוול שאתה אמור לקבל (ב- "Graph").
5. אחרי שהזנת פרמטרים נדרשים לחץ OK.
6. א. לחץ "Edit Sequence Parameters..." ובתוך דף "Controls" לחץ לחיצה על שורה מתחת ל- Start with בתוך הרשימה שתופיע בחר ב- Calibration.
 ב. כמו כן לחץ לחיצה על שורה מתחת ל- At End ובחר ב- Stop.
 ג. עבור לדף הבא "Options" ובתוך "Sequence Completion" סמן "V" ליד "Leave Flame On" לחץ OK.
7. לחץ "Analysis" בשורה שניה מלמעלה על המסך – יפתח מסך העבודה.
8. א. לחץ "Optimize" - במסך שבו הנך מתבקש לבחור שיטה לחץ OK.
 ב. ויפיע המסך "Analysis checklist" וודא נתונים תואמים - לחץ OK.
 ג. המתן להופעת קריאה ועמוד ירוק על המסך. לחץ "Optimize Lamp" ובצע אופטימיזציה של המנורה האטומית (ע"י סיבוב של שני כפתורים שחורים בתחתית המנורה).
- ד. לאחר וידוא שהלהבה כבויה, בנוכחות המדריך הורד מכסה של תא המבער וכוון את המבער באמצעות הכרטיס. החזר את המכסה למקומו והדלק את הלהבה בנוכחות המדריך.
- ה. לחץ "Optimize Signal" והמתן להופעת קריאה על המסך. הוצא את הצינור שמביא תמיסה אל המבער מתוך מים מזוקקים ולחץ "Inst. Zero". המתן לאיפוס הקריאה.
- ו. הכנס את הצינור לתוך בקבוק עם תמיסת סידן בריכוז הגבוה ביותר. המתן להופעת קריאה ועמוד כחול על המסך. נסה לקבל קריאה מקסימלית ע"י סיבוב הידית מתחת לצינור השולטת על קצב שאיבת התמיסה.
9. לחץ OK. במסך "Optimize" שיפתח, לחץ "Cancel".
10. אם הדוגמאות שלך לא צבועות בחום, לחץ על כפתור "Select" ובמסך שיופיע בחר עם ה"מרקר" את הדוגמאות שברצונך למדוד (לחיצה עם כפתור שמאלי של עכבר על משבצת של דוגמא), כך שמשבצות של דוגמאות שבחרת יהיו בצבע חום ושאר המשבצות בצבע לבן.
 - לחזור לקונפיגורציה הקודמת של המסכים ניתן ע"י לחיצה שניה על כפתור "Select".
11. א. לחץ "Start". במסך "Analysis Checklist" בדוק נתונים תואמים ולחץ OK. המתן לקבלת מסך "Prepare for Instrument Zero" – עליך להוציא את הצינור מתוך מים מזוקקים ולהשאיר אותו פתוח לאוויר – לחץ OK. ותהיה מוכן ל-CAL ZERO.

ב. המתן לסיום האיפוס והכנס את הצינור לתוך בקבוק עם תמיסת La 0.5% וחומצה 0.032% בתוך מים מזוקקים.

ג. אחרי זה יבקש המחשב להכניס תמיסת סטנדרט ראשונה – עליך לפעול בצורה דומה. (יש להכניס תמיסות סטנדרטים בסדר עולה של ריכוז). אחרי שסיים המכשיר למדוד סטנדרטים ישרטט המחשב במסך האמצעי מצד ימין עקומת כיוול.

ד. אחרי זה יבקש המכשיר להכניס את הדוגמא שלך: "Present Solution Sample 001" – עליך להכניס תמיסת נעלם שלך וללחוץ "Read".

- במשבצות של הדוגמאות שכבר עברו את הבדיקה יהיה כתוב ערך של ריכוז סידן בנעלם אשר המחשב חישב מתוך עקומת הכיוול.

12. בסיום המדידה יופיע המסך "Autorun Completed" והמכשיר יצפצף – לחץ OK.

13. אחרי ששמרת וסגרת את ה- Worksheet שלך לחץ על כפתור "Reports" ובחר ב- Worksheet שלך מתוך הרשימה. לחץ Next פעמיים. בתוך דף "Settings" קבע פרמטרים שיופיעו בהדפסה. לחץ Next עוד הפעם ואחרי זה לחץ "Print Report" אחרי שקיבלת הדפס לחץ "Close".

- דווח את כמות הסידן בטבליה.

- הערך את שגיאת המדידה ואת גורמי השגיאה.

3. שיטת הוספות סטנדרטיות:

עליך להכין תמיסות הבאות:

(1 תמיסת נעלם (מסעיף 1)

(2 תמיסת La 0.5% + HCl 0.032% בתוך מים מזוקקים (תמיסה זו תשמש תמיסת איפוס – Calibration Zero).

(3 תמיסת נעלם + Ca^{2+} 1ppm

(4 תמיסת נעלם + Ca^{2+} 2ppm

(5 תמיסת נעלם + Ca^{2+} 3ppm

(6 תמיסת נעלם + Ca^{2+} 4ppm

1. לחץ על "worksheet", בתוכו "new", ובמסך שיפתח תן שם לקובץ (במשבצת "Name") ומספר הדוגמאות שברצונך לבצע (מספר הדוגמאות צריך להיות לפחות 5) (משבצת "Samples"). לחץ OK.

2. לחץ על "Add methods" ובחר ב-Ca. לחץ OK.

3. לחץ על "Edit methods" ותוך מעבר בין דפים (ע"י לחיצה על Next) עשה שינויים נדרשים בפרמטרים שונים כגון:

Page "Type/Mode":

- a) "Sampling Mode" – Manual
- b) "Instrument Mode" – Absorbance
- c) "Flame Type" – Air/Acetylene

Page "Measurement":

- "Measurement Mode" – Integration
- "Calibration Mode" – Concentration

Page "Optical":

- a) "Lamp Position" – 1 according to the available lamp position.
 - b) "Lamp Current" - according to recommended current written on the lamp base
- לא לשכוח להעביר ידית כך שהיא תצביע על מנורת סידן.

"Standards" – Enter Standard Concentrations

4. בתוך "Cookbook" תוכל לראות קווי בליעה/פליטה (ב- "Notes") ועקומת כיוול שאתה אמור לקבל (ב- "Graph").

5. אחרי שנתת פרמטרים נדרשים לחץ OK.

6. א. לחץ "Edit Sequence Parameters..." ובתוך דף "Control" לחץ לחיצה על שורה מתחת ל- Start with בתוך הרשימה שתופיע בחר ב- "Cal Zero".

