

## VAJE IZ ANALIZNE KEMIJE III

Vaje iz Analizne kemije III z dodatnimi instrumentalnimi tehnikami dopolnjujejo sklop vaj iz Analizne kemije II in nadgradijo statistično obravnavo rezultatov ter njihovo interpretacijo. Sklop obsega pet vaj, dve sta s področja spektroskopskih tehnik, dve s področja kromatografije. Vaja Analiza naravne vode ponazarja celovit analizni pristop, ki smo ga obravnavali pri Analizni kemiji I. Oceno iz vaj bo oblikovala kakovost eseja Analiza naravne vode in kakovost izvedbe drugih vaj ter stopnja samostojnosti in pripravljenosti na vaje. Asistent si bo sliko o vaši pripravljenosti na vaje ustvaril z ustnim preverjanjem znanja in presojo dobljenih rezultatov ter njihove interpretacije.

Vaje so bile pripravljene s ciljem, da ponazorijo in poglobijo teoretično poznavanje snovi in izpostavijo izvedbene vidike analiznih metod. Kar v praksi loči delavce med seboj in vpliva na vrsto dela, ki ga kdo opravlja ter na hitrost napredovanja v službi, je samostojnost pri delu, verodostojnost, zmožnost obravnave in interpretacije rezultatov, kritičnost ter odgovornost za rezultate svojega dela in dela skupine. Smisel vaj je v približanju realni situaciji.

Gradivo je grajeno podobno kot pri predhodnih sklopih. Povezave z vsebino predavanj in vaša priprava na vaje je označena z znakom ure. Izpolnjevanja gradiv ne bomo formalno preverjali. Predvideno je, da poročilo o vaji oddaste takoj po končani vaji. Če na vaje ne boste dobro pripravljeni in gradiva pri vaji ne boste brali zbrano in po vrsti, boste to težko dosegli. Gradivo je pisano tako, da pri vsaki meritvi vsega za nazaj ne ponavljamo, temveč pričakujemo, da to, kar ste že osvojili, znate pri nadaljnjih meritvah sami pravilno vključevati in upoštevati.

Ločenega teoretičnega preverjanja znanja iz vaj ne bo, vsebina vaj bo del izpita iz predmeta, zato je pomembno, da se poglobite v pomen posameznih eksperimentov in v ugotovitve, ki iz njih sledijo.

### 1. ANALIZA NARAVNE VODE

[http://www.kii3.ntf.uni-lj.si/analchemvoc2/file.php/1/HTML/slo/SPEKTRA/water\\_intro.htm](http://www.kii3.ntf.uni-lj.si/analchemvoc2/file.php/1/HTML/slo/SPEKTRA/water_intro.htm)

### 2. MOLEKULARNA LUMINISCENČNA SPEKTROMETRIJA

Pri tej vaji boste raziskali, kako spremembe v pogojih merjenja vplivajo na meritev fluorescence. Spoznali boste različne merilne pristope. Usposobili se boste za izbiro pogojev za merjenje fluorescence neznane snovi. Ovrednotili boste, kako pogoji shranjevanja fluorescenčnega reagenta vplivajo na izmerjeno fluorescenco. Nadalje boste z molekularno fluorescenčno spektrometrijo določili koncentracijo kloridnih ali bromidnih ionov v raztopini vzorca.

Katere tehnike uvrščamo k molekularni luminiscenčni spektrometriji?



Opreделите vsako od tehnik in poudarite razlike med njimi?



Katere od teh tehnik ne moremo uporabljati pri raztopinah pri sobni temperaturi in zakaj?



Narišite energijski diagram, ki razloži pojav fluorescence! Označite  $\lambda_{\text{eksit}}$  in  $\lambda_{\text{emis}}$ !



Skicirajte blokovno shemo fluorescenčnega spektrometra in označite  $\lambda_{\text{eksit}}$  in  $\lambda_{\text{emis}}$ !



