

# המעבדה לכימיה אנליטית מכשורית

בית הספר לכימיה אוניברסיטת ת"א

מרץ 2020

# מבוא

---

המעבדה לכימיה אנליטית מכשורית מבוססת על ציוד משוכלל ויקר במעבדה שעברה שפוץ נרחב לפני ארבע שנים.

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 21-48
3. כרומטוגרפיה נוזלית Liquid Chromatography ..... עמודים 49-77
4. בליעה אטומית Flame Atomic Absorption ..... עמודים 78-121

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 תהא חצי כמותית ומבוססת על ידע כללי ו-”ניחוש אינטליגנטי” או חומר ספרותי.**

המדריכים הממונים גם על הבטיחות יוודאו ידיעה מוקדמת כנ”ל וישאלו שאלות בהתאם. המדריך מנוסח בלשון זכר אך מיועד לכל המינים.

המכשור, מערכי השיעור והתדריך מעודכנים כל שנה, כאשר המערך של GC-MS על המערכת הקוודרופולית הינו יחסית חדש. 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.

## 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 לניסוי הן מבחינת ידע הרקע התאורטי, (אין צורך בכתבת 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 מהניסוי 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 ושייכו אותן לניסויים הרלוונטיים.
- ג. לכל ניסוי יש לרשום מסקנות סופיות לגבי השגת המטרה.

## הוראות כלליות לעבודה בגז-כרומטוגרפיה

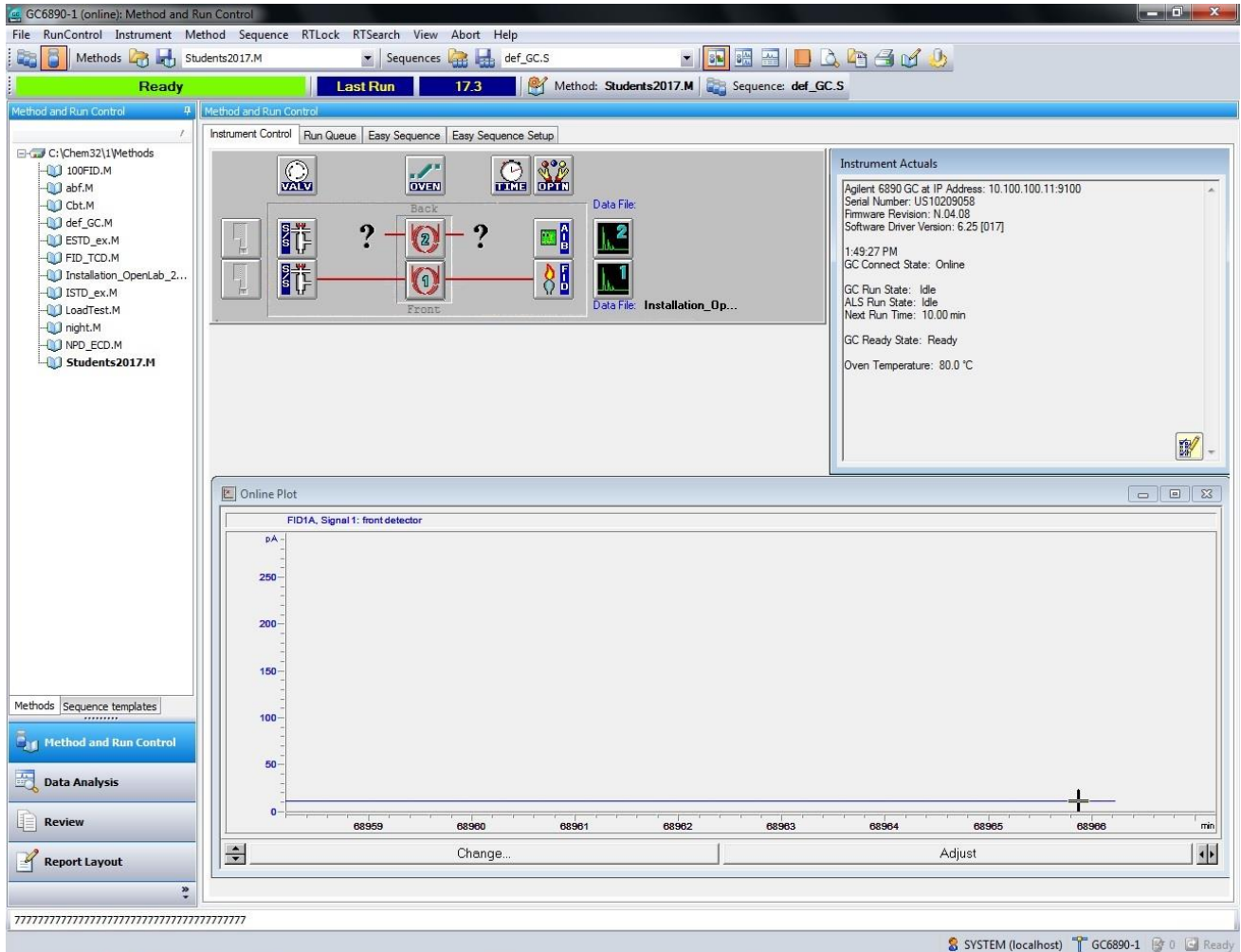
1. המזרק להזרקת הדוגמאות לתוך הגז-כרומטוגרף ובמיוחד מזרק ה- SPME הינם מכשירים עדינים, אך גם מסוכנים. יש לטפל בהם בעדינות ולהניחם בקופסא כשאינן מזריקים. חשוב מאוד ללמוד מהמדריך כיצד בדיוק משתמשים בו:  
א. נהגו בעדינות במזרק. אל תפעילו עליו לחץ מיותר.  
ב. ההזרקה חייבת להיות מהירה והמזרק חייב להיות במצב 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 $\mu$ m.
  - ד. גלאים:
- בשני המכשירים מותקן גלאי FID (ודאו שהנכם מבינים את דרך פעולתו).
  - באחד המכשירים מותקן גם גלאי PFPD שאינו פעיל.
- ה. מערכת בקרה ממוחשבת ע"י תוכנת chemstation.

## הפעלת המחשב ותוכנת chemstation

בכדי לעלות את התוכנה יש ללחוץ פעמיים על האייקון (online) GC6890-1 הנמצא על ה-  
desktop יפתח מסך הנקרא Method and run control (GC6890-1 online).



### **שיטת הרצה:**

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

- תיאור השיטה על ידי שם אופייני. במקרה הזה – STUDENT.M.
- בקרה על המכשיר- הגדרת הפרמטרים ששולטים על המכשיר למשל:  
מפרטורת ולחץ ה-inlet, קצב זרימה דרך הקולונה ועוד.

## בחירת שיטה ומאפייני הרצה:

אנו נשתמש בשיטה הנקראת STUDENT.M. על מנת להטעינה יש ללחוץ על File → Load → Method ולבחור בה (בחלון השמאלי). בשלב זה תשמע ההצתה של הגלאי [ניתן לודא הדלקה ע"י בחינת הסיגנל- על מכשיר הגז כרומטוגרף, לחצו על מקש signal 1 וראו אם ערך הסיגנל (value) עלה מאפס עקב רקע הלהבה]. בכדי לראות כיצד בנויה השיטה ולהכניס פרמטרים רצויים לכל הרצה יש ללחוץ על Instrument → Edit Agilent 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. בחלון זה ניתן לראות גם את מהירות הזרימה (u).

○ 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

H<sub>2</sub>: 40mL/min

Air: 400mL/min

Make up Gas (He): 45mL/min

● Signals : מאפשר לבחור בין הגלאים השונים. עבור signal 1 יש לסמן Det ולבחור front detector.

לאחר שבחנתם והכנסתם את הפרמטרים (טמפרטורת תנור, split, flow וכו') המתאימים לכל הרצה לחצו על Apply ו- OK. קצב זרימת הגזים יתייצב, והתנור יתחמם לטמפרטורה שהוגדרה לו.

כעת יהיה עליכם לפתוח תיקייה שבה ישמרו על ההרצות שתבצעו. את התיקייה יש לפתוח במיקום - computer → C: → Chem 32 → 1 → data → your\_folder. שימו לב ששם התיקייה לא יכיל רווחים.

## הכנה להרצה:

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

Sample Info: GC6890-1

Operator name: SYSTEM

Data file

Path: C:\Chem32\1\Data\ Subdirectory: Students2017

Name Pattern

Signal 1: <SampleName> <Date> <Time>  
AS\_W1\_1 2017-02-23 12-36-03.D

Sample parameters front

Vial/Location: 101 (blank run if no entry)

Sample name: AS\_W1\_1 Sample amount: 0


Multiplier: 1 Dilution: 1 ISTD amount: 0

Comment: Parameter experiment:  
column Flow: 1ml/min, split 50, oven: iso 80C for 10 min. detector: Nom.  
Average Velocity: 20 cm/Sec

Custom Fields ... Run Method OK Cancel Help

בחלון זה יש לבחור ב-subdirectory את תיקיית Students2017 (לא לשנות את ה-path). ב sample parameters יש לשנות את ה- sample name ולהכניס ב comment את כל מאפייני הניסוי (כולל הנתון Average velocity), כפי שניתן לראות בדוגמה, לבסוף יש ללחוץ על OK. שימו לב לא לשנות את ה-vial/location שמופיע.

כאשר בחלון ה- ChemStation status יש אור ירוק המראה על מצב ready ניתן להתחיל בהרצה. בתפריט העליון לחצו על Run Method → RunControl, הצבע הירוק ישתנה לורוד ויופיע הכיתוב waiting for injection, יש להזריק דוגמה ובהקדם 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 signal 1 → 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- Instrument Actuals שמראה לכם פרמטרים נבחרים במכשיר ה- GC בזמן ההרצה. אם ברצונכם לשנותם כנסו ל- setup actual בתחתית הימנית של החלון

אם ברצונכם לסיים את ההרצה לפני גמר התוכנית יש ללחוץ על מקש ה-STOP 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.



## שבוע 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  $80^{\circ}\text{C}$  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  $\Delta H_{des}$  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  $80^\circ\text{C}$ . 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 שני 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 גאומטרית, 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 הפוך 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  $\Delta H_{des}$ . כאשר  $P^\circ$  הנו לחץ אדים חלקי בתנאים סטנדרטיים,  $P$  – לחץ אדים חלקי בטמפרטורה נתונה,  $C$  – קבוע. חשבו את  $\Delta H_{des}$  עבור כל אחד מהחומרים בתערובת והשוו אותו לערך התיאורטי של  $\Delta H_{vap}$  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 1 ml/min ל-2 ml/min. לאחר גמר ההכנות להרצה הזריקו 1  $\mu$ L מהתמיסה. שנו את קצב זרימת הגז ל 4 ml/min והזריקו 1  $\mu$ L מהתמיסה.

בצעו את הניסויים 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:  $H = A + B/u + Cu$ . כיצד משפיע השינוי בקצב זרימת הגז הנושא על H? זיכרו, עבור קולונות קפילריות המקדם A ניתן להזנחה.

### ג. תכנות טמפרטורות

מטרת הניסוי – לימוד שיטה לקיצור זמן הכרומטוגרפיה ושיפור או שמירה על הרגישות. 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  $\mu$ 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. הזינו את נתוני ההרצה Sample Info ולחצו על Run Method. 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  $20^\circ\text{C}$  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:  $110^\circ\text{C}$  למשך 15 דקות.
- לאחר גמר הכנות להרצה הזריקו  $1\mu\text{L}$  מתערבות הכהלים. בצעו את הניסוי שנית בתכנות טמפרטורה:  $45^\circ\text{C}$  ועלייה בקצב של  $20^\circ\text{C}/\text{min}$  עד לטמפרטורה של  $180^\circ\text{C}$  עם זמן המתנה של דקה.
- הדפיסו את הכרומטוגרמות המתקבלות. שרטטו גרפים של  $t'_R$  ו  $\text{Log}(t'_R)$  כנגד מספר הפחמימים בכוהל.
  - עבור איזותרמה, אילו תוצאות קיבלתם? מה המשמעות שלהן?
  - עבור תכנות טמפרטורה, אילו תוצאות קיבלתם? האם נשמר ההבדל בטמפרטורת הנידוף של החומרים השונים?

## שבוע שני

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

1. יצירת גרף כיוול 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  $60^{\circ}\text{C}$  למשך דקה אחת, קצב עלייה של  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  עד לטמפרטורה של  $270^{\circ}\text{C}$  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  $2\ \mu\text{l}$ ). הכניסו את מחט המזרק לתמיסה ושאבו  $0.4\ \mu\text{l}$  של תמיסה. הוציאו את המחט מהתמיסה ושאבו אוויר פעם נוספת (בערך  $2\ \mu\text{l}$ ). וודאו ששאתם  $0.4\ \mu\text{l}$ . הזריקו את התמיסה ל-injector בעדינות, כך שהמחט מוכנסת ל-injector ורק לאחר סיום הכנסתה ה-plunger לחוץ.
2. הריצו את תמיסת העבודה מהחלק הראשון באותם תנאים ע"מ למצוא את זמני היציאה של כל החומרים.
3. 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 כיוול ב-Toluene חשבו את ריכוזי שאר המרכיבים. העריכו שגיאה וגורמיה.

## **ב. ניסויים מתקדמים:**

### **1. 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.

### **2. 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.

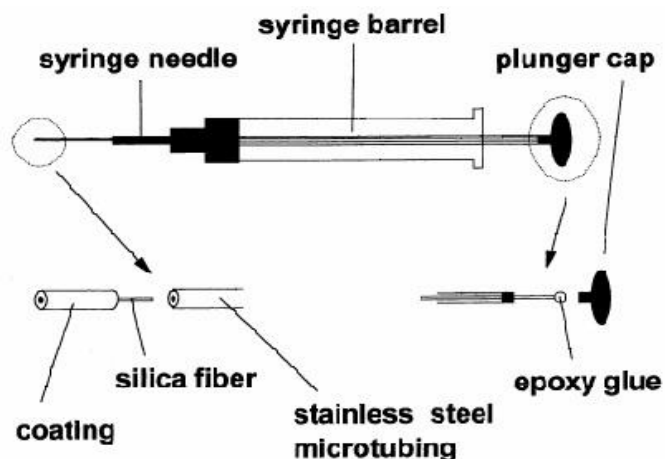
- מה ההבדלים בין כרומטוגרמה של אדי דלק ובין זאת של דלק נוזלי ומה מקורם?

## שבוע שלישי

# Solid Phase Micro Extraction

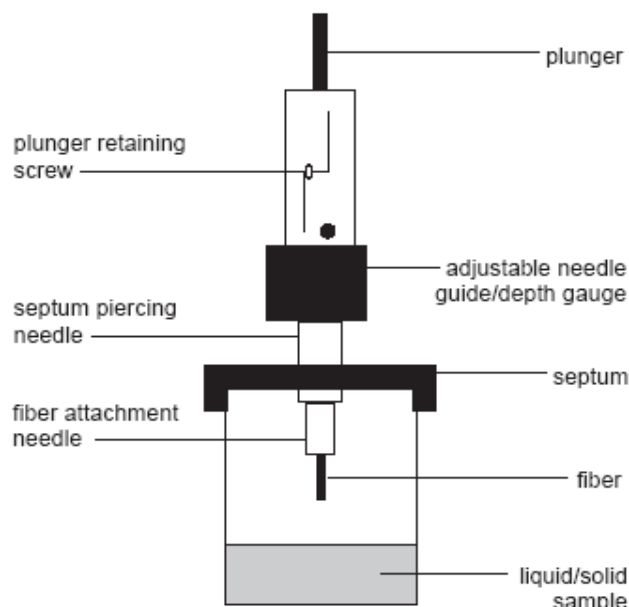
כדי להתכונן לחלק זה של הניסוי עליכם לחפש חומר על השיטה באתרי אינטרנט למשל באתר : <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spme.html> באתר זה בחרו ב SPME. שימו לב במיוחד לאנימציה של דרך הפעולה של השיטה. תוכלו גם לבחור ב SPME applications ולראות תנאי עבודה למטריצות שונות. 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 אורגניים 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, אנליזת מזון, סמים ועוד. בשיטה זו משתמשים בסיב מצופה בחומר סופח (קיימים מספר סוגים) בכדי לבדוד 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.

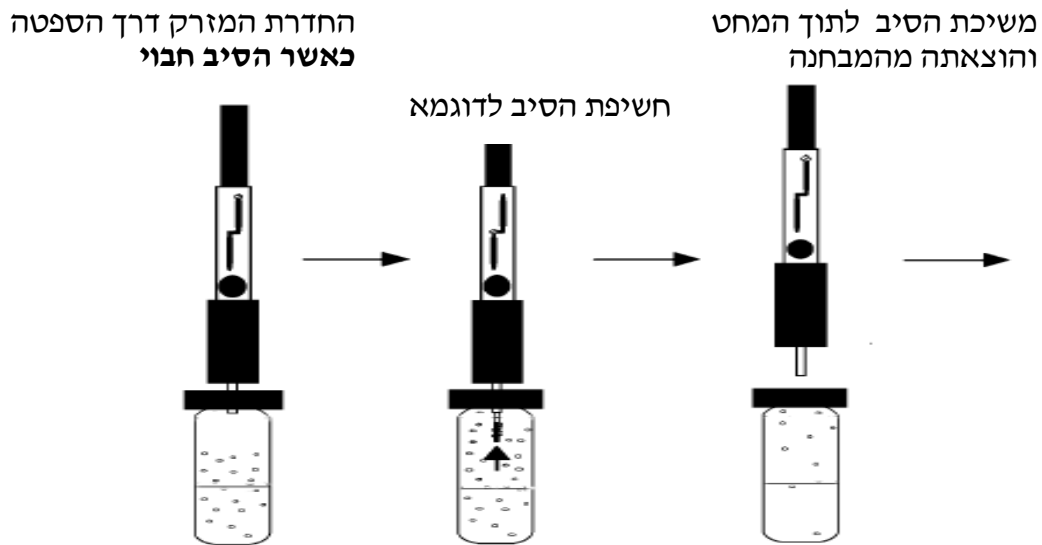


## איור 2: סכמה של ציוד ה- HeadSpace SPME

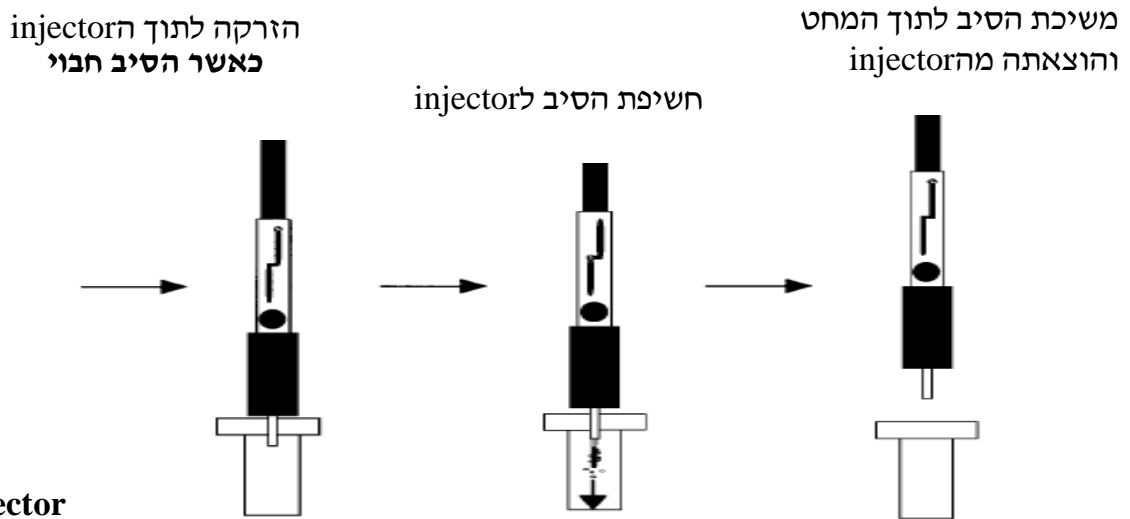
שם השיטה נגזר מהעובדה שכמות האנליט הממוצה מהדוגמא קטן בהרבה מנפח הדוגמא. כתוצאה מכך רוב האנליט לא מגיע לפאזה הממוצה מהדוגמא אלא שווי משקל מושג בין מטריצת הדוגמא והפאזה הממוצה. התהליך עצמו מודגם באיור מספר 3. סיב של סיליקה באורך של כ-1 סנטימטר, המצופה בפולימר Polydimethylsiloxane (PDMS), מוחזק במזרק הנראה 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 אנליט הספוח עובר נידוף תרמי וזורם לתוך קולנת ה-GC.



## שלב הספיחה



## שלב הנידוף



### 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.

$\Delta H$  - שינוי באנטלפיה.

$R$  - קבוע הגזים.

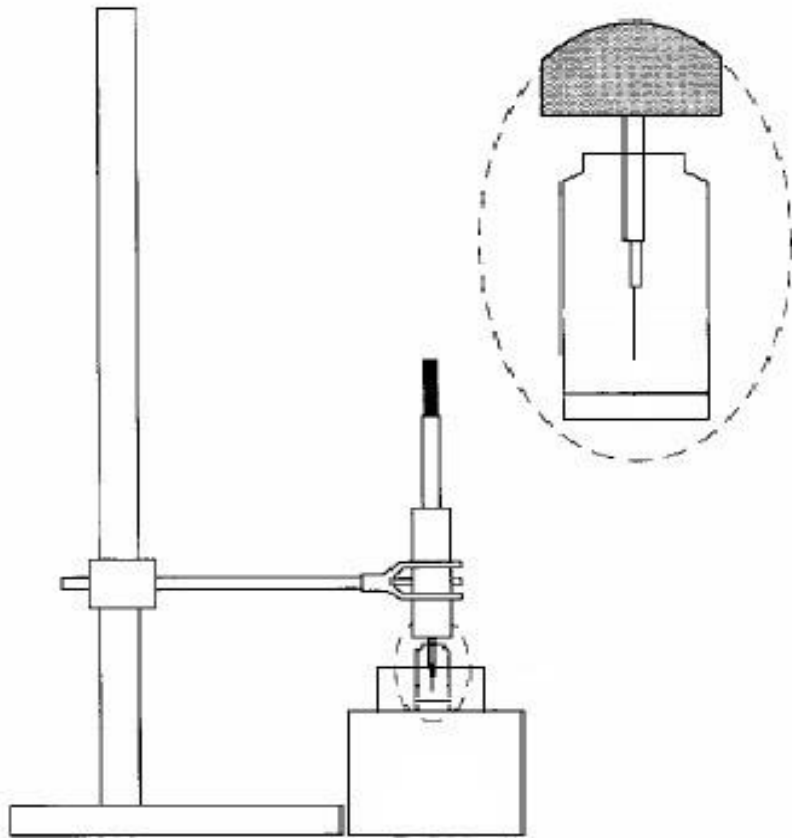
אם הערך  $K_{fs}$  שמתקבל עבור אנליט גדול מ- 1 זאת אומרת שלאנליט יש אנרגיה פוטנציאלית נמוכה יותר בסיב מאשר בדוגמא, ולכן כדי שהוא יספח לסיב תגובה אקזותרמית צריכה להתבצע כלומר  $\Delta H$  קטן מאפס. ולכן משוואה זו מראה כי קבוע החלוקה של הדוגמא/מטריצה יקטן.

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**. אם אינכם בטוחים איך משתמשים במזרק התייעצו עם המדריך/ה ורק לאחר מכן גשו לעבוד עימו!