ב. לחץ לחיצה על שורה מתחת ל- At End ובחר ב- "Stop".

ג. עבור לדף הבא "Options" ע"י לחיצה על Next ובתוך "Sequence Completion" סמן "V" ליד "Leave Flame On". לחץ OK.

7. לחץ "Analysis" בשורה שניה מלמעלה על המסך – יפתח מסך העבודה.

8. א. לחץ "Optimize" - במסך שבו הנך מתבקש לבחור שיטה לחץ OK.

ב. במידה ויופיע המסך שבו הנך מתבקש לסובב ידית השולטת על המנורות למצב "1" ו/או לבדוק זרימות הגזים אל המבער - לחץ OK.

ג. המתן להופעת קריאה ועמוד ירוק על המסך. לחץ "Optimize Lamp" ועשה אופטימיזציה של המנורה האטומית (ע"י סיבוב של שני כפתורים שחורים בתחתית המנורה).

ד. לאחר וידוא שהלהבה כבויה, בנוכחות המדריך הורד מכסה של תא המבער וכוון את המבער באמצעות הכרטיס. החזר את המכסה למקומו והדלק את הלהבה בנוכחות המדריך.

ה. לחץ "Optimize Signal" והמתן להופעת קריאה על המסך. הוצא את הצינור שמביא תמיסה אל המבער מתוך מים מזוקקים ולחץ "Inst. Zero". המתן לאיפוס הקריאה.
ו. הכנס את הצינור לתוך בקבוק עם תמיסת סידן בריכוז הגבוה ביותר. המתן להופעת קריאה ועמוד כחול על המסך. נסה לקבל קריאה מקסימלית ע"י סיבוב הידית מתחת לצינור השולטת על קצב שאיבת התמיסה.

9. לחץ OK. במסך "Optimize" לחץ "Cancel".

10. אם הדוגמאות שלך לא צבועות בחום, לחץ על כפתור "Select" ובמסך שיופיע בחר עם ה"מרקר" את הדוגמאות אשר ברצונך למדוד (לחיצה עם כפתור שמאלי של עכבר על משבצת של דוגמא) כך שמשבצות של דוגמאות שבחרת יהיו בצבע חום ושאר המשבצות בצבע לבן.

- לחזור לקונפיגורציה הקודמת של המסכים ניתן ע"י לחיצה שניה על כפתור "Select".

11. א. לחץ "Start". במסך "Analysis Checklist" בדוק נתונים תואמים ולחץ OK. המתן לקבלת מסך "Prepare for Instrument Zero" – עליך להוציא את הצינור מתוך מים מזוקקים ולהשאיר אותו פתוח לאוויר – לחץ OK. ותהיה מוכן ל CAL ZERO.
ב. המתן לסיום האיפוס והכנס את הצינור לתוך בקבוק עם תמיסת 0.5% La וחומצה 0.032% בתוך מים מזוקקים.

ג. אחרי זה יבקש המחשב להכניס דוגמא ראשונה – עליך לפעול בצורה דומה.

- במשבצות של הדוגמאות שכבר עברו מדידה יהיה כתוב "Uncal".

- ערכי הבליעה של הדוגמאות ניתן לראות בעזרת פעולה הבאה: לחץ "Options" בשורה העליונה, מתוך הרשימה בחר "Worksheet" ובתוכו – "Show in ABS/Intensity".

12. בסיום המדידה יופיע המסך "Autorun Completed" והמכשיר יצפף – לחץ OK.

13. אחרי ששמרת וסגרת את ה- Worksheet שלך לחץ על כפתור "Reports" ובחר ב- Worksheet שלך מתוך הרשימה. לחץ Next פעמיים. בתוך דף "Select" קבע פרמטרים שיופיעו בהדפסה. לחץ Next פעם נוספת ואחרי זה לחץ "Print Report" אחרי שקיבלת הדפס לחץ "Close".

- שרטט גרף של בליעה כפונקציה של ריכוז נוסף של סידן וממנו חלץ את כמות הסידן בטבלה.

ד. (לא מבוצע במעבדה) חומרים נוספים בטבליית צנטרום (ודא כמויות מול האריזה).
רשום אלו חומרים נוספים ניתן למדוד במכשיר הקיים במעבדה. לאלו הפרעות אפשריות
אתה מצפה במדידות הללו?

Centrum Multi-Vitamins (average weight 1.56 g)

(Iu – relative unit, mg – milligram, mcg – microgram)

1. Vitamin A acetate 3500 Iu
2. Beta-caroten 1050 Iu
3. Vitamin E (as di-alpha-tocopheryl acetate) 30 Iu
4. Vitamin C (as ascorbic acid) 60 mg
5. Folic acid (as Folacin) 400 mcg
6. Vitamin B₁ (as Thiamine mononitrate) 1.5 mg
7. Vitamin B₂ (Riboflavin) 1.7 mg
8. Niacinamide 20 mg
9. Vitamin B₆ (as pyridoxine hydrochloride) 2 mg
10. Vitamin B₁₂ (cyanocobalamine) 6 mcg
11. Vitamin D₃ (Cholecalciferol) 400 Iu
12. Biotin 30 mcg
13. Pantothenic acid (as Calcium pantothenate) 10 mg
14. Vitamin K₁ (as Phytonadione) 25 mcg
15. Calcium (as dibasic calcium phosphate) 162 mg
16. Phosphorus (as dibasic calcium phosphate) 109 mg
17. Iodine (as potassium iodine) 150 mcg
18. Iron (as ferrous fumarate) 18 mg
19. Magnesium (as magnesium oxide) 100 mg
20. Copper (as cupric oxide) 2 mg
21. Zinc (as zinc oxide) 15 mg
22. Manganese (as manganese sulfate) 2 mg
23. Chromium (as chromium chloride) 120 mcg
24. Molybdenum (as sodium molybdate) 75 mcg

- 25. Selenium (as sodium selenate) 20 mcg
- 26. Silicium (as sodium silicate) 2 mcg
- 27. Stannum (as stannum chloride) 10 mcg
- 28. Vanadium (as sodium vanadate) 10 mcg
- 29. Nickel (as nickel sulfates) 5 mcg
- 30. Tin 10 mcg

בסוף יום העבודה:

1. אחרי שסיימת ניסיון כבה את הלהבה ע"י לחיצה על כפתור אדום בצד שמאל של המכשיר שלידו מצויר קו
2. סגור את ברז האצטילן.
3. כבה את המכשיר.
4. לחץ "Exit" במחשב ובמסך הנפתח לחץ OK.
5. כבה את השאיבה מעל המכשיר.

