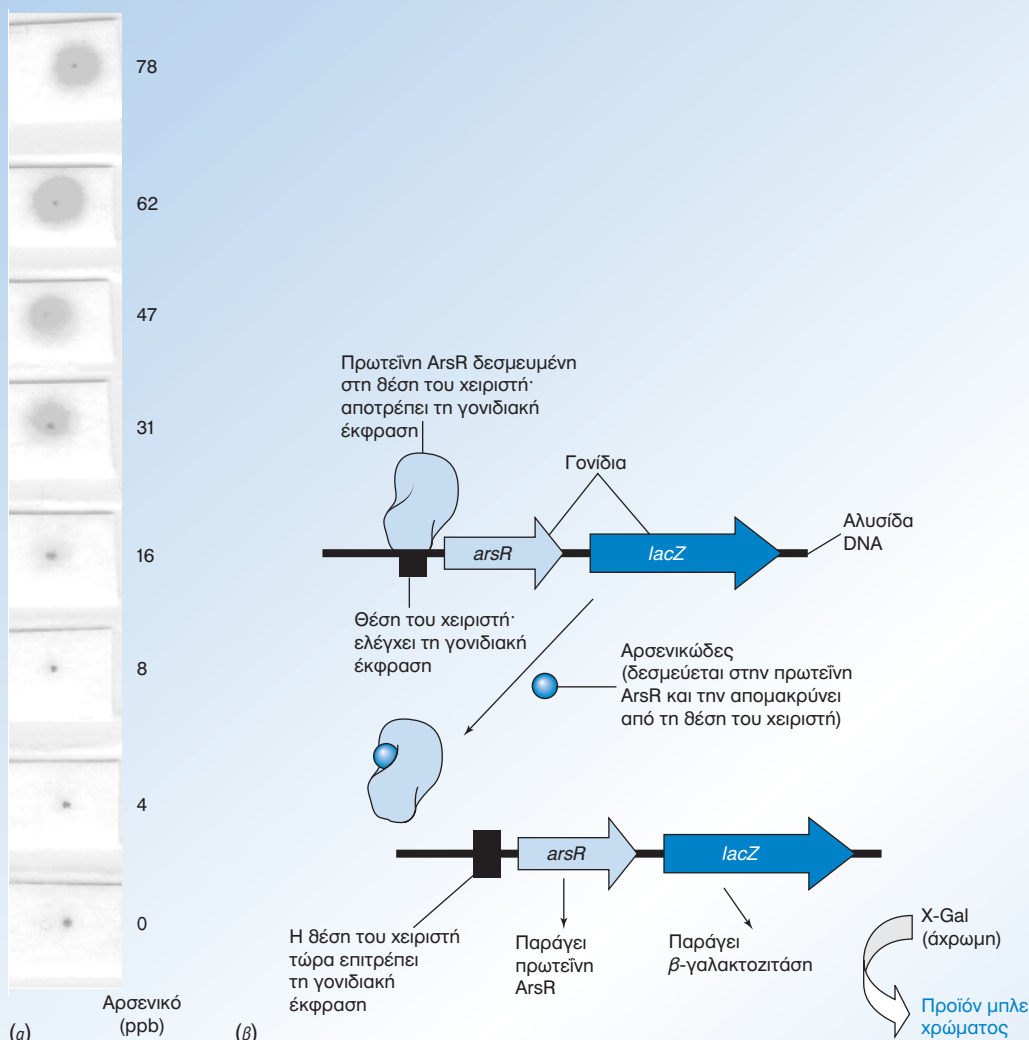


0

Η αναλυτική διαδικασία

ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ ΓΙΑ ΑΡΣΕΝΙΚΟ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ^{1,2}

(α) Δοκιμαστικές ταινίες που έχουν εκτεθεί σε διαφορετικά επίπεδα όξινου αρσενικού. [Ευγενική παραχώρηση από J. R. van der Meer, Πανεπιστήμιο Λωζάνης, Ελβετία.]
 (β) Πώς δρα το γενετικά τροποποιημένο DNA.

Στο Μπαγκλαντές, το 15-25% του πληθυσμού εκτίθεται σε μη ασφαλή επίπεδα αρσενικού στο πόσιμο νερό, τα οποία προέρχονται από υδροφόρους ορίζοντες που βρίσκονται σε επαφή με αρσενικούχα ορυκτά. Το πρόβλημα για την αναλυτική χημεία είναι να ανιχνευτούν με αξιοπιστία και χαμηλό κόστος τα πηγάδια όπου τα επίπεδα του αρσενικού υπερβαίνουν τα 50 μέρη στο δισεκατομμύριο (ppb). Αρσενικό σε τέτοια επίπεδα προκαλεί αγγειακές παθήσεις, δερματοπάθειες και καρκίνο.

Το διάγραμμα (α) δείχνει 8 δοκιμαστικές ταινίες (test strips) διαποτισμένες με γενετικός τροποποιημένα βακτήρια *E. coli*, τα γονίδια των οποίων ενεργοποιούνται από τα όξινα αρσενικόδη ιόντα (HAsO_3^-). Όταν οι ταινίες εκτίθενται σε πόσιμο νερό εμφανίζεται μια μπλε κηλίδα, το μέγεθος της οποίας αυξάνεται με τη συγκέντρωση του αρσενικού στο νερό. Συγκρίνοντας την κηλίδα με μια σειρά από πρότυπες, μπορούμε να εκτιμήσουμε αν το αρσενικό είναι πάνω ή κάτω από 50 ppb. Η δοκιμαστική ταινία ονομάζεται *βιοαισθητήρας*, επειδή για τη λειτουργία της χρησιμοποιούνται βιολογικές ουσίες.

Το διάγραμμα (β) δείχνει πώς γίνεται η ανάλυση. Το γενετικά τροποποιημένο DNA της *E. coli* περιέχει το γονίδιο *arsR*, το οποίο κωδικεύει τη ρυθμιστική πρωτεΐνη ArsR, και το γονίδιο *lacZ*, που κωδικεύει την πρωτεΐνη β-γαλακτοζιτάση. Η ArsR δεσμεύεται σε θέσεις ρύθμισης στο γονίδιο, για να εμποδίσει τη μεταγραφή του DNA. Τα όξινα αρσενικόδη ιόντα προκαλούν απόσπαση της ArsR από το γονίδιο και το κύτταρο ξεκινά την παραγωγή των ArsR και β-γαλακτοζιτάση. Κατόπιν, η β-γαλακτοζιτάση μετατρέπει μια συνθετική, άχρωμη ουσία –την X-Gal– στη δοκιμαστική ταινία σε ένα μπλε προϊόν. Όσο περισσότερα είναι τα όξινα αρσενικόδη τόσο πιο έντονο το χρώμα.



Η σοκολάτα είναι καλή να την τρώμε, αλλά όχι τόσο εύκολο να αναλυθεί. [Φωτογραφία από K. Bendo, W. H. Freeman.]

Ένα **διουρητικό** προκαλεί ούρηση.
Ένα **αγγειοδιασταλτικό** διευρύνει τα αγγεία του αίματος.

Οι σημειώσεις και οι αναφορές βρίσκονται στο τέλος του βιβλίου.

