

# KAZALO

<b>Osnovni parametri analiznega postopka</b>	2
Umerjanje v analizni kemiji	11
<b>Elektroanalizne metode</b>	13
<i>Potenciometrična titracija</i>	16
Amperometrične titracije	18
<i>Določanje vode s KFR v tekočih in trdnih vzorcih</i>	19
Ionoselektivne elektrode	21
<i>Določanje fluoridnega iona v raztopini z ISE in MAS</i>	22
<b>Spektroskopske analizne metode</b>	
Molekularna absorpcijska spektrofotometrija (MAS)	24
<i>Spektrofotometrično določanje anorganskega fosforja v krvni plazmi</i>	27
Fluorescenčna molekularna spektrofotometrija (MFS)	28
<i>Določanje riboflavina –vitamina B2 z MFS</i>	29
Plamenska emisijska spektrometrija (PES)	30
<i>Določitev Na in K v krvni plazmi s PES</i>	33
Atomska absorpcijska spektrometrija (AAS)	34
<i>Določanje Cu, Fe in Zn v šumečih tabletah z AAS</i>	41
Elektrotermična AAS (ETAAS)	43
<i>Določanje Pb, Cu in Al v biološkem materialu z ETAAS</i>	46
<b>Kromatografija</b>	49
Tekočinska kromatografija	58
<i>Določanje kofeina s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)</i>	60
Plinska kromatografija	62
<i>Določanje ftalatov v vodi s plinsko kromatografijo</i>	65

## OSNOVNI PARAMETRI ANALIZNEGA POSTOPKA

Analizni postopek opredeljujejo pravilnost, natančnost, občutljivost in meja zaznavnosti

### Napake v kvantitativni analizi

Na splošno izvrši kemik več meritev (določitev). Rezultate meritev lahko poda kot **aritmetično sredino,  $\bar{x}$  ali mediano, M.**

Aritmetična sredina rezultatov (poprečna vrednost, poprečje) je numerična vrednost, ki jo dobimo, če delimo vsoto vseh meritev s število meritev N

### Aritmetična sredina, poprečna vrednost:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$$

**Mediana, M** serije meritev je rezultat, okoli katerega so vsi ostali enako razporejeni; polovica jih je nižjih in polovica višjih.

**Natančnost** (precision, Genauigkeit, la fidélité) opisuje, kako se ponavljajo rezultati, ki smo jih dobili na enak način. Natančnost prikažemo z odmikom od aritmetične sredine (mediane), razponom in standardnim odkikom.

Odmik od aritmetične sredine (mediane) je numerična razlika, ne glede na predznak, med rezultatom  $x_i$  in aritmetično sredino  $\bar{x}$  (mediano M).

Razširitev (Spread) je numerična razlika med najvišjim in najnižjim rezultatom)

Standardni odkik (glej stran....)

**Pravilnost** (accuracy, Richtigkeit, la exactitude) označuje, kako blizu je rezultat meritve njegovi resnični oziroma sprejeti vrednosti. Izražamo ga kot napako

**Sistematične napake** določajo pravilnost rezultata oziroma postopka, izražamo pa jih z absolutno in relativno napako.

Absolutna napaka (E) je razlika med dobljeno (O) in sprejeto vrednostjo A.

$$E=O-A$$

Navadno pišemo predznak, da označimo previsok oziroma prenizek rezultat.

Sprejeta vrednost ni vedno resnična vrednost.

Relativno napako izražamo v odstotkih proti sprejeti vrednosti.

Pravilnost rezultata lahko izrazimo le, če poznamo resnično (oziroma sprejeto) vrednost rezultata, natančnost pa že, če izračunamo aritmetično sredino serije meritev; natančnost ni nujno veljaven kriterij za pravilnost rezultata

Napake analiznih rezultatov

**Sistematične** (določljive) napake imajo določeno vrednost, ki jo lahko izmerimo in izračunamo vnaprej. **Slučajne** napake (nedoločljive) nimajo določene vrednosti, temveč stresajo v nekem iznosu. Determinativne napake so lahko **konstantne ali proporcionalne**.

Sistematične napake so lahko **osebne, instrumentalne ali napake postopka - metode**.

Osebne napake izvirajo iz nevednosti, površnosti ali fizičnih sposobnosti eksperimentatorja (nepravilno delo z vzorcem, nepravilno spiranje oborine, barvna sleposta). Instrumentalne napake izvirajo iz nepopolnosti aparatov oziroma naprav, ki jih uporabljamo pri analizi (toleranca uteži, poškodovane uteži, nepravilno umerjene birete oziroma graduirane, pipete in bučke. Napake metode. Postopki, ki jih uporabljamo v analizi niso popolni (gravimetrija: čistota, topnost oborine; titrimetrija: potreben je nekoliko večji volumen titrne raztopine kot je teoretičen, da nastopi preskok indikatorja).

Ugotavljanje določljivih napak:

Instrumentalne napake navadno odkrijemo in jih tudi odstranimo z umerjanjem naprav. Napake metode in osebne napake odkrijemo težje. Načini so naslednji:

- a) analiza standardnih vzorcev (CRM – Certified reference material)
- b) uporabe dveh ali več neodvisnih metod
- c) ugotovitev slepe vrednosti (predvsem izločimo napake zaradi nečistoz v kemikalijah in posodah; v titrimetriji tako odstranimo napake zaradi razlik med stehiometrično točko in točko predkoka indikatorja),
- d) sprememba množine vzorca (ugotovimo konstantno napako)

Slučajne napake

Dve predpostavki omogočata uporabo statistike pri obravnavanju slučajnih napak:

1. višji ali nižji rezultati imajo isto verjetnost, kar kaže, da je aritmetična sredina najverjetnejša vrednost,
2. slučajne napake povzročajo pogosteje manjše in redkeje večje odmike od aritmetične sredine

Enačba normalne (Gaussove ) krivulje:

$$y = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x_i - \mu)^2}{2\sigma^2}} \quad z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

$x_i$  vrednost posamezne meritve

$\mu$  aritmetična sredina velikega števila meritev

$d=(x_i-\mu)$  odmik od aritmetične sredine (abscisa)

$y$  pogostost (ordinata)

$\sigma$  standardni odmik (deviacija)

Standardni odmik

Standardni odmik (odklon)  $s$  je merilo za stresanje rezultatov zaradi slučajnih napak. V skladu z enačbo ustreza vsaki vrednosti  $s$  le ena krivulja. Pri normalni porazdelitvi je 68,3% rezultatov v mejah  $\pm 1s$ , 95,5%  $\pm 2s$  in 99,7%  $\pm 3s$ .

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}{N}}$$

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^N x_i)^2}{N}}{N - 1}}$$

$\sigma$  standardni odmik za neskončno število meritev

$s$  standardni odmik za končno število meritev

$x_i$  posamezna meritev

$\bar{x}$  aritmetična sredina meritev

$N$  število meritev

$$s_r = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$$

Za primerjavo različnih postopkov je bolj primerno relativno podajanje standardnega odmika. Relativni standardni odmik  $s_r$  je podan z enačbo

Standardni odmik s predstavlja približek intervala okoli aritmetične sredine  $\bar{x}$ , v katerem pričakujemo, da je 68% neskončnega števila meritev. Standardni odmik je osnova za ostale statistične ocenitve in je najprimernejši parameter natančnosti metode.

Standardni odmik zbranih podatkov (ista metoda, več vzorcev)

$$s_p = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_1} (x - \bar{x}) + \sum_{j=1}^{N_2} (x - \bar{x}) + \sum_{k=1}^{N_3} (x - \bar{x}) + \dots}{N_1 + N_2 + N_3 + \dots + N_s}}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_1} (x_i - \bar{x}_1)^2 + \sum_{i=1}^{N_2} (x_i - \bar{x}_2)^2 + \dots + \sum_{i=1}^{N_k} (x_i - \bar{x}_k)^2}{N - k}}$$

$\bar{x}_1, \bar{x}_2, \bar{x}_k, \dots$  aritmetična sredina k vzorcev  
 N celotno število meritev ..... ( $N_1 + N_2 + \dots + N_k$ )

### Statistična analiza rezultatov

S pomočjo statistične obravnave rezultatov lahko ugotovimo:

1. kakšna je verjetnost, da bo eksperimentalno merjeni rezultat v določenem območju okoli resnične aritmetične sredine;
2. pri danem s: koliko meritev moramo narediti, da eksperimentalna aritmetična sredina  $\bar{x}$  pade v določeno območje okoli prave aritmetične sredine;
3. da lahko meritev zavrnemo, ko se v seriji meritev ena vrednost močno razlikuje od drugih;
4. koliko se morata razlikovati  $\bar{x}_1$  in  $\bar{x}_2$ , da lahko z veliko verjetnostjo trdimo, da sta vzorca različna glede na sestavo ( $N_1$  meritev vzorec 1,  $N_2$  meritev vzorec 2);
5. koliko se morata razlikovati standardna odmika dveh metod pri analizi istega vzorca, da lahko sklepamo o različnih slučajnih napakah pri obeh postopkih.

### Območje zanesljivosti

Standardni odmik je pomemben, ker nam pove, kakšna je natančnost uporabljene metode. Ne pove pa nam, koliko se razlikujejo  $\bar{x}$  od  $\mu$  (resnična aritmetična sredina). Verjetnost, da je razlika majhna, narašča s številom meritev N.  $\mu$  meritve je vrednost, ki je neznana, lahko pa ugotovimo s pomočjo statistične teorije meje, v katerih se nahaja  $\mu$ .

Ugotovitev območja zanesljivosti, če imamo dober približek za  $\sigma$

Območje zanesljivosti; s je dober približek za  $\sigma$

N-1>25-30

N-k>25-30

Območje zanesljivosti:

$$x \pm \frac{t\sigma}{\sqrt{N}}$$

$$I_z\mu = \bar{x} \pm \frac{z\sigma}{\sqrt{N}}$$

Z je statistični faktor, ki zavisi od stopnje verjetnosti

Stopnja verj.	50	80	90	95	99	99,9
Z	0,67	1,29	1,64	1,96	2,58	3,29

Meja zanesljivosti se pri štirih meritvah zmanjša na polovico, pri šestnajstih še za polovico. Smiselno je narediti dve ali tri meritve, redko jih delamo več.

Ugotovitev območja zanesljivosti, če  $\sigma$  ni znan (analiza z metodo, o kateri nimamo podatkov oziroma izkušenj; s je nepoznan).

Paralelne določitve morajo dati x, s, pri čemer ne nameravamo narediti 25-30 meritev. Območje zanesljivosti je zato večje.

območje zanesljivosti:

$$x \pm \frac{t\sigma}{\sqrt{N}}$$

$$I_z\mu = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$$

$$t = \frac{x - \mu}{s}$$

t faktor, ki zavisi od števila meritev, N in stopnje verjetnosti

Vrednosti za t

Stopnja zanesljivost (%)

N	80	90	95	99	99,9
2	3,08	6,31	12,7	63,7	63,7
3	1,89	2,92	4,30	9,92	31,6
4	1,64	2,35	3,18	5,84	12,9
6	1,48	2,02	2,57	4,03	6,86
11	1,37	1,81	2,02	3,17	4,59
15	1,34	1,76	1,91	2,98	4,14
$\infty$	1,29	1,64	1,76	2,58	3,29

Število meritev, ki so potrebne za določeno natančnost

$$\Delta c = \frac{ts}{\sqrt{N}}$$

$$N = \left( \frac{ts}{\Delta c} \right)^2$$

$\Delta c$  natančnost (pri določeni verjetnosti)

Upoštevanje rezultatov

Q test

Kvocien Q izračunamo iz razlike med vrednostjo, ki izpada ( $x_q$ ) in najbližjim rezultatom ( $x_n$ ) (števec) ter razliko najnižjega ( $x_n$ ) in najvišjega rezultata (imenovalec) ( $x_l$ ).

Dobljene vrednosti primerjamo z vrednostmi, ki so kritične za določeno stopnjo verjetnosti:

Q eksp. < Q kritični

$$Q_{\text{exp}} = \frac{d}{w} = \frac{|x_q - x_n|}{|x_l - x_n|}$$

Kritične vrednosti za Q

N	Q <sub>kritični</sub>
2	-
3	0,94
4	0,76
5	0,64
6	0,56
7	0,51
8	0,47
9	0,44
10	0,41

Pri majhnem N moramo biti previdni, smotrno je upoštevati mediano.

Testi za ugotovitev ujemanja med serijami (množicami) podatkov

Rezultati dveh serij se vedno ne ujemajo. Vzrok je lahko v resnični razliki, lahko pa je razlika le slučajna. Uporabimo lahko dva testa:

1. rezultate serij primerjamo glede na  $s$  ( $s_x, s_y$ ); vprašamo se, ali je natančnost obeh serij enaka (npr. vprašanje kvalitete analiz dveh analitikov, oziroma laboratorijev);
2. ugotavljamo, če je bistvena razlika med aritmetičnima sredinama obeh serij podatkov ( $\bar{x}_x, \bar{x}_y$ ). Npr. :dve analizi metodi primerjamo tako, da analiziramo isti vzorec; razlika med  $\bar{x}$  je lahko povzročena s sistematsko napako. S pomočjo statistike ugotovimo, če je diferenca resnična, ali pa je zaradi stresanj, ki so jih povzročile slučajne napake.

Test (2) lahko tudi uporabimo za ugotovitev identitete dveh vzorcev. Vzorca analiziramo z isto metodo in primerjamo  $\bar{x}$  obeh metod.

Primerjava poprečne vrednosti z resnično (sprejeto) vrednostjo:

$$\bar{x} - \mu = \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$$

Primerjava dveh eksperimentalnih vrednosti:

$$\bar{x}_1 - \bar{x}_2 = \pm t_{sp} \sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}}$$

Standardna napaka poprečne vrednosti

$$\sigma_m = \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$$

Varianca:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}$$

Relativni standardni odmik:

$$RSD = (s / \bar{x}) \cdot 1000 \text{ ppt}$$

Variacijski koeficient:

$$CV = (s / \bar{x}) \cdot 100\%$$

Standardni odmik pri aritmetičnih operacijah:

Seštevanje, odštevanje:



$$s_y = \sqrt{s_a^2 + s_b^2 + s_c^2}$$

Množenje, deljenje:

$$\frac{s_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{s_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{s_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{s_c}{c}\right)^2}$$

Občutljivost postopka (Sensitivity, Empfindlichkeit, sensitivite).

Instrumentalne metode so relativne. Množino komponente v vzorcu oziroma njeno koncentracijo določimo iz umeritvene krivulje, ki podaja odvisnost merjene količine  $y$  od koncentracije komponente  $c$ ,  $y=f(c)$ . Umeritvene krivulje so pogosto premice, predvsem v manjših koncentracijskih območjih; zanje velja enačba

$$y = a + bc$$

pri čemer je odsek na ordinati slepa vrednost postopka (meritve),  $b$  pa določa strmino premice. Občutljivost postopka je v takih primerih podana s strmino premica, torej  $b$ .

Meja zaznavnosti (Detection limit, Nachweisgrenze)

Meja zaznavnosti podaja najnižjo koncentracijo komponente v vzorcu, ki jo lahko z določeno natančnostjo določimo s postopkom. Meja zaznavnosti  $M_z$  je podana po Kaiserju z enačbo

$$M_z = 3 \sigma_{sl}$$

pri čemer je  $\sigma_{sl}$  standardni odmik za slepo vrednost. Najmanjši signal, ki ga lahko še merimo je

$$y = y_{sl} + M_z$$

Iz zveze  $y = f(c)$  lahko izračunamo koncentracijo, ki ustreza vrednosti signalov pri meji zaznavnosti in predstavlja najnižjo koncentracijo, ki jo lahko še določimo z analiznim postopkom ( $c_{sl} = M_z/b$ ). Meja zaznavnosti velja za celoten postopek, ki mora biti opisan v vseh podrobnostih in za strogo določen analizni problem.

Meja zaznavnosti so nasplošno prenizke, da bi jih lahko dosegli pri delu, zato uvajamo praktične meje določitve LQ (limit of quantitation). Praktična meja določitve je najmanjša množina nekega elementa (zvrsti, analita), ki jo lahko še določimo z relativno napako +/- 10%; tudi njo izračunamo za posamezen postopek in točno določene eksperimentalne pogoje.

## UMERJANJE V INSTRUMENTALNI KEMIJSKI ANALIZI

Za večino fizikalnih in fizikalno-kemičnih določitev je značilno, da moramo empirično ugotoviti zvezo med merjenim signalom in koncentracijo analita v vzorcu ( $y=f(c)$ ). Navadno jo določimo tako, da analiziramo po izbranem analiznem postopku vzorce oziroma raztopine, katerih sestavo točno poznamo ter iz dobljenih rezultatov pripravimo umeritveno krivuljo. Odvisnost lahko izrazimo tudi z matematičnim izrazom, pri čemer najpogosteje uporabimo metodo najmanjših kvadratov.

Navadno umerjamo s **standardnimi vzorci**, če takih nimamo si lahko pomagamo z neodvisno analiziranimi vzorci, s sintetično pripravljenimi vzorci ali pa uporabimo tehniko **standardnega dodatka**.

Umerjanje z analiziranimi vzorci oziroma raztopinami navadno poteka tako, da serijo vzorcev z različnimi koncentracijami določenega elementa raztopimo oziroma pripravimo za meritev po istem postopku, kot bomo kasneje delali z neznanimi vzorci.

**Standardni** (Referenčni) vzorci so točno analizirani vzorci, ki jih pripravljajo posebne ustanove posameznih držav in so komercialno dostopni. Vzorci so skrbno pripravljani in so zato homogeni in stabilni; posamezne komponente določijo v več laboratorijih z neodvisnimi metodami ali standardnimi postopki. Vrednosti za koncentracije posameznih komponent so navadno poprečne vrednosti vseh rezultatov in so v priloženem atestu. Na razpolago so številni metalurški, geološki vzorci ter silikati, organske substance in biološki referenčni standardni vzorci.

**Neodvisno analizirani vzorci** se razlikujejo od standardnih le v tem, da jih navadno pripravimo v manjši množini za lastno uporabo. Analiziramo jih z neodvisnimi analiznimi postopki, če je mogoče tudi v več laboratorijih.