חלק ג

א. מדידת כמות ויטמין B12 בטבליית Solgar.

- לפניך אבקת טבליית B12 של חברת סולגאר. "טבליות למציצה 1000 מק"ג ויטמין B12".
1. בהתאם לסעיפי הניסוי הקודמים הסבר כיצד ניתן לקבוע את כמות הויטמין בטבליה והצע מערך ניסוי למדידתה. באיזו שיטה תעדיף להשתמש במדידותיך (פליטה/בליעה, גרף כיול/תוספות סטנדרטיות)?
 2. השווה את כמות הויטמין שקיבלת עם זו הרשומה על גבי הבקבוק.

ב. ניסוי אנליזה של מתכות

בחלק זה תשתמשו בחומצות חזקות ואלימות. על כן יש להקפיד שכל עבודה איתן תעשה במנף. יש להצטייד במשקפי מגן, חלוק מעבדה וכפפות. העבודה עם החומצות תבוצע בנוכחות כל הסטודנטים המשתתפים בניסוי וּבנוכחות המדריך. אין לבצע חלק זה ללא המדריך.

בניסוי זה נבצע אנליזה של מטבע.

שאלה: מהו ההרכב הכימי הצפוי למטבע? (שקל, 10 אגורות)

1. שקול מטבע והכנס אותו לארלנמאייר של 250 מ"ל.
2. לתוך הארלנמאייר הכנס כ-15 מ"ל חומצת HCl מרוכזת מהבקבוק הייעודי לכך. (יש להקפיד על סדר הוספת החומצות)
3. הוסף לארלנמאייר כ-25 מ"ל חומצת HNO₃ וצפה במתרחש מהבקבוק הייעודי לכך.

(אם מבצעים אנליזה לשקל, הכמויות הן 10 מ"ל HCl ו-30 מ"ל HNO₃.)

4. לאחר שהתגובה הסתיימה העבר את התמיסה שהתקבלה לבקבוק מדידה של 500 מ"ל ומהל אותה. (מה צבע התמיסה? מה את/ה מעריך שהתמיסה מכילה?)

באיזו שיטה נעדיף לבצע את המדידות שלנו? תנו הסבר מנומק.

א. הצע נסיון לאנליזה של החומרים הבאים במטבע:

ברזל, ניקל, נחושת, כרום.

ב. בצע מדידה.

ג. הדפס את תוצאות הניסוי.

ד. חשב את ריכוז המתכת המדוברת במטבע.

מדריך לביצוע כיול בשיטת התוספת הסטנדרטיות במכשיר ה ATOMIC ABSORPTION

1. לחץ על "worksheet", בתוכו "new", ובמסך שיפתח תן שם לקובץ (במשבצת "Name") ומספר הדוגמאות שברצונך לבצע (המספר צריך להיות לפחות 4 - משבצת "Samples"). לחץ OK.

2. לחץ על "Add methods" ובחר ביסוד אותו אתה מעוניין לבדוק. לחץ OK.

3. לחץ על "Edit methods" ותוך מעבר בין דפים (ע"י לחיצה על Next) עשה שינויים נדרשים בפרמטרים שונים כגון:

Page "Type/Mode":

- a) "Sampling Mode" – Manual
- b) "Instrument Mode" – absorption
- c) "Flame Type" – Air/Acetylene

Page "Measurement":

- a) "Measurement Mode" – Integration
- b) "Calibration Mode" – standard additions

Page "Standards":

- a) "Standards" – Enter Standard Concentrations: (אין צורך להכניס ריכוז אפס)
- b) "Lower and Upper limits" – 0.00 to 15.00 (מדוע לבחור תחום זה?)

4. בתוך "Cookbook" תוכל לראות קווי בליעה/פליטה (ב-"Notes") ועקומת כיול שאתה אמור לקבל (ב-"Graph").

5. אחרי שנתת פרמטרים נדרשים לחץ OK.

6. בחר ב tab המסומן כ: Labels ובצע את השינויים הבאים:

א. לחץ על השורה הראשונה של הדוגמאות. (כדי להכניס שינויים במקום זה).

ב. לחץ על: "solution type..." ובחר ב: "Reagent Blank".

שאלה: איזו תמיסה צריכה להיות תמיסה זו, ובאיזו תמיסה נשתמש?

ג. בחר ב: "insert" כדי להכניס את הסטנדרטים בשורות חדשות.

ד. חזור על שלבים א-ג כדי להכניס את התוספות הנוספות הוסף לפי התוספות שהכנסת קודם לכן. (התוספות מופיעות כ.. ADDITION 1, ADDITION 2) אין צורך להכניס את הדוגמא כתוספת 0.

ה. לחץ על "cancel" כדי לסגור את תיבת הדיאלוג.

7. בחר ב tab המסומן כ: "Develop".

א. לחץ "Edit Sequence Parameters..." ותחת הלשונית: "Controls" לחץ לחיצה על שורה מתחת ל- Start with. בתוך הרשימה שתופיע בחר ב- "solution" (למעשה הסטנדרטים מופיעים כדוגמאות).

ב. לחץ לחיצה על שורה מתחת ל- At End ובחר ב- Stop.

ג. עבור לדף הבא "Options" ע"י לחיצה על Next. בתוך "Sequence Completion" סמן "V" ליד "Leave Flame On". לחץ OK.

8. לחץ על tab המסומן כ: "Analysis".

אם יש צורך, הדלק את הלהבה ע"י לחיצה ארוכה של 3 – 5 שניות על כפתור הדלקת הלהבה שנמצא על המכשיר.

9. א. לחץ על: "Optimize". במסך שבו הנך מתבקש לבחור שיטה, לחץ OK.

ב. במידה ויופיע המסך "Analysis Checklist" שבו הנך מתבקש לסובב ידית של המנורות ו/או לקבוע זרימות של גזים, לחץ OK.

ג. המתן להופעת קריאה ועמוד ירוק על המסך. לחץ "Optimize Lamp" ועשה אופטימיזציה של המנורה האטומית (ע"י סיבוב של שני כפתורים שחורים בתחתית המנורה).

ד. כוון את המבער באמצעות הכרטיס אם יש צורך.

ה. לחץ על "Optimize Signal" והמתן להופעת קריאה על המסך. הוצא את הצינור שמביא תמיסה אל המבער מתוך מים מזוקקים ולחץ "Inst. Zero" המתן לאיפוס הקריאה.