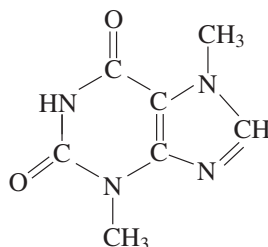
Τα *Chemical Abstracts* είναι η πιο πλήρης πηγή για την εύρεση άρθρων που έχουν δημοσιευθεί σε περιοδικά χημείας. Το *Scifinder* είναι το λογισμικό για την πρόσβαση στα *Chemical Abstracts*.

Οι ορισμοί με **έντονα** γράμματα πρέπει να μαθαίνονται. Υπάρχουν επίσης στο τέλος κάθε κεφαλαίου και στο Γλωσσάρι, στο τέλος του βιβλίου. Οι όροι με **πλάγια** γράμματα είναι λιγότερο σημαντικοί, αλλά πολλοί ορισμοί τους βρίσκονται επίσης στο Γλωσσάρι.

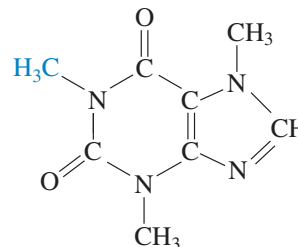
Ομογενής: έχει την ίδια σύσταση σε όλη τη μάζα του

Ετερογενής: δεν έχει την ίδια σύσταση σε όλη τη μάζα του

Η σοκολάτα³ είναι ο σωτήρας του φοιτητή στις κουραστικές νύχτες πριν από ένα διάγνισμα. Η αγαπημένη μου σοκολάτα που έχει 33% λιπαρά και 47% ζάχαρη, μου δίνει δύναμη να περιπλανιέμαι στα βουνά της Σιέρα Νεβάδα, στην Καλιφόρνια. Εκτός από τη μεγάλη περιεκτικότητα σε ενέργεια, η σοκολάτα περιέχει και διεγερτικά, όπως καφεΐνη και τη βιοχημικά πρόδρομη ουσία της, τη θεοβρωμίνη.



Θεοβρωμίνη
Διουρητικό, ελαφρύ μυοχαλαρωτικό, διεγερτικό της καρδιάς και αγγειοδιασταλτικό



Καφεΐνη
Διεγερτικό του κεντρικού νευρικού συστήματος

Η μεγάλη ποσότητα καφεΐνης είναι επιβλαβής σε πολλούς, ενώ ακόμα και μικρές ποσότητες της δεν γίνονται ανεκτές από μερικούς «άτυχους» ανθρώπους. Πόση καφεΐνη υπάρχει σε μια πλάκα σοκολάτας; Είναι η ποσότητα αυτή μεγαλύτερη ή μικρότερη από εκείνη που υπάρχει στον καφέ ή σε αναψυκτικά; Στο Bates College του Maine, ο καθηγητής Tom Weznel διδάσκει στους φοιτητές του τη λύση χημικών προβλημάτων μέσω ερωτήσεων όπως η παραπάνω.⁴

Πώς μετράμε, όμως, την ποσότητα της καφεΐνης σε μια πλάκα σοκολάτας;

0-1 Η δουλειά του αναλυτικού χημικού

Δύο φοιτητές ξεκίνησαν με έναν υπολογιστή να αναζητούν στη βιβλιοθήκη αναλυτικές μεθόδους. Έψαξαν τις λέξεις-κλειδιά «καφεΐνη» και «σοκολάτα» και βρήκαν μεγάλο αριθμό άρθρων σε περιοδικά χημείας. Αναφορές με τίτλο «High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Theobromine and Caffeine in Cocoa and Chocolate Products»⁵ περιέγραφαν διαδικασίες κατάλληλες για τον εξοπλισμό που διέθεταν στο εργαστήριό τους.⁶

Δειγματοληψία

Το πρώτο βήμα σε κάθε χημική ανάλυση είναι η εξασφάλιση ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος για μέτρηση – η διαδικασία λέγεται **δειγματοληψία**. Είναι όλη η σοκολάτα ίδια; Φυσικά όχι. Οι φοιτητές αγόρασαν μια πλάκα σοκολάτας από το γειτονικό περίπτερο και ανέλυσαν κομμάτια της. Για να εξαχθούν γενικευμένα συμπεράσματα για το θέμα «καφεΐνη και σοκολάτα» θα πρέπει να αναλυθούν διάφορες σοκολάτες από διάφορες εταιρείες. Επίσης, θα χρειαστεί να μετρηθούν πολλαπλά δείγματα από κάθε είδος, για να προσδιοριστεί το εύρος της ποσότητας της καφεΐνης σε κάθε είδος σοκολάτας.

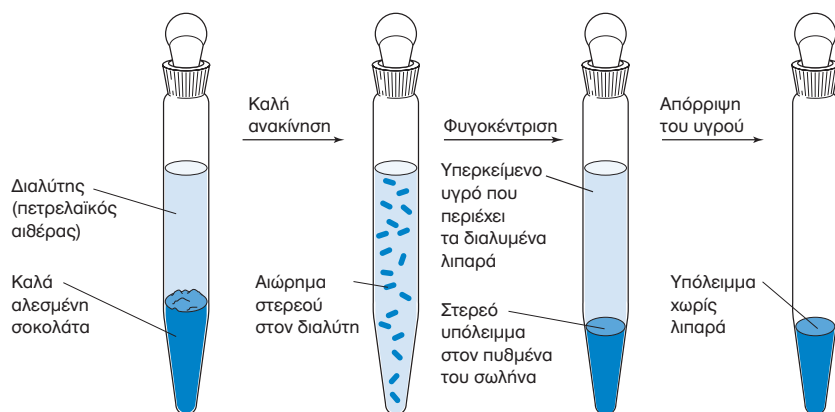
Μια πλάκα μαύρης σοκολάτας αναμένεται να είναι **ομογενής**, το οποίο σημαίνει ότι έχει την ίδια σύσταση σε όλη τη μάζα της. Επίσης, είναι ασφαλές να θεωρηθεί ότι ένα κομμάτι στο ένα άκρο έχει την ίδια περιεκτικότητα σε καφεΐνη με ένα κομμάτι στο άλλο άκρο. Μια σοκολάτα με φουντούκι, όμως, αποτελεί παράδειγμα **ετερογενούς** υλικού – δεν έχει την ίδια σύσταση σε όλη τη μάζα της. Το φουντούκι είναι διαφορετικό από τη σοκολάτα. Για να ληφθεί δείγμα από ετερογενές υλικό πρέπει να ακολουθηθεί διαφορετική διαδικασία από αυτήν που χρησιμοποιείται στα ομογενή υλικά. Πρέπει να είναι γνωστή η συνολική μάζα σοκολάτας και η συνολική μάζα φουντουκιών σε πολλά γλυκίσματα. Επίσης, θα πρέπει να είναι γνωστή η μέση περιεκτικότητα της σοκολάτας και των φουντουκιών (αν έχουν) σε καφεΐνη. Μόνο τότε μπορεί να βγει συμπέρασμα για τη μέση περιεκτικότητα σε καφεΐνη της σοκολάτας με φουντούκια.