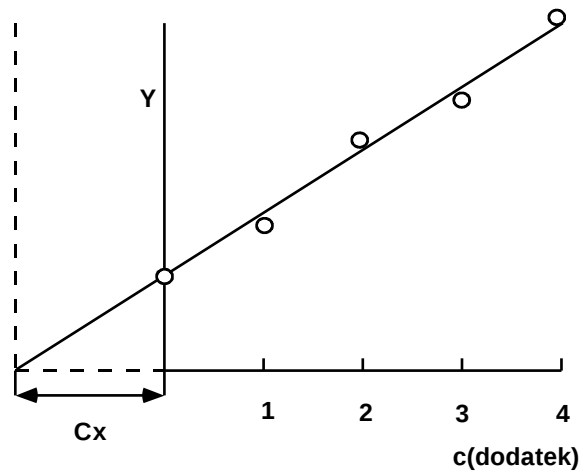
Sintetični standardni vzorci so navadno narejeni iz čistih kemikalij, pri čemer lahko upoštevamo celotno sestavo vzorcev, ki jih analiziramo (matrica ali določani elementi), ali pa le nekatere komponente. Najenostavnejši sintetični vzorci so vodne raztopine, v katere odmerimo le določene elemente. Pri delu s sintetičnimi standardnimi vzorci moramo upoštevati možnost sistematičnih napak, saj lahko vplivajo pri mnogih instrumentalnih metodah na izmejeni signal vse navzoče komponente.

### **Tehnika standardnega dodatka.**

Kot smo že omenili, lahko vplivajo na posamezni analizni rezultat tudi ostali elementi ali lastnosti matrice (osnove analiznega vzorca). Sistematičnim napakam se lahko izognemo z uporabo standardnih vzorcev, ki so po kemičnih in fizikalnih lastnostih zelo podobni analiziranim vzorcem. Če takih vzorcev nimamo, nam često koristi tehnika standardnega dodatka.

Pri tej tehniki dodamo vzorcu (raztopini), ki ga analiziramo, naraščajoče množine določane komponente. Neznani vzorec in vzorce z dodatki analiziramo po enakem

postopku. Iz umeritvene krivulje, ki jo izdelamo iz merjenih vrednosti lahko ugotovimo neznano koncentracijo tako, da dobljeno premico ekstrapoliramo na absciso (slika1). Metoda je predvsem uporabna za linearne zveze  $y = f(c)$ . Če smo to s predhodnimi poskusi ugotovili, lahko delamo kasneje le z enim ali dvema dodatkom.



Slika 1

# ELEKTROANALIZNE METODE

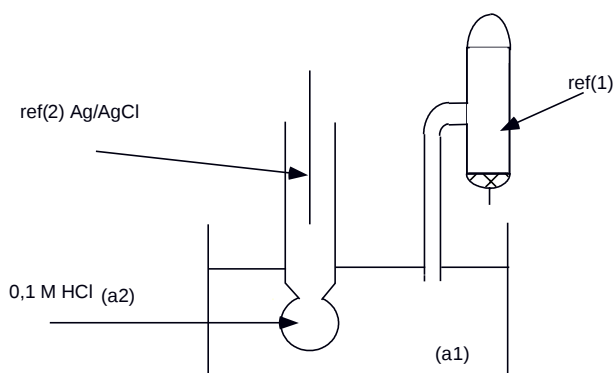
## POTENCIOMETRIJA, POTENCIOMETRIČNE TITRACIJE

Merjenje elektrodnih potencialov lahko uporabljamo v analizne namene tako, da direktno merimo potencial  $E$ , ki je funkcija koncentracije/aktivnosti določane zvrsti ali pa z merjenjem potenciala ugotavljamo ekvivalentno točko pri titracijah (Potential je funkcija volumna titrne raztopine). Direktno potenciometrične metode omogočajo hitro določevanje aktivnosti ionov v raztopinah, zato so primerne za ugotavljanje ravnotežij, za kontinuirna merjenja in za avtomatično vodenje procesov v obratih. Potenciometrične titracije lahko uporabljamo tudi pri obarvanih in motnih raztopinah, so manj subjektivne kot so indikatorski postopki, jih lahko avtomatiziramo.

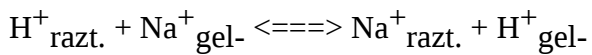
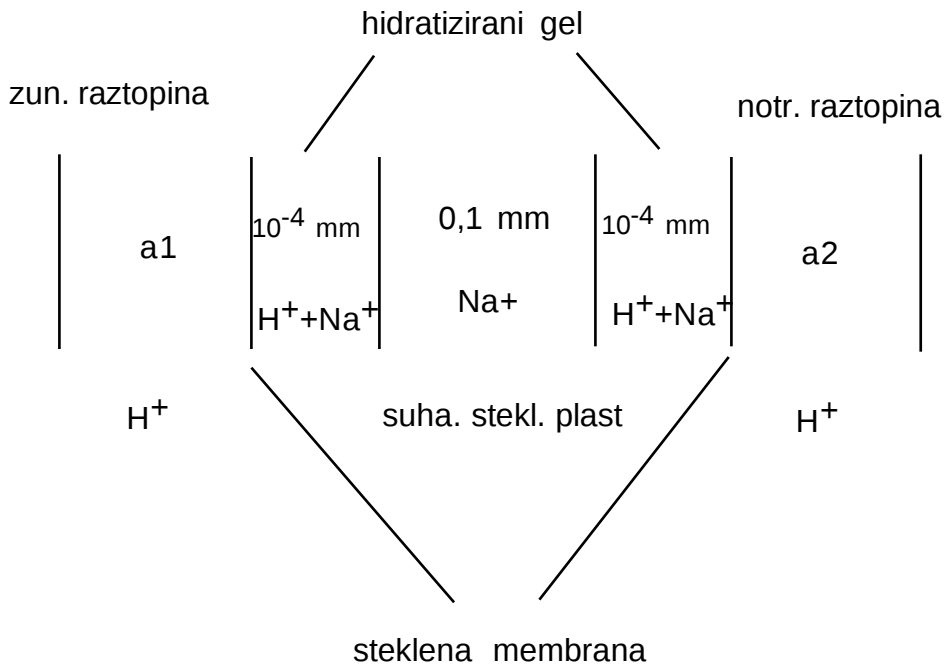
Pri potenciometričnih metodah merimo napetost galvanskega člana, ki ga tvorita indikatorska in referenčna elektroda v raztopini. Potrebujemo tudi napravo za merjenje potencialov. Indikatorske elektrode so kovinske in membranske.

## TEKOČINSKE MEMBRANSKE ELEKTRODE

### STEKLENE ELEKTRODE ZA MERJENJE PH



Shema steklene elektrode



$$a_2 = \text{konst}$$

$$E = K + 0.059 \log a_1 = K - 0.059 \text{ pH}$$

$$E = K' + \frac{RT}{F} \ln \left[ a_1 + k \left( \frac{\mu_B}{\mu_H} \right) \cdot b_1 \right]$$

$\mu_B$ ,  $\mu_H$  - gibljivosti  $B^+$  in  $H^+$  v gelu

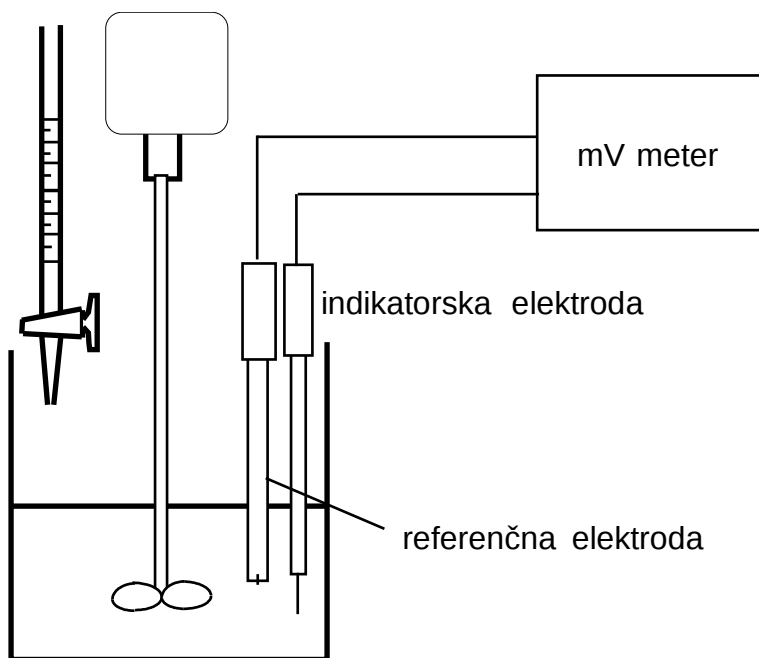
K določimo tako, da merimo potencial v raztopini, za katero poznamo  $a_1$ .

Za merjenje pH do 9 uporabljamo steklene membrane iz stekla z natrijem (22%  $\text{Na}_2\text{O}$ , 6%  $\text{CaO}$ , 72%  $\text{SiO}_2$ ), membrane namenjene za merjenje nad pH 9 vsebujejo litij.

Asimetrični potencial; E, ko je  $a_1 = a_2$

## Potenciometrične titracije

Pri potenciometričnih titracijah merimo med dodajanjem reagenta spremembo potenciala indikatorske elektrode. V začetku titracije so dodatki lahko veliki, v bližini ekvivalentne točke manjši in enaki, titriramo preko ekvivalentne točke. Za potenciometrične titracije potrebujemo instrument za merjenje napetosti (elektronski voltmeter, pH meter), indikatorsko in referenčno elektrodo (Slika 1.1.6).



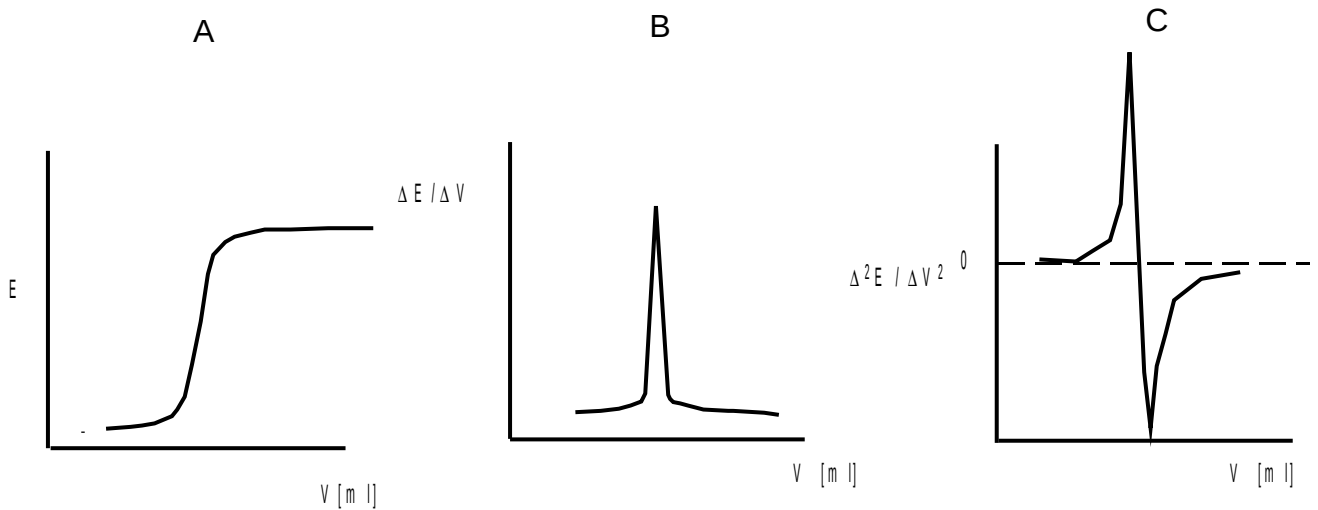
Shema aparature za potenciometrično titracijo

Končno točko titracije določimo grafično, računsko (prvi odvod, drugi odvod) ali z eksperimentalnimi tehnikami (tehnika z elektrodami z zapisom ali vnaprej določenim potencialom za konec titracije- avtomatski titratorji). Pri računskem načinu je končna točka titracije pri maksimalni vrednosti  $\Delta E/\Delta V$  ali kadar je  $\Delta^2 E/\Delta V^2 = 0$ . Porabljeni volumen  $V_x$  titrne raztopine bo zato:

$$V_x = V_1 + \Delta V \frac{\Delta^2 E_1}{\Delta^2 E_1 - \Delta^2 E_2}$$

kjer je  $V_1$  volumen titrne raztopine, ki ustreza zadnjemu pozitivnemu  $\Delta^2 E/\Delta V^2$ ,  $V$  konstantni dodatek reagenta in  $\Delta^2 E_1$ ,  $\Delta^2 E_2$  zadnji pozitivni in negativni  $\Delta^2 E/\Delta V^2$ . Slika kaže tipično titracijsko krivuljo.

Potenciometrično določanje končne točke uporabljamo predvsem pri oksidacijsko-redukcijskih, nevtralizacijskih in obarjalnih titracijah, deloma tudi v nevodnih raztopinah.



Titracijske krivulje

- A: Krivulja potenciometrične titracije
- B: Prvi odvod krivulje
- C: Drugi odvod krivulje

## ***1. Potenciometrična in klasična titracija mešanice alkalijskih zmesi karbonatov in hidrogenkarbonatov***

### **Princip:**

S potenciometrično titracijo in titracijo z uporabo indikatorjev ugotovimo vsebnost  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in  $\text{NaHCO}_3$  v zmesi.

### **Aparatura:**

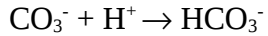
pH meter Iskra s kombinirano elektrodo.

### **Postopek:**

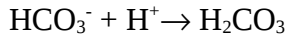
Trden vzorec najprej homogeniziramo, nato ga približno 0,5 g odtehtamo v 250 ml bučko, raztopimo in do oznake razredčimo z destilirano vodo. Alikvot 50 ml prenesemo v

elermajerico in titriramo z 0.1 M HCl potenciometrično. Titracijo dvakrat ponovimo. Na pH metru odčitavamo pH in iz spremembe pH grafično odčitamo ekvivalentno točko.

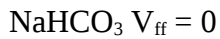
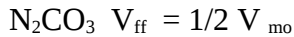
Najprej poteče nevtralizacija do hidrogen karbonata:



v naslednji stopnji pa poteče reakcija:



Postopek ponovimo še s klasično titracijo, tako da 50 ml alikvotu dodamo indikator fenolftalein in titriramo z 0.1 M HCl do spremembe barve indikatorja in odčitamo porabo HCl, nato dodamo indikator metiloranž in titriramo do spremembe barve indikatorja. Iz porabe HCl za titracijo pri obeh indikatorjih izračunamo množino karbonata in hidrogenkarbonata v vzorcu.



Rezultate podamo v % Na ali K karbonata in hidrogenkarbonata.

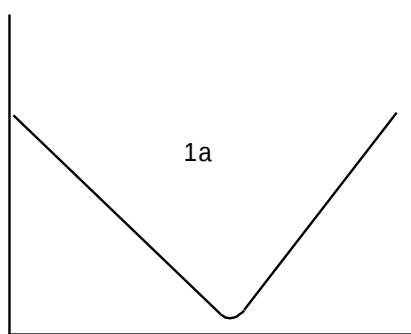


## AMPEROMETRIČNE TITRACIJE

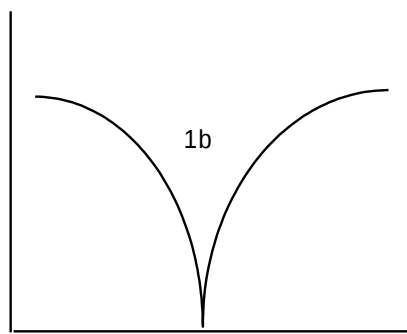
Amperometrične titracije so titracije, pri katerih merimo med dodajanjem reagenta jakost toka med dvema elektrodama. Na elektrodi pritisnemo konstantno napetost. Glede na to ali se lahko polarizirata ena ali obe elektrodi govorimo o amperometrični titraciji z eno polarizirano elektrodo ali amperometrični titraciji z dvema polariziranimi elektrodama. Amperometrična titracija z dvema polariziranimi elektrodama (dead-stop titracija, biamperometrična titracija)

Amperometrična titracija z dvema polariziranimi elektrodama temelji na ugotavljanju končne točke titracije s pomočjo merjenja toka, ki teče med dvema elektrodama, na kateri smo pritisnili ustrezno, navadno majhno napetost (15-200 mV). Tok, ki teče, ko je v raztopini oksidacijsko-redukcijski sistem, ki reagira na elektrodah reverzibilno in dovolj hitro. Jakost toka določa elektrodna komponenta, ki je v raztopini v nižji koncentraciji. Tok med elektrodama ne teče, ko ene od obeh elektroaktivnih komponent ni v raztopini. To je lahko v začetku titracije, vedno pa je v ekvivalentni točki, kar dosežemo z dodatkom titrirnega reagenta. Tipične titrationske krivulje, ki jih dobimo pri titraciji, so prikazane na sliki 1.3.14.

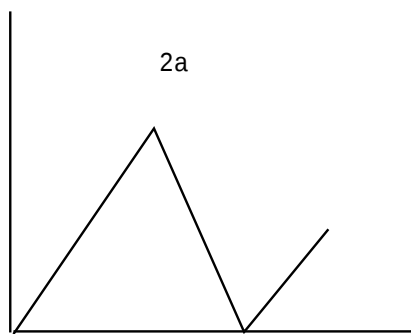
Za biamperometrično titracijo rabimo dve enaki mikroplatinski elektrodi, izvor napetosti in instrument za merjenje jakosti toka.



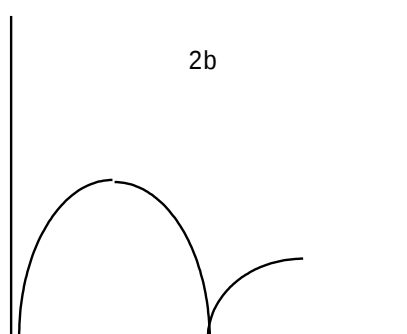
V  $K_2CrO_7$  (ml)



V  $K_2CrO_7$  (ml)



V  $K_2CrO_7$  (ml)



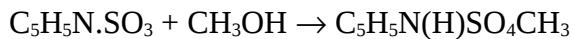
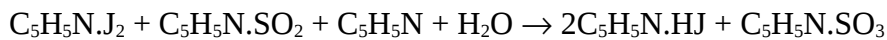
V  $K_2CrO_7$  (ml)

### **3. Določevanje vode s Karl Fischerjevim reagentom (KFR) v trdnih in tekočih vzorcih**

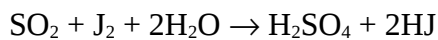
#### **Princip:**

Vodo določamo z amperometrično titracijo z dvema polariziranimi elektrodama.