ו. הכנס את הצינור לתוך בקבוק עם תמיסת הנעלם בריכוז הגבוה ביותר. המתן להופעת קריאה ועמוד כחול על המסך. נסה לקבל קריאה מכסימלית ע"י סיבוב הידית מתחת לצינור השולטת על קצב שאיבת התמיסה. יש לבצע הליך זה בזהירות מרבית וללא הפעלת כוח – כדי לא לשבור את צינורית הזכוכית העדינה המחוברת לידיית זו.

ז. לחץ OK. במסך "Optimize" שייפתח, לחץ "Cancel".

10. בחר בדוגמאות שלך עם המרקר (במידה והן כבר לא מופיעות בצבע חום). יש לשים לב שהדוגמא הראשונה (Reagent Blank) לחוצה וזאת כדי שהמכשיר יתחיל איתה.

11. לחץ "Start" ועקוב אחר ההוראות על המסך.

שים לב: אם בשלב מדידת הדוגמאות כתוב ליד הדוגמאות שנמדדו: "Uncal", הכוונה היא שהמערכת לא הצליחה לבנות עבורן גרף כיול – מה שמצביע על בעיה באחת או יותר מהתמיסות. אין להמשיך בניסוי ללא פתרון לבעיה זו. אם אין לך פתרון, קרא למדריך.

Ca

Calcium

A.W. 40.08

▼ Preparation of standard solutions

Recommended standard materials

Calcium carbonate CaCO₃

Solution technique

Dissolve 2.497 g of dried calcium carbonate in a minimum volume of 1:4 nitric acid. Dilute to 1 litre to give 1000 µg/mL Ca.

▼ Recommended instrument parameters

Atomic absorption

WORKING CONDITIONS (FIXED)

| | |
|---------------------|-------------------------------------|
| Lamp current | 10 mA |
| Fuel | acetylene |
| Support | nitrous oxide |
| Flame stoichiometry | reducing; red cone 1-1.5 cm high |

WORKING CONDITIONS (VARIABLE)

| Wavelength nm | Slit width nm | Optimum working range µg/mL |
|------------------|------------------|--------------------------------|
| 422.7 | 0.5 | 0.01-3 |
| 239.9 | 0.2 | 2-800 |

Flame emission

| | |
|------------|---------------|
| Wavelength | 422.7 nm |
| Slit width | 0.1 nm |
| Fuel | acetylene |
| Support | nitrous oxide |

Maximum intensity is obtained with an oxidizing nitrous oxide-acetylene flame (red cone 1 mm high).

▼ Interferences

Chemical interferences in the air-acetylene flame are pronounced and have been fairly well documented (1,2,3,4). These interferences which depress the calcium absorbance can be eliminated by the

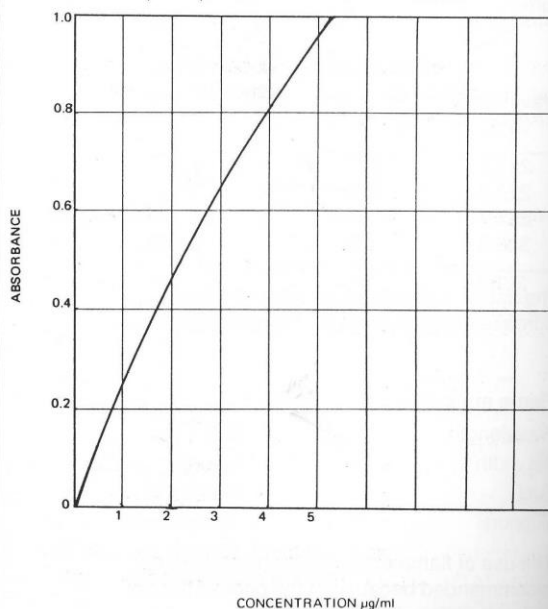
introduction of a releasing agent such as strontium (5000 µg/mL) or lanthanum (10000 µg/mL). Normally the addition of a releasing agent is used in conjunction with the practice of matching sample and standard solutions to obviate combined interference effects.

The presence of excess sodium or potassium causes 5-10% signal enhancement due to suppression of ionization.

In the nitrous oxide-acetylene flame the main interference is caused by ionization of calcium itself. This is overcome by the addition of a more readily ionizable element such as potassium (2000-5000 µg/mL).

▼ References

1. Adams, P.B. and Passmore, W.O., *Anal. Chem.*, **38**, (4), 630 (1966).
2. Ramakrishna, T.V., et al., *Anal. Chim. Acta.*, **40**, 347 (1968).
3. Hwang, J.Y., and Sandonato, L., *Anal. Chim. Acta.*, **48**, 188 (1969)



Standard conditions

Co

C o b a l t

A.W. 58.93

▼ Preparation of standard solutions

Recommended standard materials

Cobalt metal strip or wire 99.99%

Solution technique

Dissolve 1.000 g of metal in a minimum volume of 1:1 nitric acid and dilute to 1 litre to give 1000 µg/mL Co.

▼ Recommended instrument parameters

Atomic absorption

WORKING CONDITIONS (FIXED)

| | |
|---------------------|-----------|
| Lamp current | 7 mA |
| Fuel | acetylene |
| Support | air |
| Flame stoichiometry | oxidizing |

WORKING CONDITIONS (VARIABLE)

| Wavelength nm | Slit width nm | Optimum working range µg/mL |
|------------------|------------------|--------------------------------|
| 240.7 | 0.2 | 0.05-15 |
| 304.4 | 0.5 | 1-200 |
| 346.6 | 0.2 | 2-500 |
| 347.4 | 0.2 | 4-1000 |
| 391.0 | 0.2 | 150-30000 |

Flame emission

| | |
|------------|---------------|
| Wavelength | 345.4 nm |
| Slit width | 0.1 nm |
| Fuel | acetylene |
| Support | nitrous oxide |

▼ Interferences

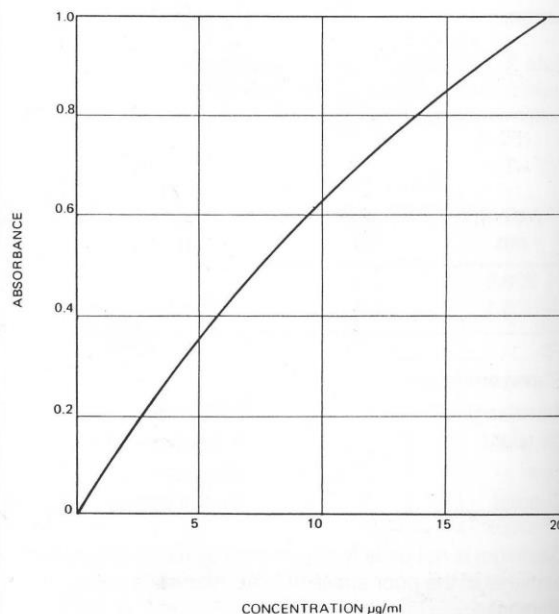
Few interferences have been observed for cobalt in an air-acetylene flame.