Προετοιμασία δείγματος

Το πρώτο βήμα στην διαδικασία απαιτεί τη ζύγιση μιας ποσότητας σοκολάτας και την απομάκρυνση των λιπαρών με τη διάλυσή τους σε έναν άπολο διαλύτη. Τα λιπαρά πρέπει να απομακρυνθούν διότι αλλοιώνουν τη χρωματογραφική ανάλυση που θα

ακολουθήσει. Δυστυχώς, αν απλώς ανακινηθεί ένα μεγάλο κομμάτι σοκολάτας με διαλύτη, η εκχύλιση δεν είναι πολύ αποτελεσματική, επειδή ο διαλύτης δεν έρχεται σε επαφή με το εσωτερικό της σοκολάτας. Έτσι, οι επινοητικοί φοιτητές μας έκοψαν τη σοκολάτα σε μικρά κομμάτια και τα κατεργάστηκαν σε γουδί με γουδοχέρι (Εικόνα 0-1), για να την κονιορτοποιήσουν.

Φανταστείτε να προσπαθεί κάποιος να αλέσει τη σοκολάτα! Το στερεό είναι πολύ μαλακό για να αλεστεί. Έτσι οι φοιτητές κατέψυξαν το γουδί και το γουδοχέρι μαζί με τη σοκολάτα. Από τη στιγμή που η σοκολάτα είχε παγώσει ήταν αρκετά εύκολο να αλεστεί. Στη συνέχεια, τα μικρά κομμάτια της σοκολάτας τοποθετήθηκαν σε έναν προζυγισμένο σωλήνα φυγοκέντρισης των 15 mL και καταγράφηκε η μάζα τους.

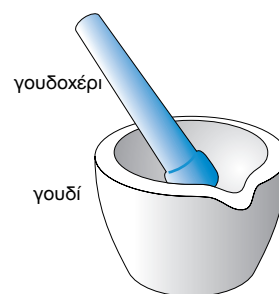


Η Εικόνα 0-2 δείχνει το επόμενο βήμα της διαδικασίας. Στον σωλήνα προστέθηκαν 10 mL διαλύτη πετρελαϊκού αιθέρα. Ο σωλήνας καλύφθηκε με ένα πώμα και ανακινήθηκε καλά για να διαλυθούν τα λιπαρά από τη στερεή σοκολάτα στον διαλύτη. Η καφεΐνη και η θεοβρωμίνη είναι αδιάλυτες σε αυτό τον διαλύτη. Το μείγμα του υγρού και των μικρών σωματιδίων φυγοκεντρίστηκε στη συνέχεια για να κατακαθίσει η σοκολάτα στον πυθμένα του σωλήνα. Το καθαρό υγρό, που περιείχε τα διαλυμένα λιπαρά, μπορούσε τώρα να μεταφερθεί και να απορριφθεί. Η εκχύλιση με νέο διαλύτη επαναλήφθηκε δύο φορές για να είναι βέβαιη η πλήρης απομάκρυνση των λιπαρών από τη σοκολάτα. Ο διαλύτης που απέμεινε στη σοκολάτα απομακρύνθηκε εντελώς με θέρμανση του σωλήνα φυγοκέντρισης σε ποτήρι με ζεστό νερό. Η μάζα της σοκολάτας που απέμεινε υπολογίστηκε ζυγίζοντας τον σωλήνα φυγοκέντρισης συν τη σοκολάτα που της είχαν αφαιρεθεί τα λιπαρά, μείον τη γνωστή μάζα του άδειου σωλήνα.

Οι ουσίες που πρόκειται να μετρηθούν, στην περίπτωση μας η καφεΐνη και η θεοβρωμίνη, καλούνται **αναλύτες**. Το επόμενο βήμα στην προετοιμασία του δείγματος, είναι η **ποσοτική μεταφορά** (πλήρης μεταφορά) της σοκολάτας που δεν έχει λιπαρά σε μια φιάλη Erlenmeyer και η διάλυση των αναλυτών σε νερό, για τη χημική ανάλυση. Αν κάποιο υπόλειμμα δεν μεταφερθεί από τον σωλήνα στη φιάλη, τότε θα υπάρξει σφάλμα στην ανάλυση, αφού θα απουσιάζει ένα μέρος του αναλύτη. Για να επιτευχθεί η ποσοτική μεταφορά, οι φοιτητές πρόσθεσαν μερικά mL καθαρού νερού στον σωλήνα φυγοκέντρισης και με θέρμανση υπό ανάδευση παρέλαβαν όσο το δυνατόν περισσότερη σοκολάτα. Στη συνέχεια, έχυσαν τον **πολτό** (αιώρημα στερεού σε υγρό) σε μια φιάλη των 50 mL. Επανάλαβαν τη διαδικασία μερικές φορές με νέα ποσότητα νερού, για να είναι σίγουροι ότι όλα τα κομμάτια της σοκολάτας μεταφέρθηκαν από τον σωλήνα φυγοκέντρισης στη φιάλη.

Για να ολοκληρωθεί η διάλυση των αναλυτών, οι φοιτητές πρόσθεσαν νερό μέχρις όγκου 30 mL. Θέρμαναν τη φιάλη σε ένα υδατόλουτρο σε θερμοκρασία βρασμού, για να εκχυλίσουν όλη την ποσότητα της καφεΐνης και της θεοβρωμίνης από τη σοκολάτα στο νερό. Για να υπολογίσουν την ποσότητα του αναλύτη αργότερα, πρέπει να είναι γνωστή με ακρίβεια η συνολική μάζα του διαλύτη. Οι φοιτητές γνώριζαν τη μάζα της σοκολάτας στον σωλήνα φυγοκέντρισης και τη μάζα της άδειας φιάλης Erlenmeyer. Οπότε, τοποθέτησαν τη φιάλη στον ζυγό και πρόσθεταν νερό σταγόνα σταγόνα μέχρι η μάζα του νερού στη φιάλη να γίνει ακριβώς 33,3g. Αργότερα, θα συγκρίνουν γνωστά διαλύματα αναλύτη σε νερό με το άγνωστο διάλυμα που περιέχει 33,3g νερού.

Πριν εισάγουν το άγνωστο διάλυμα στον χρωματογράφο, για τη χημική ανάλυση, οι φοιτητές έπρεπε να καθαρίσουν το άγνωστο (Εικόνα 0-3). Ο πολτός της σοκολάτας στο νερό περιείχε μικρά στερεά σωματίδια, τα οποία θα βούλωναν τη χρωματο-

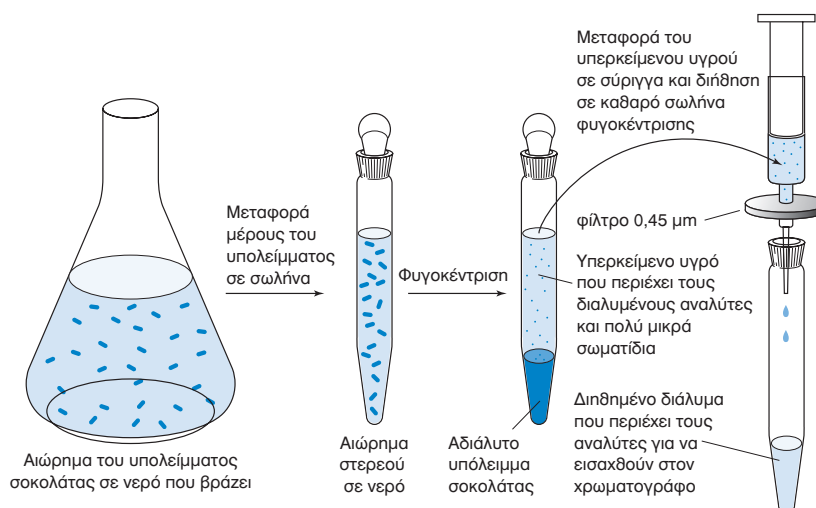


Εικόνα 0-1 Κεραμικό γουδί και γουδοχέρι που χρησιμοποιούνται για τη μετατροπή στερεών σε πολύ λεπτή σκόνη.