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.

- שימו לב, לאחר 10 שניות מהתחלת ההזרקה יש להוציא את המזרק מה-Inlet.
- שימו לב! חשוב מאוד קודם כל להחזיר את הסיב הסופח פנימה ורק אז להוציא את מזרק ה SPME. הוצאת המזרק עם הסיב הסופח גלוי תביא לו לנזק בלתי הפיך

- 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. 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 ב-injector 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.

4. אנליזה נוספת לבחירת הסטודנטים (בתיאום מראש עם המדריך/ה)

אנליזת מסטיק, שמפו, בושם, שקית תה וכיו"ב 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 200µl 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 split 20.
- 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°C/min נעלה את הטמפרטורה עד 270°C. (חישבו לגבי כל הרצה אם אלו הם התנאים האופטימלים).

5. אנליזה כמותית של נעלם (אם יש זמן).

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.

# גז כרומטוגרף ספקטרומטר מסות (GC-MS) Agilent models 5973/7 Single Quadrupole

## 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 GC-MS, הניסויים והתוצאות הצפויות.
- יש לקרוא ולהבין את מהלך הניסוי והנספחים השונים (ספקטרומים זיהוי ספרייטי ואנליזת אלמנטים) 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 ולצורך אותם לדו"ח המכין בתוספת הסבר קצר אין צורך לכתוב רקע תאורטי בדו"חות.

## דרישות לדו"ח

- מהלך הניסוי- כולל תוכניות לתנאי אנליזה מנומקים. (סוג הזרקה, תוכנית טמפ' הזרקה, ספליט, קצב זרימת גז, תוכנית טמפ' תנור, בחירת קולונה, תוכנית סריקת מסות, אנרגית יינון וכל פרמטר נסיוני נדרש ונתו לשליטה אחר)
- תשובות לשאלות מהחוברת
- תוצאות צפויות- כרומטוגרמה, ספקטרום צפוי

## הוראות בטיחות

אנו רוצים שתצאו מהמעבדה שלמים ובריאים, כפי שנכנסתם. בנוסף אנו עוסקים בצידו 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 בלשהי יש להתייעץ עם המדריך !

- יש להזהר לא לגעת ב injector הוא חם מאוד !
- אין לפתוח תנור GC לא נוכחות מדריך !
- אין לפתוח פנל MS ללא נוכחות מדריך !
- 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 הינה של חברת AGILENT ומבוססת על ספקטרומטר מסות מטיפוס קוודרופול יחיד.

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).

## ה Gas Chromatograph (GC)

ה GC (כפי שנלמד בקורס) בנוי ממספר חלקים :  
א. מערכת הכנסת דוגמא הכוללת במקרה שלנו :

- injector בעל אפשרות הזרקה split/splitless.
  - רובוט על גבי ה injector המשמש להזרקה אוטומטית: (AS) autosampler.
- המכשיר מצויד במזרק בעל נפח של 10µL ומגש עבור 16 בקבוקוני דוגמאות. בנוסף, המגש מכיל שני בקבוקוני שטיפה עם ממס ( A ו-B ) ובקבוקון עבור שפכי

שטיפה המסומן ב-W. ה-AS מזריק את הדוגמה אוטומטית רק לאחר שמכשיר כולו מוכן להזרקה ושולח אות להפעלת תוכנית העבודה ואיסוף המידע ברגע ההזרקה.

ב. תנור עם יכולת תכנות טמפרטורה

ג. קולונות הפרדה (בתוך התנור):

▪ קולונה המחוברת ל injector בעלת אורך של 30 מטר, קוטר פנימי  $250\mu$ , ציפוי

מסוג DB-5-MS המכיל: 95% polydimethylsiloxane ו 5%

polydiphenylsiloxane הציפוי בעובי  $0.25\mu$

ד. Transfer Line המשמש לחבורה GC עם ה MS

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 מטיפוס MMI (Multi mode inlet)

## ה. Mass Spectrometer (MS)

מכשיר ה MS עצמו (שלא כמו ה GC) נשלט באמצעות המחשב בלבד. הספקטרומטר מסות מכיל מקור יונים מטיפוס יינון בעזרת אלקטרונים, מאבחן מסות קוודרופולי וגלאי יונים, כולם בתוך מערכת ואקוואום.

*בקדמת המכשיר נמצא פנל נפתח המכיל:*

▪ נוזל לכיול מסות perfluorotributylamine (PFTBA). מצורף ספקטרום +

מבנה בנספח בסוף המערך.

▪ ברז סולנואידי המאפשר שליטה על כניסת חומר הכיול למערכת.

המערכת נשאבת ע"י משאבה טורבו מולקולרית בעלת מהירות שאיבה של 250 L/sec המורידה את הלחץ ל  $8 \times 10^{-6}$  torr בקצב זרימת הליום בקולונה של 1 מ"ל/דקה והמחוברת למשאבה רוטורית חיצונית השואבת 42 L/min ושומרת על לחץ של 0.5 torr.

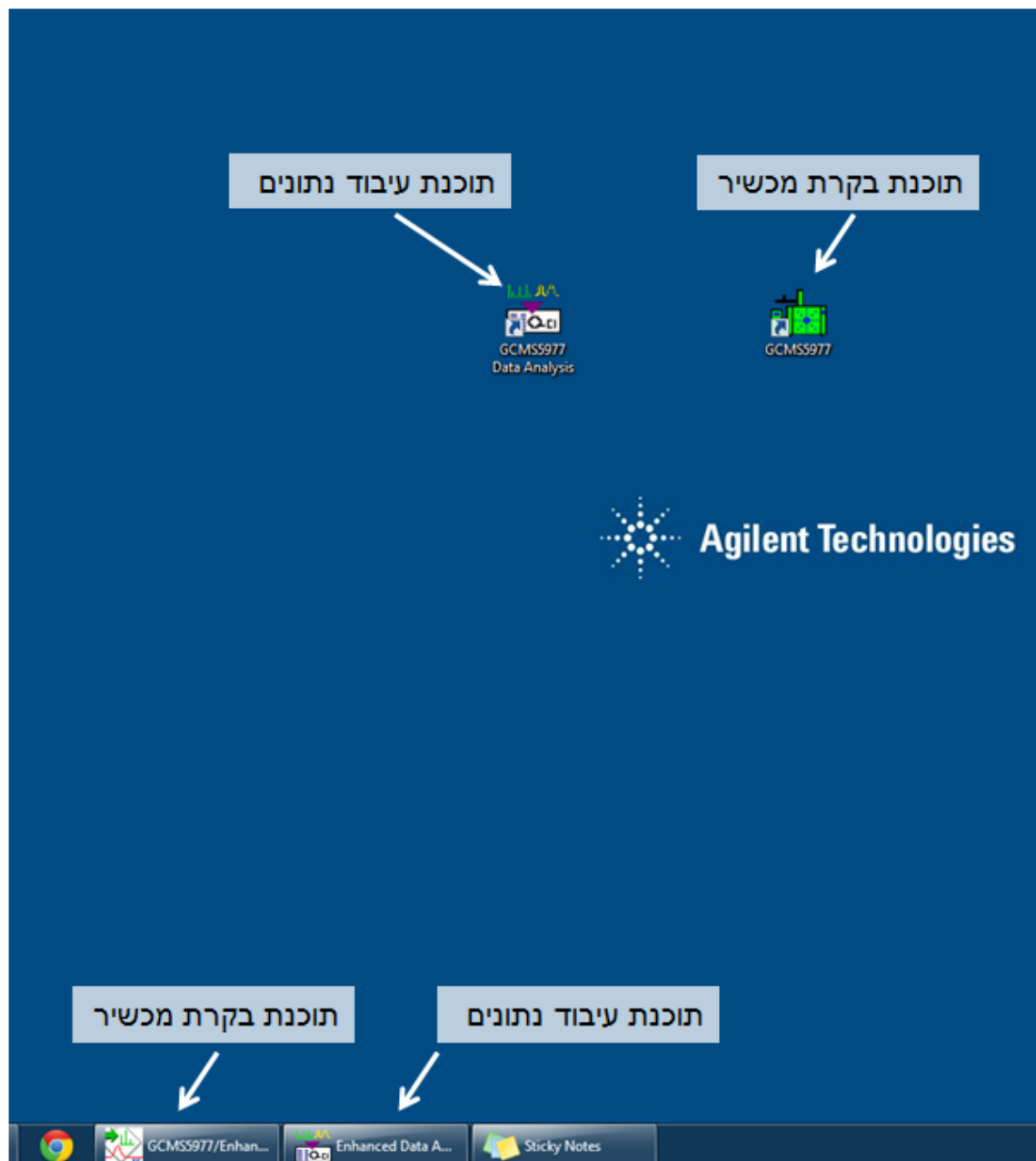
• למה לדעתכם יש לנו צורך במשאבה הרוטורית?



## נוהל תחילת עבודה עם מכשיר ה GC-MS

### מערכת המחשב

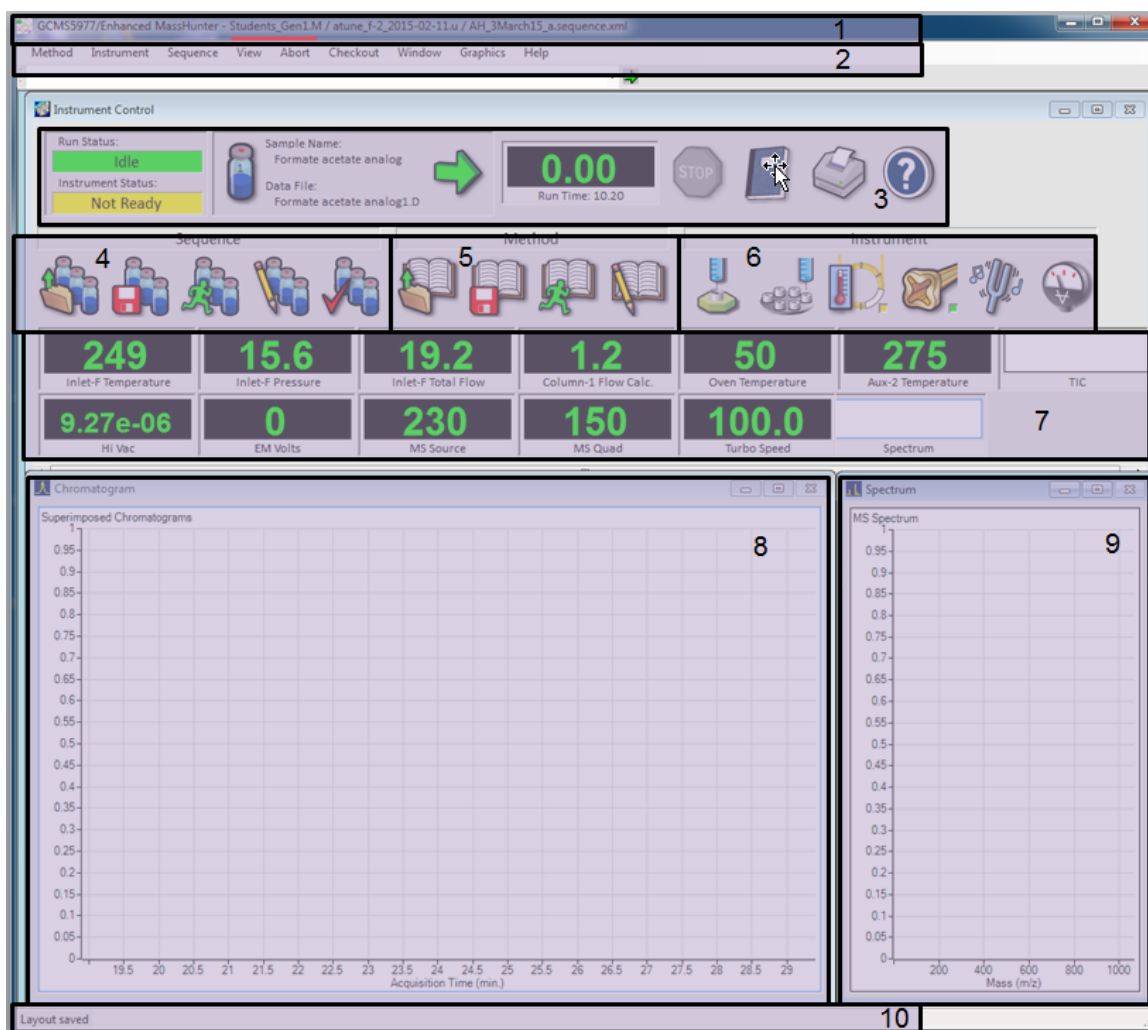
המחשב ממוקם לצד מערכת ה GC-MS. האיקונים של התוכנה מוראים בתמונה למטה.

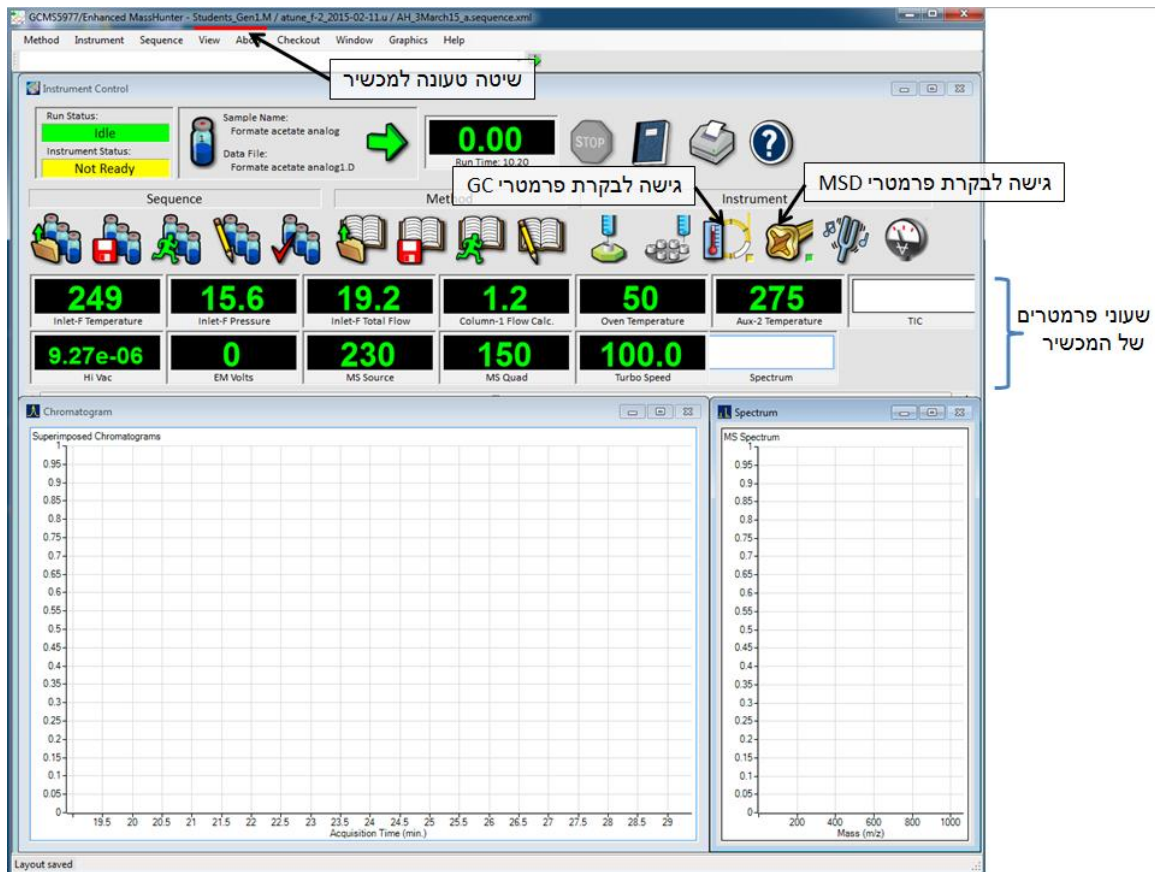


### הפעלת התוכנה

בשורה התחתונה במסך ליד הכפתור start מופיע קיצור לחלון עליו רשום GCMS5977/Enhanced MassHunter - וודאו שהוא לחוץ. במידה והכפתור לא מופיע קראו למדריך. עבור 5973 ודאו שתוכנת הפעלת המכשיר פועלת בשורת המשימות של Windows.

במהלך הניסוי אין לצאת מהתוכנה ולכן אין ללחוץ על כפתור ה X בפינה הימנית העליונה, הדבר יביא לניתוק התקשורת בין המכשיר למחשב.





בחלון בקרת המכשיר ישנם מספר איזורי מידע ובקרה:

1. שם תוכנה ושמות קבצי בקרה שטעונים כרגע (שם שיטה, קובץ TUNE ושם של הרצת רצף sequence).
2. שורת התפריטים
3. הפעלת הרצה וסטטוס מוכנות המכשיר להרצה.
4. קיצורי דרך לעבודה עם sequence
5. קיצורי דרך לעבודה עם שיטות
6. קיצורי דרך לבקרת פרמטרי מכשיר והשיטה
7. שעונים עם קריאות של פרמטרי המכשיר
8. חלון כרומטוגרמה
9. חלון ספקטרום מסות
10. שורת סטטוס

לחיצה על כפתור מודול תגרום לפתיחתו כחלון גדול בקדמת המסך.

מעבר בין המודולים מתאפשר גם ע"י בחירת המודול הרצוי לכם. 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.

ניתן לסגור חלונות עזר עם "X" לאחר סיום העבודה איתם.

### בדיקת משאבות

ראשית צריך לבדוק מה השיטה שטעונה כרגע (איזור 1) ומה סטטוס המכשיר מבחינת הריצה ומוכנות להרצה (איזור 3: Instrument & Run Status).

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

1. למנוע את שריפת הפילמנט
2. הקטנת רקע MS
3. למנוע פריצת גלאי היונים
4. הקטנת אפקט space charge במקור היונים.
5. למנוע התנגשויות יון-מולקולה שיכולות להביא לפרוק היון המולקולרי ולקלקול הפרדת המסות בקוואדרופול.

• עליכם להבין את משמעות המושגים ומדוע הם תלויים בקיום וואקום.

ב 5977 בדיקת הלחץ מבוצעת על ידי קריאת הלחץ בשעון בשם Hi Vac באיזור שעוני הבקרה וב5973 במד הלחץ החיצוני (להפעלה יש ללחוץ על כפתור Gauge). לחץ תקין כלמעלה משמעותו ששתי המשאבות השואבות את מערכת ה MS עובדות. לחץ אופייני הינו  $4 \times 10^{-6}$  mBar בשיטת night או  $9.5 \times 10^{-6}$  mBar בשיטת students ב5977 ו  $10^{-5}$  mBar ~ ב5973.

בדיקת משאבה רוטורית – המשאבה ממוקמת מתחת לשולחן. יש להקשיב לרעש הרוטורית על מנת לוודא שהיא פועלת. במידה וקיים ספק ניתן לגעת בה בזהירות ולהרגיש את רעידות המשאבה אשר מעידות על כך שהינה פועלת .  
בדיקת המשאבה הטורבו מולקולרית - בשעון בקרה מתאים באיזור שעוני בקרה : Turbo Speed צריך להיות רשום במסך המתאים 100%. לא ניתן לעבוד כאשר מתחת ל 99%.

## שבוע ראשון - MS והכנסת דוגמה בעזרת דוגם אוטומטי

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 הרכב ואקוואם שיורי ונוכחות אוויר ומים

עליכם לוודא שאין כניסה או נוכחות ניכרת של אוויר, מים ושאר מזהמים במערכת ה MS . מים ונוכחות של אוויר תצביע על אפשרות של דליפה ובנוסף נוכחות החמצן אשר באוויר עלולה לגרום לשריפת הפילנמט.

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, ארגון, 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 ?
6. מה משמעות היחס בין גבהי המסות 18amu ו 28amu ?

### בדיקה זו תבוצע בנוכחות מדריך בלבד

1. בשורת התפריטים לחצו Instrument ובחרו באופציה Edit Tune Parameters
  2. על מסך יפתחו מגוון חלונות תצוגת נתונים וחלון בקרת פרמטרים של MSD. ב5973 על מנת לראות את כל הפרמטרים יש להגיע אליהם מתפריט More Params -> Tune Parameters... או Temperatures. הפרמטרים זהים בשתי המערכות.
- ב5977 נפתח חלון בו צידו השמאלי כולל מגוון פרמטרי ה- MSD שניתנים לשינוי ידני או כיול אוטומטי ובצידו הימני של חלון הבקרה יש מספר כרטיסיות :

- א. כרטיסיית VALUES : פרמטרי טמפרטורה של מקור היונים והקוודרופול וכן מצב מהירות משאוות טורבו ולחץ ב-MSD.
- ב. כרטיסיית PROFILE : בקרת פרמטרים עבור חלון סריקת profile עבור שלושה יוני כיול. ברירת המחדל היא שלושה יונים אופיניים ל-PFTBA. ניתן לבחור מסות לסריקה, רוחב החלון מסביב למסות, מהירות הסריקה (AMU/sec), מספר סריקות למיצוע ורזולוציה.
- הכניסו את המסות הבאות לצורך סריקת גזים שיוריים : 18, 28, ו-32
- לתחילת סריקה לחצו על כפתור profile ותוצאות סריקה יוצגו בחלון נתונים עם שם זהה במסך.
- לכדו את התוצאות עם תוכנת לכידת מסך SnippingTool או כפתור PrtScr.
- שנו את פרמטרי מהירות הסריקה, מיצוע ורזולוציה. רשמו את תצפיותיכם ומסקנותיכם לגבי השפעת פרמטרים אלה על התוצאות.
- הפסיקו סריקת profile ע"י לחיצה על Stop .
- ג. כרטיסיית SCAN : בקרת סריקה בחלון עם שם זהה, ניתן לקבוע טווח מסות, רזולוציה, מהירות הסריקה ו-threshold, שקובע סיגנל מינימלי שמוצג כפיק מסה בעת סריקה.
- קבעו טווח מסות 10-50 amu והפעילו את הסריקה ע"י לחיצה על כפתור scan.
- התוצאות מוצגות בחלון נתונים בשם scan.
- לכדו את המסך עם התוצאות לצורך הערכת הימצאות גזים שיוריים.
- בידקו גזים שיוריים בטווח מצומצם יותר של 35-50 amu.
- תבדקו את ההשפעה של פרמטרי מהירות הסריקה ו-threshold.
4. ליציאה ממצב כיול וודאו שלא מתבצעות סריקה באף חלון ולחצו על כפתור Done .
- חשוב!** בחלון שמירה שמופיעה לחצו על Cancel על מנת לא לשמור את השינוי בקובץ כיול של המכשיר.

#### ✦ שאלות לגבי חלק זה :

מה משמעות הביטויים הבאים :

1. Mass 28 Peak Width

2. Ion Count

3. מה ניתן ללמוד מהספקטרום שנאספו בניסוי?

#### • 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) כיצד ניתן להבחין בין חנקן ל CO
- (5) דונו בתוצאות.

## **ניסוי מס' 2: הפרדת תערובת Basic 8 והיכרות עם בניית השיטה**

הפרדת תערובת החומרים והיכרות עם פרמטרי ואופציות בניית השיטה.

### **בדוח המכין:**

חשבו מה ה- void time המצופה עבור הקולונה בשימוש בקצב זרימה של 1.2 מ"ל לדקה.