Poteče naslednja reakcija:



enostavna reakcija:



#### **Aparatura:**

Instrument za amperometrično titracijo z dvema polariziranimi elektrodama.

#### **Postopek:**

##### Določitev titra reagenta po Karl-Fischer postopku

V titracijsko celico, kjer je metanol (kazalec titratorja je na ničli), vkapljamo 3-4 kapljice vode iz plastičnega kapalnika. Maso kapljic določimo z diferenčnim tehtanjem. Titriramo, dokler kazalec titratorja ponovno ne obstane na ničli. Titracijo trikrat ponovimo in izračunamo povprečen titer v mg (H<sub>2</sub>O)/ ml reagenta.

##### Določitev vsebnosti vode v trdnem vzorcu

V pripravljeno titracijsko celico stresemo približno 300 mg trdnega vzorca (šumeča tableta), ki ga zatehtamo na suhi tehtalni ladjici. Počakamo, da se raztopi (5-10 min) in titriramo. Če vzorca ne moremo kvantitativno pretresti, speremo ladjico z znanim volumnom topila - metanola, vendar moramo poznati vsebnost vode v njem. Postopek trikrat ponovimo in podamo povprečje določene vsebnosti vode v trdnem vzorcu v odstotkih.

Določitev vsebnosti vode v tekočem vzorcu

V titracijsko calico s pipeto odmerimo 5 ml tekočega vzorca, premešamo in titriramo. Postopek trikrat ponovimo in podamo povprečje določene vsebnosti vode v tekočem vzorcu. Rezultat podamo v mg vode na 1 ml vzorca.

**Račun:**

$$\text{titer KFR} = \frac{\text{masa H}_2\text{O}}{\text{poraba KFR}}$$

## IONOSELEKTIVNE ELEKTRODE

### Trdne elektrode

Najpomembnejšo skupino ionoselektivnih elektrod predstavljajo trdne elektrode, ki jih delimo na homogene (membrana je iz monokristala, npr. fluoridna elektroda, kjer je membrana iz monokristala  $\text{LaF}_3$ ) in heterogene (membrana je sestavljena iz nosilne neaktivne mase, npr. silikonska guma, v kateri je dispergirana ionsko selektivna membranska komponenta, npr.  $\text{AgJ}$  ali  $\text{AgCl}$ )

### Princip delovanja ionoselektivnih elektrod

Vsaka ionoselektivna elektroda sestoji iz naslednjih delov: membrane, notranje referenčne elektrode in notranje referenčne raztopine, ki je med referenčno elektrodo in membrano. Odvisnost potenciala ionoselektivne elektrode od koncentracije ionov v analizi raztopini lahko prikažemo na primeru fluoridne elektrode. Membrana je iz monokristala  $\text{LaF}_3$ , ki je zaradi večje prevodnosti dopiran z La ali drugimi elementi iz skupine redkih zemelj. Notranja referenčna raztopina je mešanica raztopin z določeno koncentracijo  $\text{Na}^+$ ,  $\text{F}^-$  in  $\text{Cl}^-$  ionov (npr. 0,1M  $\text{NaF}$  in 0,1M  $\text{NaCl}$ ). Notranja referenčna elektroda je srebrna elektroda, katere potencial določa koncentracija kloridnega iona v referenčni raztopini. Ko elektrodo pomočimo v raztopino z določeno koncentracijo (aktivnostjo) fluoridnih ionov, je potencial elektrode odvisen od koncentracije fluoridnih ionov v analizi raztopini. Potential fluoridne elektrode merimo proti zunanji referenčni elektrodi (SCE). Elektroda ima 1000 krat večjo občutljivost za  $\text{F}^-$  kot za ostale anione.

Celico ponazorimo na naslednji način:

$\text{Ag}/\text{AgCl}, \text{Cl}(0,1\text{M}), \text{F}^-(0,1\text{M})/\text{LaF}_3/\text{analizna raztopina}/\text{SCE}$

Napetost (EMS) členu definira Nernstova enačba

$$E = K + \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{a_{\text{F}^- \text{ razt.}}}{a_{\text{F}^- \text{ vzorec}}}$$

Ker je aktivnost  $\text{F}^-$  v notranji raztopini konstantna, lahko enačbo pišemo v obliki:

$$E = E' - \frac{RT}{F} \cdot \ln a_{\text{F}^- \text{ vzorec}}$$

Če v enačbi uporabimo namesto naravnega desetiški logaritem in če je temperatura  $25^\circ\text{C}$ , potem lahko gornjo enačbo preoblikujemo in je strmina elektrode enaka 0,059 V:

$$E = E' - 0,059 \cdot \log a_{\text{F}^- \text{ vzorec}}$$

Enačba kaže, da je merjena napetost členu odvisna od aktivnosti  $\text{F}^-$  v analizirani raztopini. Če poznamo  $E'$  in izmerimo  $E$ , lahko torej določimo aktivnost – koncentracijo  $\text{F}^-$  v

vzorcu. Ker vrednosti  $E'$  ne moremo točno izračunati, običajno uporabljamo za določevanje koncentracije (aktivnosti) umeritvene krivulje.

Potencial ionoselektivne elektrode pa pogosto ni odvisen samo od aktivnosti iona, ki ga določujemo, ampak vplivajo na njegovo vrednost tudi nekateri ostali ioni. Za vsako ionoselektivno elektrodo moramo zato poznati konstanto selektivnosti. Selektivnostna konstanta je merilo za spremembo elektrodnega potenciala ionoselektivne elektrode v prisotnosti interferenčnega iona v raztopini. Razen tega je potencial ionoselektivne elektrode odvisen še od ionske moči raztopine ter kemijskih reakcij v raztopini. Vse te vplive moramo pri praktičnem delu upoštevati.

### ***3. Določevanje fluoridnega iona v raztopini z ionoselektivno elektrodo in s spektrofotometrijo***

#### **Princip:**

V vzorcu določimo množino fluoridnega iona z merjenjem EMS s fluoridno ionoselektivno elektrodo in spektrofotometrično z merjenjem absorbance obarvanega kompleksa.

#### **Aparatura:**

Digitalni pH meter ORION 701 s fluoridno in referenčno elektrodo.

Spektrofotometer HP Diode array.

#### **Postopek:**

Za merjenje z s fluoridno elektrodo pripravimo za umeritveno krivuljo po 100 ml naslednjih raztopin:  $10^{-2}$  M,  $10^{-3}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M in  $10^{-6}$  M. Osnovna raztopina fluorida s konc.  $10^{-1}$  M je že pripravljena. Nato približno 30 ml vsake raztopine prelijemo v polietilensko čašo, postavimo na magnetno mešalo in po 5 minutah odčitamo potencial. pH raztopin mora biti med 5-7.

Vzorec pripravimo tako da 1ml ustne vode odpipetiramo v 100 ml bučko in dopolnimo do značke z deionizirano vodo. Preverimo pH raztopine s pH papirčkom in nato tako kot prej, izmerimo potencial, naredimo 5 ponovitev meritev za vzorec in izračunamo

povprečno vrednost in standardni odmik meritev. Na semilogaritemski papir narišemo odvisnost potenciala od log koncentracije in odčitamo koncentracijo vzorca iz umeritvene krivulje.

Za spektrofotometrično določitev fluorida pripravimo raztopine za umeritveno krivuljo tako, da v 6 25 ml bučk odpipetiramo naslednje volumne  $10^{-4}$  M raztopine fluorida: 0, 1.25, 2.50, 3.75, 5.00 in 6.25 ml. Nato dodamo ostale reagente po naslednjem vrstnem redu: 1,0 ml puferne raztopine s pH 3.5, 2.5 ml  $10^{-3}$  M  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ , 12.5 ml 50 % dimetilsulfoksida z merilnim valjem, 2.5 ml alizarin kompleksona in dopolnimo z destilirano vodo do značke. Po vsakem dodatku vsebino dobro premešamo. Vsi reagenti so že pripravljene. Analizno raztopino pripravimo tako da iz 100 ml bučke z vzorcem odpipetiramo petkrat po 2.5 ml vzorca v 5 25 ml bučk, dodamo reagente po zgoraj opisanem vrstnem redu, počakamo 10 minut, da se razvije barva in nato merimo absorbanco pri 625 nm. Narišemo graf absorbanca v odvisnosti od koncentracije in odčitamo koncentracijo vzorca iz umeritvene krivulje.

Med seboj primerjajte oba rezultata in ugotovite pravilnost postopka glede na vsebnost fluorida, ki je navedena na steklenici!

## SPEKTROSKOPSE ANALIZNE METODE

Spektroskopske analize metode temeljijo na merjenju elektromagnetnega valovanja, ki ga emitirajo ali absorbirajo posamezne komponente v vzorcu. Glede na pojav, ki ga opazujemo, lahko spektroskopske metode razdelimo v emisijske, absorpcijske in fluorescenčne, glede na naravo snovi pa na metode atomske in molekulske spektroskopije.

### MOLEKULARNA ABSORPCIJSKA SPEKTROMETRIJA

Molekularna absorpcijska spektrometrija (kolorimetrija, fotometrija, spektrofotometrija) temelji na merjenju absorpcije svetlobe, ki prehaja skozi preiskovano raztopino. Absorpcijo merimo v ultravijoličnem, vidnem in infrardečem spektralnem območju, navadno pri absorpcijskem maksimumu, ali pa posnamemo spekter -  $A = f(\lambda)$  v širšem spektralnem območju in sklepamo iz njegove oblike na kvantitativno in kvalitativno sestavo preiskovane raztopine (ali trdnega vzorca). Spektrofotometrijo v vidnem območju uporabljamo predvsem za kvantitativno določevanje posameznih elementov (ionov), ki jih prevedemo v obarvano obliko s primerno kemično reakcijo. Spektrofotometrija v ultravijoličnem in infrardečem spektralnem območju je pomembna za analizo organskih spojin.

Za absorpcijo svetlobe velja Beerov zakon

$$\log \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} = A = k \cdot b \cdot c$$

kjer je  $I_0$  jakost svetlobe vpadnega žarka,  $I$  jakost svetlobe po prehodu skozi snov,  $A$  je absorbanca (ekstinkcija),  $k$  molarni absorpcijski (ekstinkcijski) koeficient,  $b$  dolžina svetlobne poti skozi snov in  $c$  koncentracija določane zvrsti. Molarni absorpcijski koeficient je značilen za zvrst, ki absorbira svetlobo in se spreminja z valovno dolžino.

Žarek monokromatske svetlobe prehaja skozi raztopino, v kateri je  $N$  atomov oziroma molekul, ki absorbirajo svetlobo. V kratki razdalji od vstopa žarka se jakost vpadne svetlobe  $I$  zaradi absorpcije atomov in molekul zmanjša za  $\Delta I$ . V večji razdalji je ta iznos še večji, ker narašča število delcev, ki svetlobo absorbirajo.  $I$  ni odvisen samo od števila delcev  $\Delta N$ , ampak tudi od jakosti vpadne svetlobe  $I$ , medtem ko je  $\Delta I/I$  konstanta pri danem številu  $N$ . Velja zveza:

$$\Delta I = -k \cdot I \cdot \Delta N$$

Pri neskončno majhnih spremembah lahko pišemo

$$dI/I = k dN$$

Če vzamemo, da je  $I_0$  jakost svetlobe vpadnega žarka, tedaj je  $I=I_0$ , ko je  $N=0$ . Po integraciji dobimo

$$\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = -k \cdot \int_0^N dN \qquad \ln \frac{I}{I_0} = -k \cdot N$$

Število molekul  $N$ , ki absorbirajo svetlobo, je proporcionalno molarni koncentraciji  $c$  v danem volumnu in zanj velja

$$N = c \cdot 6 \cdot 10^{23} \cdot b \cdot s / 100$$

b... dolžina poti žarka (cm)

s... prerez ( $\text{cm}^2$ )

iz česar sledi

$$\log \frac{I_0}{I} = -\frac{k}{2,303} \cdot 6 \cdot 10^{23} \cdot s \cdot b \cdot \frac{c}{100} \qquad \log \frac{I_0}{I} = k \cdot b \cdot c = A$$

V eksperimentalnih okoliščinah velja približek Beerovega zakona

$$A = \log \frac{I_{\text{topila}}}{I_{\text{raztopine}}} = \log \frac{I_0}{I}$$

kjer je  $I_0$  jakost svetlobe pri prehodu skozi čisto topilo.

### Kvantitativna analiza

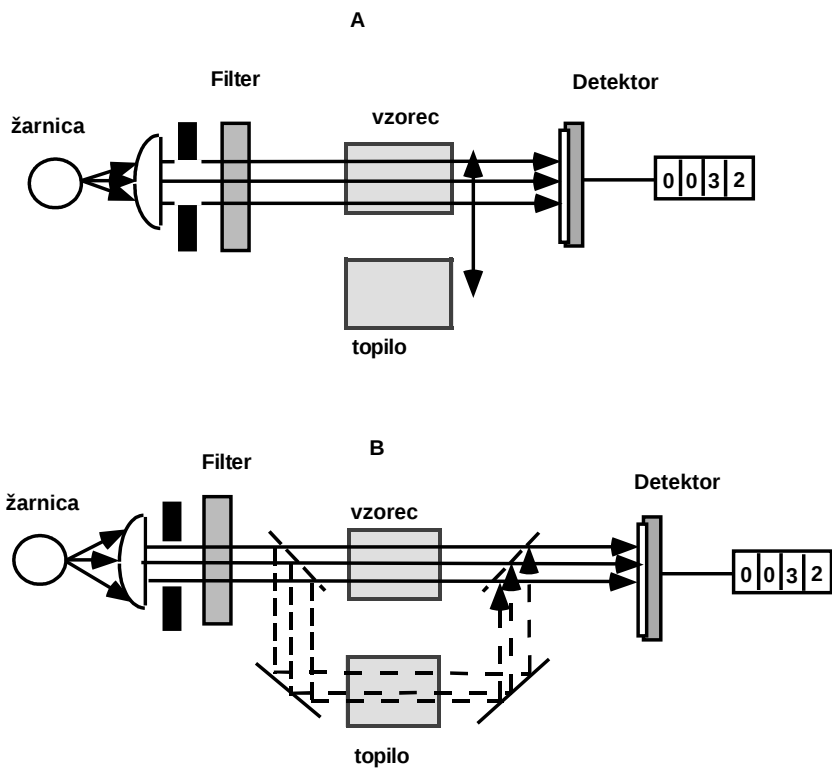
Koncentracijo določenih spojin v spektrofotometriji določamo relativno. Koncentracijo snovi v raztopini neznanega vzorca določimo posredno iz umeritvene krivulje, Umeritveno krivuljo pripravimo s pomočjo serije standardnih raztopin znanih koncentracij.

Če snov močno absorbira v UV ali vidnem območju, jo lahko s spektrofotometrijo kvantitativno določimo (aromatske spojine,  $\text{MnO}_4^-$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ). V drugih primerih dodamo reagent, ki tvori z določano snovjo obarvano spojino. Velike organske molekule često služijo kor kolorimetrični reagenti v anorganski analizi. Za določitev je bistveno, da je absorbanca stabilna, dokler ne izvršimo meritve. Absorbanca se tudi ne sme spreminjati pri manjših spremembah pH, temperature, množine dodanega reagenta itd.

Glavni problem v molekularni absorpcijski spektrometriji so motnje zaradi drugih komponent v vzorcu. Te namreč lahko tudi absorbirajo svetlobo pri izbrani valovni dolžini ali pa tvorijo z reagentom take spojine. Preden merimo absorbanco, moramo zato često odstraniti substance, ki motijo določitev (ekstrakcije, ionski izmenjevalci, elektroliza...)



Načelna shema fotometra:  
A: enožarkovni instrument  
B: dvožarkovni instrument



## ***4. Spektrofotometrično določanje anorganskega fosforja v krvni plazmi oz. serumu***

### **b) Princip:**

Anorganski fosfor v filtratu po odstranitvi proteinov reagira z amonijevm molibdatom [Mo(VI)] tako da nastane amonijev fosfomolibdat. Tega reduciramo s šibkim reducentom do molibden modrega. Absorbanco nastale modro obarvane raztopine merimo pri 690 nm.

### **Reagenti:**

5% trikloroacetna kislina  
vanadij molibdenova kislina  
aminonaftol sulfonska kislina  
standard fosforja 50 µg/ml

### **Postopek:**

V centrifugirko damo k 0.5 ml plazme 9.5 ml 5% trikloroacetne kisline, premešamo in centrifugiramo 5 minut pri 1500 obratih /min. 5 ml supernatanta prenesemo v čisto centrifugirko, dodamo 1 ml vanadij molibdenove kisline in 0.4 ml aminonaftol sulfonske kisline. Premešamo in pustimo stati 10 minut. Po 10 minutah merimo absorbanco.

Priprava umeritvene krivulje:

V tri 10 ml bučke odpipetiramo 0.5, 1.0 in 1.5 ml standarda P (50µg/ml), nato dodamo 5 ml trikloroacetne kisline, 1 ml vanadij molibdenove kisline in 0.4 ml aminonaftol sulfonske kisline. Počakamo 10 minut da se razvije barva in nato merimo absorbanco. Narišite umeritveno krivuljo in iz nje odčitajte koncentracijo P, upoštevajte redčitev vzorca!

Normalna koncentracija P v serumu je pri odraslih od 3.0 – 4.5 mg/dl in pri otrocih 4.5 – 6.5 mg/dl.

## FLUORESCENČNA MOLEKULARNA SPEKTROSKOPIJA

Pri vzbujanju molekul s svetlobo, ki jo absorbirajo pri določeni valovni dolžini, te preidejo v vzbujeno stanje. Molekule večine spojin izgubijo absorbirano energijo v obliki sproščene toplote pri trkih z drugimi molekulami. Nekatere spojine pa pri vračanju v osnovno stanje del energije oddajo v obliki svetlobe pri drugi valovni dolžini, ki je daljša kot pri absorpciji.

Lastnosti fluorescence kažejo le nekatere molekule. Pojav fluorescence je kratkoživ od  $10^{-8}$  –  $10^{-4}$ s. Najboljše fluorescenčne lastnosti imajo kondenzirani aromatski obroči. V manjši meri fluorescirajo tudi molekule s konjugiranimi dvojnimi vezmi. Toga struktura preprečuje vibracijski način relaksacije.