Εικόνα 0-2 Εκχύλιση των λιπαρών από τη σοκολάτα, ώστε να είναι δυνατή η ανάλυσή της.

Το διάλυμα μιας ουσίας σε νερό λέγεται **υδατικό διάλυμα**.

Εικόνα 0-3 Η φυγοκέντριση και η διήθηση χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό του μη επιθυμητού στερεού υπολείμματος από το υδατικό διάλυμα των αναλυτών.



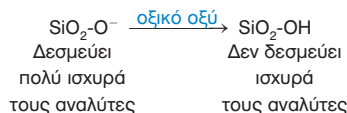
γραφική στήλη, που είναι ακριβή, και θα την κατέστρεφαν. Γι' αυτό μετέφεραν ένα μέρος του πολτού σε έναν σωλήνα φυγοκέντρισης και φυγοκέντρισαν το δείγμα για να καθιζάνει όσο το δυνατόν περισσότερη ποσότητα στερεού στον σωλήνα. Στη συνέχεια, το θολό σοκολατί **υπερκείμενο υγρό** (το υγρό πάνω από το στερεό) διηθήθηκε, προκειμένου να απομακρυνθούν ακόμα περισσότερα μικρά στερεά σωματίδια από αυτό.

Είναι πολύ σημαντικό να αποφευχθεί η εισαγωγή στερεών σε μια χρωματογραφική στήλη, αλλά το σοκολατί υγρό φαινόταν ακόμα θολό. Έτσι οι φοιτητές επανέλαβαν τη φυγοκέντριση και τη διήθηση πέντε φορές. Μετά από κάθε κύκλο διήθησης και φυγοκέντρισης του υπερκείμενου υγρού, αυτό γινόταν λίγο πιο καθαρό. Ωστόσο, το υγρό δεν ήταν ποτέ τελείως καθαρό. Με την πάροδο του χρόνου, και άλλο στερεό φαινόταν να καθιζάνει από το διηθημένο διάλυμα.

Η επίπονη διαδικασία που περιγράφηκε ονομάζεται **προετοιμασία δείγματος**, δηλαδή μετατροπή του δείγματος σε μορφή κατάλληλη για ανάλυση. Σε αυτή την περίπτωση, τα λιπαρά έπρεπε να απομακρυνθούν από τη σοκολάτα, οι αναλύτες έπρεπε να εκχυλιστούν σε νερό και το στερεό που έμεινε έπρεπε να διαχωριστεί από το νερό.

Η χημική ανάλυση (επιτέλους!)

Στη χρωματογραφία επιλέγεται ένας διαλύτης εφαρμόζοντας συστηματικά μια διαδικασία «δοκιμής και σφάλματος», που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 25. Το οξικό οξύ χρησιμοποιείται για να αντιδράσει με τα αρνητικώς φορτισμένα άτομα οξυγόνου που βρίσκονται στην επιφάνεια του SiO_2 και τα οποία, αν δεν εξουδετερωθούν, δεσμεύουν ισχυρά μια μικρή ποσότητα καφεΐνης και θεοβρωμίνης.

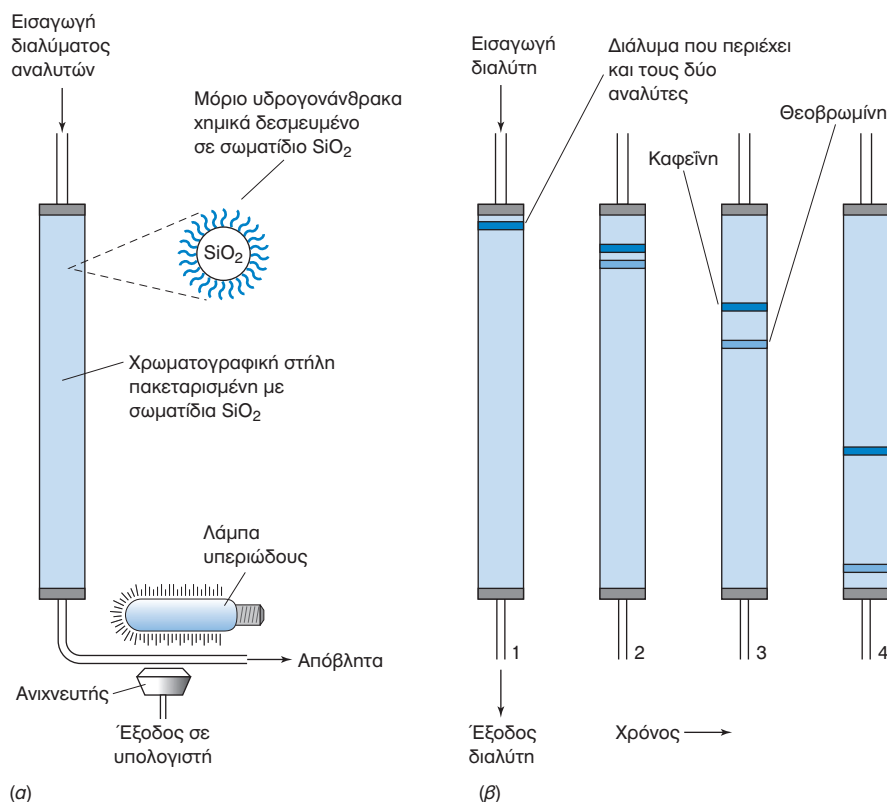


Οι φοιτητές αποφάσισαν τελικά ότι το διάλυμα των αναλυτών ήταν όσο καθαρό μπορούσε να είναι στον χρόνο που διέθεταν. Το επόμενο βήμα ήταν να εισαγάγουν διάλυμα σε μια **χρωματογραφική** στήλη, με την οποία θα διαχωρίζονταν οι αναλύτες και θα μετρούνταν η ποσότητα του καθενός. Η στήλη της Εικόνας 0-4α είναι πακεταρισμένη με σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) στα οποία υπάρχουν συνδεδεμένα επιμήκη μόρια υδρογονανθράκων. Είκοσι μL ($20,0 \times 10^{-6} \text{ L}$) του εκχυλίσματος της σοκολάτας εισήχθησαν στη στήλη και εκπλύθηκαν με διαλύτη που αποτελούνταν από 79 mL καθαρό νερό, 20 mL μεθανόλη και 1 mL οξικό οξύ. Η καφεΐνη είναι περισσότερο διαλυτή από τη θεοβρωμίνη στους υδρογονάνθρακες της επιφάνειας του SiO_2 . Κατά συνέπεια, η καφεΐνη «κολλά» ισχυρότερα από τη θεοβρωμίνη στα επικαλυμμένα σωματίδια του SiO_2 της στήλης. Όταν οι δύο αναλύτες μετακινούνται στη στήλη με διαλύτη, η θεοβρωμίνη φθάνει στην έξοδο της στήλης πριν από την καφεΐνη (Εικόνα 0-4β).