V kakšnem velikostnem odnosu sta  $E_{\text{eksit}}$  in  $E_{\text{emis}}$  ter v kakšnem  $\lambda_{\text{eksit}}$  in  $\lambda_{\text{emis}}$ ?



Kaj razumemo pod izrazom »Ratiometric measurement«? Kje uporabljamo ta način merjenja in zakaj?



Kaj je kvantni izkoristek?



Napišite izraz, ki povezuje intenziteto fluorescenčnega merjenja in koncentracijo?



Kaj razumemo pod izrazom »ratiometric measurement« in na katerem področju ima poseben pomen?



Obnovite znanje iz vaj iz Analizne kemije II in opišite pravilno ravnanje s kivetami pri molekularni fluorescenčni spektrometriji.



V čem je razlika med kivetami za merjenje absorbance in kivetami za merjenje fluorescence?



Napišite meji dinamičnega koncentracijskega območja za molekularno absorpcijsko spektrometrijo in molekularno fluorescenčno spektrometrijo.



## 2.1 Vpliv pogojev merjenja na rezultate meritve fluorescence in različni načini merjenja

V tem delu boste raziskali vpliv pogojev merjenja na meritve fluorescence kinin sulfata in preizkusili različne merilne pristope.

Poznano je, da ima absorpcijski spekter kinin sulfata dva absorpcijska maksimuma: večjega pri 250 nm in manjšega pri 350 nm. Za vzbujanje (eksitacijo) najpogosteje uporabljamo valovno dolžino 350 nm. Fluorescenco (emisijo) kinin sulfata najpogosteje merimo pri valovni dolžini 450 nm. Pri začetnih eksperimentih bomo privzeli ta dva pogoja meritve.

Poleg valovnih dolžin  $\lambda_{\text{eksit}}$  in  $\lambda_{\text{emis}}$  moramo pri fluorescenčnem merjenju za oba monokromatorja nastaviti še širini izstopnih rež:  $\Delta\lambda_{\text{eksit}}$ , »Excitation slit (nm)« in  $\Delta\lambda_{\text{emis}}$ , »Emission slit (nm)«, kar določi širino pasov valovnih dolžin okrog  $\lambda_{\text{eksit}}$  in  $\lambda_{\text{emis}}$ . Širina reže vpliva na ločljivost spektra. Pri večji širini reže je ločljivost spektra manjša kot pri manjši širini. Pogosti izhodiščni nastavitvi za oba monokromatorja sta 5 nm. Kot začetni nastavitvi za merjenje fluorescence kinin sulfata bomo za  $\Delta\lambda_{\text{eksit}}$  privzeli 2,5 nm, za  $\Delta\lambda_{\text{emis}}$  pa 10 nm.

K poskusu a) v tabelo 1, vpišite začetne pogoje merjenja.



Monokromator pri večji širini reže prepusti več svetlobe, zato je ta nastavev povezana tudi z izbiro napetosti pri fotopomnoževalki (photomultiplier tube, PMT), ki ima vlogo svetlobnega senzorja. Opisne izbire napetosti za PMT (»PMT Detector Voltage«) so: »Low«, »Medium« in »High«. Kot začetno nastavev bomo privzeli nizko stopnjo »Low«. Višje stopnje uporabimo, če je fluorescenčni signal prešibak.

### **2.1-1/5 Vpliv nastavitvev širin izstopnih rež monokromatorjev na meritev fluorescence**

V začetku vaje boste v posodicah za Coulterjev števec dobili tri odmerke iste raztopine kinin sulfata 2 mg/L v 50 mmol/L raztopini  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Ena bo ovita z aluminijevo folijo, ki raztopino ščiti pred svetlobo, druga bo imela oznako »Sobna«, tretja pa »Luč«. Posodico z oznako »Luč« postavite neposredno pod prižgano namizno svetilko in jo pustite tam do konca vaj. Posodico z oznako »Sobna« pustite pri sobnih pogojih.