### **מהלך הניסוי:**


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

1. Caffeine
2. Nicotine
3. Anthracene
4. Hexadecane (C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>)
5. Nitrobenzene
6. Methylstearate
7. Chlorpromazine
8. Quinine (it can not always be found, search if you can find it)

לגבי כל חומר:

1. הציעו תכנית אשר תתאים לדעתכם לביצוע אנליזה זאת (תחום מסות, טמפרטורות) ובעזרת המדריך קבעו את תכנית העבודה הזו.
2. הכינו את הדוגמא בצורה מתאימה לשימוש בדוגם האוטומטי.
3. בצעו את שלבי האנליזה והדפסת התוצאות.

## קביעת תוכנית עבודה (שיטה , method):

1. הניחו את בקבוקון הדוגמה במיקום מספר 1 ב AS (Autosampler). ודאו שבקבוקוני שטיפה ממוקמים במיקום A ו-B ב-AS ומכילים הקסן ומתנול (בהתאמה) מעל לקו הסימון המינימלי, ושקבוקון הפסולת המסומן ב W ריק.
2. לחצו על method בשורת התפריטים בחורו ב-load method . נווטו לתיקיה /STUDENTS/Methods בתיקיית השורש ובחרו בשיטה הרצויה (Week1\_70eV\_250).  
\* במידה ואינכם מצליחים עליכם לקרוא למדריך !
3. וודאו שהתוכנית הרשומה בכותרת החלון (איזור 1) משתנה ל- Week1\_70eV\_250.
4. שמרו את השיטה תחת שם חדש ע"י Method>Save Method בשורת התפריט (שם כללי פלוס שם שלכם).
5. לבחירת טווח מסות רלוונטי ושיטת סריקת מסות לחצו על אייקון  הקוודרופול (Instrument-MS Parameters)
6. בחלון שנפתח זהו טבלה עם טווח המסות לסריקה וודאו שהטווח מתאים. (ב3597 יש ללחוץ על Scan Params).
7. זהו את נתוני מהירות הסריקה ובחרו מהירות מתאימה על בסיס הערכותיכם מרוחב הפיק הכרומטוגרפי הצפוי.
8. בתפריט Acquisition type/mode ניתן לבחור אופציות סריקה שונות של המסות. בחרו באופציה Scan.  
\* ספקטרום ניתן לצפייה בשני אופנים : אחד הנקרא Profile בו מתקבלים פיקים בצורה אנלוגית בהתאם לקריאת גלאי היונים אשר הינם בעלי רוחב התלוי ברזולוציה המס-ספקטרומטרית ושני הנקרא Centroid בו מתקבלים קווים ישרים בלבד מתכונתיים לגובה הפיק. זהו כל אחד מהמצבים. מה היתרונות והחסרונות של כל מצב?
9. מצאו את חלון Solvent Delay. מה משמעות של הערך הרשום? מלאו אותו עם המדריך .
10. לסגירת החלון לחצו OK.





11. לעריכת שיטת GC לחצו על כפתור עם קולונה ומד-חום
12. חלון שיפתח יכלול תפריט עם כל המודולים של ה GC
- א. מודול ALS/injector מכיל את כל פרמטרי האוטוסמפלר ובין היתר כולל:
- A נפח ההזרקה, מספר וסוג השטיפות האוטומטיות מבקבוקי הממס לשטיפה A ו-B ועוד.
- ב. מודול Inlets מכיל את פרמטרי שיטה הקשורים באינג'קטור ובין היתר כולל טמפי, לחץ, שיטת ההזרקה (split/splitless) וגודל ה-split.
- ג. מודול ה-Columns שולט על זרם הגז בקולונה ומכיל מידע עליה כגון: לחץ, מהירות ממוצעת ו-holdup time מחושב.
- ד. מודול Oven מאפשר בקרה על טמפי התנור, טמפי מקסימלית מותרת ומכיל טבלת בקרה עבור ערכים של זמן, טמפי וקצב חימום/קירור
- ה. מודול Aux Heaters מאפשר בקרה על טמפי של Transfer line.
- ו. ב-5977 בלבד: GC Calculators מכיל מגוון מחשבוניים לחישוב מקדמי התפשטות של ממסים, קצבי זרימה וכו'
13. לאחר עידכון כל פרמטרי השיטה עבור המודולים, בנוכחות המדריך לחצו על Apply לשם שידור ערכים למכשיר ו/או על OK לאישור השינויים וסגירת החלון.
14. להרצת התוכנית לחצו על החץ הירוק ומלאו את הפרטים הבאים בחלון ההרצה:

- א. Operator Name - שמכם
- ב. Data Path – בחרו בתיקה /STUDENTS/Data
- ג. Data file name – שם קובץ הנתונים
- ד. Sample Name – שם הדוגמה (ניתן להשאיר כשם הקובץ או לפרט יותר)
- ה. חשוב! וודאו שהבקבוקון המסומן להזרקה בחלון הרצת הדוגמה הוא Vial Number=1, בו הדוגמה ממוקמת בפועל.
- ו. להרצה לחצו על OK and Run Method
- \* במידה ומופיע חלון ובו אפשרות ללחוץ Override, **אין ללחוץ על הכפתור הזה** אלא להמתין להיתיצבות המערכת והיעלמות החלון.
15. א. חלונות הספקטרום והכרומטוגרמה ניתן לעבור מסקאלה אבסולוטית של Ion Counts לסקלה מנורמלת ע"י לחיצה כפולה בשטח החלון.


ב. שינוי גודל הסקלה (zoom):

59777 מתבצע ע"י גרירת הציר המתאים עם כפתור ימין של עכבר.

59736 ע"י לחיצה על הכפתורים הקטנים שליד הצירים

16. כדי לצפות בנתונים פיתחו את תכנת עיבוד התוצאות Agilent Chemstation

ע"י לחיצה על האייקון GCMS5977/3 Data Analysis שנמצא בשולחן העבודה.

ניתן לצפות בנתונים תוך כדי ריצה ע"י לחיצה על כפתור ה  Snapshot.

17. אם הסתיימה ההרצה ניתן לפתוח את הנתונים בתכנה זו ע"י כפתור Load Data

 File ובחירת הקובץ המתאים: בחלון שנפתח לחצו Change path ובחרו

בתיקיה בה שמרתם א הנתונים ולחצו OK. בחרו את הקובץ הרצוי מהרשימה

ולחצו OK.

18. הכרומטוגרמה מוצגת בחלון העליון וספקטרום המסות בחלון התחתון. ניתן

לעשות Zoom ע"י סימון בגרירת העכבר של אזור ההגדלה הרצוי. יציאה מהגדלה

תבצע ע"י לחיצה כפולה (כפתור שמאלי) בשטח החלון.

19. לקבלת ספקטרום מסות בנקודת זמן כלשהי בכרומטוגרמה לחצו לחיצה כפולה

עם הכפתור הימני בעכבר במקום המתאים. לקבלת ספקטרום ממוצע של טווח

זמנים מסוים גררו את העכבר עם הכפתור הימני על האזור הרצוי בכרומטוגרמה.

20. כעת בצעו מיצוע על הכרומטוגרמה המתקבלת והדפיסו את הספקטרום ע"י

כפתור Print. בחירת האפשרות TIC & Spectrum תביא להדפסת הכרומטוגרמה

וספקטרום המסות כפי שהם מוצגים בחלונות. בחירת Selected window

מאפשרת הדפסה של רק אחד החלונות הפתוחים (1 עבור ספקטרום מסות; 2 עבור

כרומטוגרמה)

• ניתן לראות שיוך של ספקטרום מסות לזמן המתאים בהרצה בכותרת חלון

הספקטרום, גם בתוכנה וגם בהדפסה.

21. לאנליזת הכרומטוגרמה ואינטגרציה אוטומטית בחרו בשורת התפריט

Chromatogram>Percent report ופענחו את התוצאות מבחינת זמני יציאה, שטח,

גובה וצורת הפיק.



22. זיהוי כל אחד מהפיקים ע"י זיהוי ספרייטי. לצורך ביצוע הזיהוי לחצו לחיצה כפולה

על כפתור ימני על הספקטרום מסות הרצוי. הדבר יגרום לפתיחת תוכנת NIST MS

Search ובה רשימת זיהויים מבסיס נתונים. בחנו זיהויים שונים מבחינת probability

ו-R.Match.

\* ניתן לעשות החסרה של ספקטרום מסות אחד (לדוגמא: רקע) מספקטרום אחר ע"י:

- בחירה בספקטרום רצוי ע"י סימון נק' או טווח רצויים כפתור ימין על הכרומטוגרמה
  - בחירה בספקטרום אותו רוצים להחסיר (רקע) ע"י סימון נק' או טווח רצויים כפתור ימין על הכרומטוגרמה
  - לחיצה על כפתור  Substruct לקבלת ספקטרום לאחר החסרה. ניתן לראות שכותרת חלון ספקטרום מסות תכלול עכשיו את זמן ממנו הוצא ספקטרום בתוספת סימן "(-)" המעיד שזה תוצאה של החסרה.
  - 23. בחנו השפעת דגימת הסיגנל על טיב הזיהוי (לדגום סיגנל ממקומות שונים בפיק בצורה נקודתית, מיצוע של סיגנל מטווחים שונים בפיק, החסרה של רקע).
  - 24. הוציאו דו"ח Signal-to-Noise עבור הכרומטוגרמה ע"י:
  - לחיצה על כפתור  Signal-to-Noise
  - בחירה ב-No בחלון אופציית הדפסה
  - מילוי ערך "0" עבור אנליזה ל-TIC או ערך של יון SIM הרצוי לבדיקה בחלון Input ולחיצה על OK.
  - יש לפעול לפי הנחיות בשורת הסטטוס בתחתית החלון ותחילה לבחור עם כפתור ימין טווח בכרומטוגרמה המכיל סיגנל הרצוי לאנליזת Signal-to-Noise. לאחר מכן יש לבחור טווח בכרומטוגרמה המייצג רעש רקע לאנליזת Signal-to-Noise.
  - בסיום הפעולות האלה נוצר דוח Signal-to-Noise.
- השלב האחרון בעבוד התוצאות כולל שימוש בתוכנת TAMI לאנליזת התפלגות איזוטופים לאישור זיהוי ספרייטי ומתן נוסחאות מבנה. יש ללמוד את השימוש בתוכנה כמוסבר למטה.

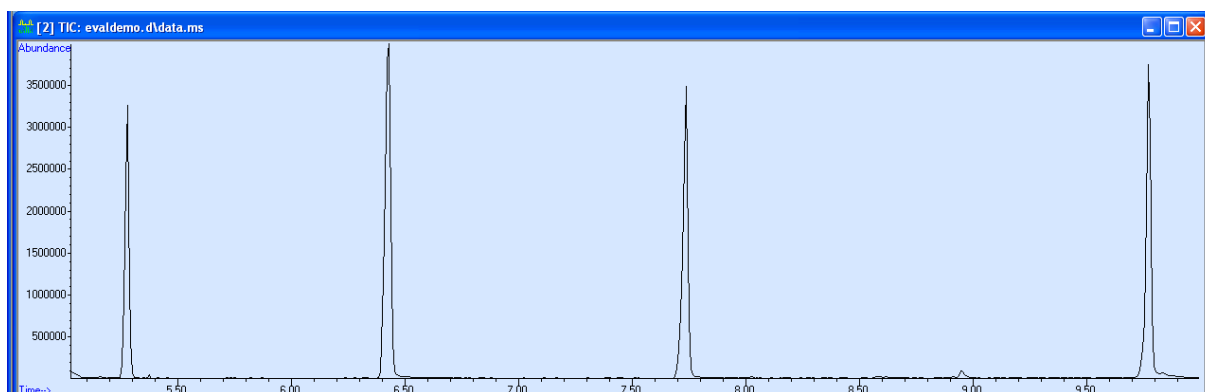
## Tal-Aviv Molecule Identifier (TAMI) Software Introduction

TAMI provides you with a collection of powerful and easy to use sample identification tools. It automatically extracts information from the measured mass spectra, analyzes it and links with NIST's MS Library to confirm or reject its identification thereby providing you with the ultimate confidence level in library based sample identification. In the case that NIST's identification is rejected TAMI provides (via a one click) elemental formula information the same as with costly high resolution MS, with your Agilent standard quadrupole based GC-MS. TAMI operates based on the conversion of experimental isotope distributions into elemental formula. TAMI operation as a result requires the availability of abundant molecular ions. After every analysis, TAMI provides additional analysis information such as elemental statistics and cross-analysis conclusions. It also includes several additional analysis tools, allowing the determination of isotopic enrichment.

### First Analysis Using TAMI with its Fully Automatic Combination with NIST Identification

Launch Chemstation and open the EVALDEMO.D chromatogram that came with it (usually found at msdchem/1/data). This Chromatogram contains four peaks and you are about to analyze the first one for your initial training.

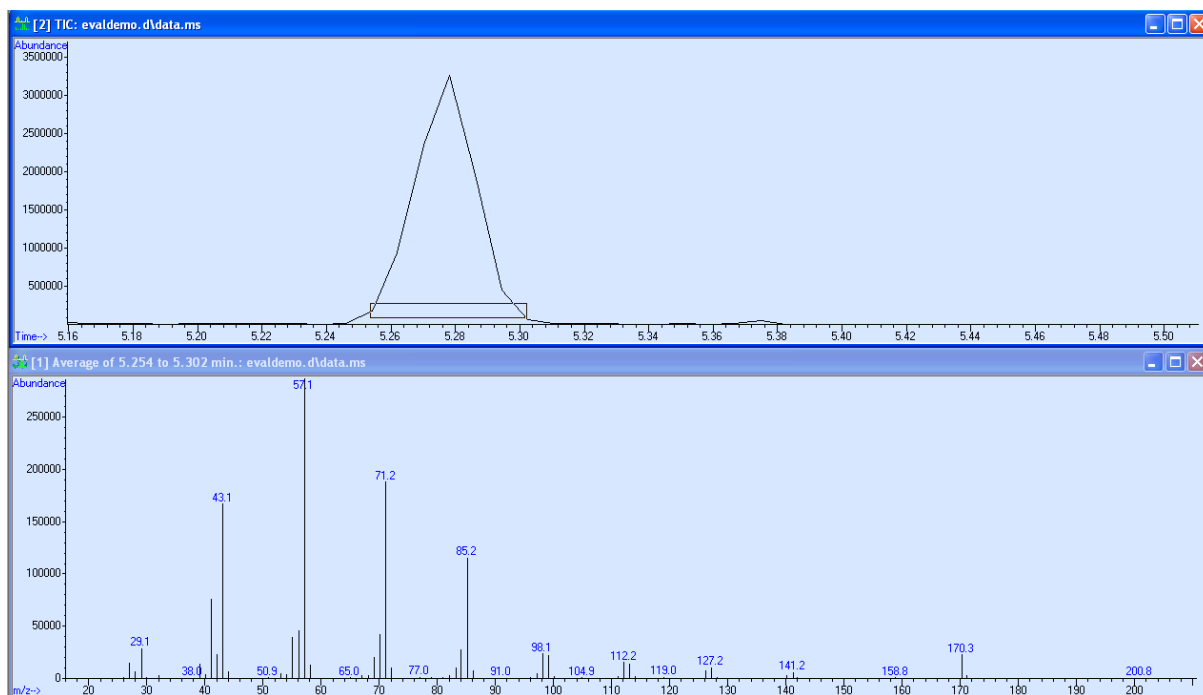
The only thing that you need to do in order to achieve a combined NIST-TAMI analysis is choose the spectrum using Chemstation and send it to NIST for analysis, TAMI does all the rest.



*The EVALDEMO mass chromatogram*

Zoom on the first peak and extract **the average** spectrum over the entire peak at its 10% valley as seen below where the spectrum is the average of scans between 5.254 and 5.302 minutes.

**Chemstation:** average by dragging the mouse over the peak while clicking the right mouse button.



A zoomed view of the first Evaldemo peak and the extracted spectrum of scans between 5.254 and 5.302 minutes.

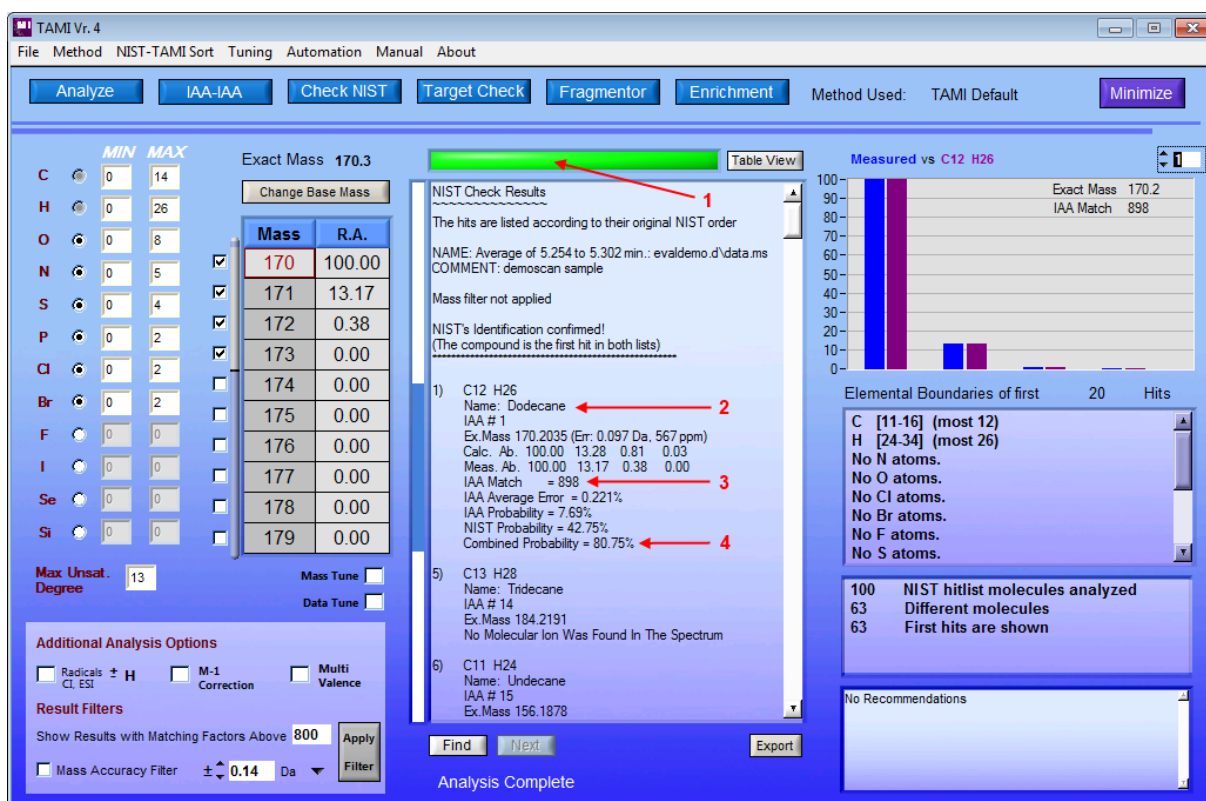
One must analyze the spectrum that is obtained by **averaging** over the peak in order to avoid **mass spectral skewing** effects on the isotopomeric pattern plus to improve the **ion statistics**.

- Explain those two terms and how averaging can affect them

Now send the averaged mass spectrum to be analyzed by NIST by double clicking the right mouse button over the spectrum.

This will launch an analysis by NIST and will also automatically open the TAMI window. TAMI will wait for the NIST analysis to complete and then perform its analysis thus you may be required to wait a few seconds to view it.

The TAMI window should look like the one on the following screenshot.



The first thing you need to check is the light above the main results window (#1) which in this case is green. A **green** light tells you that TAMI fully supports the identification made by NIST (that is presented as hit number 1 in the middle results window of TAMI (#2)). This means that the isotopic pattern of NIST's first identification candidate is similar to the measured pattern in EVALDEMO, and that no other relevant compound in NIST's list of first 100 compounds has a better fitting pattern than this number one. The IAA match (#3) shown for each identification candidate is an indication of the quality of the isotopomeric pattern matching and can be between 0 and 1000 (where 1000 is a perfect match).

This powerful analysis combined both a library search and an examination of a true physical attribute of the measured compound, and as you can see the identification probability (#4) was raised from 42.75% (NIST only) to 80.75% (NIST-TAMI).

## Using the Independent TAMI Identification Procedure without NIST

In the EVALDEMO file all molecules are identified correctly by NIST and automatically confirmed by the TAMI software, but what happens if the TAMI indicator light is not **green**? In fact it can be **orange** or even **red** and in this section we shall instruct you on the way to deal with such cases and still get the best sample identification results.

An **orange** light means that TAMI cannot fully confirm or reject NIST's identification results for one or another reason. Usually this means that the IAA matching factor is not high enough for a full confirmation or that NIST's first identification candidate cannot be tested since there are no ions where its molecular ion is supposed to be or that the NIST search results include a few isomers with the same elemental formula.

A **red** light means that TAMI has a good reason to believe that NIST's identification is false and that the compound is very likely missing from the library database altogether or that the sample co-elute with another compound/s making it unsuitable for library identification.

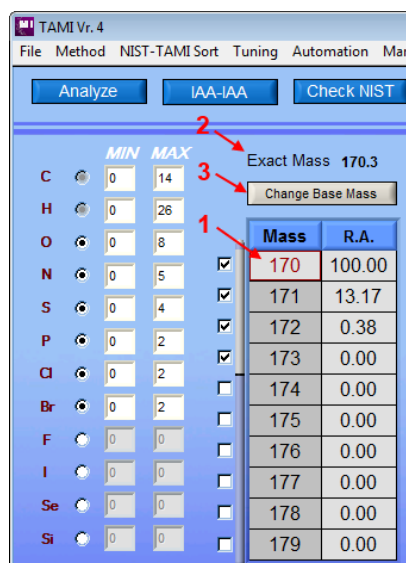
In both cases you can use TAMI to analyze the spectrum without using the NIST library, and even though this step requires your manual intervention it is fortunately rather simple as well.

Let us take for example the first peak in EVALDEMO and imagine that NIST could not identify it correctly and that a **red** indicator light was shown. Now follow these steps:

### a) Mandatory – Check the automatically identified Molecular Ion

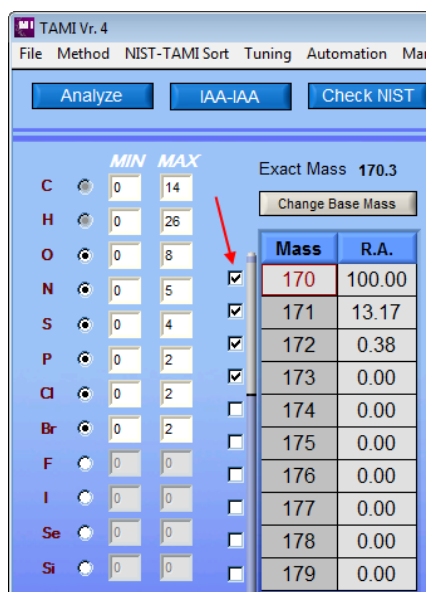
When the data is sent to be analyzed by NIST, TAMI takes a copy of that data and automatically tries to identify the m/z value of the molecular ion. This molecular ion spotting process has a high success rate but is by no means perfect since the molecular ion might be missing or very small in abundance or the spectra might include contamination peaks or abundant M-1 or M-2 ions.