Οι αναλύτες ανιχνεύονται στην έξοδο της στήλης λόγω της ικανότητάς τους να απορροφούν υπεριώδη ακτινοβολία από τη λάμπα της Εικόνας 0-4α. Το γράφημα της απόκρισης του ανιχνευτή ως προς τον χρόνο στην εικόνα 0-5 καλείται **χρωματογράφημα**. Η θεοβρωμίνη και η καφεΐνη είναι οι κύριες κορυφές στο χρωματογράφημα. Μικρότερες κορυφές προέρχονται από άλλες ουσίες που εκχυλίζονται από τη σοκολάτα.

Το χρωματογράφημα από μόνο του δεν μας λέει ποιες ουσίες υπάρχουν στο δείγμα. Ένας τρόπος να ταυτοποιηθούν οι μεμονωμένες κορυφές είναι να μετρηθούν τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά κάθε ουσίας μόλις αυτές εξέρχονται από τη στήλη. Ένας άλλος τρόπος είναι να προστεθεί ένα δείγμα καθαρής καφεΐνης ή θεοβρωμίνης στο άγνωστο και να δούμε ποια κορυφή μεγαλώνει.

Ο προσδιορισμός του είδους του αγνώστου λέγεται **ποιοτική ανάλυση**. Ο προσδιορισμός της ποσότητας κάθε ουσίας λέγεται **ποσοτική ανάλυση**. Το συντριπτικά μεγαλύτερο μέρος του βιβλίου αυτού σχετίζεται με την ποσοτική ανάλυση.



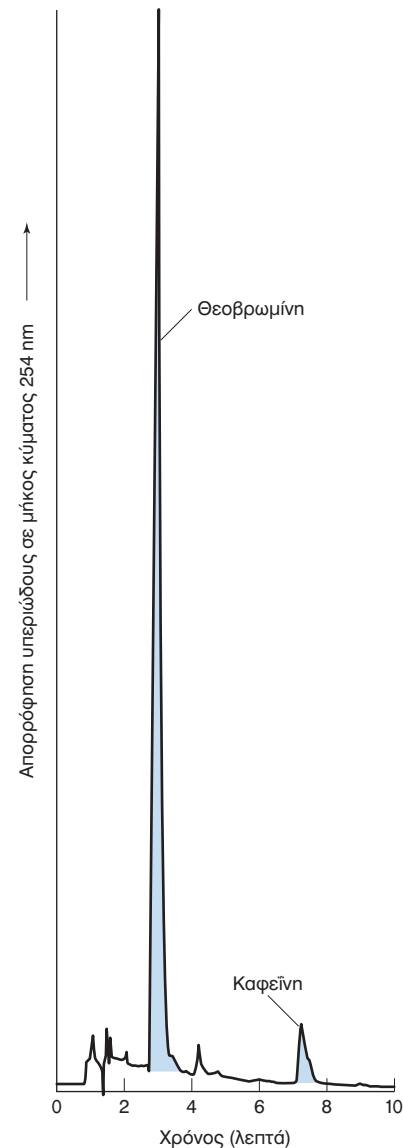
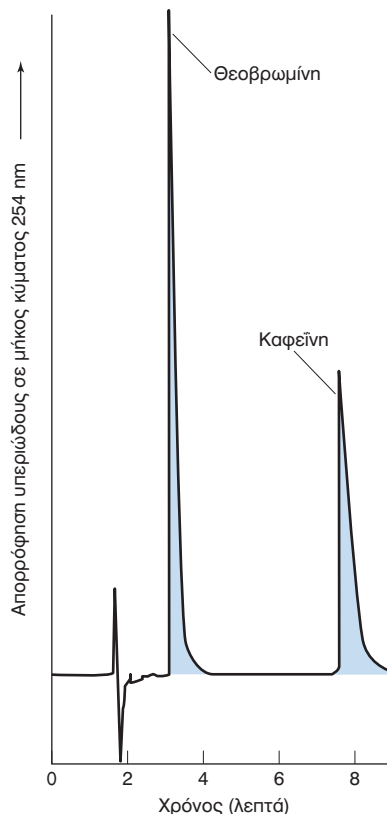
Εικόνα 0-4 Αρχή λειτουργίας υγρής χρωματογραφίας. (α) Εξοπλισμός χρωματογραφίας με έναν ανιχνευτή απορρόφησης υπεριώδους για την παρακολούθηση των αναλυτών στην έξοδο της στήλης. (β) Διαχωρισμός καφεΐνης και θεοβρωμίνης με χρωματογραφία. Η καφεΐνη είναι περισσότερο διαλυτή από τη θεοβρωμίνη στα σωματίδια υδρογονανθράκων στη στήλη. Για τον λόγο αυτό, η καφεΐνη συγκρατείται ισχυρότερα και κινείται στη στήλη βραδύτερα από τη θεοβρωμίνη.

Στην Εικόνα 0-5, το *εμβαδόν* κάτω από κάθε κορυφή είναι ανάλογο με την ποσότητα της ουσίας που φθάνει στον ανιχνευτή. Ο καλύτερος τρόπος για τη μέτρηση του εμβαδού είναι μέσω υπολογιστή που συνδέεται με τον χρωματογραφικό ανιχνευτή. Οι φοιτητές δεν είχαν υπολογιστή συνδεδεμένο με τον ανιχνευτή τους, οπότε μέτρησαν το *ύψος* της κορυφής αντί του εμβαδού.

Καμπύλες βαθμονόμησης

Γενικά, αναλύτες με ίδια συγκέντρωση δίνουν διαφορετικές αποκρίσεις. Κατά συνέπεια, πρέπει να μετριέται η απόκριση για γνωστές συγκεντρώσεις του αναλύτη. Το γράφημα της απόκρισης του ανιχνευτή συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναλύτη ονομάζεται **καμπύλη βαθμονόμησης** ή **πρότυπη καμπύλη**. Για την κατασκευή μιας τέτοιας καμπύλης, προετοιμάζονται και εισάγονται στη στήλη **πρότυπα διαλύματα** που περιέχουν γνωστές ποσότητες καθαρής θεοβρωμίνης ή καφεΐνης και μετριοούνται τα ύψη των κορυφών που προκύπτουν. Η Εικόνα 0-6 είναι το χρωματογράφημα ενός από τα πρότυπα διαλύματα και η Εικόνα 0-7 δείχνει τις καμπύλες βαθμονόμησης που προκύπτουν από διαλύματα που περιέχουν 10,0, 25,0, 50,0 ή 100,0 μg κάθε αναλύτη ανά g διαλύματος.