It has been reported that nickel levels in excess of 1500 µg/mL cause severe depression of about 50%.

This interference can be avoided by diluting solutions to less than 1500 µg/mL Ni and using the nitrous oxide-acetylene flame.

▼ References

1. Ginzberg, V.L. and Satarina, G.I., *Zhv Anal. Chem.*, **21**, 5, 593 (1966).



Standard conditions

Chromium

Cr

A.W. 52.00

▼ Preparation of standard solutions

Recommended standard materials

Chromium metal strip or wire 99.99%
 Potassium Dichromate A.R. Grade $K_2Cr_2O_7$

Solution technique

Dissolve 1.000 g of chromium metal in 1:1 hydrochloric acid with gentle heating. Cool and dilute to 1 litre to give 1000 $\mu\text{g/mL}$ Cr.

▼ Recommended instrument parameters

Atomic absorption

WORKING CONDITIONS (FIXED)

Lamp current 7 mA
 Fuel acetylene
 Support air
 Flame stoichiometry reducing

WORKING CONDITIONS (VARIABLE)

| Wavelength nm | Slit width nm | Optimum working range $\mu\text{g/mL}$ |
|------------------|------------------|---|
| 357.9 | 0.2 | 0.06-15 |
| 425.4 | 0.2 | 0.4-40 |
| 428.9 | 0.5 | 1-100 |
| 520.8 | 0.2 | 20-2600 |
| 520.4 | 0.2 | 50-6000 |

Flame emission

Wavelength 425.4 nm
 Slit width 0.1 nm
 Fuel acetylene
 Support nitrous oxide

▼ Interferences

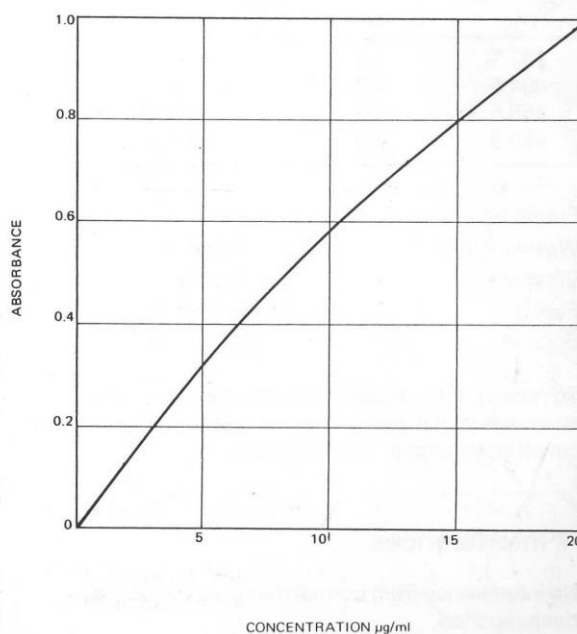
Cobalt, iron and nickel (particularly in the presence of perchloric acid) have been found to cause depression of chromium absorbance.

This can be overcome by the use of an oxidizing air-acetylene flame or preferably a nitrous oxide-acetylene flame. No ionization suppressant is necessary.

Several authors (1, 2, 3) have found interference in air-acetylene flame from copper, barium, aluminium, magnesium and calcium. The extent of interference is strongly dependent on the flame stoichiometry. Optimization of the stoichiometry or the use of the nitrous oxide-acetylene flame can eliminate the interference.

▼ References

1. Yanagisawa, M., Suzuhri, M. and Takreuchi, T., *Anal. Chim. Acta*, **52**, 386-389 (1970).
2. Wilson, L., *Anal. Chim. Acta*, **40**, 503-512 (1968).
3. Taylor, R.W., *American Laboratory*, November, 33-35 (1970).



Standard conditions

17

Copper

Cu

A.W. 63.54

▼ Preparation of standard solutions

Recommended standard materials

Copper metal strip or wire 99.99%

Solution technique

Dissolve 1.000 g of copper metal in a minimum volume of 1:1 nitric acid and dilute to 1 litre to give 1000 µg/mL Cu.

▼ Recommended instrument parameters

Atomic absorption

WORKING CONDITIONS (FIXED)

Lamp current 4 mA
 Fuel acetylene
 Support air
 Flame stoichiometry oxidizing

WORKING CONDITIONS (VARIABLE)

| Wavelength nm | Slit width nm | Optimum working range µg/mL |
|------------------|------------------|--------------------------------|
| 324.7 | 0.5 | 0.03-10 |
| 327.4 | 0.2 | 0.1-24 |
| 217.9 | 0.2 | 0.2-60 |
| 218.2 | 0.2 | 0.3-80 |
| 222.6 | 0.2 | 1-280 |
| 249.2 | 0.5 | 4-800 |
| 244.2 | 1.0 | 10-2000 |

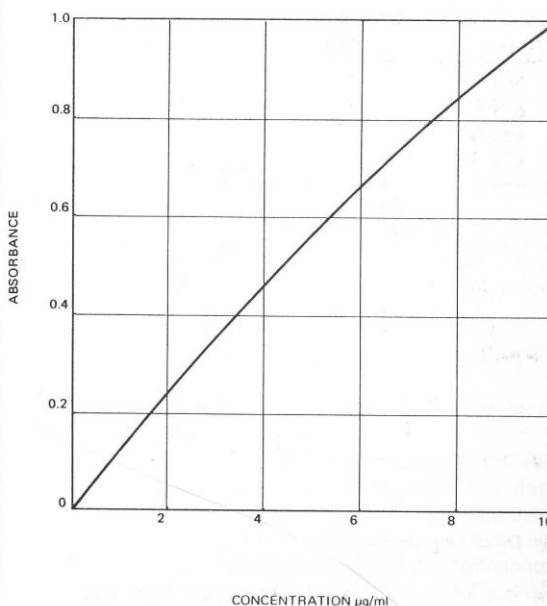
Flame emission

Wavelength 327.4 nm
 Slit width 0.1 nm
 Fuel acetylene
 Support nitrous oxide

▼ Interferences

No interferences have been reported for copper in the air-acetylene flame, but some depression has been

noted at high Zn/Cu ratios. This can be minimized by the use of a lean air-acetylene flame or a nitrous oxide-acetylene flame.