So the first thing to do is to check the scanned molecular ions peaks. In the Mass/Relative Abundance table check the mass value in red (*#1 in the screenshot below*) and you can even check the exact measurement (*#2*). If you want to choose another mass from the file, use the "Change Base Mass" button (*#3*) and specify the desired value. In our case you can just leave the value 170Da in.



### b) Review the Selected Ions List

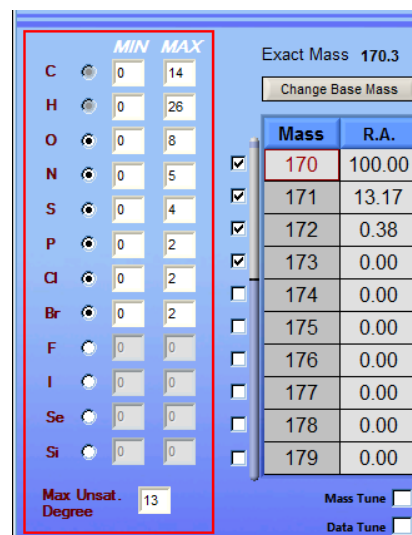
Notice the checkboxes on the left of the Mass/RA table, they allow you to select which of the ions should be considered during the pattern matching process. Here you should make an educated decision and remove ions that hold no data or alternatively contain false data such as due to co-elution or vacuum background. In our case we can leave all checkboxes as they are. Note that this number of four isotopomers used is a default value in the TAMI method and you can change it for your future experiments. This method can be found in the upper menu bar at "Method".



### c) Review the Selected Element List & Unsaturation degree

As is the case for accurate-mass instruments TAMI performs its analysis within a restricted set of elements. This serves two purposes; the first of which is lowering the analysis time (considering all elements and all possible quantities will take even a supercomputer a very long time analyze). The second purpose, which is important for us, is giving the user the ability to add extra available information in order to aid the analysis and get better results.

The general default list of elements (area #1 in the image) is usually OK for general unknown calculations. This list can be changed in the TAMI method for future experiments or temporarily via the table values.



In certain cases however we would want to remove a certain element if we are sure that it is not present and add or increase the amount of an element if the need arises. For our example we shall use the default elemental list.

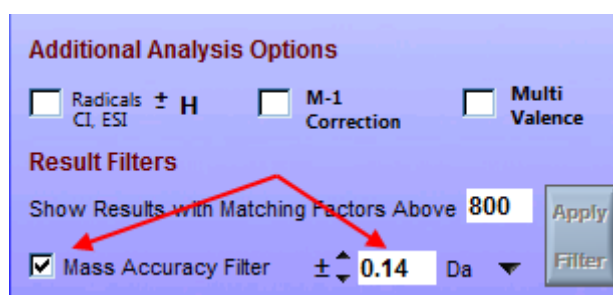
### d) Optional but Recommended - Define a Reasonable Mass Accuracy Window

One of the powerful features of TAMI is the ability to use the mass accuracy filter window. This window filters out elemental compositions with masses that are too far away from the exact measured mass. We use this option since we found that the Agilent MSD's are capable of consistently providing mass accuracy within  $\pm 0.1$  amu provided that proper mass calibration was performed with the PFTBA tune.



In the 'Result Filters' area, consider activating the Mass Accuracy Filter and set a reasonable window size. If your MS is tuned and is operating correctly the recommended value is  $\pm 0.14$  Da.

In our case we activated it and entered the default 0.14 Da value (as seen below).



### e) Additional Optional Tweaks

For now we shall skip this part that includes accounting for multi valence configurations, accounting for radicals and correcting for m-1 ion interference, as it is optional and good for specific cases. These options are discussed in the manual.

### f) Run the Analysis and Read the Results

Click the 'Analyze' button (#1 below) and let the analysis complete and see the result area (#2).

TAMI V4.4

File Method NIST-TAMI Sort Tuning Automation Manual About

Analyze IAA-IAA Check NIST Target Check Fragmentor Enrichment Method Used: TAMI Default

MIN MAX 1 Exact Mass 170.3  Measured vs C12 H26

C 0 14  
H 0 26  
O 0 8  
N 0 5  
S 0 4  
P 0 2  
Cl 0 2  
Br 0 2  
F 0 0  
I 0 0  
Se 0 0  
Si 0 0

Change Base Mass

Mass	R.A.
170	100.00
171	13.17
172	0.38
173	0.00
174	0.00
175	0.00
176	0.00
177	0.00
178	0.00
179	0.00

Search Results

NAME: Average of 5.254 to 5.302 min.: evaldemo.d\data.ms  
COMMENT: democan sample

Mass filter applied with  $\pm 0.14$ Da window around 170.3 Da

1) C12 H26  
Ex.Mass 170.2035 (Err: 0.097 Da, 567 ppm)  
Calc. Ab. 100.00 13.28 0.81 0.03  
Meas. Ab. 100.00 13.17 0.38 0.00  
Degree of Unsaturation = 0  
IAA Match = 898  
IAA Average Error = 0.221%  
IAA Probability = 74.77%

Elemental Boundaries of first 1 Hits

Exactly 12 C atoms.  
Exactly 26 H atoms.  
No N atoms.  
No O atoms.  
No Cl atoms.  
No Br atoms.  
No S atoms.  
No P atoms.

102060 Elemental compositions scanned  
325 Chemically correct molecules found  
3 Passed the mass accuracy filter  
1 Passed the minimum match restriction

No Recommendations

Analysis Complete 100%

The results window shows the list of possible elemental formulae in order of their identification probability. In the example above only one elemental composition is shown – C<sub>12</sub>H<sub>26</sub> which we know to be the correct composition. Also notice the **green** light at the top of the results screen, indicating that the analysis went well and found a worthy candidate.

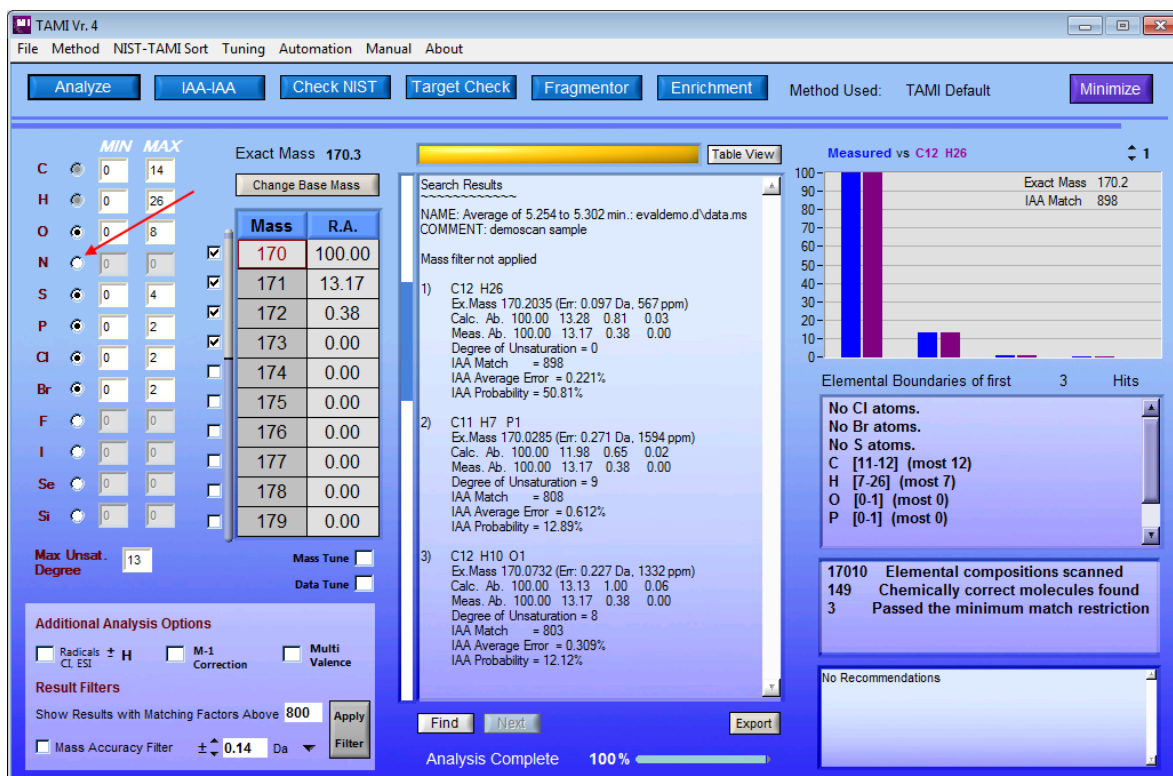
Skipping the mass accuracy filter step (*d*), even though it is a potentially useful filter would have resulted in a slightly worse identification (uncheck the mass accuracy filter and click the 'Analyze' button once again) as shown below:

The screenshot shows the TAMI V4.0 software interface. The main window displays search results for a mass of 170.3. The interface is divided into several sections:

- Control Panel (Left):** Contains element selection buttons (C, H, O, N, S, P, Cl, Br, F, I, Se, Si) with MIN and MAX values. It also includes a 'Max Unsat. Degree' set to 13, 'Additional Analysis Options' (Radicals, M-1 Correction, Multi Valence), and 'Result Filters' (Mass Accuracy Filter set to ±0.14 Da).
- Search Results (Center):** A table showing the top results:
 

Rank	Formula	Ex. Mass	Err.	R.A.
1)	C11 H10 N2	170.0844	0.216 Da, 1266 ppm	100.00
2)	C12 H26	170.2035	0.097 Da, 567 ppm	13.17
3)	C11 H7 P1	170.0285	0.271 Da, 1594 ppm	0.38
4)	C12 H10 O1	-	-	0.00
- Right Panel:** Contains a 'Measured vs C11 H10 N2' bar chart, 'Elemental Boundaries of first 4 Hits' (No Cl, Br, S atoms; C [11-12], H [7-26], N [0-2], O [0-1], P [0-1]), and a summary: '102060 Elemental compositions scanned', '325 Chemically correct molecules found', '4 Passed the minimum match restriction'. A note at the bottom says: '1) Notice the high unsaturation degree (8) of the 1st hit'.

Here we see that the first suggested composition is not correct (the 2<sup>nd</sup> one is the correct one). We can still use our knowledge of the sample, for example if we know that there is a very small probability that the molecule has any Nitrogen atom in it, or if we are certain that the Unsaturation degree is small (smaller than 7), we can input this information and run the analysis again. Uncheck the nitrogen's checkbox (*pointed out below*) and run the analysis again by pressing the 'Analyze' button.



בצע אנליזת התפלגות איזוטופים לתערובת Basic 8 ורשמו עבור שמונת החומרים בה אם זיהוי NIST אושר ואת מידת הצלחת קביעת נוסחת מבנה ללא הספריה בעזרת תוכנת TAMI

### מהלך הניסוי כולל- סכום:


- ביצוע אנליזה ע"פ השיטה שתכנתם בהתאם למהלך העבודה בעמודים הקודמים.
- הצעת שיטה חדשה ומשופרת בהתאם לתוצאות שקיבלתם וביצוע אנליזה.
- ביצוע זיהוי ספרייתי לכל החומרים הנ"ל על הספקטרום הטוב ביותר שקיבלתם לכל חומר.
- ערכו טבלה של פרמטרי הספריה כולל Match, Reversed Match, Identification Probabilities לכל החומרים במידה ונמצאו חומרים נוספים, בצעו 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

- רשום תוצאות אישור הספריה בעזרת תוכנת TAMI וכן הרכב אלמנטרי מוצע אם אין אישור לזיהוי הספריתי

### ניסוי מספר 3: אנליזת מסות ע"י ינון ב EI ב 70 eV בטמפרטורות שונות של

#### מקור היונים.

מטרת הניסוי הנה לצפות בספקטרום מסות EI בשימוש סטנדרטי ב 70 eV של מספר חומרים אבל בטמפרטורות מקור יונים של 180, 250, 300 מעלות. ברשותכם התמיסה מהניסוי הקודם (תערובת Basic 8) מהלך האנליזה:

1. בתוכנת בקרת המכשיר העלו שיטה Week1\_70eV\_180C
  2. בצעו הזרקה של התערובת
  3. בצעו עיבוד תוצאות לכרומטוגרמה: זיהוי חומרים, דו"ח אינטגרציה, דו"ח Signal-to-Noise.
  4. השוו את הכרומטוגרמות: בתכנת Data Analysis פתחו את הקובץ האחרון. בסרגל הכלים לחצו על  Overlay Chromatograms, בחרו באפשרות TIC והוסיפו את קבצי שתי ההרצות של התערובת לעמודה הימנית.
- לדו"ח מסכם:
- השוו בין ספקטראות המסות והכרומטוגרמות מההרצות השונות ואת תוצאות הזיהוי.

## נוהל סיום עבודה עם מכשיר ה GC-MS

במטרה לשמור על הציוד עליו עבדתם במצב תקין ושמיש יש לבצע סיום עבודה מסודר. שנו את התוכנית ל NIGHT. וודאו שטמפרטורת התנור מתחילה לרדת ל 50 וטמפרטורת ה injector יורדת ל 100 מעלות. שיטת העבודה night מקררת את כל חלקי המערכת, סוגרת split ל 10, לחיסכון בגזים ומכבה את ה 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.

#### ניסוי מספר 4: 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 לתוכנית בה השתמשתם בשבוע שעבר (שבוסס על Week1\_70eV\_250C.m) (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.

- א. ערכו אנליזה הרכב איזומרי על ידי RSIM על פיקים מולקולריים של מספר פחמימנים ארומטיים ואליפטיים מה מסקנותיכם? התייחסו לקשר שבין התכונות הפיזיקליות של הדלק לבין התפלגות האיזומרים בו.
- ב. בדקו זיהוי מולקולות שכיחות על ידי הספריה
- ג. מדדו את אחוז הבנזן, טולואן קסילן ומזיטילן בדלק
- ד. מהו טווח הפחמימנים מבחינת גודלם בדלק הסילוני

### **ניסוי מספר 5: אנליזה כמותית של בושם (נתן להעביר לשבוע השלישי)**

תכננו ניסוי בו תבצעו אנליזה כמותית לבושם Chanel N°5 או בושם לבחירתכם. בדו"ח המכין:

1. ערכו רשימה של 10 החומרים הנפוצים ביותר בבושם
2. תכננו שיטה לאנליזה הבושם והסבירו את בחירותיכם מהלך הניסוי:

1. הראו את השיטה למדריך לאישור
2. הריצו את האנליזה לאחר אישור המדריך
3. בצעו ניתוח כמותי של מרכיבי הבושם שבחרתם:

בתכנת עיבוד הנתונים בחרו Chromatogram>Percent report משורת התפריט ונתחו את התוצאות.

4. הכינו טבלה כמו בדוגמה ומלאו אותה עבור כל החומרים שציפיתם לראות:

Compound name	Molecular weight	% in sample	NIST match	NIST reverse match	NIST probability	TAMI match +number
---------------	------------------	-------------	------------	--------------------	------------------	--------------------

5. הנחיות האיחוד האירופי דנות בקיומם של אלרגנים (חומרים משרי אלרגיה) בבשמים, ומספקים רשימה של 84 חומרים כאלה. האתר בו נמצאת הרשימה:
6. [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/opinions\\_layman/perfume-allergies/en/index.htm#il1](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/perfume-allergies/en/index.htm#il1)

עבור הגורמים העיקריים לאלרגיה נקבעו האיסורים הבאים:

The following allergen compounds need to be below the 10-100 ppm

List A: Fragrance chemicals, which according to existing knowledge, are most frequently reported and well-recognized consumer allergens:

Amyl cinnamal  
Amylcinnamyl alcohol  
Benzyl alcohol  
Benzyl salicylate  
Cinnamyl alcohol  
Cinnamal  
Citral  
Coumarin  
Eugenol  
Geraniol  
Hydroxycitronellal  
Hydroxymethylpentyl-cyclohexenecarboxaldehyde  
Isoeugenol

List B: Fragrance chemicals, which are less frequently reported and thus less documented as consumer allergens:

Anisyl alcohol  
Benzyl benzoate  
Benzyl cinnamate  
Citronellol  
Farnesol  
Hexyl cinnamaldehyde  
Lilial  
d-Limonene  
Linalool  
Methyl heptine carbonate  
3-Methyl-4-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)-3-buten-2-one

Furthermore, two fragrances (natural mixtures) were added

Common name  
Oak moss  
Tree moss

בצעו ניתוח תוצאות מתאים וקיבעו אם הבושם עומד בתקנות לגבי ארבעה אלרגניים  
נבחרים מהרשימה A מבחינת כמות מעל 100 PPM. מה הריכוזים הנמדדים. התיעצו  
עם המדריך לבחירת ארבעת האלרגניים.

ניתן כעת אם הזמן מאפשר לבצע אנליזת בושם אחר או After Shave ולהשוות  
תוצאות.

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

## **שבוע שלישי - אנליזות מתקדמות**

---

### **ניסוי מספר 6 - אנליזה כמותית של טבליית Exedrin**

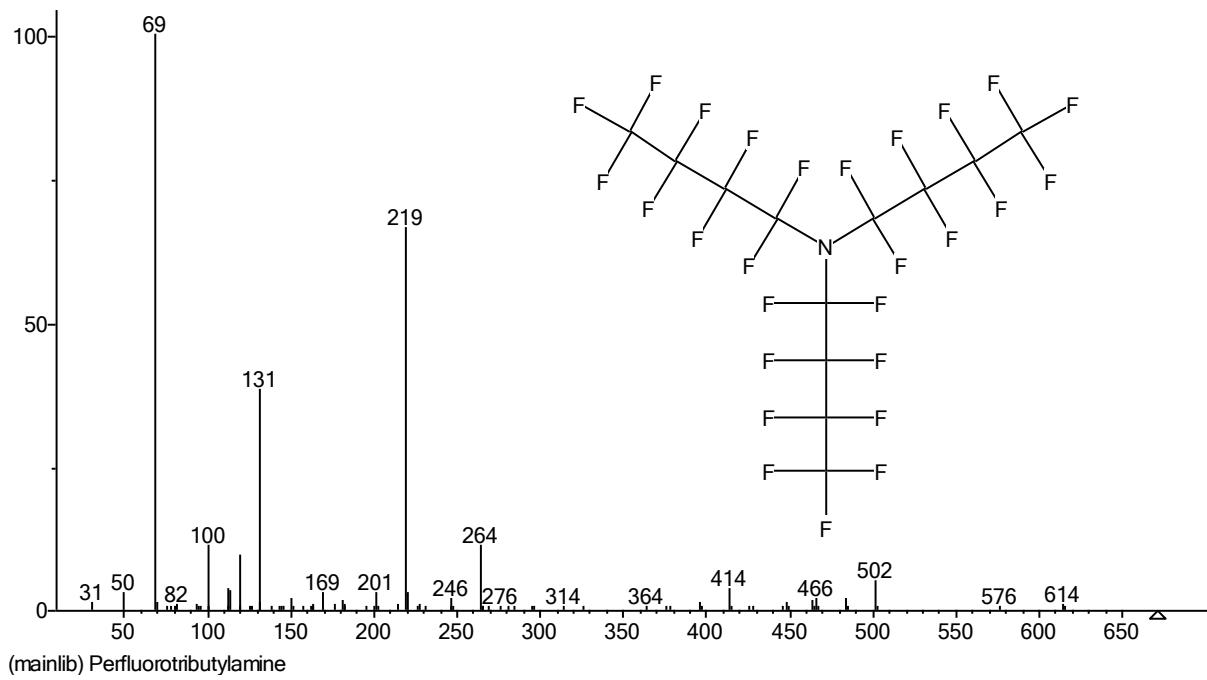
Exedrin היא תרופה נפוצה לטיפול בכאבי ראש. מהם החומרים הפעילים בטבלייה? תכננו ניסוי לאנליזה של טבלייה זו, כולל הכנת הדוגמה לפי הדגשים הבאים. מהלך הניסוי:

1. טחנו טבלייה אחת של Exedrin
2. שקלו במדוייק את הכמות הרצוייה מאבקת הטבלייה והמיסו אותה במתנול לקבלת הריכוז הרצוי לכם (מהו הריכוז? כמה תשקלו?)
3. בנו שיטת עבודה במכשיר והראו אותה למדריך לאישור
4. הזריקו את התמיסה ונתחו את התוצאות באופן כמותי (אחוז המרכיבים בתמיסה)
5. מלאו טבלה כמו בניסוי 8 ודונו בתוצאות. תנו דגש ליחס בין אספירין וחומצה סליצילית. מה משמעות יחס זה?

### **ניסוי מספר 7 - אנליזה לבחירתכם ו\או שפור תוצאות**



נספח: ספקטרום מסות אופייני של PFTBA (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 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 (כתיבת הרקע התיאורטי לא חובה אלא אם צוין אחרת). הדו"ח המכין יכלול רק את פרטי המהלכים הטכניים, סיבותיהם ותוצאות הניסיון הרצויות. יש לקרוא ולהבין את מערך השיעור לפני התחלת המעבדה.

ב. לכל שלב ושלב של הניסוי פרטו את:

- מטרת הניסוי.
- סדר פעולותיכם הכרוכות בתפעול המכשיר.
- תוצאות להן אתם מצפים ומדוע, תוך הדגשת השוני מהניסיון הקודם.
- רשמו כרומטוגרמה באופן ידני לה אתם מצפים עם צירי זמן ובליעה חצי כמותיים (יש להפעיל שיקול דעת לגבי יחסי עוצמות הפיקים וסדר היציאה)
- יש לבוא עם ספקטרום בליעה של החומרים שיופרדו.
- ענו על השאלות המופיעות במערך הניסוי וצרפו את התשובות לדו"ח המכין.

## דרישות לעריכת דו"ח מסכם (יש להגיש דוח מסכם אחד כולל בסוף שלושת

השבועות):

- א. לרכז נתונים ותוצאות בטבלאות, היכן שניתן.
- ב. לרשום את מהלך החישובים.
- ג. להגיש את הכרומטוגרמות בצורה מסודרת, כולל הנתונים הרשומים על גביהן (שם דוגמא, ממש מריץ, אופי ההרצה (איזוקרטית/גרדיאנט) - במקרה של גרדיאנט יש

- לציין מאיזה ריכוז לאיזה ומה הזמנים, קצב זרימה וטמפרטורה)..
- ד. לוודא כי יש ברשותכם ספקטרום עבור כל אחד מהחומרים בתמיסות העבודה (בטווח של 200-400 nm).
- ה. לכל ניסיון יש לרשום את מטרתו ומסקנות סופיות לגבי השגת המטרה.
- ו. יש להתייחס לשוני התוצאות מהצפי – ממה נבע ואיך ניתן להסבירו.
- 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 לשימוש במים בדרגת HPLC grade להכנת התמיסות. המים מכילים כמות מסוימת (10%) מתנול כדי למנוע התפתחות אצות.

### **3. גזים בפאזה המובילית**

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

### **4. מזרק ל-HPLC**

בעל נפח  $100\mu\text{L}$ , שונה מזה של GC. הזהרו לא להחליף ביניהם. חשוב לשטוף את המזרק לפני תחילת העבודה מספר פעמים במתנול. לפני כל הזרקה יש לשטוף אותו בתמיסה המוזרקת. בסוף המעבדה שטפו את המזרק מספר פעמים באתנול והחזירו למקומו. הכניסו 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 טיפוף ל-waste המעיד על כך שלולאת ההזרקה אכן מלאה בדוגמא.

5. חשוב להקפיד על דיוק בהכנת התמיסות. שימו לב לסימון ברור על בקבוקי מדידה

וויילים.