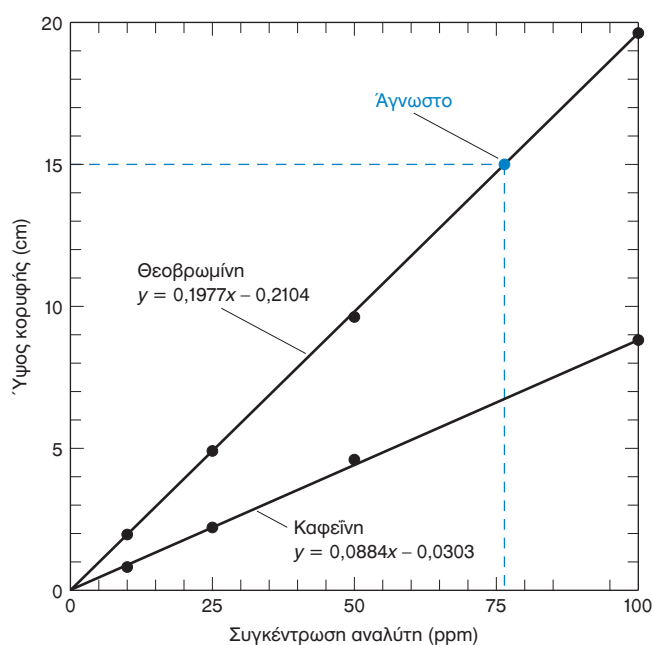
Οι ευθείες οι οποίες περνούν από τα σημεία που προκύπτουν από την καμπύλη βαθμονόμησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να βρεθούν οι συγκεντρώσεις της θεοβρωμίνης και της καφεΐνης στο άγνωστο. Από την εξίσωση της ευθείας της θεοβρωμίνης στην Εικόνα 0-7, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι αν το ύψος της κορυφής για τη θεοβρωμίνη στο άγνωστο διάλυμα είναι 15,0 cm, τότε η συγκέντρωσή της είναι 76,9 μg ανά g διαλύματος.



Εικόνα 0-5 Χρωματογράφημα 20,0 μL εκχυλίσματος μαύρης σοκολάτας. Χρησιμοποιήθηκε στήλη διαστάσεων 4,6 mm (διάμετρος) × 150 mm (μήκος), πακεταρισμένη με σωματίδια 5 μm Hypersil ODS, και διαλύτης έκλουσης νερό:μεθανόλη:οξικό οξύ (79:20:1 κατ' όγκο), με ταχύτητα ροής 1,0 mL/min.

Εικόνα 0-6 Χρωματογράφημα 20,0 μL ενός πρότυπου διαλύματος που περιέχει 50,0 μg θεοβρωμίνης και 50,0 μg καφεΐνης ανά g διαλύματος.

Εικόνα 0-7 Καμπύλες βαθμονόμησης που δείχνουν τα ύψη των κορυφών για γνωστές συγκεντρώσεις καθαρών ουσιών. Ένα μέρος στο εκατομμύριο είναι ένα μg αναλύτη ανά g διαλύματος. Η εξίσωση της ευθείας για τα πειραματικά δεδομένα καθορίστηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 4.



Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Γνωρίζοντας πόσος αναλύτης υπάρχει στο υδατικό εκχύλισμα της σοκολάτας, οι φοιτητές μπορούν να υπολογίσουν πόση θεοβρωμίνη και καφεΐνη υπήρχε στην αρχική σοκολάτα. Τα αποτελέσματα για τη μαύρη και τη λευκή σοκολάτα φαίνονται στον Πίνακα 0-1. Οι ποσότητες που βρέθηκαν στη λευκή σοκολάτα είναι μόνο το 2% των ποσοτήτων που βρέθηκαν στη μαύρη.

Πίνακας 0-1 Αποτελέσματα ανάλυσης μαύρης και λευκής σοκολάτας

Αναλύτης	Γραμμάρια αναλύτη ανά 100 g σοκολάτας	
	Μαύρη σοκολάτα	Λευκή σοκολάτα
Θεοβρωμίνη	0,392 ± 0,002	0,010 ± 0,007
Καφεΐνη	0,050 ± 0,003	0,0009 ± 0,0014

Οι αβεβαιότητες οφείλονται στις τυπικές αποκλίσεις τριών ενέσεων κάθε εκχυλίσματος.

Στον πίνακα φαίνεται επίσης η τυπική απόκλιση τριών επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για κάθε δείγμα. Η τυπική απόκλιση, που αναλύεται στο Κεφάλαιο 4, είναι μέτρο της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Αν τα τρία δείγματα έδιναν πανομοιότυπα αποτελέσματα, η τυπική απόκλιση θα ήταν 0. Αν τα αποτελέσματα δεν είναι τόσο επαναλήψιμα, η τυπική απόκλιση είναι μεγάλη. Για τη θεοβρωμίνη στη μαύρη σοκολάτα, η τυπική απόκλιση (0,002) είναι μικρότερη του 1% της μέσης τιμής (0,392) και η μέτρηση θεωρείται επαναλήψιμη. Για τη θεοβρωμίνη στη λευκή σοκολάτα, η τυπική απόκλιση (0,007) είναι σχεδόν όση και η μέση τιμή (0,010), οπότε η μέτρηση θεωρείται ελάχιστα επαναλήψιμη.

Πίνακας 0-2 Περιεκτικότητα αναψυκτικών και τροφών σε καφεΐνη

Πηγή	Καφεΐνη (mg ανά μερίδα)	Μερίδα ^a (ουγγιές)
Καφές κανονικός	106-164	5
Καφές χωρίς καφεΐνη	2-5	5
Τσάι	21-50	5
Ρόφημα κακάο	2-8	6
Σοκολάτα αρτοποιίας	35	1
Γλυκιά σοκολάτα	20	1
Σοκολάτα γάλακτος	6	1
Αναψυκτικά με καφεΐνη	36-57	12

a. 1 ουγγιά = 28,35 g.

ΠΗΓΗ: Tea Association (<http://www.chinamist.com/caffeine.htm>).

Ο σκοπός μιας ανάλυσης είναι να φθάσει σε κάποιο συμπέρασμα. Η ερώτηση που τέθηκε στη αρχή του κεφαλαίου ήταν «Πόση καφεΐνη περιέχει μια πλάκα σοκολάτας;» και «Είναι η ποσότητα αυτή μεγαλύτερη ή μικρότερη από εκείνη στον καφέ και στα αναψυκτικά;» Μετά από όλη αυτή τη δουλειά, οι φοιτητές ανακάλυψαν πόση καφεΐνη υπάρχει σε μια συγκεκριμένη πλάκα σοκολάτας, την οποία ανέλυσαν. Χρειάζεται πολύ περισσότερη δουλειά για να πάρουν δείγμα από πολλές πλάκες σοκολάτας του ίδιου τύπου, και πολλών διαφορετικών τύπων, για να έχουν μια γενική άποψη. Στον Πίνακα 0-2 συγκρίνονται αποτελέσματα αναλύσεων διαφορετικών πηγών καφεΐνης. Ένα κουτί αναψυκτικού ή ένα φλιτζάνι τσάι περιέχει λιγότερη από τη μισή ποσότητα καφεΐνης που υπάρχει σε ένα μικρό φλιτζάνι καφέ. Η σοκολάτα περιέχει ακόμα λιγότερη καφεΐνη, αλλά ένας πεινασμένος οδοιπόρος –αν φάει αρκετή σοκολάτα– θα ανακτήσει τις δυνάμεις του γρήγορα!

0-2 Βασικά βήματα στη χημική ανάλυση

Η αναλυτική διαδικασία πολλές φορές ξεκινά με μια ερώτηση που δεν εκφράζεται με όρους της χημικής ανάλυσης. Η ερώτηση μπορεί να είναι: «Πίνεται αυτό το νερό;» ή «Ο έλεγχος εκπομπών των αυτοκινήτων μειώνει τη ρύπανση της ατμόσφαιρας;» Ένας επιστήμονας μπορεί να μεταφράσει αυτές τις ερωτήσεις σε ανάγκη πραγματοποίησης συγκεκριμένων μετρήσεων. Στη συνέχεια, ένας αναλυτικός χημικός επιλέγει ή επινοεί μια διαδικασία για την εκτέλεση αυτών των μετρήσεων.