Standard conditions

19

I r o n

Fe

A.W. 55.85

▼ Preparation of standard solutions

Recommended standard materials

Iron metal strip or wire 99.9%

Solution technique

Dissolve 1.000 g of metal in 20 mL of 1:1 hydrochloric acid and dilute to 1 litre to give 1000 µg/mL Fe.

▼ Recommended instrument parameters

Atomic absorption

WORKING CONDITIONS (FIXED)

| | |
|---------------------|-----------|
| Lamp current | 5 mA |
| Fuel | acetylene |
| Support | air |
| Flame stoichiometry | oxidizing |

WORKING CONDITIONS (VARIABLE)

| Wavelength nm | Slit width nm | Optimum working range µg/mL |
|------------------|------------------|--------------------------------|
| 248.3 | 0.2 | 0.06-15 |
| 372.0 | 0.2 | 1-100 |
| 386.0 | 0.2 | 1.5-200 |
| 392.0 | 0.2 | 20-3200 |

Flame emission

| | |
|------------|-----------|
| Wavelength | 372.0 nm |
| Slit width | 0.1 nm |
| Fuel | acetylene |
| Support | air |

▼ Interferences

Interference from citric acid has been reported (1) to suppress the absorbance by up to 50% for a citric acid level of 200 µg/mL. The effect is not overcome by adjustment of flame stoichiometry.

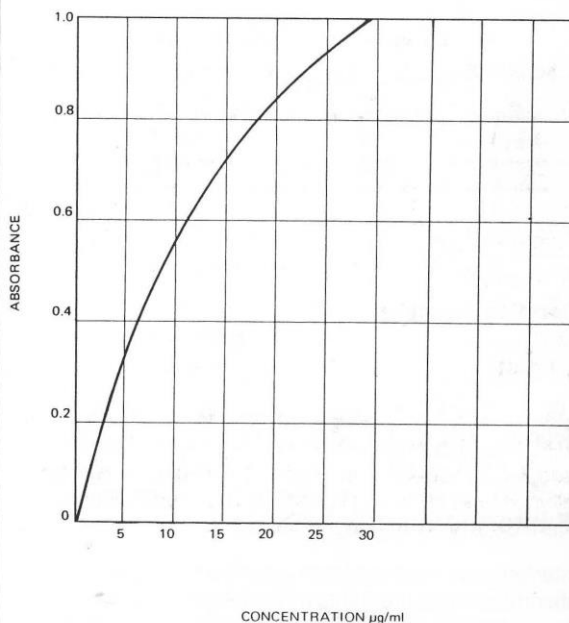
The interference has been minimized by measuring the absorbance in the presence of phosphoric acid. It is necessary to select an optimum burner height to gain maximum freedom from interference.

There is also some evidence that high sulfate concentrations have a slightly depressive effect on iron determination.

The use of a nitrous oxide-acetylene flame has been found to remove all interference.

▼ References

1. Roos, J.T.H. and Price, W.J., *Spectrochimica Acta*, **26B**, 279-284 (1971).
2. Van Loon, J.C. and Parissis, C.M., *Analyst*, **94**, 1057-1062 (1969).



Standard conditions

23

Potassium

K

A.W. 39.10

▼ Preparation of standard solutions

Recommended standard materials

Potassium chloride KCl A.R. Grade

Solution technique

Dissolve 1.907 g of dried potassium chloride in water and dilute to 1 litre to give 1000 µg/mL K.

▼ Recommended instrument parameters

Atomic absorption

WORKING CONDITIONS (FIXED)

| | |
|---------------------|-----------|
| Lamp current | 5 mA |
| Fuel (Note 1) | acetylene |
| Support | air |
| Flame stoichiometry | oxidizing |

Note 1: An air-acetylene flame is normally used because interferences are reduced and the signal/noise ratio is improved.

WORKING CONDITIONS (VARIABLE)

| Wavelength nm | Slit width nm | Optimum working range µg/mL |
|------------------|------------------|--------------------------------|
| 766.5 | 1.0 | 0.03-2.0 |
| 769.9 | 1.0 | 1-6.0 |
| 404.4 | 0.5 | 15-800 |

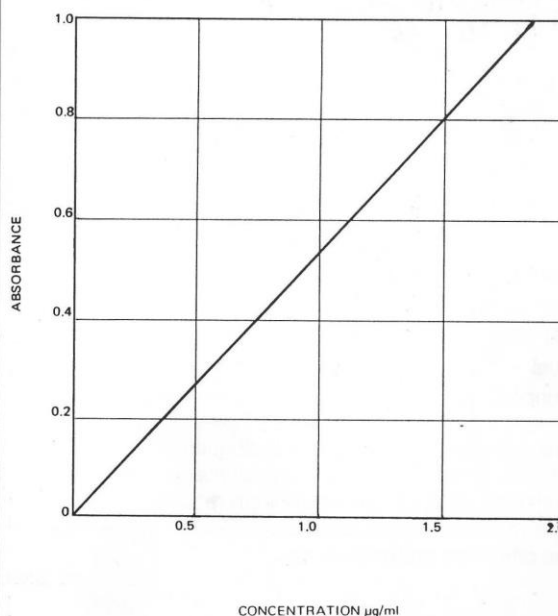
Flame emission

| | |
|------------|-----------|
| Wavelength | 766.5 nm |
| Slit width | 0.1 nm |
| Fuel | acetylene |
| Support | air |

The flame emission determination of potassium is limited by flame stability and by 'pick up' of potassium from the air and storage vessels. Air-acetylene can be used if an ionization suppressant is added.

▼ Interferences

Potassium is partially ionized in the air-acetylene flame. To suppress ionization, add cesium nitrate or chloride solution to give a final concentration of 1000 µg/mL cesium in all solutions including the blank. The purest available cesium compound must be used to avoid potassium contamination.



Standard conditions

33

L i t h i u m

Li

A.W. 6.939

▼ Preparation of standard solutions

Recommended standard materials

Lithium carbonate Li_2CO_3 99.9%

Solution technique

Dissolve 5.324 g of Li_2CO_3 in a minimum volume of 1:5 nitric acid and dilute to 1 litre to give 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Li.