Za raztopine z nizko koncentracijo analita velja, da je intenziteta fluorescence linearno sorazmerna koncentraciji analita in intenziteti vzbujevalne svetlobe. Če so vsi eksperimentalni parametri konstantni velja zveza:

$$F = k \cdot c$$

$F$  = intenziteta fluorescence

$k$  = konstanta

$c$  = koncentracija

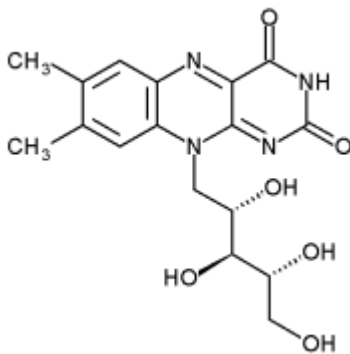
Pri višjih koncentracijah zveza ni več linearna, saj molekule analita znatno absorbirajo emitirano svetlobo (samoabsorpcija).

Aparatura za molekulska fluorescenčna spektroskopija je sestavljena iz izvora svetlobe, monokromatorja za izbiro valovne dolžine vzbujevalne svetlobe, kivete, monokromatorja za izbiro valovne dolžine emitirane svetlobe in detektorja. Intenziteto emitirane svetlobe merimo pod kotom  $90^\circ$  glede na vpadni žarek.

## 10. Določanje riboflavina – vitamina B2 v vitaminskih molekulsko fluorescenčno spektrometrijo

Riboflavin – vitamin B2 v telesu proizvaja črevesna flora in se lahko absorbira, ker se ga malo uskladišči je potreba po tem vitaminu konstantna. Telo ga potrebuje za metabolizem aminokislin, maščobnih kislin in ogljikovih hidratov. Riboflavin je potreben tudi za aktivacijo vitamina B6 (piridoksina), za nastanek rdečih krvnih teles, celično dihanje in rast.

### Kemična struktura riboflavina



### Eksperimentalni del

Če riboflavin vzbujamo s svetlobo primerne valovne dolžine, ta močno fluorescira.

#### Aparatura:

Fluorescenčni spektrofotometer Cary Eclipse

Valovna dolžina vzbujanja 430 nm, valovna dolžina emisije 480 nm.

#### Postopek:

Standardne raztopine za umeritveno krivuljo pripravimo iz raztopine riboflavina s koncentracijo 10 µg/ml v 5% očetni kislini.

V pet 50 ml bučk pripravite standardne raztopine s koncentracijo 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 in 1,0 µg/ml v 5% očetni kislini.

Vzorec pripravite tako da vitaminsko tableto najprej stehtate nato pa jo v čaši raztopite v 5% očetni kislini, prefiltrirate skozi filtrirni papir beli trak v 100 ml bučko in z očetno kislino razredčite do oznake. Glede na navedene vrednosti za riboflavin na embalaži, je potrebno tako pripravljen vzorec ustrezno razredčiti. Za vse redčitve uporabljajte 5% očetno kislino. Tako pripravljenim raztopinam izmerite fluorescenco. Za slepo probo uporabite 5% očetno kislino.

Narišite graf za umeritveno krivuljo in iz krivulje odčitajte koncentracijo riboflavina. Izračunajte maso riboflavina na tableto!

## PLAMENSKA EMISIJSKA SPEKTROMETRIJA

Metode emisijske spektroskopske analize temeljijo na lastnosti atomov, da pri določenih pogojih prehajajo elektroni zunanjih orbital v energetsko višje nivoje. Ta vzbujena stanja so za atome neugodna in so zato kratkotrajna ( $10^{-8}$  sek.) Pri spontanih prehodih v nižja (osnovna) energetska stanja se sprošča energija v obliki elektro-magnetnega valovanja. Valovna dolžina sevanja svetlobe je odvisna od razlike energij osnovnega in vzbujenega stanja

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

$h$  ... Planckova konstanta

$c$  ... hitrost elektromagnetnega valovanja

$\nu$  ... frekvenca elektromagnetnega valovanja

$\lambda$  ... valovna dolžina

Atomi imajo lahko več vzbujenih stanj, ki so odvisna predvsem od dovedene energije pri vzbujanju. Možne prehode med posameznimi stanji določajo pravila kvantne mehanike.

Vsak element ima značilna energetska stanja oziroma karakteristične elektronske prehode, zato je tudi spekter emitirane svetlobe za vsak element specifičen in ga lahko uporabljamo za identifikacijo elementov v vzorcu (kvalitativna analiza).

Intenziteta sevanja svetlobe zavisi od števila vzbujenih atomov in je v neposredni zvezi z množino elementa v vzorcu in pogojev pri vzbujanju. Za čim večjo občutljivost emisijske spektroskopije mora biti razmerje med številom atomov v vzbujenem stanju in številom atomov v osnovnem stanju čim večje.

$$\frac{N^*}{N^0} = \frac{g^*}{g^0} \cdot e^{\frac{-E_n}{kT}}$$

$N^*$  ..... število atomov v vzbujenem stanju

$N^0$  ..... število atomov v osnovnem stanju

$E_n$  ..... energija vzbujenega stanja

$k$  ..... Boltzmanova konstanta

$T$  ..... temperatura izvora

$g^*$ ,  $g^0$  .... statistični uteži osnovnega in vzbujenega stanja

Vidimo, da je število vzbujenih atomov odvisno od temperature, zato moramo pri emisijskih spektroskopskih metodah uporabljati izvore z visoko temperaturo. Uporabljamo lahko istosmerni in izmenični lok, visokonapetostno iskro in plazemske izvore.

Izvor ima dvojno nalogo: v prvi stopnji mora pretvoriti komponente vzorca v atomarno obliko (atomizacija), v drugi stopnji pa vzbuditi elektrone v atomih (ekscitacija). Obe stopnji vključujeta številne mehanizme, ki so odvisni predvsem od vrste izvora in narave vzorca.

## Plamenska emisijska spektroskopska analiza

Pri plamenski emisijski spektroskopiji (plamenska fotometrija) uporabljamo za atomizacijo komponent vzorca in njihovo vzbujanje toplotno energijo plamena. Vzorec je v obliki raztopine. S pomočjo razpršilca, ki je običajno sestavni del gorilca, vzorec razpršujemo v aerosol, ki ga nato uvajamo v plamen, kjer se upari, atomizira in vzbuja. Uporabljamo različne plinske mešanice. Zaradi relativno nizkih temperatur lahko s plamensko emisijsko spektrometrijo določamo le elemente z majhnimi energijami vzbujanja (alkalije in zemeljske alkalije). Emisijski spekter je preprost, zato zahteve o ločljivosti monokromatorja niso velike. Često zadoščajo že filtri.

V tabeli so prikazani potenciali vzbujanja in analizne linije (valovne dolžine emisijskih črt) za nekatere elemente, ki jih določujemo s plamensko emisijsko spektrometrijo.

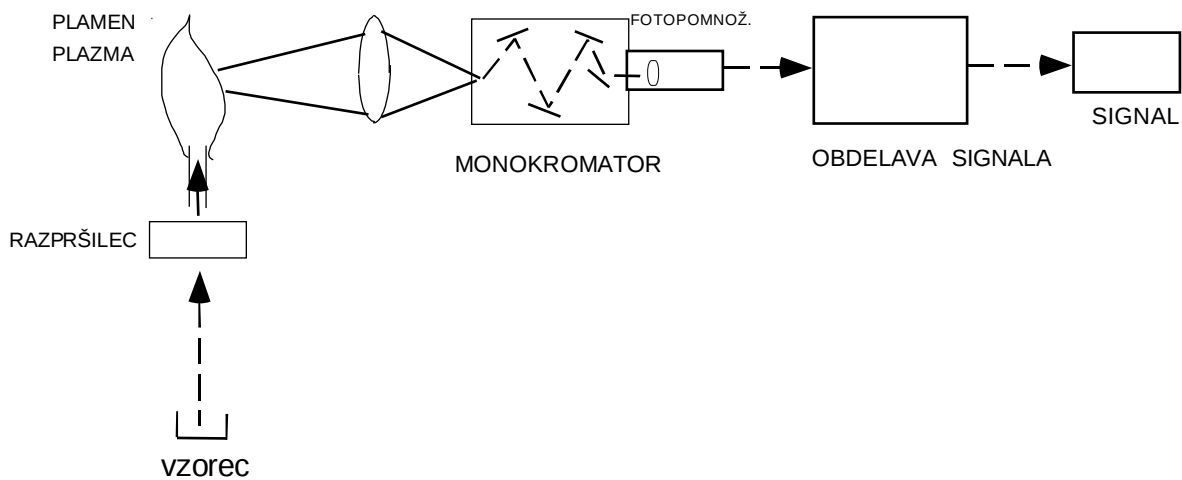
Tabela

Element	Energija vzbujanja (eV)	analizna črta (nm)
Li	1,9	670,8
Na	2,1	589,6
K	1,6	769,9
Cs	1,4	849,4
Ca	2,9	422,7
Mg	4,3	285,2
Sr	2,7	460,7
Ba	2,2	553,6

Na jakost emitirane svetlobe vpliva tudi ionizacija atomov in rekombinacija prostih atomov v molekule, saj zmanjšujeta število prostih in vzbujenih atomov v plamenu. Pri praktičnem delu moramo izbrati take pogoje, da sta atomizacija in vzbujanje čim večja, da pa pri tem ne prevlada ionizacija oziroma rekombinacija prostih atomov. To dosežemo z ustrezno temperaturo in sestavo plamena. Alkalije določamo z bolj hladnimi plameni, zemeljske alkalije pa z bolj vročimi plameni.

## Aparatura

Aparatura za plamensko emisijsko spektrometrijo sestoji iz gorilnika z razprševalcem, monokromatorja in detektorja z ustrezno eklektroniko. Načelno shemo kaže spodnja slika



Shema emisijskega spektrometra

Gorilnik daje laminarni ali turbulentni plamen z določeno temperaturo in kemično sestavo (butan-zrak,  $T=1930^{\circ}\text{C}$ ; acetilen-zrak,  $T=2120^{\circ}\text{C}$ ). Z monokromatorjem, katerega sestavljanje disperzijski element (prizma, mrežica) in ustrezna optika (leče, zrcala), ločimo spektralno črto določenega elementa ali posnamemo spekter v valovnem območju 200-800 nm. Detektorji so navadno fotocelice in foto pomnoževalke, fototok pa ojačujemo z ojačevalniki in zapisujemo na rekorderju. Enostavnejši plamenski fotometri ločijo spektralno črto s filtrom ter merijo jakost svetlobe s fotoelementom in občutljivim galvanometrom.

### Kvantitativna analiza

Iz teoretskih osnov je razvidno, da vseh spremenljivk, ki vplivajo na meritev, ne moremo poznati toliko, da bi lahko neposredno iz merjenih količin izračunali koncentracijo določenega elementa z zadovoljivo pravilnostjo. Zato v praksi delamo z umeritvenimi krivuljami, ki jih izdelamo z modelnimi raztopinami, katerih sestava mora biti čim bolj podobna vzorcu. Često uporabljamo tudi tehniko standardnega dodatka. Z metodo največ določamo alkalijske in tudi zemljoalkalijske kovine. V literaturi so postopki za njihovo določevanje v raznovrstnih materialih, predvsem v bioloških vzorcih, zemljah, rastlinah in vodah.

## **6. Določitev natrija in kalija v plazmi s plamensko emisijsko spektrometrijo**

### **Princip:**

Raztopino vzorca razpršujemo v plamen acetilen-zrak, emisijo svetlobe merimo pri valovni dolžini 589 nm za Na in 770 nm za K.

### **Aparatura:**

Plamenski spektrometer VARIAN AA 240, plinska mešanica acetilen-zrak.

### **Postopek:**

Mokri razkroj krvne plazme

0.5 ml krvne plazme prenesemo v stekleno posodico za razkroj in dodamo 0.3 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konc. in 1.5 ml HNO<sub>3</sub> konc. in previdno segrevamo na gorilniku do rahlih belih par. Nato dodajamo ob steni posode toliko časa 30 % raztopino H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da postane raztopina brezbarvna. Raztopino izparimo do suhega, ostanek raztopimo v 1 ml HCl konc., prelijemo v 100 ml bučko, dopolnimo z destilirano vodo do značke in razpršujemo raztopino v plamen.

### **Priprava umeritvene krivulje:**

Uporabimo standardno raztopino za Na in K (1mg/ml). V 100 ml bučkah si pripravimo raztopine z naraščajočo koncentracijo (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 µg/ml Na in 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 µg/ml K) ter razredčimo z destilirano vodo do oznake. Del raztopine prelijemo v posodico in merimo jakost emitirane svetlobe.

Načrtamo diagram tako da vnesemo vrednosti emisij, ki jih izmerimo, proti ustreznim koncentracijam natrija oz. kalija. Iz umeritvene krivulje odčitamo množino Na in K. Rezultat podamo v µg/ml plazme.



## ATOMSKA ABSORPCIJSKA SPEKTROMETRIJA

Značilnosti:

Spektralno območje: 190-860 nm

Izvor svetlobe: žarnica z votlo katodo, spektralne žarnice visokofrekvenčne brezelektrodne žarnice

Generator atomov: plamen, grafitna cevna pečica

Disperzijski element: uklonska mrežica

Detektor: fotopomnoževalka

Vzorci: raztopine (redko trdni vzorci, suspenzije)

Koncentracijsko območje 0,05-200 $\mu$ g/ml

Absolutna meja zaznavnosti:  $10^{-13}$ g

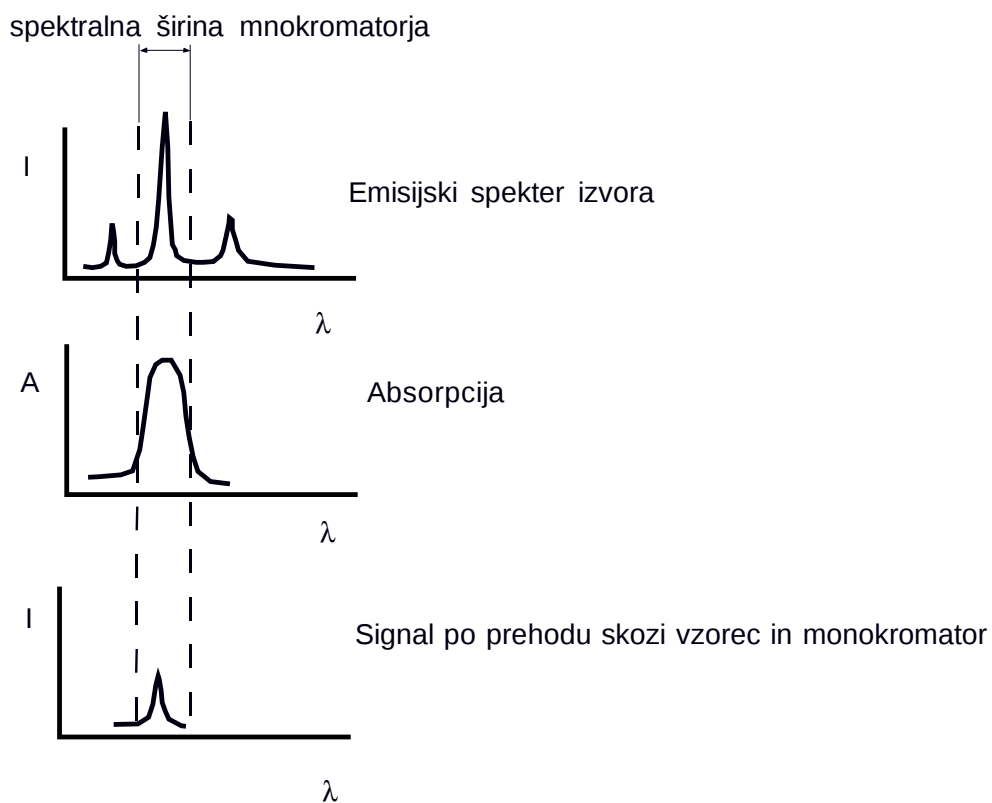
Natančnost metode: (relativni standardni odmik)  $v = 0,5-2\%$

Atomska absorpcijska spektrometrija je analizna metoda, ki je osnovana na pojavu, da prosti nevzbujeni atomi absorbirajo svetlobo karakterističnih valovnih dolžin. Iz deleža absorbirane svetlobe sklepamo na množino elementa v raztopini (kvantitativna analiza), valovna dolžina absorbirane svetlobe pa določa element (kvalitativna analiza).

### **Princip metode:**

Princip metode je nazorno prikazan na sliki 1. Svetloba iz svetila prehaja skozi plamen, v katerega razpršujemo preiskovano raztopino. Atomi elementa, ki ga določujemo, absorbirajo del svetlobe zanj karakteristične valovne dolžine, intenziteta te spektralne črte je po prehodu skozi plamen zmanjšana. Monokromator prepušča le svetlobo določenega območja, zato pada na detektor le svetloba karakteristične spektralne črte.

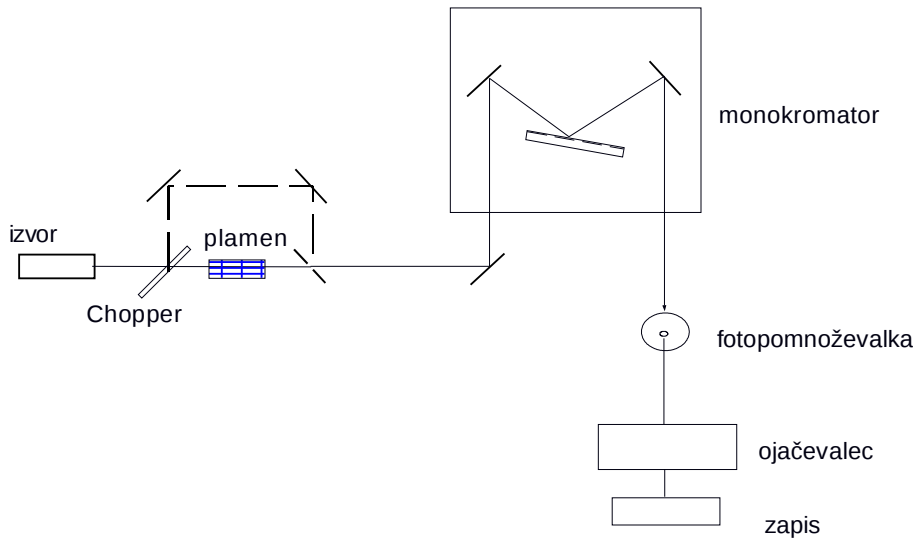
Slika1: Princip AAS



**Aparatura:**

Aparatura za atomsko absorpcijsko spektrometrijo sestoji iz izvora svetlobe, generatorja atomov, monokromatorja in detektorja z ustrezno elektroniko. Načelno shemo kaže slika 2. Sistemi so nemedulirani, modulirani dvožarkovni in večkanalni.