Όταν η ανάλυση ολοκληρωθεί, ο αναλυτής πρέπει να μεταφράσει τα αποτελέσματα σε όρους που να μπορούν να γίνουν κατανοητοί από άλλους, κατά προτίμηση από το ευρύ κοινό. Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό κάθε αποτελέσματος είναι τα όριά του. Ποια είναι η στατιστική αβεβαιότητα στα αναφερόμενα αποτελέσματα; Αν τα δείγματα ληφθούν με διαφορετικό τρόπο, θα πάρουμε τα ίδια αποτελέσματα; Μια πολύ μικρή ποσότητα του αναλύτη (ιχνοποσότητα) που ανιχνεύεται βρίσκεται πράγματι στο δείγμα ή πρόκειται για επιμόλυνση; Μόνον αφού γίνουν κατανοητά τα αποτελέσματα και τα όριά τους μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα.

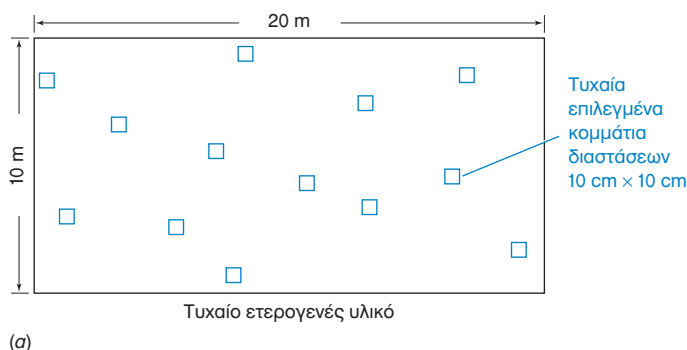
Τα βασικά βήματα μιας αναλυτικής διαδικασίας συνοψίζονται ως εξής:

Διατύπωση της ερώτησης	Μετατροπή των γενικών ερωτήσεων σε ειδικές, που να μπορούν να απαντηθούν μέσω χημικών μετρήσεων.
Επιλογή αναλυτικής διαδικασίας	Έρευνα της χημικής βιβλιογραφίας ώστε να βρεθούν κατάλληλες διαδικασίες ή, αν είναι απαραίτητο, επινοήση νέων διαδικασιών για την πραγματοποίηση των απαιτούμενων μετρήσεων.
Δειγματοληψία	<i>Δειγματοληψία</i> είναι η διαδικασία επιλογής αντιπροσωπευτικού υλικού για ανάλυση. Το Πλαίσιο 0-1 παρέχει μερικές ιδέες για το πώς πραγματοποιείται αυτό. Αν ξεκινήσει κάποιος με λάθος επιλεγμένο δείγμα ή δείγμα που μεταβάλλεται στο χρονικό διάστημα μεταξύ της συλλογής του και της ανάλυσής του, τα αποτελέσματα δεν έχουν νόημα.
Προετοιμασία δείγματος	Η <i>προετοιμασία δείγματος</i> είναι η διαδικασία μετατροπής ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος σε μορφή κατάλληλη για χημική ανάλυση, το οποίο συνήθως σημαίνει διάλυση του δείγματος. Δείγματα με μικρή συγκέντρωση του αναλύτη μπορεί να χρειάζεται να συμπυκνωθούν πριν από την ανάλυση. Μπορεί να χρειάζεται να απομακρυνθούν ή να <i>καλυφθούν</i> ουσίες που παρεμποδίζουν τη χημική ανάλυση. Για μια πλάκα σοκολάτας, η προετοιμασία του δείγματος περιλαμβάνει την απομάκρυνση των λιπαρών και τη διάλυση των αναλυτών. Ο λόγος της απομάκρυνσης των λιπαρών ήταν ότι θα παρεμπόδιζαν τη χρωματογραφία.
Ανάλυση	Μέτρηση της συγκέντρωσης του αναλύτη σε διάφορα ίδια κλάσματα του δείγματος (aliquot). Σκοπός των <i>επαναλαμβανό-</i>

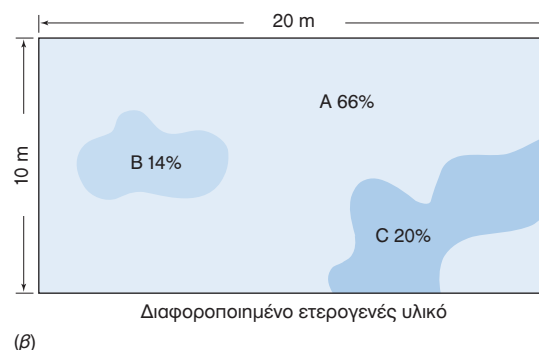
Οι χημικοί χρησιμοποιούν τον όρο **σωματίδιο** για να αναφερθούν σε οποια ουσία τους ενδιαφέρει. **Παρεμπόδιση** συμβαίνει όταν μια ουσία διαφορετική από τον αναλύτη αυξάνει ή μειώνει την απόκριση μιας αναλυτικής μεθόδου, με αποτέλεσμα να φαίνεται ότι υπάρχει μεγαλύτερη ή μικρότερη ποσότητα αναλύτη από την πραγματική. **Κάλυψη** είναι η μετατροπή μιας παρεμποδίζουσας ουσίας σε μια μορφή που δεν ανιχνεύεται. Για παράδειγμα, τα ιόντα Ca^{2+} στο νερό μιας λίμνης μπορούν να μετρηθούν με ένα αντιδραστήριο που λέγεται EDTA. Τα ιόντα Al^{3+} παρεμποδίζουν αυτή την ανάλυση, επειδή αντιδρούν επίσης με το EDTA. Τα ιόντα Al^{3+} μπορούν να καλυφθούν με την κατεργασία του δείγματος με περίσσεια F^- , οπότε παράγεται AlF_3 , το οποίο δεν αντιδρά με το EDTA.

ΠΛΑΙΣΙΟ 0-1 Πώς λαμβάνουμε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα

Σε ένα **τυχαίο ετερογενές υλικό**, οι διαφορές στη σύσταση είναι τυχαίες ακόμα και στη μικροκλίμακα. Όταν συλλέγεται ένα μέρος του υλικού για ανάλυση, παραλαμβάνονται τμήματα από κάθε διαφορετική σύσταση. Για να κατασκευαστεί ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα από ετερογενές υλικό, πρέπει το υλικό να μοιραστεί οπτικά σε τμήματα. Ένα **τυχαίο δείγμα** συλλέγεται λαμβάνοντας τυχαία ποσότητες από τα διαφορετικά τμήματα του υλικού. Αν θέλουμε να μετρήσουμε την ποσότητα μαγνησίου στο γρασίδι του χωραφιού διαστάσεων 10 m × 20 m στο διάγραμμα (α), μπορούμε να χωρίσουμε το χωράφι σε 20.000 μικρά κομμάτια πλευράς 10 cm. Μετά την αρίθμηση των μικρών κομματιών, μπορούμε με τη βοήθεια ενός υπολογιστή να επιλέξουμε 100 τυχαίους αριθμούς από 1 έως 20.000. Στη συνέχεια, κόβουμε και συνδέουμε το γρασίδι από κάθε ένα από τα 100 τετράγωνα για να κατασκευαστεί ένα αντιπροσωπευτικό συνολικό δείγμα για ανάλυση.