▼ Recommended instrument parameters

Atomic absorption

WORKING CONDITIONS (FIXED)

| | |
|---------------------|-----------|
| Lamp current | 5 mA |
| Fuel | acetylene |
| Support | air |
| Flame stoichiometry | oxidizing |

WORKING CONDITIONS (VARIABLE)

| Wavelength nm | Slit width nm | Optimum working range $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
|------------------|------------------|--|
| 670.8 | 1.0 | 0.02-5 |
| 323.3 | 0.2 | 10-2000 |
| 610.4 | 0.5 | 200-32000 |

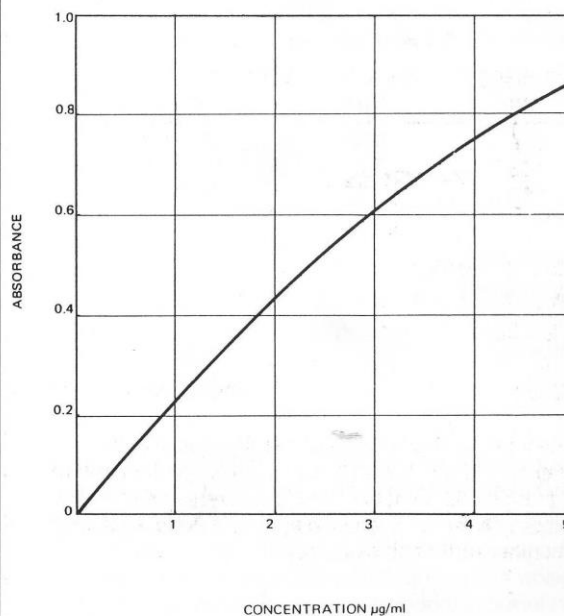
At 670.8 nm it is advisable to use a sharp cutoff filter to avoid second-order interference from the neon 335.5 nm line emitted by the lamp.

Flame emission

| | |
|------------|-----------|
| Wavelength | 670.8 nm |
| Slit width | 0.1 nm |
| Fuel | acetylene |
| Support | air |

▼ Interferences

In the air-acetylene flame, ionization is appreciable and it is necessary to match all solutions with respect to easily ionized elements such as Na, K, Rb, Cs, Ca, Sr and Ba. Ionization is suppressed if all solutions are made to contain 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ potassium. No chemical interferences are known.



Magnesium

A.W. 24.31

▼ Preparation of standard solutions

Recommended standard materials

Magnesium metal strip or wire 99.99%

Solution technique

Dissolve 1.000 g of magnesium in 1:4 nitric acid.
Dilute to 1 litre to give 1000 µg/mL Mg.

▼ Recommended instrument parameters

Atomic absorption

WORKING CONDITIONS (FIXED)

| | |
|---------------------|-----------|
| Lamp current | 4 mA |
| Fuel | acetylene |
| Support | air |
| Flame stoichiometry | oxidizing |

WORKING CONDITIONS (VARIABLE)

| Wavelength nm | Slit width nm | Optimum working range µg/mL |
|------------------|------------------|--------------------------------|
| 285.2 | 0.5 | 0.003-1 |
| 202.6 | 1.0 | 0.15-20 |

Note: Sensitivity is strongly dependent on lamp current.

Flame emission

| | |
|------------|---------------|
| Wavelength | 285.2 nm |
| Slit width | 0.1 nm |
| Fuel | acetylene |
| Support | nitrous oxide |

▼ Interferences

The most common interferences in air-acetylene can be overcome by the addition of a known excess of a releasing agent such as strontium (1000-5000 µg/mL)

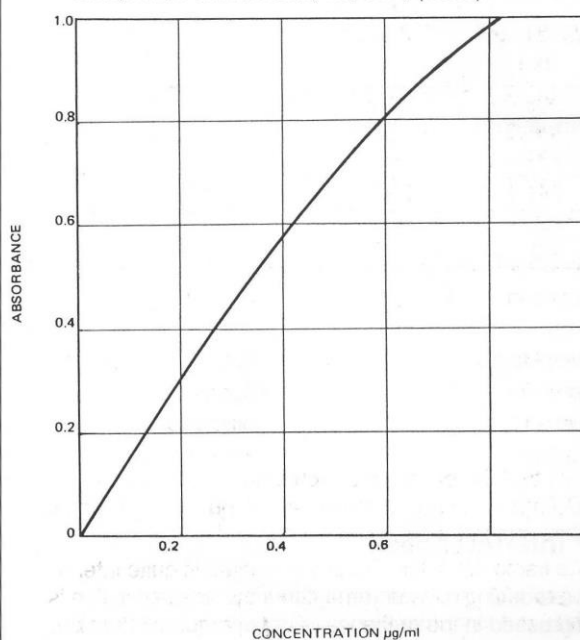
or lanthanum (10000 µg/mL). Solutions containing 200 µg/mL interferent in 0.4 µg/mL Mg show the following interference pattern:

| Mg Absorbance | Mg Absorbance |
|---------------|-----------------------|
| Al -24% | SiO ₃ -42% |
| Li +10% | CO ₃ -17% |
| Ti -16% | SeO ₃ -14% |
| Zr -9% | |

The nitrous oxide-acetylene flame shows no interference except a general absorbance enhancement of 15% by the alkali metals due to suppression of ionization.

▼ References

- Halls, D.J. and Townshend, A., *Anal. Chim. Acta*, **38**, 278 (1966).
- Firman, R.J., *Spectrochim. Acta*, **21**, 341 (1965).
- Ramakrishna, T.V., West, P.W. and Robinson, J.W., *Anal. Chim. Acta*, **40**, 347, (1968).



Standard conditions

37

Mn

M a n g a n e s e

A.W. 54.94

▼ Preparation of standard solutions

Recommended standard materials

Manganese metal strip or wire 99.99%

Solution technique

Dissolve 1.000 g manganese in a minimum volume of 1:1 nitric acid and dilute to 1 litre to give 1000 µg/mL Mn.

▼ Recommended instrument parameters

Atomic absorption**WORKING CONDITIONS (FIXED)**

| | |
|---------------------|-----------|
| Lamp current | 5 mA |
| Fuel | acetylene |
| Support | air |
| Flame stoichiometry | oxidizing |

A nitrous oxide-acetylene flame can also be used but sensitivity is poorer.