## 2. Shema dvožarkovne aparature za AAS



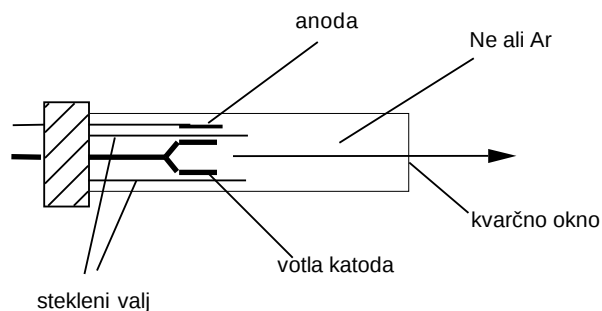
Izvor svetlobe:

Kot izvor svetlobe navadno uporabljamo žarnice z votlo katodo (angl. "hollow cathode lamp") (slika 3), za nekatere elemente (Na, K, Rb, Cs) navadne spektralne žarnice, v zadnjih letih pa tudi visokofrekvenčne žarnice brez elektrod.

Generator atomov:

Za produkcijo prostih atomov navadno uporabljamo plamen. Plameni, ki jih največ uporabljamo v atomski absorpcijski spektrometriji so v tabeli 1. Največ uporabljamo mešanice acetylen-zrak in acetylen-didušikov (I) oksid. Slednji ima relativno visoko temperaturo in je zato primeren za spojine, ki tvorijo termično stabilne okside in druge spojine. (Slika 4).

Slika 3. Shema žarnice z votlo katodo



Slika 4.  
Shema razpršilca in gorilnika za AAS

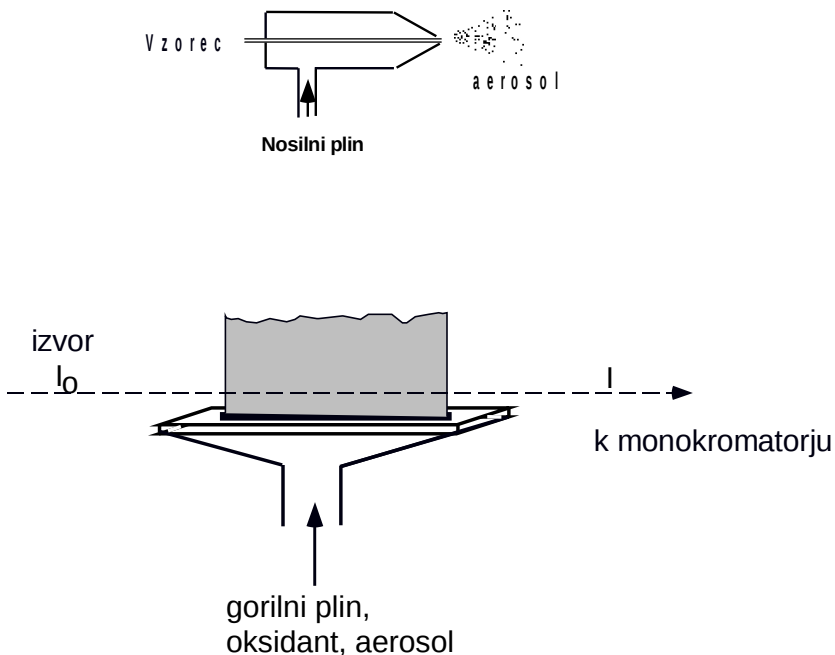


Tabela: Lastnosti nekaterih plinskih mešanic

Mešanica	Hitrost gorenja (cm/s)	Temperatura(°C)
butan-zrak	82,1	1935
vodik-zrak	440	2045
vodik-kisik	3680	2660
acetylen-zrak	160	2125
acetylen-kisik	2480	3100
acetylen-N <sub>2</sub> O	180	2955

Fizikalne osnove metode:

Absorpcija svetlobe zavisi od absorpcijskega koeficienta in dolžine poti skozi plamen ali grafitno cevno peč.

Iz kvantne mehanike oziroma klasične teorije lahko izvedemo za absorpcijski koeficient enačbi:

$$k = h \frac{\nu}{c} B_{i,k} = \frac{\pi \cdot e^2}{m \cdot c} \cdot f_{i,k}$$

$k$  je integralni koeficient za celotno širino spektralne črte,  $B_{i,k}$  je Einsteinova verjetnost prehoda in  $f_{i,k}$  moč oscilatorja za določeno spektralno črto,  $h$  Planckova konstanta,  $\nu$  frekvenca spektralne črte,  $c$  hitrost svetlobe in  $m$  masa elektrona.

Zaradi lažjih eksperimentalnih pogojev merimo absorpcijo v maksimumu spektralne črte

$$k_0 = \frac{K}{\Delta\nu} f \cdot N,$$

pri čemer je  $k_0$  absorpcijski koeficient v maksimumu spektralne črte,  $\Delta\nu$  je širina spektralne črte,  $K$  konstanta,  $f$  moč oscilatorja in  $N$  število prostih, nevzbujenih atomov v enoti prostornine.

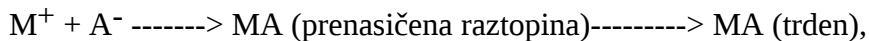
Absorpcija svetlobe zavisi pri konstantni dolžini poti in koncentraciji atomov od moči oscilatorja izbrane absorpcijske črte  $f$  in od širine spektralne črte, ki jo emitira svetilo. S fizikalnih vidikov vpliva temperatura v manjši meri ( $\sqrt{T}$ ) na absorpcijo, torej le toliko, kolikor od nje zavisi širina spektralne linije.

## Reakcije v plamenu

Razen absorpcijskega koeficienta  $k_0$  in dolžine poti svetlobe  $b$  je v enačbi za absorpcijo tudi koncentracija oziroma število prostih nevzbujenih atomov, ki je v neposredni zvezi s koncentracijo elementa v raztopini. Vsaka sprememba razmerja med številom prostih atomov v plamenu in koncentracijo elementa v raztopini spremeni občutljivost določitve, zato posvečamo največjo pozornost pojavom, ki lahko zmanjšajo množino prostih atomov v plamenu.

Osnovni **procesi in reakcije** v plamenu so naslednji :

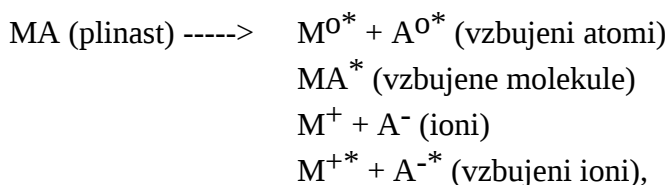
- *tvorba aerosola*; izparevanje topila v plamenu



- *taljenje in izparevanje* (ali sublimacija)

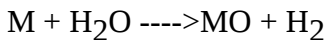
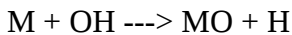
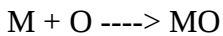


- *disociacija, vzbujanje, ionizacija*  $M^0 + A^0$  (nevtralni atomi)

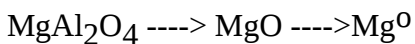


- sekundarne reakcije v plamenu med atomi, radikali in molekulami.

Proste atome pridobivamo neposredno z disociacijo soli ali pa preko vmesnih spojin, ki nastanejo v plamenu. Nastali atomi lahko reagirajo s plini plamena in njihovimi produkti gorenja. Pri teh sekundarnih reakcijah med atomi, radikali in molekulami lahko nastanejo plinaste spojine (npr. oksidi, hidroksidi, hidridi)



ali pa trdne spojine (oksidi  $M_yO_z$ ) in karbonati). V kompleksnih sistemih lahko nastanejo težkohlapne molekule, npr. halogenidi ( $AlF_3$ ), soli oksikislin ( $CaSO_4$ ,  $Ca_3(PO_4)_2$ ) ali kompleksni oksidi ( $MgAl_2O_4$ ,  $CaTiO_3$ ) zaradi drugih kationov in anionov, ki so v raztopini. Te spojine zaradi višjih tališč težko uparijo in ponovno disociirajo v atome ter zato znižajo koncentracijo prostih atomov v plamenu.



Smer reakcije, ki prevlada, zavisi od večjega števila faktorjev, predvsem pa od pogojev v plamenu in kemične sestave vzorca.

V AAS moramo zato skrbno izbrati plamen ( $H_2$ /zrak,  $C_2H_2$ /zrak,  $C_2H_2/N_2O$ ), sestavo plamena (razmerje gorilnega plina in oksidanta) in višino, pri kateri merimo absorpcijo svetlobe, saj so za posamezne elemente najugodnejši pogoji različni.

### Občutljivost in meja zaznavnosti

Medtem ko zavisi občutljivosti za posamezne elemente predvsem od osnovnih zakonitosti, ki veljajo za metodo, odločajo o meji zaznavnosti v veliki meri tudi karakteristike uporabljene aparature (stabilnost, šum itd.).

Relativno občutljivost v AAS definiramo kot koncentracijo v mg elementa/ml, ki daje signal 1% absorpcije. Navadno je to tudi koncentracija, ki jo lahko še določujemo z dovolj veliko natančnostjo.

Relativna meja zaznavnosti je podana s koncentracijo v mg elementa/ml, ki daje trojni signal stresanj ozadja (šuma). Parametri aparature, kot so jakost toka svetila, pretok

plinov, lega gorilca in dušenje, morajo biti pri določevanju meje zaznavnosti naravnani optimalno.

## **Interference**

Motnje v atomski spektrometriji so lahko *spektralne, fizikalne in kemične*. Medtem ko so prve redkejšje in jih povzročajo predvsem superpozicije absorpcijskih in emisijskih črt oz. trakov, so fizikalne in kemične motnje bolj pogoste, vendar se lahko izognemo njihovem vplivu na pravilnost rezultata s pravilno izdelanimi umeritvenimi krivuljami in izbiro ustreznih eksperimentalnih pogojev.

*Fizikalne motnje* povzročajo spremembe fizikalnih lastnosti raztopin, in vplivajo na procese pri nastanku aerosola ter na temperaturo plamena.

*Kemične motnje* pa povzročajo že prej opisane reakcije, ki vplivajo na spremembe ravnotežij v plamenu ter s tem na nepopolno atomizacijo in znižanje absorpcijskega signala. Tovrstne interference so zlasti značilne za snovi z močnimi ionskimi vezmi. Tako npr. prisotnost sulfata ali fosfata močno zmanjša absorpcijski signal kalcija zaradi afinitete med kalcijem in fosfatom oziroma sulfatom. Pri teh pogojih se zmanjša število prostih atomov v plamenu. Vplive sulfata oziroma fosfata lahko znatno zmanjšamo z dodatkom lantanovih ionov, ki vežejo fosfatni oziroma sulfatni ioni ter tako sproščajo kalcij; omilimo pa jih tudi z uporabo tehnike standardega dodatka.

## **Uporabnost metode**

Metoda atomske absorpcije je primerna predvsem za določevanje posameznih elementov v raztopinah. Ne moremo določati plinov, halogenov, ogljika, fosforja in žvepla.

Alkalijske kovine določujemo s precejšnjo občutljivostjo in natančnostjo. Glavne spektralne črte so v vidnem delu spektra (Li 670,8 nm; K 766,5 nm; Na 589,0 nm; Rb 852,1 nm; Cs 852,1 nm). V plamenu so glede na občutljivost odločilna predvsem disociacijska in ionizacijska ravnotežja, zadoščajo že "hladni" plameni. Napake lahko nastanejo zaradi ionizacijskih vplivov, zato pogosto dodajamo element z nizkim ionizacijskim potencialom (npr. Cs).

Od zemljoalkalijskih kovin določamo z veliko občutljivostjo magnezij in kalcij, medtem ko je ta pri stronciju in bariju slabša. V plamenu so kovine v radikalnih MOH, MOH<sup>+</sup>, za popolno disociacijo potrebujemo visoke temperature. Nekateri ioni tvorijo z zemljoalkalijami spojine, ki imajo visoka tališča.

Mnoge kovine (Cu, Ag, Zn, Cd, Pb, Hg, Sn itd.) lahko določamo enostavno, ker dobro disociirajo v plamenu; absorbirajo v UV delu spektra. Motnje so na splošno majhne, zato rezultati niso zelo odvisni od sestave vzorca.

Metoda atomske absorpcijske spektrometrije se je uveljavila na vseh področjih analize kemije in je predvsem uporabna za določevanje manjših množin elementov v anorganskih in organskih snoveh. Metodo prištevamo tudi med osnovne v kliničnih, metalurških, geoloških in farmacevtskih analiznih laboratorijih, pomembna je tudi pri analizah v zvezi z varstvom okolja (določevanje kovin v zraku in vodah).

## **7. Določanje bakra, železa in cinka v vinu ali šumečih tabletah SUPRADIN**

**Princip:**

Raztopine vzorcev po pripravi razpršujemo v plamen acetilen-zrak ter merimo absorbcijo pri valovni dolžini 324.8 nm za Cu in 248.3 nm za Fe in 213.9 nm za Zn.

**Aparatura:**

Enožarkovni atomski absorpcijski spektrometer Perkin-Elmer 1100B, Cu in Fe žarnica z votlo katodo.

**a) Postopek:**

Vzorci vina ne zahtevajo posebne predpriprave, samo filtriramo jih skozi filtrirni papir, črni trak in jih razpršujemo direktno v plamen.

**Priprava umeritvene krivulje:**

Baker: Pripravi po 50 ml standardnih raztopin bakra s koncentracijami 0.3, 0.5, 1.0 in 2.0  $\mu\text{g/ml}$  z razredčitvijo standardne raztopine 1 mg/ml z 12 % etanolom.

Železo: Iz 12 % etanola in standardne raztopine s koncentracijo 1 mg/ml pripravimo po 50 ml standardnih raztopin s koncentracijami 2.0, 4.0, 8.0 in 10  $\mu\text{g/ml}$ .

Merimo absorbanco tako pripravljenih raztopin, potem ko jih razpršujemo v plamen, tako da odčitamo višino vrha, ki ga nariše rekorder.

Narišemo graf in iz umeritvene krivulje odčitamo koncentracijo Cu in Fe v vzorcih. Če so absorbance za vzorec zelo nizke, si pomagamo z metodo standardnega dodatka tako, da vzorcu dodamo znano množino standarda in razredčimo z 12 % etanolom.

**b) Postopek**

V 150 ml čašo natehtamo 1 tableto, dodamo 10 ml deionizirane vode in 4 ml konc. HCl. Postavimo na kuhalnik in zavremo, nato ohladimo pod tekočo vodo. Raztopino kvantitativno prelijemo v 50 ml bučko in do oznake dopolnimo z vodo.

Priprava umeritvenih krivulj:

Cu: 0.3, 0.5, 1.0 in 2.0  $\mu\text{g/ml}$

Fe: 2.0, 4.0, 6.0 in 8.0  $\mu\text{g/ml}$

Zn: 0.3, 0.5, 0.7 in 1.0  $\mu\text{g/ml}$



Umeritvene krivulje pripravimo iz osnovnih standardov za Cu 10 µg/ml, za Fe 100 µg/ml in za Zn 10 µg/ml.

Vzorec je za določevanje Cu potrebno razredčiti 20x, za Fe 50x in za Zn 200x.

Rezultate podajte v mg na povprečno maso tablete!

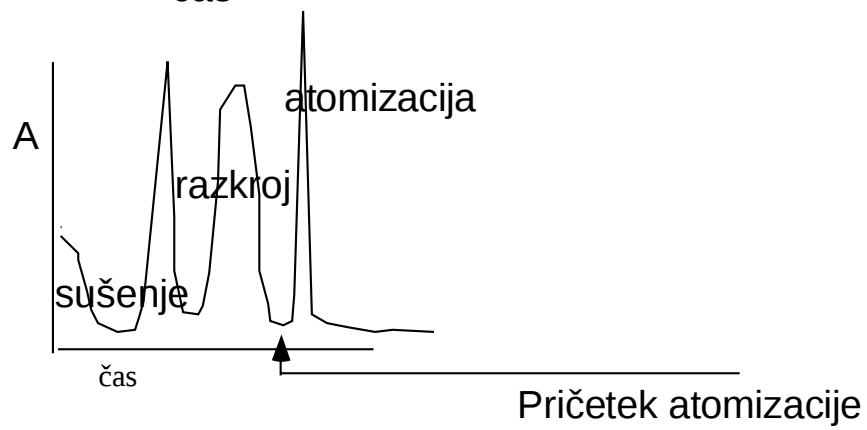
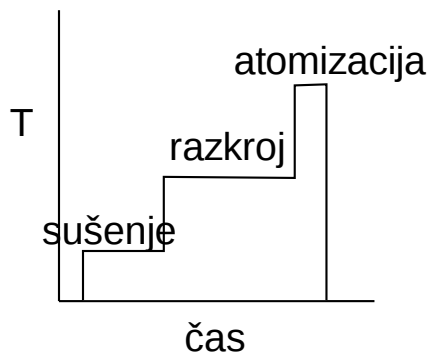
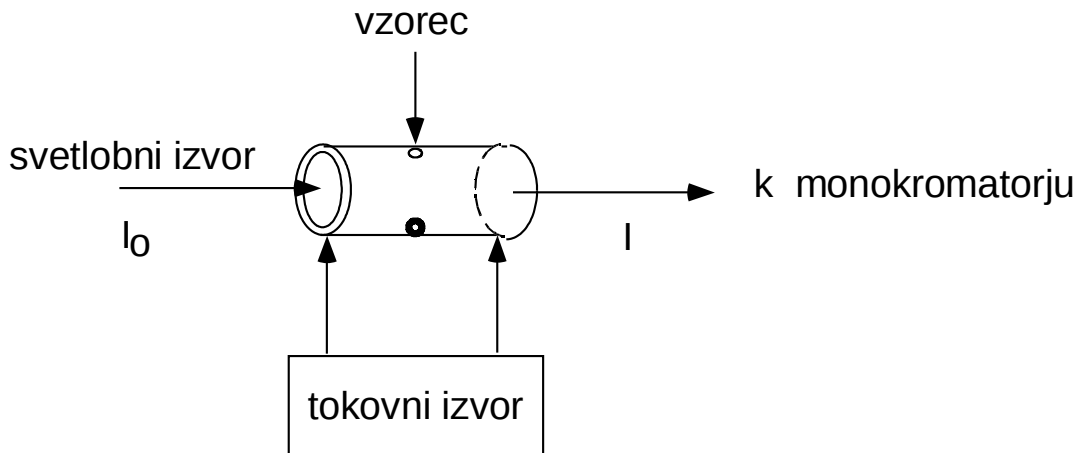
## ELEKTROTERMIČNA AAS

V zadnjem času vse bolj pridobivamo proste atome tudi v električno gretih ceveh; najprimernejše so grafitne cevke ( $d = 8 \text{ mm}$ ), ki jih segrevamo z visokimi jakostmi toka (200-400 A).