6. לפני מיהול שטפו את בקבוק המדידה בכמות קטנה של תמיסה המשמשת למיהול (פאזה מובילית או מים ל-HPLC). עם זאת, רצוי להשתמש בבקבוקים יבשים כשיש צורך להעביר לתוכם אבקות יבשות. לפני העברת תמיסה לכוסית לשם הזרקה, שטפו את הכוסית בתמיסה עצמה.
7. סמנו וציינו על כל כרומטוגרמה את כל הפרמטרים החשובים: שם המבצע/ים, שם הדוגמה, סוג התמיסה, אורך גל לבליעה, תכנית גרדיאנט, סוג הדוגמה ותאריך.

### הוראות כלליות להפעלת המכשיר:

1. **אם המכשיר כבוי**, הדליקו את כל חלקי מערכת ה-HPLC ע"י לחיצה על כפתור Power בכל קופסה. סדר ההדלקה:

- גלאי סדרת הדיודות: SPD-M10A.
- משאבת ה-LC: LC-10AT.
- תנור לייצוב טמפרטורת הקולונה: CTO-10AS.
- משאבת הוואקום לדגזינג: GT-154.

כפתור ההדלקה של המכשירים נמצא מצד שמאל למטה מלבד GT-154 בו הוא נמצא מאחור.

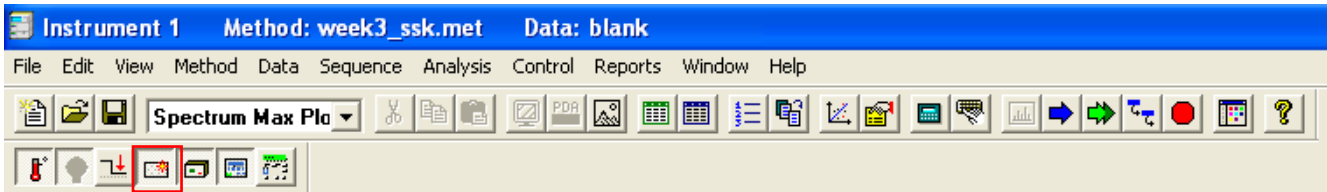
- קופסת הבקרה: SCL-10A.
- להדליק את המחשב – שלב אחרון, למניעת בעיות תקשורת.

2. לחצו לחיצה כפולה (double click) על class-VP icon לקבלת החלון Shimadzu class VP –. בחרו ע"י לחיצה כפולה ב- icon "Instrument 1" לאחר פעולות אלו המערכת תשמיע ציפצוף וזהו סימן לכך שיש תקשורת (נשלח סיגנל מה-PDA למחשב) ויש חיבור למערכת ה-HPLC. במידה ועל מסך המחשב לא מופיע חלון הנקרא LC Setup Assistant, יש ללחוץ על האייקון הבא:



**אזהרה:** במידה ולא נשמע הציפצוף – סימן שלא היה חיבור תקין בין המחשב למכשיר (קראו למדריך).

3. לאחר מכן יש להדליק את המכשיר ע"י לחיצה על האייקון הבא :



### Instrument on/off

לחיצה על כפתור זה מפעילה את כל רכיבי המערכת, אך הגלאי עדיין יכול להיות כבוי.



לחצו על האייקון של המנורה הצהובה :  
כך צריכה להיראות שורת האייקונים כאשר כל רכיבי המכשיר פעילים (המנורה עשויה להיות תחילה אפורה ורק לאחר מכן צהובה):



וודאו שאכן כל האייקונים הנדרשים נראים לחוצים.

### לפני תחילת העבודה:

פתחו תיקיית עבודה אישית בכתובת :

C:/Class-VP/Students/Method/"currentYear"/"yourFolder"

והעתיקו את שיטת העבודה "student.met" לתיקייה שלכם. זו היא שיטת העבודה בה תעבדו במשך כל הניסוי.

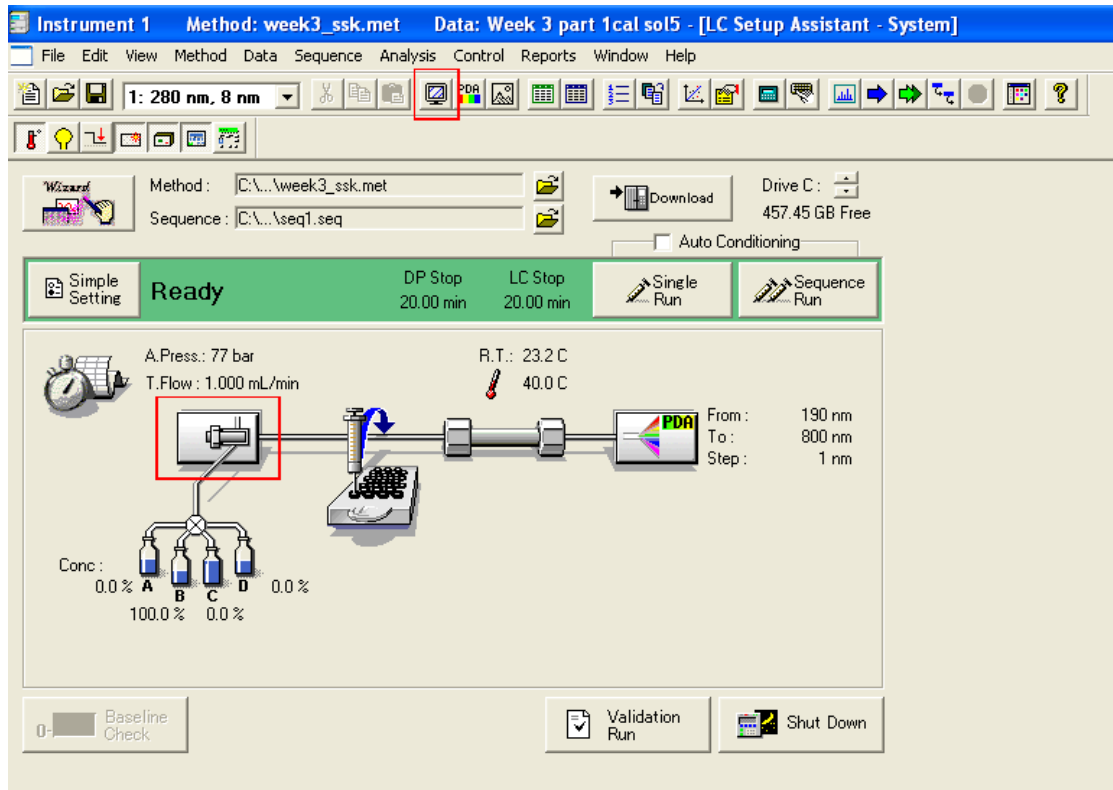
לאחר מכן פתחו תיקייה נוספת לצורך שמירת התוצאות שלכם בכתובת הבאה :

C:/Class-VP/Students/Data/"currentYear"/"yourFolder"

לצורך בחירת שיטת עבודה יש ללחוץ על file שנמצא בפינה השמאלית העליונה של המסך. בחרו באופציית - method, שיטת העבודה. לחיצה או הצבעה על method תפתח תת חלון נוסף בו בחרו ב - open. ברגע זה נפתח חלון open method file וודאו כי התיקייה בה אתם נמצאים היא של השנה הנוכחית וע"י לחיצה כפולה בחרו ב - "student.met" כעת וודאו ששמה של השיטה שבחרת מופיעה בחלק העליון של חלון העבודה.

## קביעת פרמטרים ניסיוניים בשיטת העבודה:

לחצו 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). לחלופין ניתן לבחור את האייקון עם התמונה של המשאבה (שתי האופציות מסומנות בריבוע אדום בתמונה מטה).



ברגע זה נפתח חלון בו ניתן לבחור ב-6 סוגים של פרמטרים. האפשרויות הן מ- Pumps עד Time program, כאשר ניתן לעבור מאחת לשניה ע"י לחיצת העכבר על סוג הפרמטר. יש למלא את כל הפרמטרים הנרשמים לפי הניסוי הראשון באותו יום.

**"Pumps"**: בחלון זה תוכל לקבוע את הרכבה של הפאזה הניידת ומהירות זרימתה,

כאשר ההרכב נקבע ע"י רישום ערך מספרי של אחוז המתנול בשורה B.Conc. את אחוז המים בפאזה 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 לחצו Apply ולאחר מכן Download הנמצאים בחלק הימני התחתון של המסך (אין צורך לגעת בפרמטרים של SCL-10, CTO-10 ו-

Status log)

- לבחירתכם קיימים שלושה ממסים: תמיסה A הינה HPLC Grade Water עם 5-10% מתנול (למה?), תמיסה B הינה מתנול, תמיסה C הינה: מתנול + מים + חומצה אצטית ביחסי נפחים 30: 70: 3 בהתאמה.

**"SPD-M10A"**: ניתן להגדיר את אורך זמן האנליזה ע"י קביעת הערך ב-Run Time. שימו לב, בדרך כלל מוגדר זמן של 20 דקות.

**"CTO-10AS"**: מאפשר לשלוט בטמפי' התנור של הקולונה.

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

לאחר הכנסת כל הפרמטרים הרצויים לחצו תמיד על Apply ו-Download (הפעולה גורמת למערכת ה-HPLC להכיר בפרמטרים הנ"ל). צאו מהמסך של Insrtument setup ע"י לחיצה על "X" שנמצא בחלק ימני עליון של החלון הפנימי. לחיצה על ה-"X" האדום בחלון העליון תזרוק אתכם מהתוכנה. ראו הוזהרתם! וכן, אל תשכחו לשמור את השיטה עם השינויים החדשים שביצעתם.

**במהלך מעבדה זו, בכל פעם שתמצו לשנות את תנאי ההרצה חיזרו להוראות הנ"ל!**

**שבוע מס' 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 נוזלית על פני כרומטוגרפיה גזית?
- 2) תארו את המערכת על כל חלקיה והסבירו 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, נמקו את בחירתכם ותארו את התוצאות הצפויות עבור האנליזה בשבוע הראשון.  
נתונה תמיסת עבודה המכילה את החומרים הבאים:

Benzene	$10^{-3}$ (v/v)
Mesitylene	$10^{-3}$ (v/v)
Naphthalene	$4 \times 10^{-5}$ M
Anthracene	$3 \times 10^{-5}$ 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:**

היעזרו בהוראות הכלליות להפעלת המכשיר (קביעת פרמטרים ניסיוניים) ובצעו את הניסיונות הבאים:

1. קבעו את הרכב הפאזה המובילית ל- 65% אחוז מתנול ו- 35% מים עם קצב זרימה של 1 ml/min (isocratic elution), וטמפ' תנור של  $40^{\circ}\text{C}$ . מדידה זאת נועדה לחילוץ פרמטרים כרומטוגרפיים כגון: מספר פלטות תאורטיות בקולונה, גובה פלטה תאורטית, רזולוציה וכו'.

**לפני כל הזרקה קראו למדריך על מנת למנוע תקלות מיותרות.**

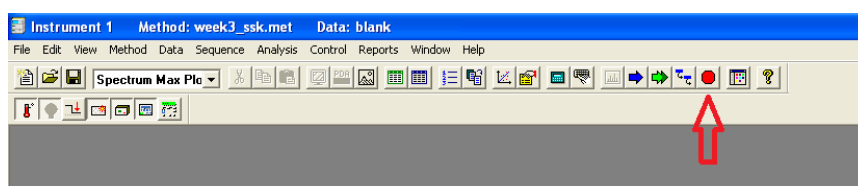


## ביצוע הרצה:

1. לחצו על icon "חץ כחול" (Single Run), יופיע חלון הנקרא Single Run Acquisition.
2. הכניסו את שם הדוגמא ב - Sample ID ושם הקובץ ב - Data file. וודאו שבשורת Data Path מופיעה התיקיה האישית שלכם. שנו את ה" sample description" בהתאם לניסוי. לחצו על Start.
3. במידה ויופיע המסך "The Current Method has Changed" לחצו "Yes".  
3. חכו לקבלת ההודעה בתחתית המסך: "Waiting for Trigger" (מוצג באיור הבא)

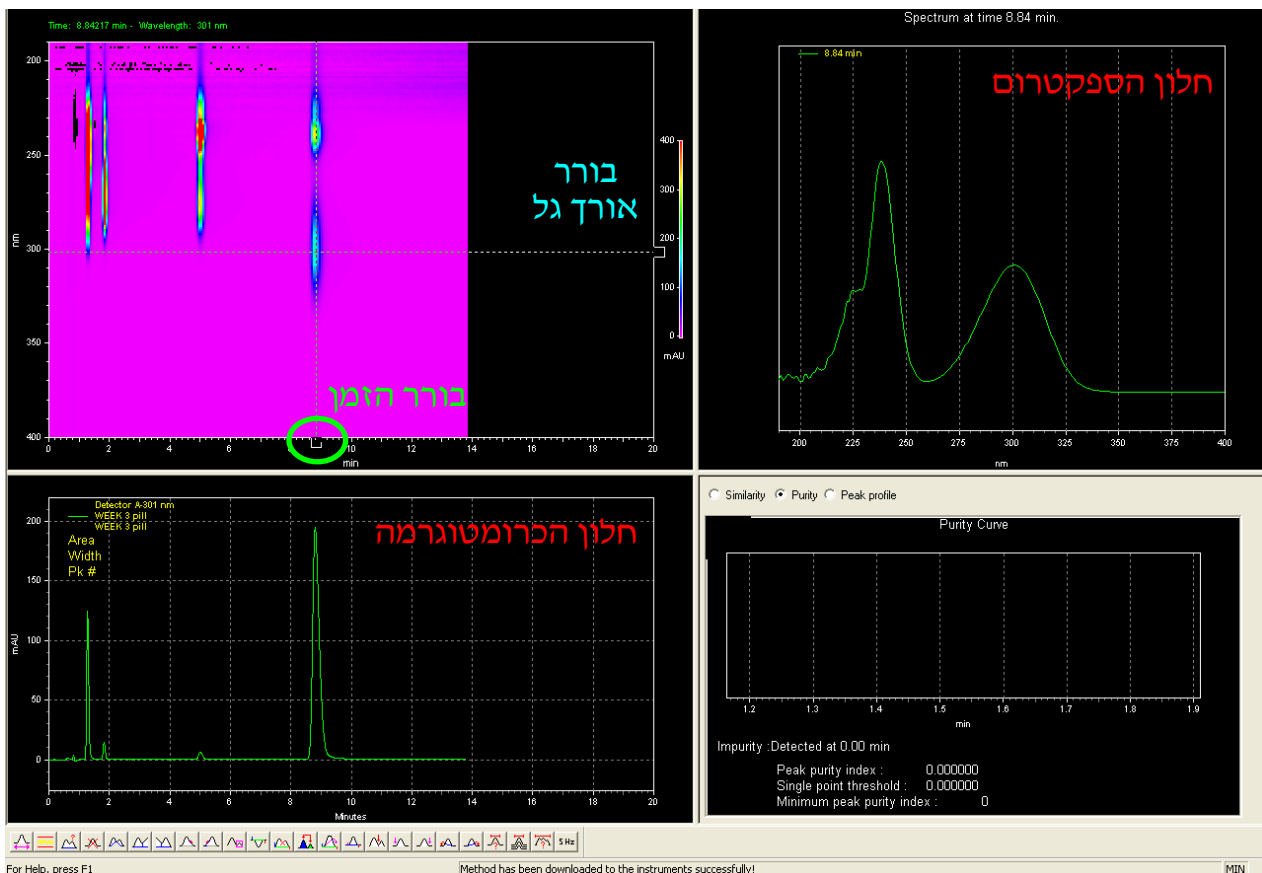


4. הכניסו את הדוגמא של התמיסה של (50  $\mu$ L לפחות) לתוך האינג'קטור, המצוי בחלק העליון בצד שמאל בקופסת הממסים, כאשר הוא נמצא במצב Load (הידית בשעה 2). הכנסת הדוגמא ללולאת ההזרקה (נפחה 20  $\mu$ L) מתבצעת בעדינות תוך כדי ווידוא שבועות לא נכנסות ללולאה ושהמזרק אכן חדר דרך הספטום (מרגישים את התנגדות הספטום לחדירת המחט). **לאחר הכנסת הדוגמא משאירים את המזרק בתוך האינג'קטור.**
5. יש לסובב את הידית של האינג'קטור בבת אחת למצב Inject (90 מעלות בכיוון השעון ביחס למצב Load – שעה 4). הכרומוטוגרמה תתחיל באופן אוטומטי. **כעת ניתן להוציא את המזרק.**
6. חכו לקבלת הכרומוטוגרמה. (במידה וחלון הכרומוטוגרמה לא מופיע יש לבחור view->gallery->mix view). זוהי כרומוטוגרמה מס' 1.
7. אם ברצונכם לעצור את ההרצה לפני שעוברות 20 דקות, לחצו stop icon עם סימן עצור אדום) לעצירת ההרצה, אם לא אזי ההרצה תגמר אוטומטית לאחר 20 דקות (כפי שמוגדר בPDA). אחרי לחיצה על "Stop" יופיע המסך: "Abort Current Run?" אם ברצונכם לעצור את ההרצה לחצו "Yes".



2. השיגו ספקטרום בליעה נפרד לכל אחד מארבעת החומרים מכרומטוגרמה מס' 1 ונסו לזהות לפיהם את החומר.

- ניתן להדפיס את הספקטרה של כל החומרים בפעם אחת ע"י הצגתם יחד. לשם כך, בחלון הספקטרום יש ללחוץ על הלחצן הימני של העכבר ולבחור "overlay spectra". לאחר מכן יש לבחור את הספקטרום הרצוי ע"י הזזת בורר הזמן לזמן היציאה של הפיק הראשון ולמקם אותו במרכז הפיק. (כפי שמוצג באיור הבא). לאחר מכן יש להזיז את בורר הזמן לפיק הבא, הספקטרום שלו יתווסף אוטומטית וכן הלאה.




- בכדי להדפיס את חלון הספקטרום יש להקיש על הלחצן הימני בעכבר ולבחור Utilities -> print

3. השיגו כרומטוגרמה סלקטיבית לאנטרצן (כרומטוגרמה שבה רואים בעיקר אנטרצן) - רמז: היעזרו בבורר האורך גל. במה נבדל האנטרצן משאר החומרים?

בכדי להדפיס את חלון הכרומטוגרמה, יש ללחוץ על הלחצן הימני בעכבר ולבחור Utilities -> print

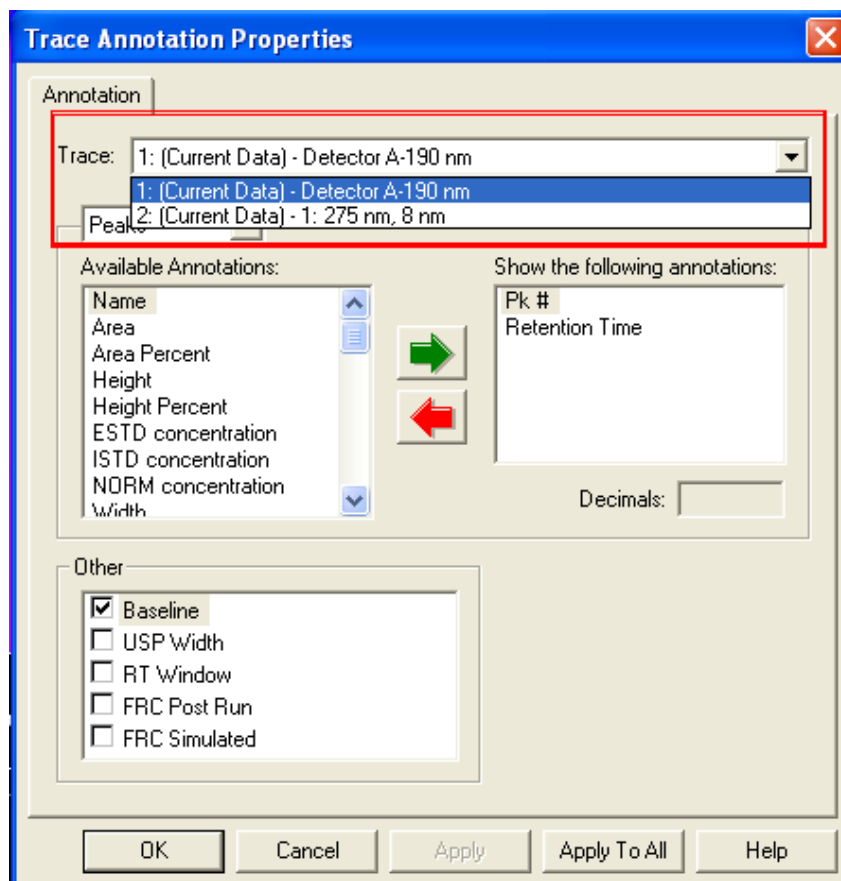
כעת נבצע עיבוד נתונים לכרומטוגרמה לצורך הפקת דו"ח כרומטוגרפיה.

- יש לבחור את אורך הגל הרצוי להצגת הכרומטוגרמה המיטבית (אורך גל זה ניתן להגדיר בתור "ערוץ" ע"י בחירת method->PDA setup->multi, מעין קיבוע של אורך גל נבחר, מה שיקל על עיבוד הנתונים בהמשך).

- בכדי לבצע אינטגרציה יש ללחוץ על Analysis->analyze או לחלופין על כפתור המחשבון (השלישי משמאל לחץ הכחול)  - במידה וברצונכם לראות פרמטרים שונים של האינטגרציה (זמן יציאה, שטח וכו') בחלון הכרומטוגרמה יש ללחוץ על הכפתור הימני בעכבר בחלון זה ולבחור "Annotations".

לדוגמא: ניתן למספר את הפיקים ע"י לחיצה על הכפתור הימני של העכבר כאשר הינו בחלון הכרומטוגרמה (חלון שמאלי תחתון) לאחר בחירה ב-"Annotations". בחלון הנפתח (Trace Annotation Properties) בחרו ב- PK# (מספור פיקים) ע"י לחיצה על חץ ירוק. אשרו את הבחירה ע"י לחיצה על OK. האישור יגרום למספור הפיקים לאחר ביצוע האינטגרציה.

- בחלון שיפתח יש לשים לב כי מדובר בערוץ הרלוונטי לחלק זה של הניסוי (ראו באיור מטה) שכן האינטגרציה מבוססת על הכרומטוגרמה שתלויה באורך הגל הנבחר.



- ניתן לבטל אינטגרציה, להפריד בין פיקים וכו' ע"י שימוש באייקונים המופיעים מתחת לחלון הכרומטוגרמה (שהייה של סמן העכבר על כל אחד מהאייקונים תציג הוראות רלוונטיות לו מתחת לחלון הכרומטוגרמה. יש ללחוץ על האייקון הרצוי ולביטול ניתן ללחוץ על Esc).

למשל: במידה ובוצעה אינטגרציה על פיקים לא רצויים ניתן לבטל אותה באמצעות לחיצה על ה- icon הרביעי מצד שמאל.