WORKING CONDITIONS (VARIABLE)

| Wavelength nm | Slit width nm | Optimum working range µg/mL |
|------------------|------------------|--------------------------------|
| 279.5 | 0.2 | 0.02-5 |
| 403.1 | 0.2 | 0.5-60 |
| 321.7 | 0.2 | 100-14000 |

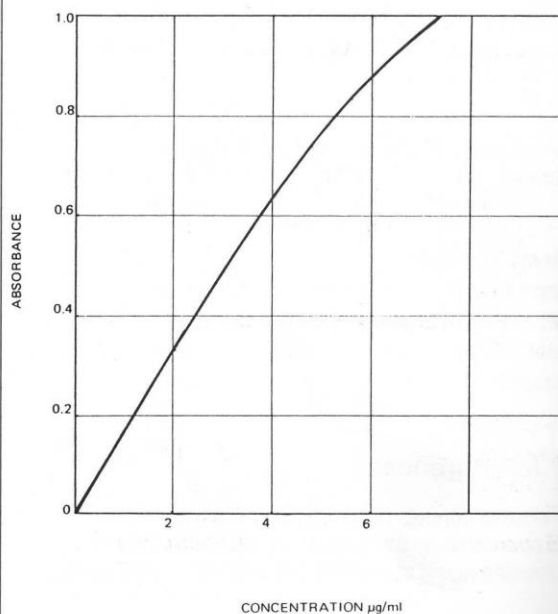
Flame emission

| | |
|------------|---------------|
| Wavelength | 403.1 nm |
| Slit width | 0.1 nm |
| Fuel | acetylene |
| Support | nitrous oxide |

▼ Interferences

In a reducing air-acetylene flame the absorbance is depressed in the presence of phosphate, perchlorate, iron, nickel, silicon and cobalt. In an oxidizing air-

acetylene flame or a nitrous oxide-acetylene flame these interferences do not arise. No releasing agent is usually necessary.

*Standard conditions*

Na

S o d i u m

A.W. 22.99

▼ Preparation of standard solutions

Recommended standard materials

| | |
|--|--------|
| Sodium chloride NaCl | 99.99% |
| Sodium carbonate Na ₂ CO ₃ | 99.99% |

Solution technique*

Dissolve 2.542 g of dried NaCl in water and dilute to 1 litre to give 1000 µg/mL Na.

▼ Recommended instrument parameters

Atomic absorption

WORKING CONDITIONS (FIXED)

| | |
|---------------------|-----------|
| Lamp current | 5 mA |
| Fuel | acetylene |
| Support | air |
| Flame stoichiometry | oxidizing |

WORKING CONDITIONS (VARIABLE)

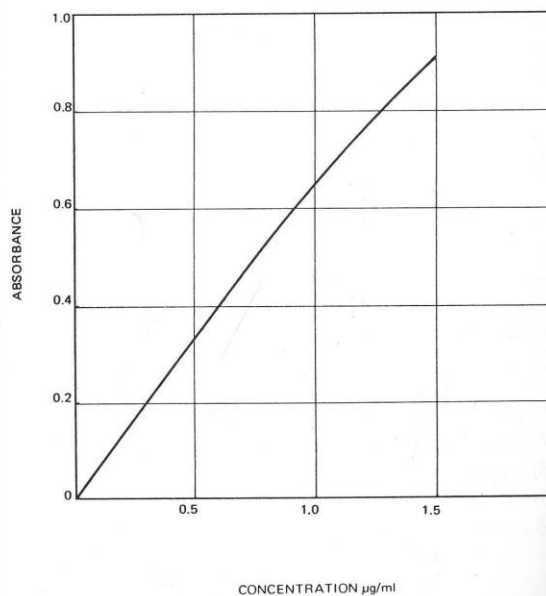
| Wavelength nm | Slit width nm | Optimum working range µg/mL |
|--------------------|------------------|--------------------------------|
| 589.0 | 0.5 | 0.002-1.0 |
| 589.6 | 1.0 | 0.01-2.0 |
| 330.2 } 330.3 } | 0.5 | 2-400 |

Flame emission

| | |
|------------|-----------|
| Wavelength | 589.0 nm |
| Slit width | 0.1 nm |
| Fuel | acetylene |
| Support | air |

▼ Interferences

Sodium is partially ionized in the air-acetylene flame. To suppress ionization, add potassium nitrate or chloride solution to give a final concentration of 2000 µg/mL potassium in all solutions including the blank.



Standard conditions

N i c k e l

Ni

A.W. 58.71

▼ Preparation of standard solutions

Recommended standard materials

Nickel metal strip or wire 99.99%

Solution technique

Dissolve 1.000 g of nickel in 1:1 nitric acid and dilute to 1 litre to give 1000 µg/mL Ni.

▼ Recommended instrument parameters

Atomic absorption

WORKING CONDITIONS (FIXED)

| | |
|---------------------|-----------|
| Lamp current | 4 mA |
| Fuel | acetylene |
| Support | air |
| Flame stoichiometry | oxidizing |

A nitrous oxide-acetylene flame can also be used, with poorer sensitivity.

WORKING CONDITIONS (VARIABLE)

| Wavelength nm | Slit width nm | Optimum working range µg/mL |
|------------------|------------------|--------------------------------|
| 232.0 | 0.2 | 0.1-20 |
| 341.5 | 0.2 | 1-100 |
| 352.4 | 0.5 | 1-100 |
| 351.5 | 0.5 | 3-180 |
| 362.5 | 0.5 | 100-8000 |

Note: The 352.4 nm line is preferred because the calibration is less curved over the working range and the signal is less susceptible to non-atomic absorbance than at the more sensitive 232.0 nm line.

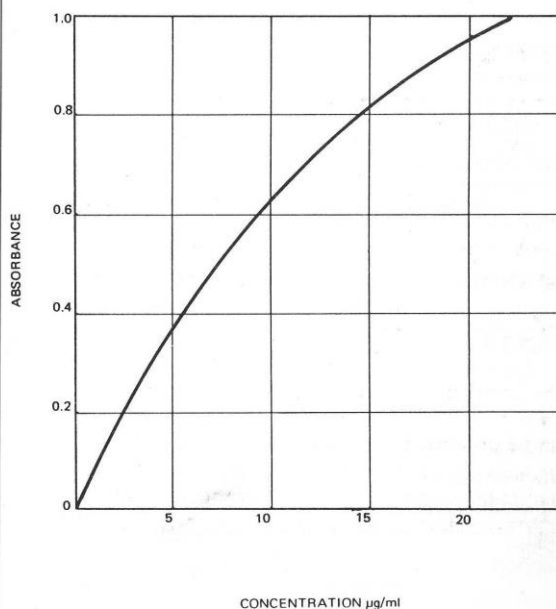
Flame emission

| | |
|------------|---------------|
| Wavelength | 341.5 nm |
| Slit width | 0.1 nm |
| Fuel | acetylene |
| Support | nitrous oxide |

▼ Interferences

At 232.0 nm wavelength, non-atomic species in the flame absorb strongly. Where the sample has a high concentration of dissolved solids it is necessary to correct for non-atomic absorption by using the background corrector. At 352.4 nm, this effect is negligible even for high matrix solutions.

In hydrochloric and perchloric acid solution, a slight (5%) absorbance depression has been observed in the presence of iron, cobalt and chromium. In a more oxidizing flame the effects are minimized and in the nitrous oxide-acetylene flame no interferences are observed.



Standard conditions

43