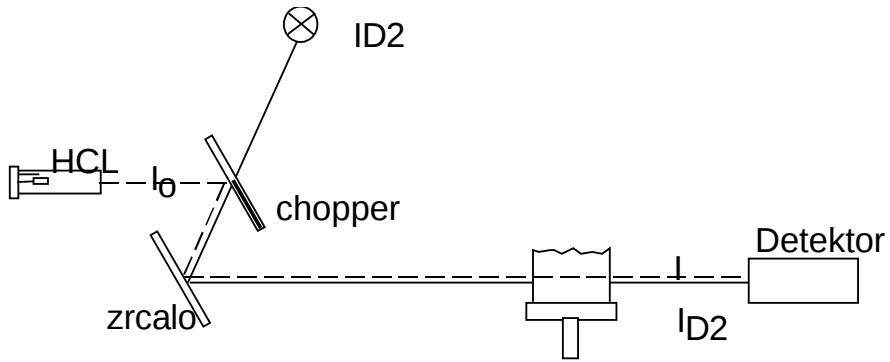
Tehnika elektrotermične AAS ima v primerjavi s plamensko tehniko nekatere prednosti. Pri tej tehniki nadomestimo plamen z razpršilnikom z grafitno cevko, ki jo namestimo v aparaturo tako, da prehaja žarek svetlobe iz izvora skozi sredino cevke. Vzorec vnašamo v cevko skozi odprtino za vnos, ki se nahaja na zgornjem delu cevke. V cevko vnašamo zelo majhne volumne vzorca 5-50  $\mu\text{l}$ . Grafitna cevka se nahaja v večji cevi, ki jo prepihujemo z argonom. Grafitno cevko uporovno grejemo (veliki tokovi!), pri čemer lahko temperaturni program poljubno uravnamo ter s tem kontroliramo procese, ki vodijo do nastanka prostih atomov. Navadno uporabljamo trostopenjske temperaturne programe. V prvi stopnji (100°C) vnešeni vzorec posušimo. Tej stopnji sledi stopnja razkroja ( $T=300^\circ\text{C}-900^\circ\text{C}$ ), v kateri odstranimo del analizne osnove. Ta stopnja je zlasti pomembna pri analizi organskih vzorcev. Sledi stopnja atomizacije, pri kateri v zelo kratkem času (nekaj ms) segrejemo cevko na temperaturo, ki zadošča za atomizacijo določenega elementa (do 2500°C). Eksperimentalne pogoje (temperaturni program) določimo eksperimentalno ali pa uporabimo dosegljive literaturne podatke. Shema aparature je prikazana na sliki 1.

Nespecifično absorpcijo, ki je pogosta pri elektrotermični AAS (prisotnost molekularnih zvrsti, pojav dima v stopnji atomizacije...) in pri atomizaciji koncentriranih raztopin v plamenu, lahko deloma zmanjšamo ali celo odstranimo s korektorjem ozadja. Princip ene od možnosti za korekcijo je prikazan na sliki 2. V tem primeru uporabimo dva izvora, žarnico z votlo katodo in devterijsko žarnico, ki emitira kontinuirni spekter. Rotirajoči sektor-chopper izmenično prepušča skozi absorpcijski prostor (grafitna cevka, plamen) resonančno linijo elementa, ki ga določamo, in svetlobo, ki jo seva devterijska žarnica. Element, ki ga želimo določiti absorbira samo svetlobo, ki jo emitira žarnica z votlo katodo, trdni delci (dim) ali molekule pa svetlobo iz obeh izvorov. Če časovno ločeno opazujemo razmerje obeh intenzitet, lahko z ustrezno elektronsko obdelavo signalov kompenziramo nespecifično absorpcijo. Princip delovanja devterijskega korektorja ozadja je prikazan na sliki 2.

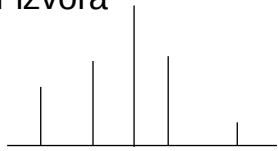
Slika 1.  
Shema aparature za elektrotermično atomizaciju



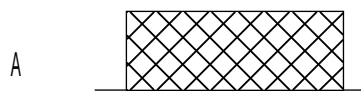
Slika 2. Princip delovanja devterijskega korektorja ozadja



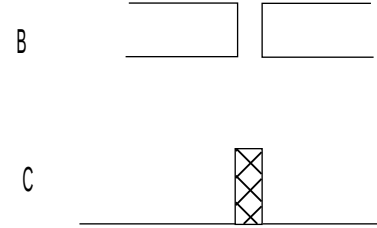
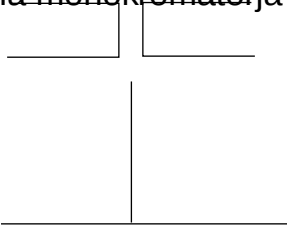
spekter izvora



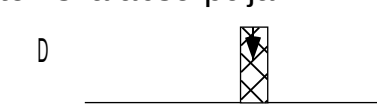
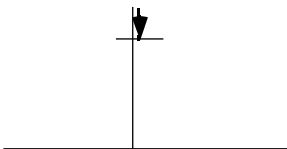
spekter  $D_2$  žarnice



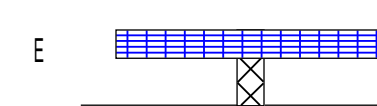
sp. širina monokromatorja



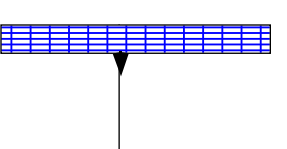
atomska absorpcija



nespecifična absorpcija



atomska + nespecifična absorpcija



Zaradi veliko večje učinkovitosti atomizacije v grafitni cevki (100% glede na 0,1% učinkovitost v plamenu) je ta tehnika bistveno bolj občutljiva od plamenske tehnike, zato so meje zaznavnosti glede na plamensko tehniko tudi do 1000 krat nižje. Ker delamo pri elektrotermični tehniki z majhnimi množinami raztopin od 1 do 100  $\mu\text{l}$ , so absolutne občutljivosti zelo visoke in znašajo od  $10^{-10}$  do  $10^{-12}$  g.

Pomanjkljivost tehnike pa so predvsem večje interference, ki jih večkrat ne moremo povsem odstraniti, slabša natančnost meritev in daljši čas potreben za analizo.

## ***8. Določevanje svinca, bakra in aluminija v biološkem materialu z elektrotermično atomsko absorpcijsko spektrometrijo***

### **Princip:**

Standardne raztopine za umeritveno krivuljo in vzorec po predhodni pripravi prelijemo v vialo, vstavimo v ustrezno mesto na avtomatskem vzorčevalniku in merimo absorpcijo po elektrotermični atomizaciji.

### **Aparatura:**

Atomski absorpcijski spektrometer Perkin Elmer 1100B z elektrotermično atomizacijo in printerjem, Al, Pb in Cu žarnice z votlo katodo in valovnimi dolžinami za Al 309.3 nm, za Pb 217.0 nm in za Cu 324.8 nm.

### **Postopek:**

Zatehtamo 100-200 mg biološkega vzorca (lasje) in ga prenesemo v kjeldalsko bučo. Dodamo 0.5 ml konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in 1.0 ml konc.  $\text{HNO}_3$  ter med stalnim mešanjem segrevamo nad gorilnikom. Pazimo, da je ustje buče obrnjeno v notranjost digestorija, da ne bi po nesreči ogrozili sebe in drugih. Izhajajo dušikovi oksidi in vzorec se začne razkrajati. Ko opazimo pooglenitev, prekinemo s segrevanjem in počakamo da se buča in vsebina primerno ohladita. Po kapljicah dodajamo 0.5 ml 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Postopek ponavljamo toliko časa, da pri segrevanju ne pride več do pooglenitve in je zato raztopina ves čas brezbarvna, nadaljujemo do par  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Bele pare  $\text{H}_2\text{SO}_4$  naj izhajajo približno pol minute. Ohladimo bučo in prenesemo raztopino vzorca v merilno 50 ml bučko,

poplaknemo z Milli-Q deionizirano vodo, ohladimo bučko pod tekočo vodo in dopolnimo do značke z deionizirano vodo.

**Meritve:**

Priprava standardnih raztopin za umeritveno krivuljo.

**Al** – pripravimo po 100 ml standardnih raztopin Al s koncentracijo 50, 100 in 150 µg/l z redčenjem osnovne raztopine s koncentracijo 10 µg/ml z Milli-Q vodo do oznake.

Pogoji za atomizacijo

STEP	T (°C)	R.T.	H.T.
1	110	3	20
2	150	3	20
3	1700	2	15
4	2500	0	3 rec, read, stop flow
5	2550	1	2
6	20	1	10

**Pb** – Pripravimo po 100 ml standardnih raztopin Pb s koncentracijo 50, 70 in 100 µg/l z redčenjem osnovne raztopine s koncentracijo 10 µg/ml z Milli-Q vodo do oznake.

Pogoji atomizacijo

STEP	T (°C)	R.T.	H.T.
1	110	3	20
2	150	3	20
3	850	2	15
4	1800	0	3 rec, read, stop flow
5	1850	1	2
6	20	1	10

**Cu** – Pripravimo po 100 ml standardnih raztopin Cu s koncentracijo 30, 50 in 70 µg/l z redčenjem osnovne raztopine s koncentracijo 10 µg/ml z Milli-Q vodo do oznake.

### Pogoji za atomizacijo

STEP	T (°C)	R.T.	H.T.
1	110	3	20
2	150	3	20
3	1000	2	15
4	2300	0	3 rec, read, stop flow
5	2350	1	2
6	20	1	10

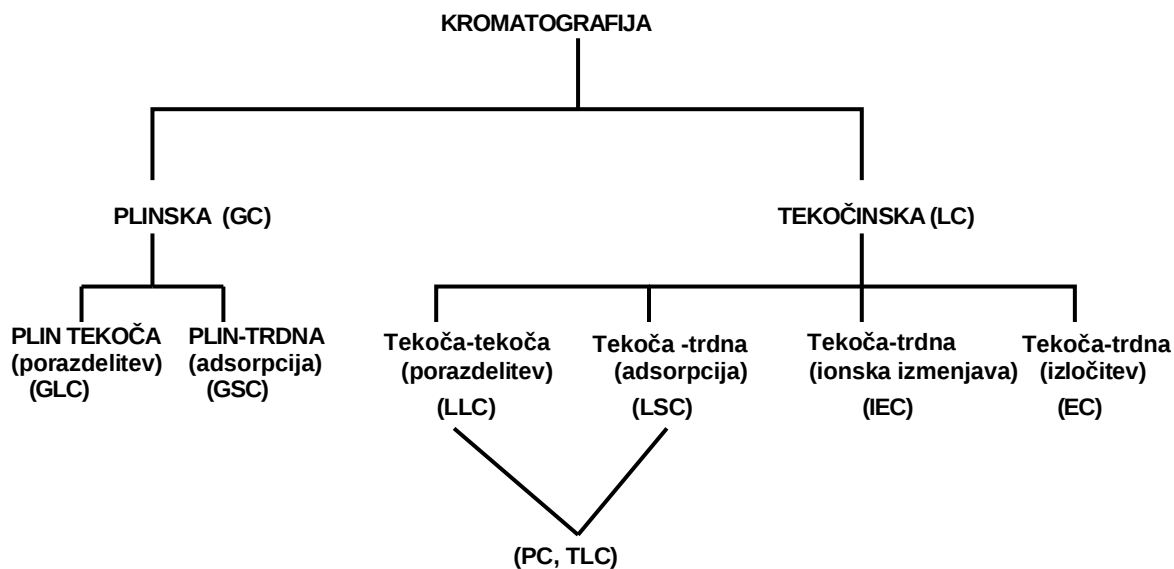
### **Račun:**

Na osnovi meritev narišite grafe in iz umeritvenih krivulj odčitajte koncentracijo posameznih elementov. Rezultate podajte v % glede na zatehto.

# KROMATOGRAFIJA

## UVOD

Pod pojmom *kromatografija* razumemo vrsto postopkov separacije in/ali določitve kemijskih spojin, od najmanjših plinskih molekul do bioloških velemolekul (Sl.1). Kromatografska separacija je posledica razlik v hitrosti potovanja posameznih komponent pod vplivom mobilne faze (plin, tekočina), zaradi selektivnega zadrževanja (retenzije) komponent na stacionarni fazi (trdna površina ali nemobilna tekočina).



Slika 1. Shematski pregled kromatografskih metod

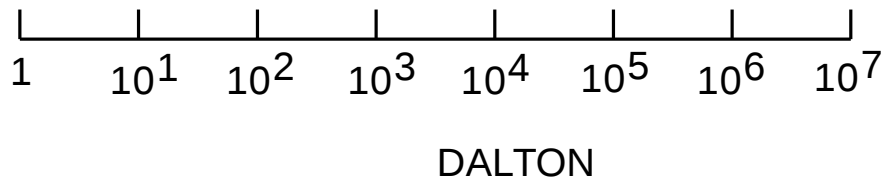
Danes zavzemajo kromatografske metode osrednje mesto v analizni kemiji organskih spojin, predvsem na področjih kemije naravnih spojin, farmacije, medicine in okolja. Tako lahko s plinsko kromatografijo ločimo organske spojine z maso do 1000 D ter nekatere hlapne anorganske substance, z izločitveno kromatografijo (SEC) pa celo molekule z molsko maso do  $10^7$  D (Sl.2).



## IZLOČITVENA KROMATOGRAFIJA

### TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA

#### PLINSKA KROMATOGRAFIJA



Slika 2. Območje kromatografskih metod glede na molekulsko maso topljenca

Pojem kromatografija je uvedel ruski botanik M.Cvet (1903), ko je na kolono s kalcijevim karbonatom nanese rastlinske pigmente iz listov (klorofil) in jih z izpiranjem s petrolejem separiral v karotene in ksantofile. To je bila dejansko metoda tekočinske kromatografije (LC). Šele v letu 1938 sta Izmailov in Shraiber opisala uporabo papirne (PC) in tankoslojne kromatografije (TLC), ki jo je razvil kasneje Stahl. Martin in Synge sta z delom o tekočinski porazdelitveni kromatografiji položila teoretske temelje tekočinski kromatografiji in dala osnove za razvoj papirne in plinske kromatografije. Za to delo sta leta 1952 prejela Nobelovo nagrado.

### KROMATOGRAFSKE METODE

Glede na naravo interakcije med topljencem in obema fazama sta kromatografskim metodam najbližji separacijski metodi ekstrakcija tekoče-tekoče in destilacija (porazdelitev topljenca med fazama). Glede na vrsto stacionarne in mobilne faze lahko delimo kromatografske metode v PLINSKO KROMATOGRAFIJO (GC) in TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO (LC)

#### VRSTE PLINSKE KROMATOGRAFIJE:

##### *Porazdelitvena kromatografija plin-tekoče (GLC - Gas Liquid Chromatography)*

Hlapne komponente vzorca se selektivno zadržujejo na stacionarni fazi in pod vplivom mobilne faze (dušik, helij, vodik) potujejo skozi kolono. Stacionarna faza je običajno nehlapna organska tekočina, s katero je prevlečen nosilec ('polnjena kolona') ali notranja stena kapilarne kolone. Ker je osnova separacije porazdelitev komponente med obema fazama (enako se topi v enakem), uporabljamo za različne skupine organskih spojin raznolike stacionarne faze. Ker je hlapnost organskih spojin in tako tudi stacionarnih faz

odvisna tudi od temperature, morajo biti posamezne stacionarne faze obstojne v območju med 20-350°C.

#### *Adsorpcijska kromatografija na trdnih sorbentih (GSC - Gas Solid Chromatography)*

Separacija komponent poteka na osnovi sorpcije na trdnih adsorbentih ('molekulska sita', ki jih pripravljajo iz naravnih zeolitov) in desorpcije v plinsko fazo pri višjih temperaturah.

#### VRSTE TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE:

##### *Adsorpcijska kromatografija (LSC - Liquid Solid Chromatography)*

Tu je mobilna faza tekočina, stacionarna faza pa trden adsorbent (silikagel,  $Al_2O_3$ , molekularna sita, aktivno oglje, porozna stekla). Tenkoplastno in deloma papirno kromatografijo lahko glede na mehanizem separacije tudi uvrščamo v to zvrst kromatografije. Uporaba adsorbentov je bila v tekočinski kromatografiji (HPLC) v začetku zelo razširjena, vendar so pri tej metodi številne težave: neponovljivost separacije, pri adsorpciji lahko pride do močne vezave nekaterih komponent (kemosorpcija), ki se ne izperejo iz kolone. *Porazdelitvena kromatografija (LLC - Liquid Liquid Chromatography)*

Pri tem postopku je topljenec (molekula vzorca) porazdeljen med mobilno fazo (tekočina) in tekočo stacionarno fazo. Izpolnjen mora biti pogoj, da mobilna faza ne raztaplja stacionarne faze, ki je nanešena na inertnem nosilcu. Stacionarna faza je pogosto vezana na nosilec ("bonded phase chromatography") in sta tako sorpcija in porazdelitev vzrok za separacijo. Porazdelitveno kromatografijo delimo na "normalno fazno" (NP) in "reverzno fazno" (RP). Pri prvi je stacionarna faza polarna in mobilna faza nepolarna (separacija polarnih spojin). Pri "reverzni fazi" (RP) imamo obrnjene pogoje: stacionarna faza (običajno vezana na nosilcu) je nepolarna.

##### *Ionska kromatografija (IC - Ion Chromatography)*

Pri ionski kromatografiji uporabljamo zeolite ali umetne organske in anorganske smole (kationske in anionske izmenjalce). Osnova je ionska izmenjava med ionskimi skupinami v izmenjalcu in protiioni vzorca. Medtem, ko je ta način separacije zelo preprost v običajni izvedbi, je pri HPLC precej zahteven: pogoji separacije so odvisni od vrste vplivov (pH, ionska moč itd) in je pogoje težko predvideti.