- ודאו שהאינטגרציה על הפיקים נעשתה בצורה מדויקת תוך שימוש ב- zoom. מצאו לבד איך עושים zoom ומבטלים אותו. במידה והאינטגרציה אינה לשביעות רצונכם ניתן להגדיר תנאי אינטגרציה שיגבילו את התוכנה לקבלת התוצאה המיטבית בטבלת ה"integration events" אליה ניתן להגיע ע"י בחירת method->integration events או לחיצה על האייקון עם הטבלה הירוקה (ראו איור מטה)

#	Event	Start Time	Stop Time	Value
1	Width	0.000	0.000	0.2
2	Threshold	0.000	0.000	50
3		0.000	0.000	0.2

למשל הגדרה של minimal area מסדר גודל רלוונטי לפיק הנמוך ביותר אותו תרצו (לראות) תאפשר להוריד אינטגרציה של פיקים לא רצויים. הערה: גם בחלק זה יש לוודא כי הטבלה עליה אתם עובדים מכוונת לערוץ הנכון (ראו איור מטה):

#	Event	Start Time	Stop Time	Value
1	Threshold	0.000	20.000	1000
2	Width	0.000	20.000	0.2
3	Minimum Area	0	20	0
4		0.000	0.000	0.2

הערה: יש לשים לב כי שימוש בפעולות אלו קובע כללים שנישמרים תחת שיטת העבודה ועלולים להיגרר ולהכשיל אינטגרציה בהרצות הבאות. ניתן לזהותם בטבלאות integration events ו-MIF table (האייקון של הטבלה הירוקה והכחולה) ולשנותם למחוק אותם אם יהיה בכך צורך.

## בניית והדפסת דו"ח הכרומטוגרפיה הסופי.

לשם הגדרת ה-report יש לבחור method->custom report או ללחוץ על האייקון הרביעי משמאל לחץ הכחול של אייקון ההרצה (יד מחזיקה פתק צהוב). יש לוודא כי הדו"ח מכיל את החלקים הבאים: תיאור ההרצה, כרומטוגרמה וטבלה המרכזת את כל ערכי האינטגרציה של הכרומטוגרמה.

**שימו לב שבחלק זה הנכם מעצבים את התבנית הכללית של הדו"ח, מעין טיוטה ולכן לא תוכלו לראות נתונים מספריים בשלב זה!**

### **- תיאור ההרצה:**

מדובר בsample description כפי שהוגדר בתחילת ההרצה. ניתן להוסיף שדה זה ע"י לחיצה על כפתור ימני ובחירת insert field->sample description

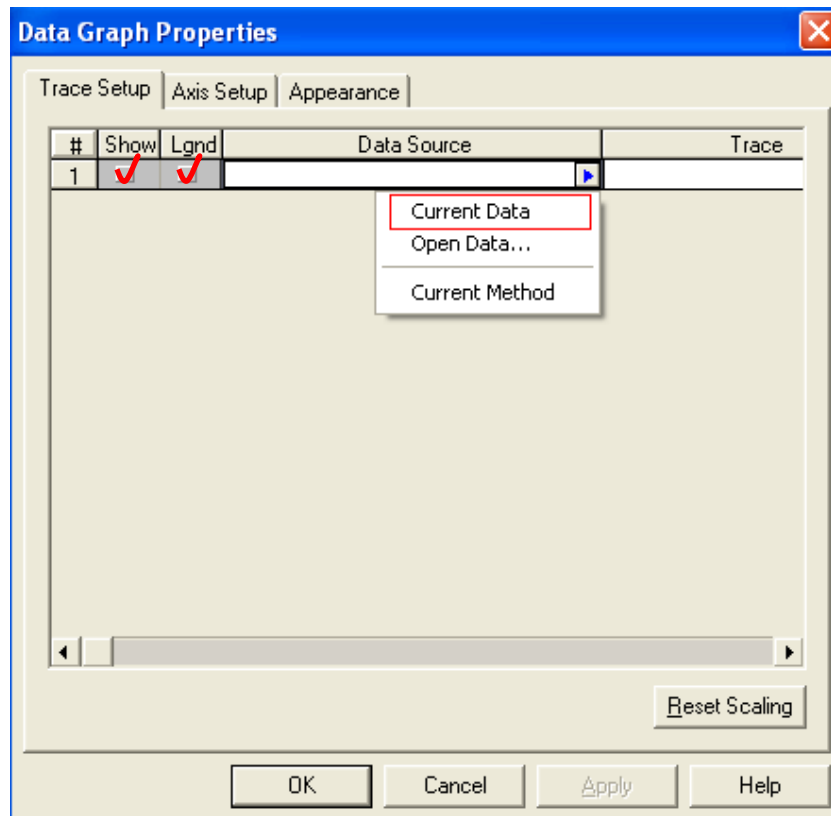
### **- כרומטוגרמה:**

במידה וחלק זה אינו מופיע בדו"ח, ניתן להוסיפו ע"י לחיצה על הכפתור הימני ובחירת insert graph->data graph.

בחלונית "data graph properties" יש לבחור את המקור להיות "current data"

ואת ה-trace לערוץ הרלוונטי בו תעשו את האינטגרציה וכן יש לוודא שישנו "V"

אדום תחת Show ו-Lgnd. (ראו איור מטה) וכן ללחוץ apply ו-ok.



הערה: במידה והכרומטוגרמה כבר מופיעה בדו"ח ניתן לעשות עליה double-click בכדי להגיע לחלון של data graph properties.

במידה ותוצו לשנות את טווח הזמנים של הכרומטוגרמה יש לחזור לחלון הנ"ל, לבחור ב-axis setup, ולסמן את אופציית "use this range" ולבחור את טווח הזמנים הרצוי וכן ללחוץ apply ו-ok.

#### **- טבלת אינטגרציה:**

בכדי להוסיף את טבלת האינטגרציה יש ללחוץ על הכפתור הימני ולבחור insert report->run report. בחלונית "run report" יש להגדיר את הערוץ הרלוונטי לאינטגרציה ולבחור את הפרמטרים הבאים מתוך הרשימה המופיעה בחלק השמאלי של החלון (available parameters) כל פרמטר יש להעביר לרשימה המופיעה בחלק הימני של המסך (report the following parameters) ע"י לחיצה על הכפתור עם החץ הירוק:

.Pk#, Area, Rt, Height, Resolution, Width50%, Theoretical Plates, Lambda Max

לשם הצגת ה-report לפני ההדפסה (כעת מדובר ב-Preview של הדו"ח) יש לבחור reports->view->method costum report. **שימו לב כי הדו"ח מכיל כרומטוגרמה תקינה ונתונים בטבלת האינטגרציה.** אם הדו"ח המתקבל הוא לשביעות רצונכם ניתן להדפיסו ע"י לחיצה על הכפתור הימני ובחירת print. הערה: גם כאן יש לוודא כי מדובר באינטגרציה של הערוץ הרלוונטי וכי האינטגרציה נעשית גם לפיקים להם אין שם (יש לסמן unnamed peaks בחלון האפשרויות). במידה ויש צורך להציג אינטגרציה לכמה ערוצים ניתן להוסיף טבלה נוספת (או להעתיק את הקיימת ולשנותה בהתאם, זאת ע"י סימונה ושימוש בקיצורי הדרך Ctrl+C ואז Ctrl+V). במידה ויש צורך לשנות פרמטרים בטבלה קיימת יש ללחוץ על הכפתור הימני כאשר הסמן נמצא על הטבלה ולבחור ב-report properties.

למעבר לניסיון חדש (הרצה חדשה) יש לסגור את המסך הפנימי ע"י לחיצה על "X" התחתון בצד ימין עליון.

4. חזרו על ההרצה הקודמת, 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? זוהי כרומטוגרמה מס' 2.

5. חזרו על ההרצה שוב, הפעם בקצב זרימה של 0.3 ml/min, כאשר הרכב הפזה המובילית היא 100% מתנול טהור. מה ניתן ללמוד מניסוי זה? זוהי כרומטוגרמה מס' 3.

6. עבור ניסיונות ב- Gradient elution – קבעו הרכב התחלתי של פזה מובילית ל- 65% מתנול והמשך ב- gradient elution למשך 4 דקות עד 100% מתנול בקצב 1ml/min. זוהי כרומטוגרמה מס' 4.

לכתיבת התוכנית התחילו במסך Pumps מתוך Instrument setup ("טלוויזיה") בו תקבעו את ריכוז המתנול ההתחלתי. עברו למסך Time program : במשבצת Time הכניסו את הזמן הקובע את הזמן הסופי לפעולה, ב- Module הכניסו את האלמנט שמתוכנת בזמן ז.א. Pump, ב- Events הכניסו את המסמ שקצב זרימתו מתוכנת בזמן - B.Conc, ב- Value רשמו את הערך הסופי של ריכוז B בסוף זמן התכנות. כך צריכה להיראות התוכנית :

#	Time	Module	Event	Value	Comment
1	4	Pumps	B.Conc	100	
2					

7. נסו לשנות את איכות הכרומטוגרמה על ידי שינוי התוכנית הנ"ל. (זמן הגרדיאנט, קצב זרימה...).

8. מהלו את תמיסת העבודה פי 100 ובדקו את רגישות השיטה. קבעו באיזו שיטה תעדיפו להשתמש ונמקו את בחירתכם. מה ניתן ללמוד מכך על סף הגילוי למרכיבי הדוגמה השונים?

9. העלו את טמפרטורת התנור של הקולונה ב 20C (ע"י שינוי ב-CTO-10ASvp תחת instrument setup) והזריקו את תמיסת העבודה בתנאי ניסוי זהים לאלה בהם עבדתם בניסוי מס' 1. מה ניתן ללמוד מניסוי זה?

## עיבוד תוצאות לדו"ח המסכם

מהכרומטוגרמה שקיבלתם בסעיף 1' חשבו 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. הסבירו גורמים אפשריים להבדלים בין מספר הפלטות עבור החומרים השונים.

(ב) גובה פלטה תיאורטית.

(ג) השווו בין הכרומטוגרמות הבאות: כרומטוגרמה מס' 1 לעומת 2. וכרומטוגרמה מס' 2 לעומת 3. מהם 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 ביצעתם בסעיף 7? מה ניתן ללמוד מהם?

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



## שבוע 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 והחסרונות לעומת גלאי בליעה רגיל? מהם העקרונות האופטיים של הגלאים השונים (גלאים שונים מאשר סידרת דיודות) ופרטו עליהם **בקצרה** (לדוגמא גלאי פיזור, גלאי שבירה וכו'). הסבירו בקצרה את עקרון פעולת הגלאי.

### מטרה:

היכרות 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 את ריכוזי החומרים בפיקים חופפים. הציעו דרך לחישוב הריכוזים הללו והוסיפו לדו"ח. (הכוונה לכתוב בפירוט את כל המשוואות).

לרשותכם תמיסת עבודה אשר כוללת את 2 הפרבנים ו-2 הפתלאטים הבאים:

- 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 החומרים הנ"ל בריכוז לא ידוע בתחום של  $10^{-5}$  –  $10^{-4}$  g/ml במתנול (תמיסת נעלם)

### ניסיונות לביצוע:

1. הזינו שיטה אותה יצרתם שבוע שעבר. על מנת להפריד את התערובת יש ליצור את 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 המכשיר משלים עם מים. אחרי שינוי השיטה יש להמתין לפחות 5 דקות. הזריקו את התערובת בתנאים אלו. התבוננו בספקטרומי הבליעה 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 60% והשאר – מים. קבלו כרומטוגרמות באורכי גל שבחרתם בסעיף קודם.

**שימוש בתכונת Peak Purity:** מצאו את החלון הימני התחתון ובחרו ב-Purity. במידה ואין חלון כזה, באחד מהחלונות לחצו על הכפתור הימני של העכבר ובחרו ב-Gallery ומתוכו ב-Mixed View. עליכם להגדיר את אורך הגל אופטימלי ולהזין אותו בחלון הכרומטוגרפיה (כפתור ימני בעכבר על חלון הכרומטוגרפיה, בחירה ב-Properties, חלונית Trace Setup והזנת אורך הגל בשורת trace) וגם בשורת האייקונים הראשית. ביצעו אינטגרציה ע"י לחיצה על כפתור Analyze. שימו לב שהאינטגרציה חייבת להיות מדוייקת. בכדי לתקן את תנאי האינטגרציה שנו את הפרמטרים בטבלת ה-integration events. גם כאן הקפידו להגדיר את אורך הגל הנכון ב-trace. אחרי שווידאתם כי בוצעה אינטגרציה מדוייקת, ניתן ללחוץ על הפיק שאותו תרצו לבדוק כאשר כפתור Ctrl מוחזק. בחלון ימני תחתון אמורות להופיע כרומטוגרמות של אותו פיק המצוירות באורכי גל שונים. וודאו שאתם במצב של 3-point Purity Index Mode ע"י לחיצה על הכפתור הימני בעכבר בחלון הימני התחתון ובחירה ב-Properties. העזרו במדריך, אילו 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 את אורכי הגל שבחרתם לתוך PDA SETUP (העזרו במדריך). בחלון הכרומטוגרמה יש ללחוץ על הכפתור הימני של העכבר 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 הכפתור הימני של העכבר ובחרו ב-INSERT GRAPH ומתוכו ב-PEAK PURITY CONTROL. בתוך חלון CUSTOM בחרו בשם הפיק עבורו יוצג הגרף. הדפיסו את הכרומטוגרמה שקיבלתם באורכי גל שונים כולל גרף של PEAK PURITY ותוצאות האינטגרציה הכוללות זמני היציאה, גבהי הפיקים ושטחיהם.

3. הכינו תערובת של שני הפאראבנים (paraben) לחוד (בריכוז בין  $10^{-5}$  –  $10^{-4}$  g/ml)

ותערובת נוספת של שני הפתאלטים (phthalate) לחוד (בריכוז בין  $10^{-5}$  –  $10^{-4}$  g/ml).

2. הריצו את שתי התערובות בתנאים של סעיף 2.

4. הזריקו את תערובת הנעלם בתנאים של סעיף 2.

5. הציעו פתרון איך עדיין ניתן לחשב את ריכוז החומרים בתערובת, אף על פי שהפיקים לא מופרדים כרומטוגרפית. השתמשו בתמיסות שלרשותכם. חישבו את הריכוזים של החומרים אשר לא עברו הפרדה מתוך תערובת הנעלמים.

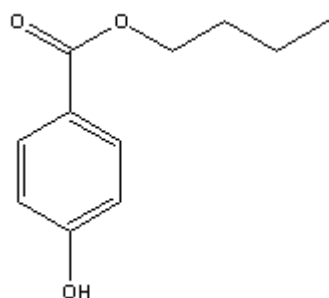
### עיבוד תוצאות:

6. התייחסו להבדלים בין הכרומטוגרמות באורכי הגל השונים אשר קיבלתם בשיטת Isocratic Elution.

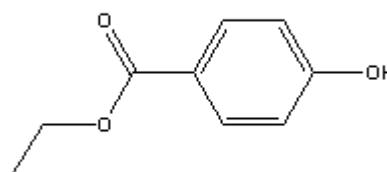
7. חישבו את הריכוזים של שני החומרים הנותרים מתוך תערובת הנעלמים. האם עדיף לבצע חישוב לפי גובה הפיקים או לפי שטח? מהם המקורות לשגיאות?

8. מה הרווח בשיפור מהירות האנליזה בין שתי השיטות? (גרדיאנט מול שיטה איזוקרטית).

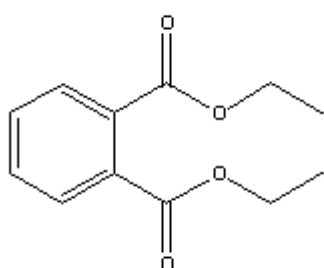
### מרכיבי התערובת



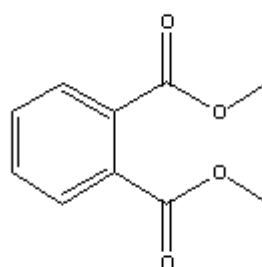
**Butylparaben**



**Ethylparaben**



**Diethylphthalate**



**Dimethylphthalate**

### שבוע 3: אנליזה כרומטוגרפית כמותית

- בשבוע זה זוג אחד יבצע אנליזה כרומטוגרפית של טבלית משכך כאבים (אשר ינתן ע"י המדריך) וזוג שני יבצע אנליזה כרומטוגרפית של קפאין. על כל זוג לברר מראש איזה חלק הוא מבצע.
- ביצוע של אנליזה כרומטוגרפית כמותית אחרת הינה אפשרית אך מותנית באישור המדריך. אם ברצונכם להציע אנליזה אחרת, עליכם לספק:
  1. פרוצדורה מדוייקת מהספרות או פרוצדורה שקל להמיר כך שתתאים לעבודה עם המכשיר והגלאי הנוכחי.
  2. דוגמה ברת השגה שתהליך הכנת הדוגמה שלה מתאים לטווח שעות פעילות המעבדה ולא דורש שימוש בציוד שאינו זמין במעבדה.
  3. שימו לב! מכיוון שמדובר באנליזה כמותית, עליכם לוודא מראש כי יש בנמצא את האנליט הדרוש להכנת התמיסות הסטנדרטיות.

#### לדו"ח המכין:

- יש לוודא שיש ברשותכם את כל הנתונים הנדרשים לביצוע חישובי ריכוזים מראש, וכן לכתוב את מהלך הכנת התמיסות הסטנדרטיות הנחוצות לאנליזה מראש בדו"ח המכין.
- עליכם להכין טבלת חומרים.
- עליכם לתכנן מראש את כל החומרים, כמויותיהם והכלים הנדרשים לביצוע הניסוי.
- יש למצוא ולהביא את אורך הגל בו הבליעה מקסימלית עבור כל אחד מהחומרים הנבדקים (אינטרנט).

**ה ע ר ה : במידה ותגיעו בשבוע זה עם מידע חסר – לא תוכלו להשתתף במעבדה.**

## אנליזה כרומטוגרפית של טבלית משכך כאבים

### מטרת הניסוי:

קביעה כמותית של חלק ממרכיבי הטבלייה בעזרת גרף כיוול.

### לרשותכם נתונים החומרים הבאים:

1. טבליות משככי כאבים – הרכב טבלית "אקסידול" \*\* (לדוגמה)

37.9%	250 mg	Paracetamol
37.9%	250 mg	Acetylsalicylic Acid (Aspirin)
9.8%	65 mg	Caffeine
14.4%	95 mg	חומרי עזר
100.0%	660 mg	משקל ממוצע של טבלייה אחת כ-660 mg

2. אספירין.

3. קפאין.

4. חומצה סליצילית.

5. פרצטמול.

6. מים ל-HPLC.

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

של הפזה המובילית צריך להיות 1 ml/min.

שימו לב: שנו את הרכב הפזה המובילית בחלון Pumps כאשר C.conc:100%

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

**הערה:** ניסוי זה תוכנן תוך ניסיון להיצמד ככל האפשר לשיטה הנהוגה ב-

USP (United States Pharmacopea). USP כולל שיטות ספציפיות לתרופות הנבדקות

ומהווה סמכות לשיטה המומלצת לבדיקה בתעשיית התרופות. עם זאת, משיקולים שונים

לא היה ניתן לבצע את השיטה לגמרי באותו האופן הרשום שם.

(ראה USP 1995, תחת "Acetaminophen, Aspirin & Caffeine Tablets").

**\*\* השמות המסחריים של התרופה משתנים כל הזמן, אך אנו משתדלים להיצמד לתרופה**

**המכילה את ההרכב הנ"ל\*\***

## מהלך הכנת הדוגמה:

### תמיסה מרוכזת של טבלית משכך כאבים

בבדיקה כמותית של הרכב טבלייה מקובל לכתוש כ-10 טבליות על מנת לקבל מדגם סטטיסטי מייצג. כדי לחסוך בחומר, וודאו **האם יש אבקה אשר הוכנה מראש – במידה ולא, כתשו בעצמכם.**

### הכנת אבקה מטבליות (במידה ואין אבקה אשר הוכנה מראש)

שקלו 10 טבליות במדוייק. חשבו את המשקל הממוצע לטבלייה. כתשו את הטבליות בעזרת מכתש ועלי. פתיחת הכוס לאחר הטחינה תיעשה במנדף. אכסנו את האבקה בווייל. אטמו אותו כראוי. רשמו את השם המסחרי של התרופה, הרכבה (במידה והוא שונה מהצויין לעיל) תאריך הכנת האבקה ואת המשקל הממוצע של טבלייה בודדת.

### המסת האבקה

שקלו בערך חצי טבלייה מהאבקה שקיבלתם (שקילה מדוייקת) והעבירו לבקבוק מדידה של 50 מ"ל. הוסיפו כ-40 מ"ל של תערובת "מתנול + חומצה אצטית", נערו לעידוד המסה חלקית. הניחו את הבקבוק בסוניקטור ל-5 דקות. השלימו עם אותה התמיסה. האבקה לא תימס לחלוטין היות וחומרי העזר של הטבלייה לא מסיסים בממס זה. הם ישארו כמשקע. הניחו לשקיעה עד שהתמיסה תהיה צלולה. (10 דקות לערך).

### תמיסת טבלית משכך כאבים מהולה

העבירו בעזרת פיפטה כ-10 מ"ל מהחלק העליון הצלול של התמיסה המרוכזת לתוך כוסית. סננו את התמיסה הנ"ל דרך מסנן  $0.2\mu\text{m}$ . העבירו 5 מ"ל מהתמיסה המסוננת לבקבוק מדידה של 25 מ"ל, השלימו 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 (כאשר כל תמיסה מכילה את כל ארבעת החומרים) 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 תמיסת אם לצורך הכנת התמיסות הסטנדרטיות בטבלה הבאה.

**תזכורת:** יש לבצע חישובי ריכוזים ולכתוב את מהלך הכנת התמיסות הסטנדרטיות מראש בדו"ח המכין. עם זאת, יהיה עליכם להזין לתוכנה את הריכוזים האמיתיים כפי שיחושבו לאחר השקילה בפועל.

פרטי הכנה	ממס	נפח (mL) בקבוק המדידה	מרכיבים <sup>1</sup>	שם התמיסה
להמיס ראשית בכ-10 מ"ל ממס, להשלים בממס	MeOH + AcOH 95:5	100	200 mg Aspirin 200 mg Paracetamol	תמיסת אס מרוכזת A
להמיס ראשית בכ-10 מ"ל Methanol, להשלים בממס	מים	50	25 mg Salicylic Acid	תמיסת אס מרוכזת B
	מים	25	5 ml A + 1 ml B	תמיסה סטנדרטית לדוגמה

### קביעה כמותית של המרכיבים בטבליה

-יש ליצור שיטה חדשה ולשמור אותה בשם "StudentCal" בתיקייה הייעודית לקבוצתכם. תזכורת: "C:/Class-VP/Students/Method/"currentYear"/"yourFolder". יש לשנות את פרמטרי הניסוי כפי שמתואר בסעיף 7. עברו על פרמטרי השיטה וודאו כי הינם נכונים. לכו ל-Method, בחרו PDA setup ואז ב-General, ב-Run Time שנו את זמן ההרצה ל-15 דק'. וודאו כי כל השורות ב-Time Prog. ריקות מתוכן. לחצו על Apply ו-Download.

1. בדיקת הדירות המערכת בתנאי העבודה הנתונים. בחרו אחת מתמיסות הכיול. בצעו 3 הזרקות עוקבות. בחרו את אורך הגל האופטימלי לעבודה והזינו את אורך הגל שבחרתם לתוך PDA SETUP:

PDA SETUP-> multi-> active (V)

לחצו על apply ושמרו את השיטה. לכל כרומטוגרמה ערכו אינטגרציה (וודאו כי אורך הגל הנכון מוזן לפני האינטגרציה בכל פעם) ובדקו: א) את הדירות זמן האלוציה.