Na delovni površini se odločite, kam boste odlagali kiveto s slepo in kam kiveto s preiskovano raztopino tako, da bosta vedno na svojem mestu in ju ne boste zamenjali med seboj, ko boste meritve ponavljali v več korakih. Lahko si pomagata tako, da podložite list papirja in napišete oznaki mest za obe kiveti.

Z raztopino kininsulfata iz posodice ovite v aluminijasto folijo sperite eno od kivet in jo do treh četrtin višine napolnite s to raztopino ter postavite na mesto z ustrežno oznako. Posodico za Coulter-jev števec zaprite in z ovojem iz aluminijaste folije čim boljše zaščitite pred svetlobo ter postavite na stran za zadnjo vajo.

Drugo kvarčno kiveto speremo in nato približno do treh četrtin višine napolnimo s slepo, za kar uporabljamo delovno raztopino  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (50 mmol/L). Kiveto s slepo odložimo na ustrežno mesto.

Fluorescenčni spektrometer Cary Eclipse vklopimo s preklopom stikala, ki je spredaj desno. Prižgemo računalnik. Pritisnemo »F1« in vtipkamo geslo. Na namizju odpremo program »Cary Eclipse«. V tem delu vaje bomo uporabili način merjenja »Simple Reads«.

Ko se okno odpre, pritisnemo gumb »Setup«, ki je levo zgoraj. Pod zavihkom Cary pri »Data Mode« izberemo možnost »Fluorescence« in nastavimo vse pogoje merjenja, kot smo jih za poskus a) povzeli v tabeli 1. Pod zavihkom Options za poskus a) izberemo ustrežno nastavev napetosti za PMT in potrdimo z gumbom »OK«.

Kiveto s slepo vstavimo v nosilec v fluorescenčnem spektrometru. Bodite pozorni na položaj oznake na kiveti, da boste kiveto vedno vstavljali enako. Da izničimo fluorescenčno ozadje slepe, v programu pritisnemo gumb »Zero«, ki je pod gumbom »Setup«.

Kiveto z raztopino kinin sulfata vstavimo v nosilec v fluorescenčnem spektrometru ter v programu pritisnemo »Start«. Počakamo, da se pod »Results Flags Legend« izpiše rezultat in ga prepisemo v tabelo 1. S ponavljanjem pritiska na gumb »Start« pridobimo še štiri ponovitve iste meritve in jih vpišemo v tabelo 1. Te rezultate boste nujno rabili v povezavi z zadnjo vajo 2.4.

Tabela 1. Meritev fluorescence kinin sulfata pri začetnih pogojih

Poskus a)	$\lambda_{\text{eksit}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{eksit}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emis}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{emis}}$ (nm)	Napetost PMT Nizka (Low)
Odčitek	1.	2.	3.	4.	5.
Meritev					

Podobno naredimo še poskusa b) in c), le da tokrat merilno vrednost odčitamo le enkrat in rezultata vpišemo v tabelo 2. Pred vsakim poskusom moramo izničiti fluorescenčno ozadje slepe.

Tabela 2. Vpliv nastavitve širin rež monokromatorjev na meritev fluorescence

Poskus	$\lambda_{\text{eksit}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{eksit}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emis}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{emis}}$ (nm)	Napetost PMT	Meritev
b)	350	5	450	10	Nizka	
c)	350	2,5	450	20	Nizka	

Primerjajte rezultate poskusov a), b) in c) in presodite, kako sprememba nastavitve širine reže vzbujevalnega monokromatorja vpliva na rezultat meritve fluorescence? Povezavo med nastavitvama in meritvama opišite kvantitativno!

*R*

Kako sprememba nastavitve širine reže emisijskega monokromatorja vpliva na rezultat meritve fluorescence? Povezavo med nastavitvama in meritvama opišite kvantitativno!