Για ένα **διαφοροποιημένο ετερογενές υλικό** (στο οποίο υπάρχουν μεγάλες περιοχές με εμφανώς διαφορετική σύσταση), πρέπει να κατασκευαστεί ένα αντιπροσωπευτικό **σύνθετο δείγμα**. Για παράδειγμα, το χωράφι στο διάγραμμα (β) έχει τρία διαφορετικά είδη από γρασίδι στις περιοχές Α, Β και Γ. Μπορεί να σχεδιαστεί ένας χάρτης σε χαρτί μιλιμετρέ και να μετρηθεί το εμβαδόν κάθε περιοχής. Σε αυτή την περίπτωση, 66% της επιφάνειας βρίσκεται στην περιοχή Α, 14% βρίσκεται στη Β και 20% στη Γ. Για να κατασκευαστεί ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα από αυτό το διαφοροποιημένο υλικό, λαμβάνονται 66 μικρά τετράγωνα από την περιοχή Α, 14 από τη Β και 20 από τη Γ. Αυτό μπορεί να γίνει επιλέγοντας τυχαία νούμερα από το 1 έως το 20.000, που αντιστοιχούν σε τετράγωνα, μέχρι να συμπληρωθεί ο επιθυμητός αριθμός από κάθε περιοχή.



μενων μετρήσεων είναι ο προσδιορισμός της μεταβλητότητας (αβεβαιότητας) στην ανάλυση και η προφύλαξη από σοβαρό σφάλμα κατά την ανάλυση ενός μόνο δείγματος. Η *αβεβαιότητα της μέτρησης είναι τόσο σημαντική όσο και η ίδια η μέτρηση*, γιατί δείχνει πόσο αξιόπιστη είναι αυτή. Αν είναι απαραίτητο, χρησιμοποιούνται διαφορετικές αναλυτικές μέθοδοι σε παρόμοια δείγματα, για να επιβεβαιωθεί ότι όλες οι μέθοδοι δίνουν το ίδιο αποτέλεσμα και ότι η επιλογή της αναλυτικής μεθόδου δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα. Μπορεί επίσης να θέλουμε να παρασκευαστούν και να αναλυθούν διαφορετικά δείγματα για να διερευνηθούν οι αποκλίσεις που οφείλονται στη διαδικασία δειγματοληψίας.

Έκθεση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη σαφή, γραπτή και ολοκληρωμένη έκθεση των αποτελεσμάτων, όπου υπογραμμίζεται ο όποιος περιορισμός τους. Η έκθεση μπορεί να έχει γραφεί έτσι ώστε να γίνεται κατανοητή μόνο από έναν ειδικό (όπως ο καθηγητής σας) ή από το ευρύτερο κοινό (όπως η μητέρα σας). Πρέπει να είστε βέβαιοι ότι η έκθεση είναι κατάλληλη για το κοινό στο οποίο απευθύνεται.

Εξαγωγή συμπερασμάτων

Από τη στιγμή που η έκθεση γράφεται, ο αναλυτής μπορεί να μη συνδέεται με τη χρήση των αποτελεσμάτων, όπως είναι η τροποποίηση της προμήθειας πρωτογενών υλικών ή η θέσπιση νέων νόμων για τον καθορισμό των προσθέτων στα τρόφιμα. Όσο σαφέστερα είναι γραμμένη μια έκθεση, τόσο λιγότερο πιθανό είναι να παρερμηνευθεί από αυτούς που τη χρησιμοποιούν.

Το μεγαλύτερο μέρος αυτού του βιβλίου ασχολείται με τη μέτρηση χημικών συγκεντρώσεων σε ομογενή δείγματα ενός αγνώστου. Η ανάλυση είναι άσκοπη εκτός εάν έχει πραγματοποιηθεί σωστά η συλλογή του δείγματος, έχουν βρεθεί τρόποι ελέγχου της αξιοπιστίας της αναλυτικής μεθόδου και τα αποτελέσματα αναφέρονται ολοκληρωμένα και με σαφήνεια. Η χημική ανάλυση είναι μόνο το μέσο μιας διαδικασίας που αρχίζει με μια ερώτηση και καταλήγει σε ένα συμπέρασμα.

Όροι προς κατανόηση

Όροι που γράφονται με έντονα γράμματα στο κεφάλαιο αυτό, και οι ορισμοί τους υπάρχουν στο Γλωσσάρι.

αναλύτης	καμπύλη βαθμονόμησης	πολτός	σωματίδιο (χημικό)
δειγματοληψία	κλάσμα δείγματος	ποσοτική ανάλυση	τυχαίο δείγμα
διαφοροποιημένο ετερογενές υλικό	μετάγγιση	ποσοτική μεταφορά	τυχαίο ετερογενές υλικό
ετερογενής κάλυψη	ομογενής παρεμπόδιση	προετοιμασία δείγματος	υπερκεείμενο υγρό
	ποιοτική ανάλυση	πρότυπο διάλυμα	
		σύνθετο δείγμα	

Προβλήματα

Σύντομες απαντήσεις στα αριθμητικά προβλήματα υπάρχουν στο τέλος του βιβλίου.

- 0-1.** Ποια η διαφορά μεταξύ ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης;
- 0-2.** Ποια είναι τα βήματα σε μια χημική ανάλυση;
- 0-3.** Τι σημαίνει *κάλυψη* μιας παρεμποδίζουσας ουσίας;
- 0-4.** Ποιος είναι ο σκοπός μιας καμπύλης βαθμονόμησης;
- 0-5. (α)** Ποια η διαφορά μεταξύ ενός ομογενούς και ενός ετερογενούς υλικού;
- (β)** Μετά την ανάγνωση του Πλαισίου 0-1, πείτε μας ποια είναι η διαφορά μεταξύ ενός διαφοροποιημένου ετερογενούς υλικού

και ενός τυχαίου ετερογενούς υλικού.

(γ) Πώς λαμβάνεται αντιπροσωπευτικό δείγμα από κάθε είδος υλικού;

0-6. Η περιεκτικότητα σε ιόντα ιωδίου (I^-) ενός εμπορικά διαθέσιμου μεταλλικού νερού μετρήθηκε με δύο μεθόδους, που έδωσαν πολύ διαφορετικά αποτελέσματα.⁷ Με τη μέθοδο Α βρέθηκαν $0,23 \text{ mg } I^-$ ανά λίτρο (mg/L) και με τη μέθοδο Β $0,009 \text{ mg/L}$. Κατά την προσθήκη Mn^{2+} στο νερό, η περιεκτικότητα σε I^- που προσδιορίζεται με τη μέθοδο Α αυξανόταν όσο περισσότερο Mn^{2+} προσθέταμε, ενώ τα αποτελέσματα της μεθόδου Β δεν άλλαζαν. Ποιος από τους Όρους προς κατανόηση περιγράφει αυτό που συμβαίνει στις παραπάνω μετρήσεις;