##### *Izločitvena kromatografija (Size Exclusion Chromatography, Gelpermeation, Gel - filtration Chromatography)*

Pri tej metodi mora biti stacionarna faza kemično inertna, glede na vrsto stacionarne faze imamo tudi različna poimenovanja (n.pr., Gelska kromatografija na Sephadex koloni).

Separacija poteče zaradi različnih velikosti molekul vzorca in por v stacionarni fazi: manjše molekule prodrejo (difuzija) v mrežo polimerne stacionarne faze, medtem ko se srednje velike zadržujejo zaradi tega manj časa v koloni, največje pa potujejo skozi kolono hitro. Ta metoda je posebno uporabna za separacijo visokomolekularnih spojin in biomolekul od manjših molekul v vzorcu.

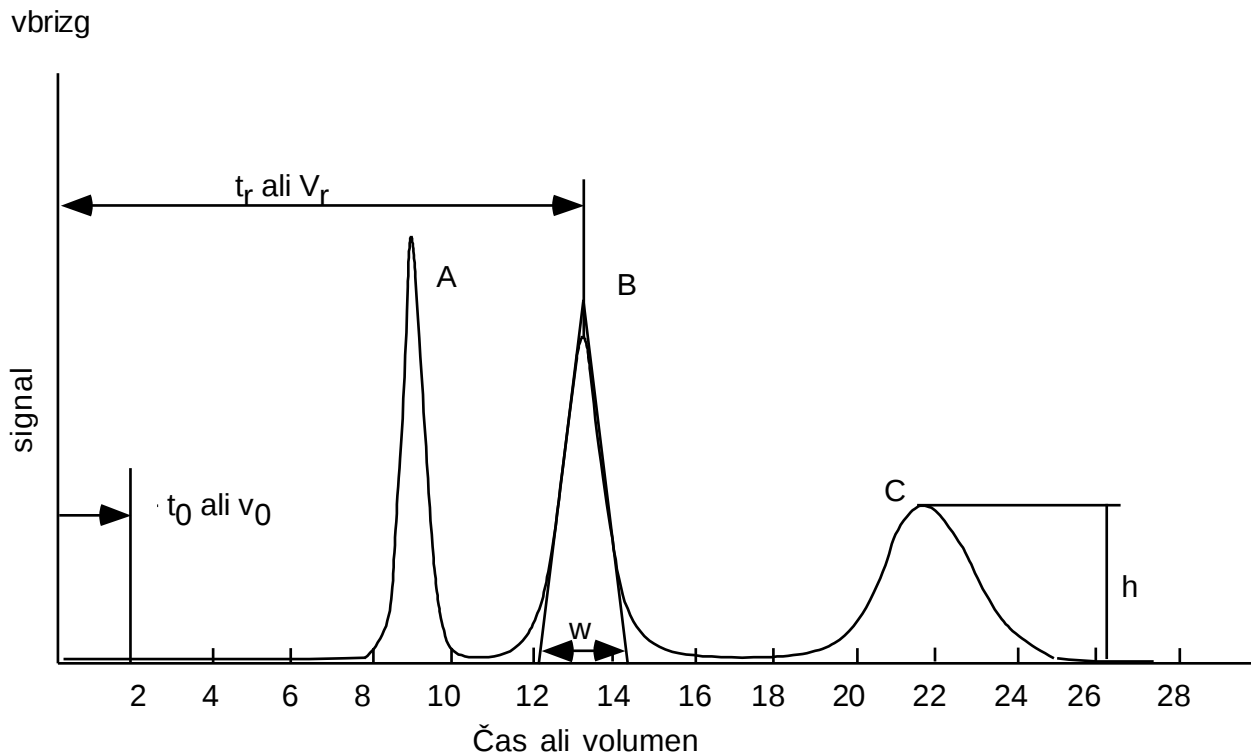
## **OSNOVNI POJMI IZ TEORIJE SEPARACIJE NA KOLONI**

Proces separacije na kromatografski koloni lahko opišemo z različnimi parametri, kot npr. časom zadrževanja (retenzija) komponente na koloni ( $t_R$ ) ali z ustreznim retencijskim volumnom ( $V_R$ ) mobilne faze, ki je potreben, da se komponenta eluira iz kolone, številom teoretskih podov, ki ponazarjajo zmogljivost kolone ( $N$ ), kapacitivnostjo ali porazdelitvenim razmerjem kolone ( $k'$ ) in njeno selektivnostjo ( $\alpha$ ). Vzrok zadrževanju določene komponente na koloni je porazdelitev topljenca med stacionarno in mobilno fazo.

### *Retenzijski čas*

$t_R$  komponente je čas, ki ga le-ta potrebuje za potovanje od injektorja do detektorja skozi kromatografsko kolono (Sl.3) in je ob danih kromatografskih pogojih specifičen za posamezno substanco.

$t_0$  je čas, ki je potreben za prehod mobilne faze po enaki poti.



Slika 3. Značilen kromatogram večkomponentne mešanice

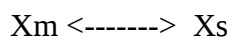
Iz vrednosti za  $t_0$  in  $t_r$  v kromatogramu lahko dobimo ustrezne volumne, če poznamo pretok  $q$  (ml/min) in sicer

$$V_r = qt_r \text{ in } V_m = qt_0,$$

kjer  $V_r$  pomeni *retenzijski volumen* in  $V_m = V_0$  *intersticialen volumen* mobilne faze ('void volume', 'dead volume').  $V_0$  dejansko predstavlja totalni volumen mobilne faze v koloni v slehernem trenutku (vključno z volumni injektorskega dela, priključkov in detektorja), medtem ko je  $V_r$  volumen mobilne faze, ki je potreben, da določeno komponento "izperemo" (eluiramo) iz stacionarne faze.

*Porazdelitveni koeficient ( $K_D$ )*

Vsaka komponenta  $X$  se porazdeli med stacionarno in mobilno fazo



Proces opišemo z ravnotežno konstanto

$$K_D = [X_s]/[X_m]$$

ki jo imenujemo *porazdelitveni (termodinamski) koeficient* za določeno komponento X. Visoka vrednost  $K_D$  pomeni, da je komponenta X pretežno v stacionarni fazi ter potuje počasneje skozi kolono. Tako je torej  $K_D$  merilo za zadrževanje določene komponente na koloni.

#### *Kapacitivnost (porazdelitveno razmerje) kolone ( $k'$ )*

Namesto termodinamske konstante  $K_D$  (koeficienta porazdelitve) uporabljamo v GC in HPLC običajno kapacitivni faktor

$$k' = \frac{\text{štev. molov X v stac. fazi}}{\text{štev. molov X v mob. fazi}} = V_s \cdot [X]_s / V_m \cdot [X]_m = K_D \cdot V_s / V_m$$

kjer sta  $V_s$  in  $V_m$  ustrezna volumna obeh faz in ga lahko določimo direktno iz kromatograma (Sl. 3.3.). Razmerje  $V_s/V_m$  označujejo včasih z  $\beta$  (fazno razmerje) in izrazimo  $k' = K_D/\beta$ . Pri adsorpcijski kromatografiji moramo  $V_s$  nadomestiti z ustreznim izrazom, ki odgovarja aktivni površini adsorbenta.

Separacija (zadrževanje) komponent v mešanici je v bistvu odvisna od relativne množine vsake komponente v posamezni fazi ( $k'$ ) in ne od njunih relativnih koncentracij ( $K_D$ ).

#### *Selektivnost kolone - ločitev pasov*

Selektivnost  $\alpha$  se nanaša na zmožnost kolone, da loči dve komponenti.

$$\alpha = \frac{t_{rB} - t_0}{t_{rA} - t_0} = k'_B / k'_A = K_D(B) / K_D(A)$$

Selektivnost kolone izračunamo iz vrednosti  $k'$  in mora biti vedno večji od 2. Pri vrednostih okrog 1 je ločitev nemogoča; za izboljšanje selektivnosti je treba menjati stacionarno ali mobilno fazo oziroma obe, oziroma koeficient porazdelitve  $K_D$  (ali T kolone pri GC). Selektivnost je možno orientacijsko predvideti iz molekularnih interakcij med topljencem in stacionarno fazo (npr. vodikova vez ipd).

#### *Učinkovitost kolone - razširitev pasov*

Pod pojmom učinkovitost kolone ('column efficiency') razumemo hitrost razširjanja pasov posameznih komponent med potovanjem topila skozi kolono (ali vzdolž papirja oziroma plošče pri PC ali TLC). Ta parameter izrazimo kvantitativno s številom

teoretskih podov ('Theoretical Plates'). To število pomeni, kolikokrat se topljenec porazdeli med fazama pri potovanju skozi kolono :

$$N = L/H = (t_r/\sigma)^2 = 16 (t_r/w)$$

kjer je L dolžina kolone, H je višina poda,  $\sigma$  standardni odmik vrha in  $w = 4\sigma$  že znana širina vrha na osnovi, t.j. na bazni črti.

Koncept teoretskih podov (N) je prevzet iz teorije destilacije (destilacijske kolone za frakcionirano destilacijo), ki predpostavlja, da je takšna kolona sestavljena iz velikega števila podov (platojev), kjer obstaja ravnotežje topljenca med obema fazama. Torej predstavlja N potencialno separacijsko zmožnost kolone - čim večji je N tem večja je učinkovitost. Tako učinkovite kolone (visok N) zmanjšajo razšititev vrhov (ozki vrhovi).

Pomembno je, da je N proporcionalen dolžini kolone, zato je lahko merilo za učinkovitost kolone tudi parameter HETP (Heigh Equivalent to a Theoretical Plate) :

$$H = L/N$$

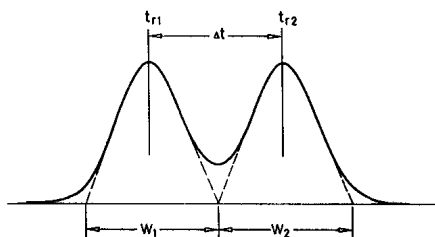
kjer je L dolžina kolone, običajno v milimetrih. Ta parameter omogoča primerjavo učinkovitosti različno dolgih kolon. Odvisnost višine teoretičnih podov od linearne hitrosti mobilne faze opisuje van Deemterjeva enačba.

### Ločljivost

Ločljivost med dvema vrhoma, ki se lahko deloma prekrivata, določamo iz kromatograma in je definirana z

$$R = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{(w_2 + w_1)/2} = \frac{2 \Delta t}{w_2 + w_1}$$

Za dva sosednja vrhova, ki sta blizu skupaj, velja, da je  $w_1 \cong w_2 = 4\sigma$  in  $\Delta t \cong 2\sigma_1 + 2\sigma_2 \cong 4\sigma$ . Tako dobimo za  $R = \Delta t/w_2 = 1,0$ . To je numerična vrednost za ločljivost dveh vrhov, pri katerih se tangenti ravno dotikata (Sl.4). Za popolno ločitev vrhov na osnovni črti mora biti vrednost za ločljivost večja od 1,5.



Slika 4. Definicija ločljivosti (nepopolno ločena kromatografska vrhova)

Jasno je, da zgornja definicija ločljivosti velja le za vrhove z enako višino in enako širino, zato je pri odstopanjih potrebno upoštevati še druge parametre. Pri kromatografskih in ostalih separacijskih tehnikah je ločljivost zadovoljiva takrat, ko so komponente ločene v čim krajšem času tako, da je razdalja med dvema vrhovoma večja od širine vrhov.

#### KVANTITATIVNA ANALIZA

Čeprav je kvalitativna analiza s kromatografskimi metodami (predvsem z GC in HPLC) možna, je veliko pomembnejša kvantitativna analiza. Pri kvalitativni analizi je skoraj edini parameter, ki nam služi pri identifikaciji neke spojine, čas zadrževanja ( $t_r$ ) neke komponente na določeni koloni pri točno določenih pogojih. Primerjava teh časov s tabeliranimi vrednostmi je zelo nezanesljiva, saj ima vrsta spojin skoraj enake čase zadrževanja na isti koloni. Z uporabo standardov se tem problemom le delno izognemo. Uporaba različnih mobilnih in stacionarnih faz (večkolonska kromatografija) je bila nedavno zelo obetavna, vendar je časovno in stroškovno neprimerna. Danes je na voljo vrsta 'sklopitev' GC in HPLC z masno specifičnimi in/ali selektivnimi detektorji, s katerimi je možna tako identifikacija posameznih komponent kot tudi njihova kvantitativna določitev v času, ki je v bistvu odvisen od časa separacije na kromatografski koloni (GC-MS, HPLC-MS, GC-IR). Kljub temu pa sta GC in HPLC danes najpomembnejši metodi za kvantitativno analizo večine organskih spojin v vzorcih hrane, vode, zdravil, v analizah okolja itd. Vsekakor pa je edinstvena prednost GC, HPLC in ostalih kromatografskih metod v sposobnosti separacije posameznih spojin med seboj in od osnove (matriksa) vzorca.

Večina detektorjev v kromatografiji daje signal, ki je sorazmeren koncentraciji topljenca v mobilni fazi. Za takšne detektorje je površina signala (vrh, ki ima bolj ali manj verno obliko Gauss-ove krivulje) sorazmerna masi neke komponente in obratno sorazmerna pretoku mobilne faze. Zato je izrednega pomena, da je pretok mobilne faze konstanten. Vedeti moramo tudi, da višina signala pomeni tisti čas, ko je polovico snovi prešlo skozi detektor, zato je treba biti previden pri uporabi višine vrha kot merilo koncentracije, če signali niso simetrični.

Večinoma zapišemo signale detektorjev pri GC in HPLC v analogni obliki kromatograma. Površino signala (vrha) lahko izračunamo z grafično ('ročno') integracijo ali s pomočjo integratorjev oziroma digitalnih računalnikov (PC) z ustrezno programsko opremo.

### *Računanje koncentracij*

Z običajnimi integratorji dobimo vrednosti za  $t_r$ , višine vrhov ( $h$ ) in površine vrhov iz katerih lahko izračunamo koncentracije posameznih komponent na več načinov: *umeritev s standardom, normalizacija površin, metoda internega standarda*.

#### *a) Umeritev s standardom (eksterni standard)*

To metodo pogosto uporabljamo, kadar poznamo volumen vzorca. Prednost te metode je v tem, da merimo le površini vrhov, ki nas zanimajo. Ustrezni standard(i) morajo biti kromatografirani pod enakimi pogoji kot vzorec. Pri tem ni potrebno injicirati enake množine vzorca in standarda. Koncentracije posameznih komponent izračunamo s pomočjo zveze  $X_i = P_i \cdot K_i$ , kjer je  $P_i$  površina vrha določene komponente in  $K_i$  razmerje med koncentracijo in površino določenega standarda oziroma naklon umeritvenega grafa. Umeritvene grafe (regresijske premice) uporabljamo, kadar hočemo zelo natančno določiti koncentracije posameznih komponent. Ker imamo pri izračunu koncentracij opravka s parametri kot so volumen in koncentracija, so lahko napake zaradi hlapnosti topila vzrok znatnim napakam.

#### *b) Umeritev z internim standardom*

Pri tej metodi kromatografiramo znano množino *internega standarda* in mu izračunamo razmerje površina/koncentracija (lahko tudi iz grafa). Nato dodamo k vzorcu znano množino tega standarda. Kot interni standard lahko uporabimo komponento, ki je ni v vzorcu in je popolnoma ločena od sosednjih vrhov, vendar ima podobne retencijske čase kot komponenta, ki jo določujemo ter mora biti inertna do mobilne faze in ostalih komponent v vzorcu. Ta metoda ne zahteva ponovljivega injiciranja vzorcev in enakih kromatografskih pogojev, kar zmanjšuje glavni vir nenatančnosti, posebej pri GC, kjer običajno ne poznamo množino injiciranega vzorca. Glavni vir napak povzroča neidealni interni standard, zato uporabljamo za natančne določitve markirane spojine (s  $C^{13}$ ,  $N^{15}$ ,  $O^{18}$  ipd) določenih komponent.

#### *c) Normalizacija površin vrhov*

Ta metoda je primerna takrat, kadar kromatogram resnično odraža sestavo celotnega vzorca in so vse komponente dobro ločene med seboj. Merimo površino vsakega vrha in jo delimo z odgovarjajočimi faktorji odziva za določeno komponento. Delež (%) posamezne komponente dobimo iz s pomočjo izraza  $X_i(\%) = (P_i / \sum P_i) \cdot 100$



Kadar nimamo na voljo posameznih standardov, lahko uporabimo kar % površine (višine) posamezne komponente od celokupne površine (višin) vseh vrhov. To je smiselno, kadar primerjamo kvantitativno sestavo enakih vzorcev.

## TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA

V tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti ali pri visokih pritiskih (HPLC - High Pressure Liquid Chromatography, High Performance Liquid Chromatography) so uporabni vsi naštetih načini separacije. Komponente (topljenec) raztopimo in jih nato pod visokom pritiskom (do 200 barov) potiskamo skozi (kovinsko) kolono s pomočjo mobilne faze. Kolona je napolnjena z delci polnila (običajno velikost  $<10\ \mu\text{m}$ ), ki so prekriti s stacionarno fazo. Z izbiro ustreznih faz in ostalih pogojev, dosežemo separacijo večkomponentne mašanice v nekaj minutah.