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

-שימו לב לזמן ההרצה האופטימלי ועדכנו אותו ב-General, ב-Run Time. - כעת ניתן לקבוע שמות לפיקים ולהגדיר את הריכוזים של התמיסות הסטנדרטיות אשר יוזרקו בהמשך. אחרי לחיצה על כפתור Analyze, בחלון הכרומטוגרמה לחצו על הכפתור הימני של העכבר 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.

<sup>1</sup> שיטת השקילה האנליטית: שקלו כמות מומלצת על נייר שקילה. העבירו את נייר השקילה עם החומר לכלי המיועד לשמירת הדוגמא מחוץ למאזניים. שקלו את בקבוק המדידה ועשו Tare. העבירו את החומר השקול לבקבוק המדידה שנמצא מחוץ למאזניים. שימו-לב! יש למנוע פיזור חומר. שקלו שנית את הבקבוק עם החומר ורשמו את המשקל המדויק.

- כנסו לתוך טבלת GROUP/PEAK מתוך METHOD והזינו את שמות החומרים. שימו לב שהעמודות הרלוונטיות הבאות מופיעות בטבלה: #, Name, Retention Time, Level-ו.
- ב- Quantitate הזינו Area וב- Fit type הזינו Linear.
- בתוך עמודות LEVEL יש להזין את הריכוזים של התמיסות הסטנדרטיות עבור כל חומר, כאשר LEVEL 1 הינו תמיסה סטנדרטית ראשונה, LEVEL 2 – תמיסה 2 וכו'.
- שימרו את השיטה שבניתם.
- כעת נתכונן להזרקת תמיסות סטנדרטיות. לצורך כך ניצור רצף של הזרקות, המכונה SEQUENCE RUN. המכשיר יבצע רצף אנליזות אחת אחרי השניה: תתבקשו להזריק תמיסה סטנדרטית ראשונה, המכשיר יבצע אנליזה, יעצור בזמן שהגדרתם ויעבור לאנליזה של התמיסה הסטנדרטית הבאה וכו'.
- להגדרת SEQUENCE יש ללחוץ על כפתור File, SEQUENCE, ולבחור ב-NEW. יש לתת שם לקובץ ב-Sample ID, למשל, (01) SAMPLE, (המספר בסוגריים מאפשר למחשב להגדיל את השם של הדוגמה הבאה באופן אוטומטי) וב-Data File, לדוגמה: FILE (001). יש לציין את מיקום השיטה ואת המיקום בו יישמרו הקבצים ב-Method ו-Data Path. יש לציין את מספר ההזרקות (Number of Runs) שתבצעו, יש לקבוע לפי כמות הסטנדרטים אשר תזריקו. לחצו OK.
- במסך שיפתח שימו לב כי מופיעים שמות הדוגמאות שנתתם ושמות הקבצים העתידיים. בעמודה LEVEL יש להזין מספרים מ-1 ומעלה (ע"פ מה שהוגדר ב-peaks table).
- בשורה הראשונה, בעמודה RUN TYPE לחצו על החץ הכחול (וודאו שזו אכן הדוגמה הסטנדרטית הראשונה). במסך שיפתח בחרו ב- CLEAR ALL CALIBRATION וגם ב- BEGIN CALIBRATION ולחצו OK.
- כעת לחצו על החץ הכחול תחת RUN TYPE עבור הדוגמה האחרונה ובחרו ב- END CALIBRATION. לחצו OK.
- וודאו כי עבור הדוגמה הראשונה RUN TYPE השתנה וכעת הוא CAL CAB CCA, בשאר הדוגמאות רשום CALIBRATION ועבור הדוגמה האחרונה רשום CAL CAE.
- כעת שימרו את ה-SEQUENCE. צרו תיקיה לקבוצה שלכם ושמרו ב:
 

```
C:/Class-VP/Students/Sequence/"currentYear"/"yourFolder"
```
- עכשיו אתם מוכנים לתחילת האנליזה: לחצו על כפתור "חץ ירוק כפול" (SEQUENCE ACQUISITION) ובמסך שיפתח בדקו שאכן מופיע ה-SEQUENCE שבניתם. לחצו על

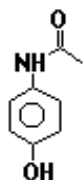


START. עקבו אחר ההוראות בתחתית המסך. בדומה להזרקה רגילה תופיע ההודעה  
 WAITING FOR TRIGGER, יש להזריק את הדוגמה ולסובב את האינגיקטור.  
 - לאחר סיום הרצת התמיסות הסטנדרטיות בחרו Method ואז Review Calibration.  
 במסך שייפתח אמור להיות מוצג גרף כיול עבור כל חומר בתמיסות הסטנדרטיות. עברו עם  
 המדריך על המידע שבמסך זה.  
 - לאחר שהרצף נגמר, בצעו הרצה בודדת (בנפרד מה-Sequence) בכדי להשיג כרומטוגרמה  
 עבור תמיסת הטבליה המהולה. וודאו שאורך הגל אשר הגדרתם קודם לכן ב-PDA  
 (כשביצעתם בדיקות הדירות) אכן מופיע ורק לאחר מכן בצעו אינטגרציה ולחצו Analyze.  
 - חזרו למסך Review Calibration, על עקומת הכיול שהתקבלה לחצו על הכפתור הימני  
 בעכבר ובחרו ב-Concentration Calculator. הזינו את השטח אשר התקבל עבור כל חומר  
 בתמיסה המהולה ולחצו Calculate. זהו הריכוז של החומר לפי עקומת הכיול. רשמו  
 לעצמכם את התוצאות.  
 - כנסו לתוך CUSTOM REPORT מתוך METHOD ועברו על REPORT. הוסיפו  
 לטבלת האינטגרציה עמודה בשם: ESTD CONCENTRATION – זה בעצם הריכוז של  
 הנעלם שהמחשב חישב בהתאם לגרף הכיול. ניתן להוסיף ל REPORT עקומות כיול לכל  
 חומר ע"י לחיצה על כפתור ימני בעכבר, בחירה ב-Insert Graph ואז Calibration Curve.  
 שימו לב שעקומת הכיול מעודכנת לפי אורך הגל הנכון. לחצו פעמיים על עקומת הכיול  
 שנוספה ובדקו את ה-Trace. לחצו Apply ו-Ok.

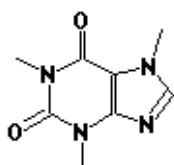
### עיבוד תוצאות

- חשבו את הכמות של אספירין, קפאין והפרצטמול בטבלייה המקורית לפי התוצאות שקיבלתם. מהו להערכתכם מקדם אי הוודאות בחישוב זה?
- חשבו את הכמות האבסולוטית של חומצה סליצילית בטבלייה ואת אחוז הפרוק של אספירין מתוך הכרומטגרמות. האם זה עומד בתנאי של 5%?

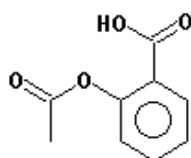
### Organic Components of the pill



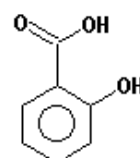
Acetaminophen  
(Paracetamol)



Caffeine



Acetylsalicylic  
acid (Aspirin)



Salicylic Acid

## אנליזה כרומטוגרפית של קפאין

### מטרת הניסוי:

קביעה כמותית של קפאין ממקורות שונים בעזרת גרף כיוול.

### לרשותכם החומרים הבאים:

-קפאין (נקי).

-מים HPLC grade.

-מתנול HPLC grade.

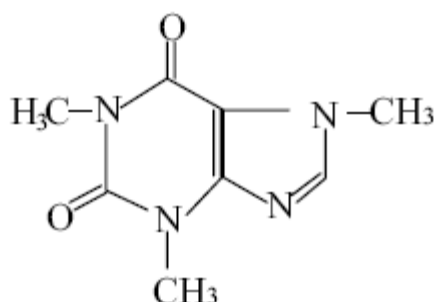
דוגמאות לבדיקה: קפה נמס, קפה שחור, תה.

ניתן להביא עצמאית: קולה, משקה אנרגיה, קפה/תה נטול קפאין, קפסולות למכונת

קפה, אבקת קקאו, שוקו, משקה מבוסס Guarana, מאטה, Matcha וכו'.

### 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 כיוול. בנוסף, יש להכין את משקאות הקפה והתה כפי שיוסבר בהמשך, ולהזריקם ל- HPLC. מתוך הכרומטוגרמות מקבלים את זמן השהיה,  $t_r$ , ושטחי הפיקים. ניתן לצייר גרף כיוול (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- 1 ml/min. המתינו להגעת המערכת לשיווי משקל כך שקו הבסיס ישר, בטרם תזריקו את התמיסות.

### א. קפאין במשקאות

הכינו את דוגמאות המשקה בדרך הבאה (ניתן להוסיף סטירר להעצת תהליך הערבוב):  
**קפה, קפה נטול קפאין:** שקלו בדייקנות (או במדידה מדויקת) כ- 1 גר' מדוגמת הקפה לכוס בנפח 100 מ"ל. הוסיפו כ-50 מ"ל מים מזוקקים, כסו בזכוכית שעון והרתיחו עד להמסה מלאה (אלא אם מדובר בקפה שאינו נמס ואז יש להקביל את הזמן לפי זמן ממוצע להכנת משקה). קררו את הכוס לטמפרטורת החדר, העבירו כמותית לבקבוק כיוול 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 כיוול בנפח 100 מ"ל והשלימו במים מזוקקים.

המתינו עד לשקיעת המשקעים ולאחר מכן העבירו בעזרת פיפטור מהחלק הצלול העליון 10 מ"ל מתמיסת הקפה ו-10 מ"ל מהתה לווילים. סננו כ-5 מ"ל מכל דוגמה דרך פילטר מיקרוני  $0.2\mu\text{m}$  לתוך ווילים חדשים. אם התמיסה לא צלולה, סננו בשנית. עבור כל דוגמה, העבירו 5 מ"ל מסוננים (היטב!) לתוך בקבוק מדידה של 50 מ"ל והשלימו במים מזוקקים. את הדוגמאות אשר נטולות קפאין אין צורך למהול, ניתן להזריק ישירות מהויל לאחר הסינון. (גרגרי דוגמה לא מסוננים יכולים לקלקל את הקולונה – כיצד? מה האפקט הכרומוטוגרפי?)

**קולה, משקה אנרגיה:** העבירו מעט מהמשקה המוגז לכוס מתאימה, כסו בזכוכית שעון, הרתיחו בעדינות להרחקת  $\text{CO}_2$ . קררו לטמפרטורת החדר. מהלו פי 2 לבקבוק מדידה והשלימו עם מים. סננו דרך פילטר מיקרוני  $0.2\mu\text{m}$  לתוך ווילים.

### ב. הכנת תמיסת Stock של קפאין (בריכוז 25mg/100ml)

תחילה יש להכין תמיסת אם של קפאין בבקבוק מדידה של 50 מ"ל. שקלו את בקבוק המדידה ועשו Tare. העבירו קפאין לבקבוק המדידה שנמצא מחוץ למאזניים (שימו לב כמה עליכם לשקול בהתאם לריכוז הנ"ל), שקלו שנית את הבקבוק עם החומר ורשמו את המשקל המדויק. נערו לעידוד המסה חלקית. הניחו את הבקבוק בסוניקטור ל-5 דקות.  
1. לתוך 5 בקבוקי כיוול בנפח 10 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 הניידת דרך הקולונה למשך חמש דקות. שימו לב לתגובת הגלאי וודאו שלא נשארו בעמודה שאריות חומרים מניסויים קודמים.

### 3. קביעה כמותית של קפאין

-יש ליצור שיטה חדשה ולשמור אותה בשם "StudentCal" בתיקייה הייעודית לקבוצתכם.

תזכורת: "C:/Class-VP/Students/Method/"currentYear"/"yourFolder"

יש לשנות את פרמטרי הניסוי כפי שמתואר במהלך הניסוי. עברו על פרמטרי השיטה וודאו כי הינם נכונים. לכו ל-Method, בחרו PDA setup ואז ב-General, ב-Run Time שנו את זמן ההרצה ל-5 דק'. וודאו כי כל השורות ב-Time Prog. ריקות מתוכן. לחצו על Apply ו-Download.

1. בדיקת הדירות המערכת בתנאי העבודה הנתונים.

בחרו אחת מתמיסות הכיול. בצעו 3 הזרקות עוקבות. בחרו את אורך הגל האופטימלי לעבודה והזינו את אורך הגל שבחרתם לתוך PDA SETUP:

PDA SETUP-> multi-> active (V)

לחצו על apply ושמרו את השיטה. לכל כרומטוגרמה ערכו אינטגרציה (וודאו כי אורך הגל הנכון מוזן לפני האינטגרציה בכל פעם) ובדקו:

א) את הדירות זמן האלוציה.

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

-שימו לב לזמן ההרצה האופטימלי ועדכנו אותו ב-General, ב-Run Time.

- כעת ניתן לקבוע שם לפיק ולהגדיר את הריכוזים של התמיסות הסטנדרטיות אשר יוזרקו בהמשך. אחרי לחיצה על כפתור Analyze, בחלון הכרומטוגרמה לחצו על הכפתור הימני של העכבר ובחרו ב-DEFINE PEAKS מתוך GRAPHICAL PROGRAMMING. הצביעו על תחילת תחום הפיק 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 את שם הפיק-הקפאין. שימו לב שהעמודות הרלוונטיות הבאות מופיעות בטבלה: #, Name, Retention Time, ו-Level.

ב-Quantitate הזינו Area וב-Fit type הזינו Linear.

בתוך עמודות LEVEL יש להזין את הריכוזים של התמיסות הסטנדרטיות,

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, המכונה SEQUENCE RUN. המכשיר יבצע רצף אנליזות אחת אחרי השניה: תתבקשו להזריק תמיסה סטנדרטית ראשונה, המכשיר יבצע אנליזה, יעצור בזמן שהגדרתם ויעבור לאנליזה של התמיסה הסטנדרטית הבאה וכו'.

- להגדרת SEQUENCE יש ללחוץ על כפתור File, SEQUENCE, ולבחור ב-NEW. יש לתת שם לקובץ ב-Sample ID, למשל, (01) SAMPLE, (המספר בסוגריים מאפשר למחשב להגדיל את השם של הדוגמה הבאה באופן אוטומטי) וב-Data File, לדוגמה: FILE (001). יש לציין את מיקום השיטה ואת המיקום בו יישמרו הקבצים ב-Method ו-Data Path. יש לציין את מספר ההזרקות (Number of Runs) שתבצעו, יש לקבוע לפי כמות הסטנדרטים אשר תזריקו. לחצו OK.

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

- בשורה הראשונה, בעמודה RUN TYPE לחצו על החץ הכחול (וודאו שזו אכן הדוגמה הסטנדרטית הראשונה). במסך שייפתח בחרו ב- CLEAR ALL CALIBRATION וגם ב- BEGIN CALIBRATION ולחצו OK.

- כעת לחצו על החץ הכחול תחת RUN TYPE עבור הדוגמה האחרונה ובחרו ב- END CALIBRATION. לחצו OK.

- וודאו כי עבור הדוגמה הראשונה RUN TYPE השתנה וכעת הוא CAL CAB CCA, בשאר הדוגמאות רשום CALIBRATION ועבור הדוגמה האחרונה רשום CAL CAE.

- כעת שימרו את ה-SEQUENCE. צרו תיקיה לקבוצה שלכם ושמרו ב:

C:/Class-VP/Students/Sequence/"currentYear"/"yourFolder"

- עכשיו אתם מוכנים לתחילת האנליזה: לחצו על כפתור "חץ ירוק כפול" (SEQUENCE ACQUISITION) ובמסך שייפתח בדקו שאכן מופיע ה-SEQUENCE שבניתם. לחצו על START. עקבו אחר ההוראות בתחתית המסך. בדומה להזרקה רגילה תופיע ההודעה WAITING FOR TRIGGER, יש להזריק את הדוגמה ולסובב את האינגיקטור.

- לאחר סיום הרצת התמיסות הסטנדרטיות בחרו Method ואז Review Calibration. במסך שייפתח אמור להיות מוצג גרף כיול עבור הקפאין בתמיסות הסטנדרטיות. עברו עם

המדריך על המידע שבמסך זה.

- לאחר שהרצף נגמר, בצעו הרצה בודדת (בנפרד מה-Sequence) בכדי להשיג כרומטוגרמה עבור כל דוגמאת קפאין. מומלץ להאריך את זמן ההרצה לפחות ל-10 דק'. וודאו שאורך הגל אשר הגדרתם קודם לכן ב-PDA (כשביצעתם בדיקות הדירות) אכן מופיעו ורק לאחר מכן בצעו אינטגרציה ולחצו Analyze.

- בסיום הרצת כל דוגמה, חזרו למסך Review Calibration, על עקומת הכיול שהתקבלה לחצו על הכפתור הימני בעכבר ובחרו ב-Concentration Calculator. הזינו את השטח אשר התקבל עבור פיק הקפאין בתמיסה ולחצו Calculate. זהו הריכוז של החומר לפי עקומת הכיול. רשמו לעצמכם את התוצאות.

- כנסו לתוך CUSTOM REPORT מתוך METHOD ועברו על REPORT. הוסיפו לטבלת האינטגרציה עמודה בשם: ESTD CONCENTRATION – זה בעצם הריכוז של הקפאין שהמחשב חישב בהתאם לגרף הכיול. ניתן להוסיף ל REPORT את עקומת הכיול של הקפאין ע"י לחיצה על כפתור ימני בעכבר, בחירה ב-Insert Graph ואז Calibration Curve. שימו לב שעקומת הכיול מעודכנת לפי אורך הגל הנכון. לחצו פעמיים על עקומת הכיול שנוספה ובדקו את ה-Trace. לחצו Apply ו-Ok.

- הפיקו כרומטוגרמה כזו עבור כל תמיסת שבדקתם.

### עיבוד תוצאות

לפי תוצאות חישוב ריכוז הקפאין בתמיסות המהולות, חשבו את כמות הקפאין בתמיסה המקורית ביחידות mg/gr עבור קפה ותה וביחידות של mg/ml עבור שאר התמיסות.

### שאלות הכנה:

1. מהם אורכי הגל האופייניים לבליעה של קפאין?
2. מדוע משתמשים בקולונת פאזה הפוכה לקביעת קפאין?
3. האם בניית עקומת כיול מתוך גובה שיאו של הקפאין (ולא מתוך שטחו) הייתה נותנת תוצאות מדויקות בניסויי זה?
4. האם ניתן להשתמש בקולונה מחליפת יונים לקביעת קפאין? הסבירו.

# Atomic Absorption

---

## מבוא:

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

## מטרות הניסוי:

- א. היכרות עם מכשיר הבליעה האטומית – Atomic Absorption
- ב. בדיקות איכותיות
- ג. בדיקות כמותיות

## דרישות לעריכת דו"ח מכין:

1. על הסטודנטים לבוא מוכנים לניסוי מבחינת ידע על אופן פעולת המכשיר על כל רכיביו ותפעולו. הדו"ח המכין יכלול את פרטי המהלכים הטכניים, סיבותיהם ותוצאות הניסוי הצפויות (ספקטרא חצי כמותיים).
2. לכל שלב ושלב של הניסוי יש לפרט את:
  - מטרת הניסוי.
  - אופן הכנת התמיסות.
  - התוצאות הצפויות והסיבה להן.
  - תשובות לשאלות המופיעות בתיאור של הניסוי.

## דרישות לעריכת דו"ח מסכם:

1. ציון מטרת הניסוי, מהלך הניסוי, הצגת חישובים רלוונטיים ותוצאות.
2. לכל התוצאות יש להוסיף את גורמי השגיאה הנסיוניים, מה גודלם וכיצד ניתן לצמצמם.
3. עבור כל ניסוי יש לדון בתוצאות בדגש על תוצאות צפויות מראש אל מול התוצאות בפועל.
4. יש לכתוב דיון שיכיל יתרונות וחסרונות ולציין מסקנות סופיות לגבי השגת המטרה.

## שבוע ראשון

### 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

בניסוי נשתמש בלהבת אוויר/אצטילן. יש לוודא את מיקום בלון האצטילן ומיקום ברז הצינור שמביא אצטילן אל המכשיר (ברז תחתון מתחת לחלון). יש להדליק 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 נצפה אם נשנה את רוחב הסדק? מהי רזולוציית המונוכרומטור? האם היא מספיקה? מהם הגורמים לקבלת קווים נוספים בספקטרום?

### הוראות כלליות להפעלת המכשיר:

1. יש לוודא הפעלת שאיבת גזי הלהבה וכן לוודא שהמחשב דלוק ולאחר מכן להפעיל את המכשיר על ידי לחיצה על כפתור ההפעלה שלו (כפתור שחור מצד שמאל על המכשיר ליד המנורה הירוקה) ולהמתין לצפוף מזמר. - המכשיר מכיל בזיכרונו ספרייה עם שיטות העבודה המוכנות וגם קיימת אפשרות ליצור שיטת עבודה חדשה. בניסוי 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 הידית 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 tab 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. חזור 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

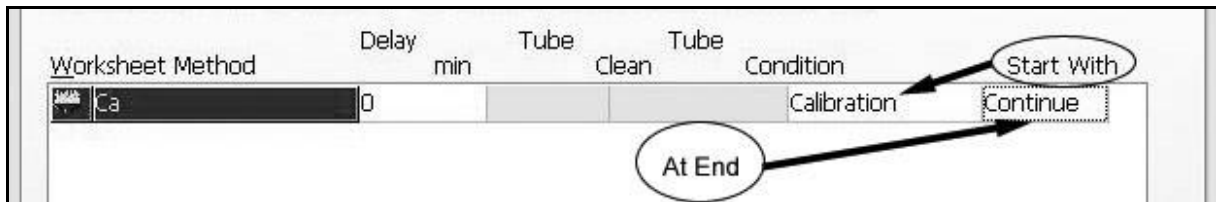
Page "Measurement":

- 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 Parametrs..." 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 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. השאירו את הצינור שמביא תמיסה אל המבער במים מזוקקים, במסך המחשב לחץ "Inst. Zero", המתן כמה שניות לאיפוס הקריאה. (Instrument Zero) תמיד נעשה עם מים מזוקקים).

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. אין לגעת בידית הממוקמת מתחת לצינור שמביא תמיסה אל המבער (היא שולטת על קצב השאיבה אך מחוברת לצינורית זכוכית עדינה ושבירה שמחוברת אליה בנבולייזר).  
המדריך יכול עם צריך לסובב ידית זו בעדינות מירבית כדי לא לשבור צינורית זכוכית המחוברת אליה בנבולייזר וללחוץ 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 במים מזוקקים. 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" - עכשיו 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 הסידן:

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 -  $\text{La } 0.1\% + \text{PO}_4^{-3} 20\text{ppm} + \text{Ca}^{2+} 4\text{ppm}$

6 קריאה -  $\text{La } 0.1\% + \text{Ca}^{2+} 4\text{ppm}$

- 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 עכשו 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 של מנורת הסידן

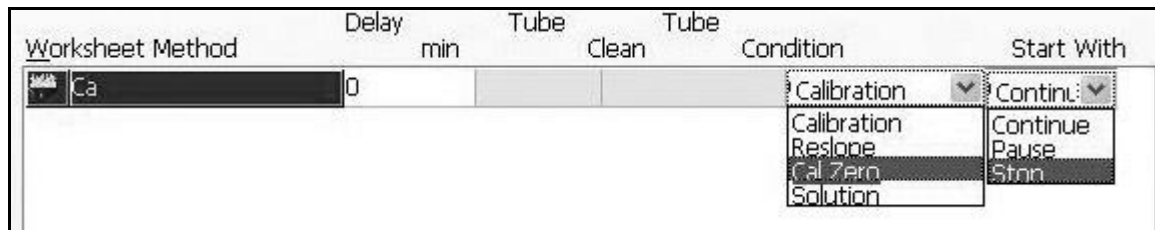
4. בתוך דף "Cookbook" תוכל לראות קווי בליעה/פליטה (ב-"Notes") ועקומת כיוול שאתה אמור לקבל (ב-"Graph").

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-"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.



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 (“Leave Flame On”). לחץ OK.

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

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

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

ב. במידה ויפיע 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 יש ללחוץ “Optimize Signal” ולהמתין להופעת קריאה על המסך. יש להשאיר את הצינור שמביא תמיסה אל המבער במים מזוקקים וללחוץ “Inst. Zero”. להמתין 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 מסומנות 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 להשאיר את הצינור במים מזוקקים (לצורך איפוס קריאת המכשיר) – לחץ OK. ותהיה מוכן ל CAL ZERO. כשהתוכנה מתחילה לספור אחורה ל CAL ZERO בשורת המצב למטה, יש להשאיר את הצינורית במים 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. אם עוצרים לפני יש ללחוץ "Pause".
- 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 שמרת וסגרת את ה- Worksheet שלך לחץ על כפתור המדפסת - "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 את התמיסות 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. חזור את המכסה למקומו והדלק את הלהבה בנוכחות המדריך.
- ה. אחרי זה לחץ "Optimize Signal" – המתן להופעת הקריאה על המסך. השאר את הצינורית במים 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 מסומנות 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 להשאיר את הצינורית במים מזוקקים וללחוץ OK. להיות מוכן ל-CAL ZERO.
- ב. המתן לסיום האיפוס ושמור את הצינור בתוך 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 דוגמת הנעלם 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. (או לחילופין ללחוץ Pause בחלון שמחכה לדוגמה הבאה)

14. אחרי ששמרת וסגרת את ה- Worksheet שלך לחץ על כפתור “Reports” ובחר ב- Worksheet שלך מתוך הרשימה. לחץ Next פעמיים. (או פשוט לבחור בכפתור של המדפסת) 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 את הניסוי 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.

## שבוע שני

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

### א. השפעת יחס מחמצן/מחזור על בליעה של סידן ונחושת בלהבה

שימו לב: יש להמנע מליצור להבה עשירה מדיי במחזור (אצטילן) כיוון שזה יכול לגרום להתחממות יתר ופגיעה במכשיר. מסיבה זו הכדור שמהווה אינדיקציה לכמות המחזור לא יעלה על 2.0 יחידות.

The following positions of the rotameter ball (upper point) can be recommended as

0.8 (less than 1.0) for fuel lean flame.

~1.0 for near stoichiometric flame.

~ 1.5 for fuel rich flame at the border of soot formation limit.

~ 1.8-2.0 sooting flame.

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 של 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. חזור 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). אזוהרה: יש להרכיב משקפי מגן בעת הצפייה בלהבה. טמפרטורת הלהבה מגיעה ל2400 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. השאר את הצינור שמביא תמיסה אל המבער במים 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 מסומנות בלבן, 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 יצפצף).
11. הכנס שמות לדוגמאות tab: "Labels" **בין כל מדידה למדידה יש להכניס מדידת מים מזוקקים.**
12. לפני תחילת הניסוי יש לקבל הסבר מן המדריך על כמות אצטילן מינימלית ומכסימלית וקריאת מדיד לחץ האצטילן. תכנן ארבע מדידות בין הערך המינימלי למכסימלי. לאחר כל שינוי של ברז האצטילן יש לבצע מדידת בליעת רקע חדשה.
13. א. לצורך התחלת הניסוי לחץ "Start". במסך "Analysis Checklist" בדוק נתונים תואמים ולחץ OK. המתן לקבלת מסך "Prepare for Instrument Zero" – עליך להשאיר את הצינור בתוך המים המזוקקים (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 יצפצף – 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 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.

יש להציג בצורה גראפית את השינויים בבליעה בעקבות השינוי ביחס המחזור/מחמצן בלהבה, ולרשום מסקנותיך.

יש לחזור על ניסוי זה עם נחושת, להשוות את התוצאות שקיבלת עם הסידן ולדון בתוצאות.

### **ב. 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.

#### **1. 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 שייפתח 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. החזר את המכסה למקומו והדלק את הלהבה בנוכחות המדריך.

ה. אחרי זה לחץ "Optimize Signal" – המתן להופעת הקריאה על המסך. השאר את הצינור שמביא תמיסה אל המבער במים מזוקקים ולחץ "Inst. Zero". המתן לאיפוס הקריאה.

ו. 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 מסומנות 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 להשאיר

את הצינור במים מזוקקים – לחץ OK. ותהיה מוכן ל CAL ZERO.

ב. המתן לסיום האיפוס והשאר את הצינור בתוך 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. (או לחילופין, לחץ Pause).

14. אחרי ששמרת וסגרת את ה- Worksheet שלך לחץ על כפתור "Reports" ובחר ב- Worksheet שלך מתוך הרשימה. לחץ Next פעמיים. (או בחר בכפתור של המדפסת) 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 "קשיות" המים?

## **2. 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)  $K^+$  1ppm + מי עדן

(4)  $K^+$  2ppm + מי עדן

(5)  $K^+$  3ppm + מי עדן

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

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” עיי לחיצה על Next. בתוך “Sequence Completion” סמן “V” ליד “Leave Flame On”. לחץ OK.

7. לחץ על tab: “Analysis” - הלהבה צריכה להישאר דולקת מהניסיון הקודם, אם לא - הדלק להבה עיי לחיצה ארוכה של 3 – 5 שניות על כפתור שחור מצד שמאל של המכשיר שליזו מצוירת להבה.

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

ב. במידה ויפיע המסך “Analysis Checklist” וודא נתונים תואמים ולחץ OK.

ג. המתן להופעת קריאה בסביבות אפס על המסך. השאר את הצינור במים 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 עיי סיבוב הידית מתחת לצינור השולטת על קצב שאיבת התמיסה, וכפתור אצטילן. (בעזרת המדריך).

9. לחץ OK. הוצא את הצינורית מהתמיסה והכנס אותה למים מזוקקים.

במסך “Optimize” לחץ “Cancel”.

10. אם הדוגמאות שלך לא מסומנות 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 ושים אותו במים מזוקקים, לחץ OK. אחרי שלחצת OK המכשיר יבצע פעולת "Instrument Zero" באופן אוטומטי.

**ג.** הצג תמיסת "Calibration Zero" (מים מזוקקים) – השאר את הצינור במים 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?

### 3. קביעת כמות הסידן בטבליות Centrum Multi-Vitamins

לרשותך אבקת טבליות. (משקל הטבליה בערך 1.5g). הטבליות מכילות את הסידן 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

בבקבוק 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 לשובב את הידית כך שהיא תצביע על מנורת הסידן.

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. חזור את המכסה למקומו והדלק את הלהבה בנוכחות המדריך.
- ה. לחץ "Optimize Signal" והמתן להופעת קריאה על המסך. השאר את הצינור שמביא תמיסה אל המבער במים 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 מסומנות 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 להשאיר את הצינור במים מזוקקים – 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 בטבלה.

- הערך את שגיאת המדידה ואת גורמי השגיאה.

### **3. שיטת הוספת 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 +  $\text{Ca}^{2+}$  1ppm

4) תמיסת נעלם +  $\text{Ca}^{2+}$  2ppm

5) תמיסת נעלם +  $\text{Ca}^{2+}$  3ppm

6) תמיסת נעלם +  $\text{Ca}^{2+}$  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" – Standard Edition

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. 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. 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 לשוב ידיית 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 כבוייה, בנוכחות המדריך הורד מכסה של תא המבער וכוון את המבער באמצעות הכרטיס. חזור את המכסה למקומו והדלק את הלהבה בנוכחות המדריך.

ה. לחץ "Optimize Signal" והמתן להופעת קריאה על המסך. השאר את הצינור שמביא תמיסה אל המבער במים 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 מסומנות 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 להשאיר את הצינור במים מזוקקים – 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 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 יצפצף – לחץ OK.

13. אחרי ששמרת וסגרת את ה- Worksheet שלך לחץ על כפתור "Reports" ובחר ב- Worksheet שלך מתוך הרשימה. לחץ Next פעמיים. (או בחר בכפתור המדפסת) 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 B<sub>1</sub> (as Thiamine mononitrate) 1.5 mg
7. Vitamin B<sub>2</sub> (Riboflavin) 1.7 mg
8. Niacinamide 20 mg
9. Vitamin B<sub>6</sub> (as pyridoxine hydrochloride) 2 mg
10. Vitamin B<sub>12</sub> (cyanocobalamine) 6 mcg
11. Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) 400 Iu
12. Biotin 30 mcg
13. Pantothenic acid (as Calcium pantothenate) 10 mg
14. Vitamin K<sub>1</sub> (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 sulfate) 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.

## שבוע שלישי

### 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 ובנוכחות 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 HNO<sub>3</sub> וצפה במתרחש מהבקבוק הייעודי לכך.

(אם מבצעים אנליזה לשקל, הכמויות הן 10 מ"ל HCl ו-30 מ"ל HNO<sub>3</sub>.)

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 כיוול 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 "Optical":

- a) "Lamp Position" – according to the available lamp position.
- b) "Lamp Current" – according to recommended current written on the lamp base

### 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 כיוול 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. לחץ על "Optimize Signal" והמתן להופעת קריאה על המסך. השאר את הצינור

שמביא תמיסה אל המבער במים מזוקקים ולחץ "Inst. Zero" המתן לאיפוס הקריאה.

ה. 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.

ו. 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 כיוול – 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  $\text{CaCO}_3$ 

## 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 $\mu\text{g}/\text{mL}$
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

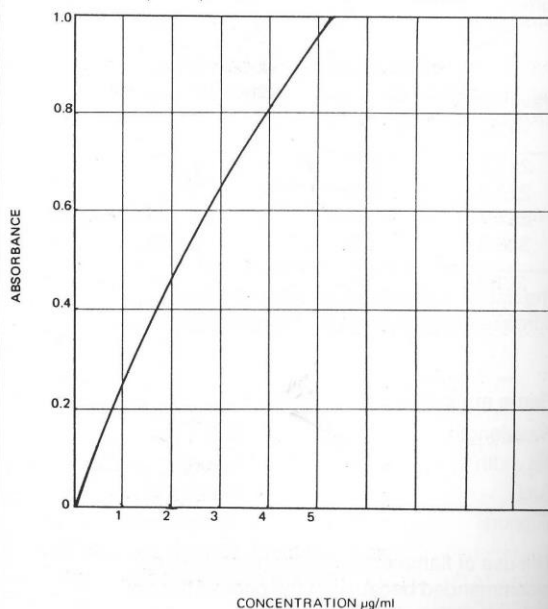
introduction of a releasing agent such as strontium (5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or lanthanum (10000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Normally the addition of a releasing agent is used in conjunction with the practice of matching sample and standard solutions to obviate combined interference effects.

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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

## ▼ 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

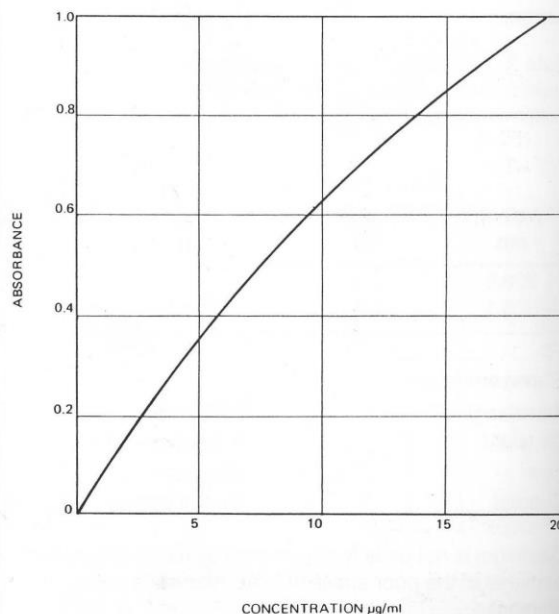
Few interferences have been observed for cobalt in an air-acetylene flame.

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

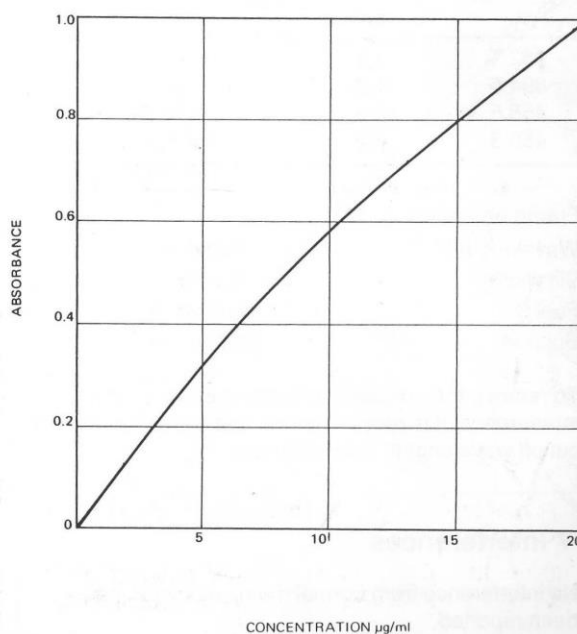
Cobalt, iron and nickel (particularly in the presence of perchloric acid) have been found to cause depression of chromium absorbance.

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

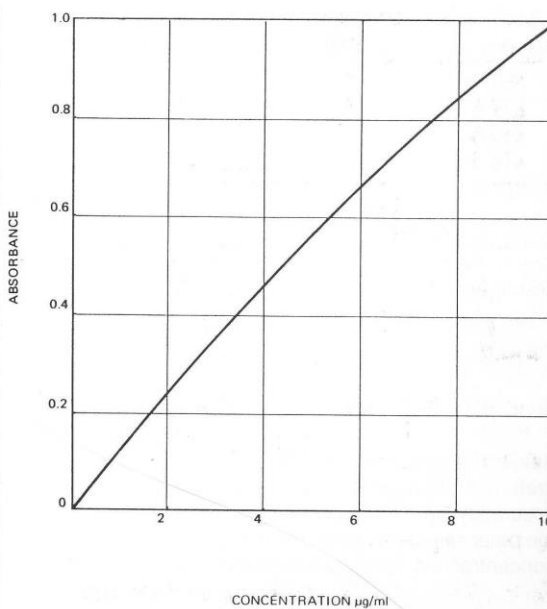
### Flame emission

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.

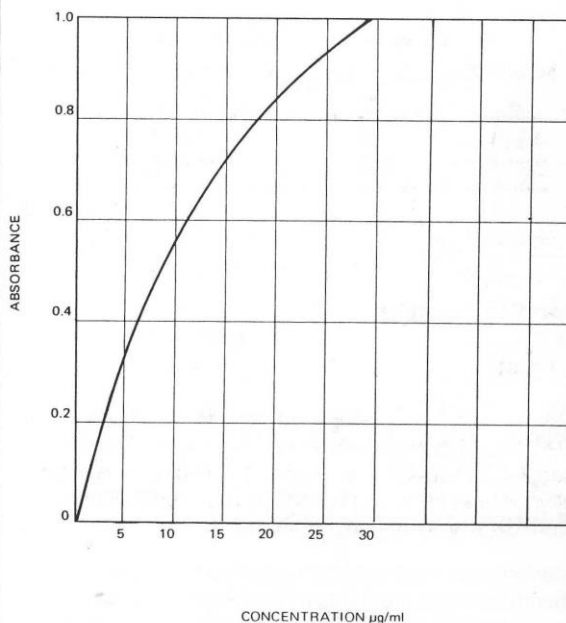
The interference has been minimized by measuring the absorbance in the presence of phosphoric acid. It is necessary to select an optimum burner height to gain maximum freedom from interference.

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

# P o t a s s i u m

# 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

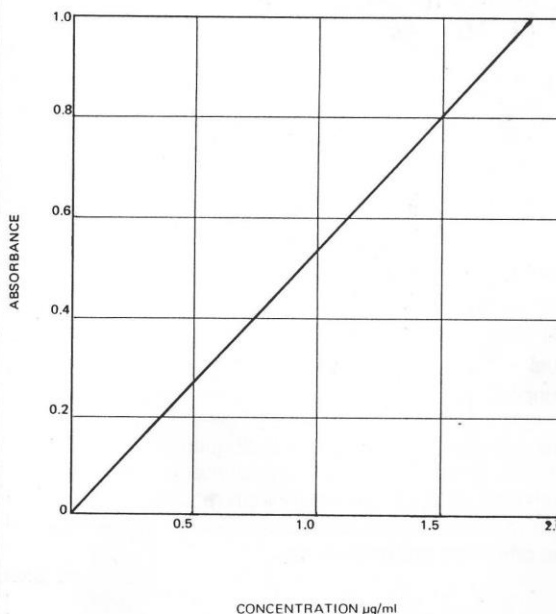
### Flame emission

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  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  99.9%

### Solution technique

Dissolve 5.324 g of  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  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

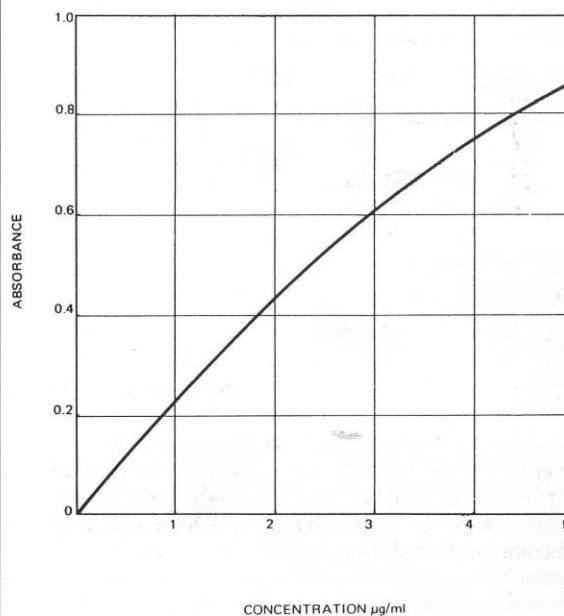
At 670.8 nm it is advisable to use a sharp cutoff filter to avoid second-order interference from the neon 335.5 nm line emitted by the lamp.

### 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)

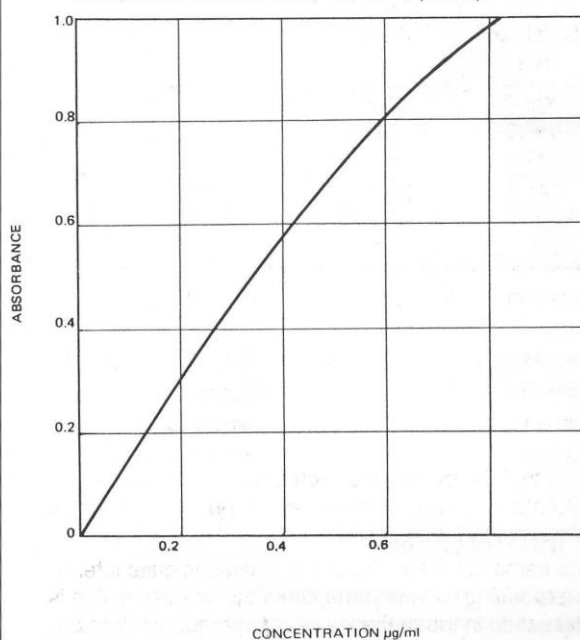
or lanthanum (10000 µg/mL). Solutions containing 200 µg/mL interferent in 0.4 µg/mL Mg show the following interference pattern:

Mg Absorbance	Mg Absorbance
Al -24%	SiO <sub>3</sub> -42%
Li +10%	CO <sub>3</sub> -17%
Ti -16%	SeO <sub>3</sub> -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

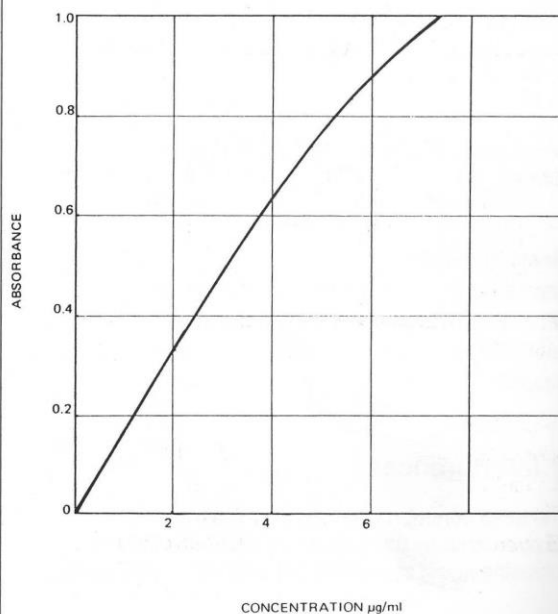
### Flame emission

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 <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	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)

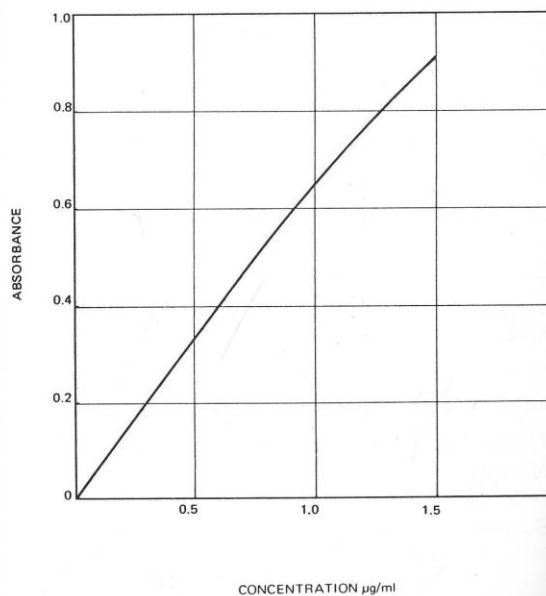
Wavelength nm	Slit width nm	Optimum working range µg/mL
589.0	0.5	0.002-1.0
589.6	1.0	0.01-2.0
330.2 } 330.3 }	0.5	2-400

### 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.

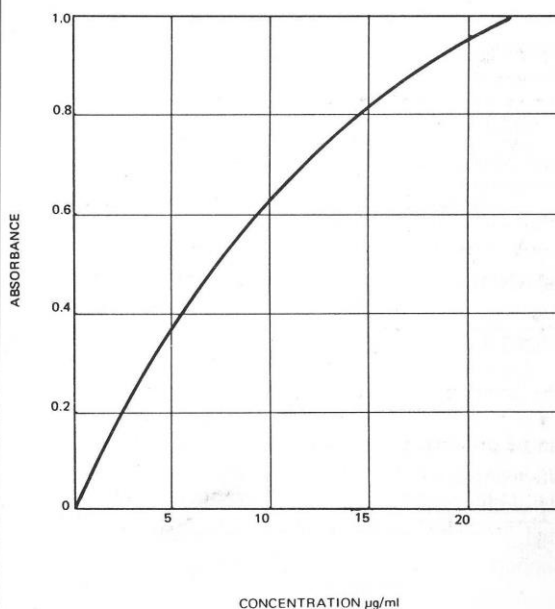
### Flame emission

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