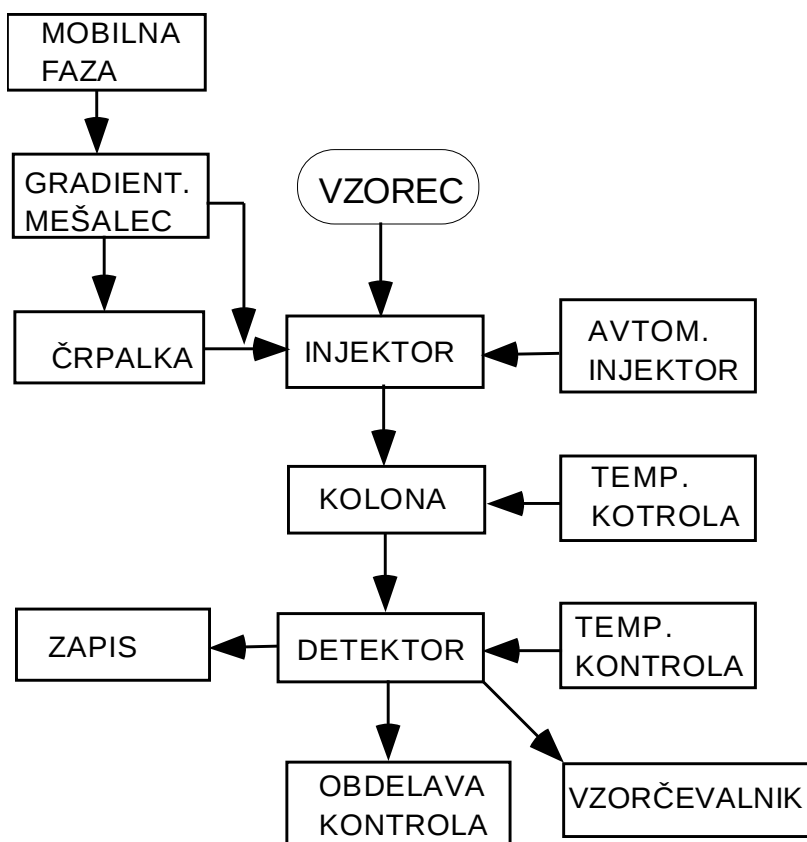
Pri HPLC je bistvenega pomena izbira stacionarne in mobilne faze. Sestavo (polarnost) mobilne faze lahko med separacijo tudi programirano spreminjamo - ta način imenujemo gradientno izpiranje za razliko od izokratskega, pri katerem ostane polarnost mobilne faze (lahko tudi večkomponentna) v času separacije nespremenjena.

Z razvojem črpalk za visoke pritiske in konstantne pretoke brez pulziranja, tehnologije kolon in različnih detektorjev, je postala HPLC ob GLC nepogrešljiva metoda za separacijo in določevanje večine organskih (in anorganskih) spojin po načelu: "Kar lahko raztopiš, lahko tudi ločiš in določiš". Odlikujejo jo: hitrost, občutljivost, ločljivost, majhna množina vzorca (pogosto tudi slaba stran, saj otežuje identifikacijo neznane komponente) in večkratna ("neomejena") uporaba kolone. Ena od odlik kromatografskih metod je uporaba v zelo širokem masnem območju.

V HPLC se običajno uporabljajo pretočni detektorji z majhnim volumnom (10 $\mu\text{l}$ ). V spodnji tabeli so navedene glavne karakteristike najbolj značilnih detektorjev.

## KOMPONENTE HPLC SISTEMA

Osnovne komponente HPLC sistema so: razervoar z mobilno fazo, črpalka, injektor, kolona z detektorjem in rekorder. Sodobni sistemi dopuščajo modularno sestavo in uporabo mikroračunalnikov za kontrolo procesa, zbiranje in obdelavo podatkov.



Shema HPLC sistema

Parameter	SF	RI	Fluorescenčni	EC
specifičnost	selektiven	univerzalen	selektiven	selektiven
občutljivost	$10^{-9}$	$10^{-7}$	$10^{-10}$	$10^{-9}$
gradientna tehnika	možna	-	možna	možna
omejitev	topilo	T odvisnost	din. območje	adsorpcija topila

## ***9. Določanje kofeina s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)***

### **Princip:**

Alkaloidi so bazične organske snovi, ki vsebujejo dušik in so naravni rastlinski produkti. Večinoma imajo pomembne fiziološke učinke. Mnogi so zelo toksični, pogosto pa hkrati zelo uspešna zdravila. Pomembni alkaloidi so: kofein, strihnin, nikotin, morfin, kokain, atropin,...

Za separacijo in določevnje alkaloidov lahko uporabljamo HPLC. Separiramo jih na polarnih kolonah, kot mobilno fazo uporabimo mešanico organskih topil in vode, detektiramo pa jih z UV detektorjem.

### **Aparatura:**

Črpalka s pretokom 1 ml/min, UV detektor  $\lambda = 254$  nm, injektor, volumen vzorca je 20  $\mu$ l, kolona Phenomenex GeminiC 18, 5  $\mu$ m delci 250 x 4.6 mm in integrator HP. Mobilna faza: 20 % acetonitrila in 80 % deionizirane vode.

### **Postopek:**

Vzorci, ki vsebujejo kofein (kava, čaj, energetski napitki) pripravimo za določitev z ustrezno razredčitvijo in jih vbrizgamo v analitsko kolono. Vzorce, ki vsebujejo CO<sub>2</sub> pred pripravo odplinimo v ultrazvočni kopeli.

### **Priprava umeritvene krivulje:**

Pripravimo štiri standardne raztopine kofeina v koncentracijskem območju od 20 do 100 µg/ml v 50 ml bučke iz osnovne raztopine kofeina s koncentracijo 1 mg/ml.. Standardne raztopine kofeina in vzorec vbrizgamo na kolono in odčitamo površino vrha. Narišemo umeritveno krivuljo in odčitamo koncentracijo vzorca. Če je potrebno, lahko uporabimo tudi standardni dodatek, tako da k vzorcu dodamo takšno količino standardne raztopine kofeina da se signal poveča od 50-100 %. Koncentracijo kofeina odčitamo iz grafa za standardni dodatek, ali pa jo izračunamo.

### **Račun:**

Iz umeritvene krivulje odčitajte koncentracijo vzorca.

Izračunajte učinkovitost kolone, ki jo kvantitativno izrazimo s številom teoretskih podov.

Za izračun uporabite zvezo:

$$N = 5,54 \left( \frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2$$

$t_r$  = retencijski čas kofeina

$w_{1/2}$  = polovična širina kromatografskega vrha kofeina

Kapacitivnost (porazdelitveno razmerje) kolone ( $k'$ )

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

$t_0$  – mrtvi čas, pot mobilne faze od injektorja do detektorja, ker se ne zadrži na koloni

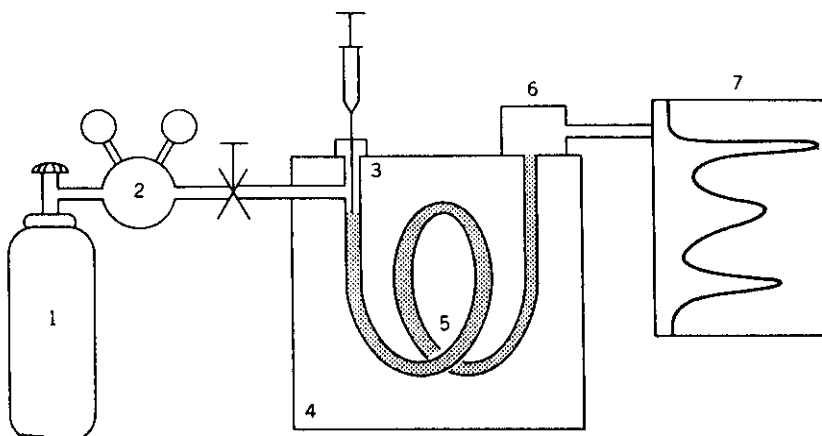
## PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Plinska kromatografija je primerna za separacijo in kvantitativno določitev termično stabilnih spojin, ki imajo ustrezen parni tlak (hlapnost) in so termično stabilne do 300 - 350° C. Največ uporabljamo GLC, ki jo običajno označujemo kar z GC, kjer poteka separacija na osnovi porazdelitve komponent v vzorcu med mobilno fazo (He, N<sub>2</sub>) in stacionarno fazo (tekočina na nekem trdnem nosilcu). Za detekcijo imamo na voljo občutljive in selektivne detektorje (FID, ECD, MS) s katerimi lahko detektiramo množine pod 1 ng.

### *Plinski kromatograf*

sestavljajo trije glavni, med seboj povezani deli: *injektor*, *kromatografska kolona* in *detektor*. Vsak od teh osnovnih delov ima vrsto dodatnih komponent (Sl.1), ki zagotavljajo:

- \*konstanten pretok mobilne faze
- \*injiciranje vzorca na kolono
- \*ustrezno dolžino kolone (stacionarne faze)
- \*primerno temperaturo kolone
- \*detekcijo posamezne komponente na izhodu kolone
- \*ustrezen signal posamezne komponente za nadaljnjo procesiranje



Slika 1. Funkcionalna shema plinskega kromatografa

### a) *Injektor*

Pri polnjenih kolonah ('packed column') uporabljamo direktno injiciranje vzorca. Z brizgo ('syringe') prebodemo tesnilo ('septum') in vbrizgamo določen volumen vzorca v steklen vložek pred kolono, ki je segret na ustrezno temperaturo, da vzorec v hipu uparimo in splaknemo z nosilnim plinom (mobilna faza) v kolono. Za merjenje volumnov

vzorca lahko uporabimo kalibrirane zanke, ki so vgrajene v večpotni ventil, in jih pri injiciranju preklonimo v pretok plina.

Pri kapilarnih kolonah je potrebno zmanjšati volumen vzorca s pomočjo 'spliterja' ('splitter'), kjer se od prvotne množine vzorca (1  $\mu\text{L}$ ) prenese na kolono le manjši del (0,01  $\mu\text{L}$ ). S tem preprečimo preobremenjenost kolone (kapacita kolone), izgubimo pa večino vzorca, kar vpliva na velikost signala. Pri zelo nizkih koncentracijah pa moramo injicirati vzorec na kolono brez 'spliterja' ('splittless' injection). Pri tem dobimo ogromen vrh topila z izrazitim repom ('tailing'), ki lahko moti analizo komponent z nizkimi časi zadrževanja. Ta rep lahko delno odpravimo s primernim izpiranjem injekcijskega dela v atmosfero takrat, ko je ves vzorec z delom topila prišel do kolone.

Za nekatere spojine, ki so termično nestabilne (mnoge polarne spojine) ali pa se ne ločijo zadovoljivo, lahko pripravimo bolj hlapne in obstojne derivate. Danes poznamo več odličnih reagentov, ki pretvorijo polarne skupine (-OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, ipd) v ustrezne derivate hitro in kvantitativno (trimetilsililacetamid, trifluoroacetyl itd.). Pogosto dajejo ti derivati tudi večje signale kot originalne spojine (fluorirani derivati za ECD).

#### b) Kolone v GC

V plinski kromatografiji uporabljamo dve vrsti kolon: polnjene in kapilarne kolone.

Polnjene kolone ('packed columns') so običajno kovinske ali steklene z notranjim premerom od 2 - 8 mm in dolžine okrog 3 m. Napolnjene so s trdnim, inertnim polnilom, ki je prevlečen s tekočo stacionarno fazo (običajno od 10-20 %). Velikost delcev polnila znaša običajno 100/120 mesh (150 - 125  $\mu\text{m}$ ). Notranji premer kolone mora biti vsaj 8-krat večji od premera delcev polnila.

Kapilarne kolone imajo običajno notranji premer, ki je manjši od 1 mm in so narejene iz staljenega kvarca ('fused silica'), ki daje tudi daljšim kolonom (do 50 m) prožnost. Od različnih vrst kapilarnih kolon so danes največ v uporabi odprte kapilarne kolone, ki imajo notranje stene prevlečene z ustrezno stacionarno fazo (1-2  $\mu\text{m}$ ) z oznako WCOT ('Wall-Coated-Open-Tubular'). Glavna prednost teh kolon so krajši časi analize, večja inertnost, daljša življenjska doba, boljše ponovljivost in visoke vrednosti N (učinkovitost) ter zmanjšano izcejanje ('krvavenje') stacionarne faze.

Naloga tekoče 'stacionarne' faze je separacija (selektivno zadrževanje posameznih komponent). Selektivnost je merilo za zadrževanje polarnih spojin glede na nepolarno fazo. Stacionarne faze klasificiramo običajno glede na njihovo selektivnost. Zaradi kompleksne narave interakcij med topilom in topljencem je optimalna izbira stacionarne faze zelo težka.

V praksi pa si lahko pomagamo z enostavnim pristopom. Če imajo posamezne komponente v vzorcu različna vrelišča, uporabimo nepolarno fazo. Če imajo nekatere komponente podobna vrelišča, bomo izbrali stacionarno fazo, ki bo močno zadrževala eno ali več komponent. Ravno tako lahko uporabimo za izbiro stacionarne faze staro kemijsko pravilo: 'enako se topi v enakem'. Tako bomo za separacijo alkoholov vzeli kot stacionarno fazo poliglikole, za separacijo ogljikovodikov pa nepolarno stacionarno fazo

ipd. Za nekatere spojine (halogenirane in dušikove) uporabljamo posebne stacionarne faze.

Z izbiro primerne stacionarne faze smo določili osnovni parameter kromatografske separacije, ki jo lahko izboljšamo z dodatnimi parametri kot so dolžina kolone, temperatura, pretok plina (optimizacija kolone) in ne nazadnje z izbiro detektorja.

### c) Detektorji za GC

Na izhodu kromatografske kolone je nameščen detektor, s katerim zaznamo komponente, ki jih eluiramo iz kolone s pomočjo mobilne faze. Prostornina detektorja mora biti čim manjša, da preprečimo ponovno mešanje komponent po separaciji. Detektor daje analizni signal, ki ga ustrezen senzor pretvori v analogni električni signal. Ta signal ojačimo in ga pošljemo direktno na registrirni instrument (rekorder), ki nam prikazuje analogni zapis, ali pa ga pretvorimo v digitalno obliko in vodimo na integrator oziroma v računalnik. Detektorski sistem s temi perifernimi enotami zagotavlja zvezni zapis v obliki koncentracijskih profilov (vrhov) komponent, ki se eluirajo iz kolone. V plinski kromatografiji poznamo vrsto različnih detektorjev kot so: TCD-Thermal Conductivity Detector, TED-Thermoionic Emission Detector, FPD-Flame Photometric Detector, PID-Photoionization Detector, NPD-Nitrogen Phosphorus Detector, FID-Flame Ionization Detector, ECD Electron Capture Detector,... Pri rutinskem delu se največkrat uporablja FID in ECD detektorja. Prvi je skoraj univerzalen detektor za večino organskih spojin, medtem ko se ECD uporablja za detekcijo spojin s prostimi elektronskimi pari (halogenidi, aromatske spojine...). Bistvene značilnosti posameznih detektorjev so občutljivost, linearnost in selektivnost.

Detektor na osnovi toplotne prevodnosti (TCD) je edini univerzalni detektor za vse spojine, ki jih lahko separiramo na GC koloni in ima linearno območje nad  $10^4$ . Ker je nedestruktiven, ga lahko uporabimo tudi v preparativni plinski kromatografiji. Zaradi nizke občutljivosti (nad 0,3 ng/ml), pa ni primeren za analizo sledov.

Plamensko-ionizacijski detektor (FID) je osnovan na merjenju toka, ki izvira iz ionov in elektronov, nastalih pri gorenju organskih spojin v čistem plamenu vodik/zrak. Če pride v detektor organska spojina iz kolone, tok močno naraste in je sorazmeren z množino snovi v eluatu. Nastali tok povzroči padec napetosti na visokoomeškem uporu; ta napetostni signal ojačimo in peljemo na izhodno enoto (rekorder ali integrator). Detektor je 1000 krat bolj občutljiv kot TCD in je linearen v območju  $10^6$ . Njegova meja zaznavnosti je okoli 5 pg/sek. Ker ni občutljiv na vrsto permanentnih plinov ( $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ), je zelo primeren za analizo organskega onesnaženja v zraku.

V detektorju na zajetje elektronov (ECD) eluent iz kolone vodimo preko dveh elektrod, od katerih ima ena nanešen radioaktiven izotop, ki emitira elektrone ( $\beta$  sevalec, npr.  $\text{Ni}^{63}$ ). Ti visokoenergijski elektroni povzročijo po trkih z nosilnim plinom ( $\text{N}_2$ ) nastanek plazme (ioni, elektroni, radikali). S primernim potencialom dobimo nek konstanten tok, ki predstavlja bazno linijo. Ko pride iz kolone elektrofilska spojina, pride do zajetja

elektronov, kar povzroči negativen signal, ki je sorazmeren množini eluirane komponente. Da dosežemo najnižjo mejo zaznavnosti (0,1 pg/sek), moramo iz nosilnega plina odstraniti sledove kisika in vlage. Največjo občutljivost dosežemo s polikloriranimi spojinami (pesticidi), linearno območje pa je omejeno na dve do največ štiri velikostne rede

## **11. Določanje ftalatov v vodi s plinsko kromatografijo**

### **Princip:**

Ftalati so skupina industrijskih kemikalij in se uporabljajo kot mehčalci v PVC plastiki, kot topila v kozmetični industriji in drugih potrošniških proizvodih (npr. otroške igrače, medicinske vrečke, cevke ipd.), zato so ljudje precej izpostavljeni njihovemu škodljivemu delovanju. Ftalati lahko poškodujejo jetra, ledvice, pljuča in reproduktivne organe. Ena od metod za njihovo določevanje je tudi plinska kromatografija.

### **Apertura:**

Plinski kromatograf HP 5890 Series II z FI (plamenski ionizacijski) detektorjem

Pogoji dela: Kolona HP1 – nepolarna, stacionarna faza je dimetil siloksan, debelina faze 0,11 $\mu$ m. Dolžina kolone je 25 m, ID 0,2 mm.

Temperaturni program: 45°C – 1 min, 20°C/min do 280°C – 5min.  $T_{inj}=250^{\circ}C$ ,  $T_{det}=300^{\circ}C$

Nosilni plin: N<sub>2</sub> s pretokom 1,2 ml/min

### **Postopek:**

V lij ločnik odmerite 200 ml vode iz plastenke in dodajte 10 ml heksana. Stresajte 5 minut. Počakajte da se fazi ločita, nato vodno fazo odstranite, ekstrakt pa ulovite v čisto epruveto, v katero dodajte približno 4 žličke trdnega Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zato da veže vodo, ki je lahko še prisotna, bister tekoči del nato prelijte v novo epruveto.

Epruveto damo v čašo z vročo vodo in v epruveto uvajamo dušik, tako da odhlapimo heksan, trden vzorec pa nato ponovno raztopimo v 0,1 ml heksana. Vzorec je tako predkoncentriran. 1 $\mu$ l tako pripravljenega vzorca nato injiciramo v kromatograf.

Priprava umeritvene krivulje:

Pripravimo si standarde dibutil ftalata (DBP) in dioktil ftalata (DOP) s koncentracijo v območju od 10 do 100 mg/L v heksanu iz osnovne raztopine s koncentracijo 1000 mg/L.

Koncentracijo ftalatov izračunamo iz umeritvene krivulje!