*R*

### 2.1-2/5 Vpliv nastavitve napetosti za PMT na rezultat meritve fluorescence

Ovrednotite vpliv spremembe napetosti PMT na meritev fluorescence. Pogoj meritve in rezultat vpišite v tabelo 3.

Tabela 3. Vpliv nastavitve napetosti PMT na meritev fluorescence

Poskus	$\lambda_{\text{eksit}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{eksit}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emis}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{emis}}$ (nm)	Napetost PMT	Meritev
d)	350	2,5	450	10		
e)	350	2,5	450	10		


Kako sprememba nastavitve napetosti PMT vpliva na rezultat meritve fluorescence? Odnose med meritvami izrazite kvantitativno!

R

**2.1-3/5 Vpliv nastavitve valovne dolžine vzbujanja in valovne dolžine emisije na rezultat meritve fluorescence**

Poskuse naredite pri pogojih, ki so povzeti v tabeli 4. Ne pozabite popraviti tudi nastavitve napetosti PMT!

Tabela 4. Vpliv spremembe valovne dolžine vzbujanja ali valovne dolžine emisije na meritev fluorescence

Poskus	$\lambda_{\text{eksit}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{eksit}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emis}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{emis}}$ (nm)	Napetost PMT	Meritev 
f)	330	2,5	450	10	Nizka	
g)	370	2,5	450	10	Nizka	
h)	350	2,5	430	10	Nizka	
i)	350	2,5	470	10	Nizka	

Kako sprememba nastavitve valovne dolžine vzbujanja vpliva na rezultat meritve fluorescence? Odnose med meritvami izrazite kvantitativno!

R

Razložite opažanja!

R

Kako sprememba nastavitve valovne dolžine emisije vpliva na rezultat meritve fluorescence? Odnose med meritvami izrazite kvantitativno!

R

Razložite opažanja!

R

**2.1-4/5 Primerjalno merjenje »Ratiometric«**

Fluorescenčne indikatorje lahko uporabljamo za določanje pH ali koncentracije sestavin, ki vplivajo na fluorescenčni odziv posameznega indikatorja. Odziv fluorescenčnega indikatorja je odvisen tudi od drugih pogojev v raztopini, kot so temperatura in koncentracija drugih

sestavin. Primerjalno merjenje v načinu »Ratiometric« ovrednoti odziv fluorescenčnega indikatorja kot razmerje glede na nek drug fluorescenčni odziv, ki je odvisen samo od vpliva pogojev v raztopini in ni odziv na neko specifično sestavino. Ta pristop uporabljamo v okoljih, kjer ne moremo enostavno uravnati pogojev eksperimenta in ne moremo izvesti klasične kalibracije ali kadar merimo odziv indikatorja v vezani obliki primerjalno glede na odziv prostega indikatorja. Omogoča nam, da vpliv pogojev pri meritvi upoštevamo in tako dobimo smiselne rezultate za spremljani parameter. Tak način pogosto uporabljajo pri študiju metabolizma celic.

Pogosto kot primerjalno fluorescirajočo snov izberemo tako, ki ima enako vzbujevalno valovno dolžino kot fluorescenčni indikator ali pa gre kar za drugo obliko iste snovi, ki fluorescira pri drugačni valovni dolžini. Lahko je tudi obratno, da obe snovi emitirata svetlobo pri isti valovni dolžini, emisijo pa dosežemo z vzbujanjem pri drugačnih valovnih dolžinah.

Ta način merjenja bomo ponazorili na primeru kinin sulfata, za katerega smo omenili, da ima pri absorpcijskem spektru dva emisijska maksimuma, enega pri 250 nm in drugega pri 350 nm. Slednjo valovno dolžino smo kot vzbujevalno uporabljali pri dozdajšnjih eksperimentih. Emisijo smo merili pri 450 nm. Ta pogoj kot tudi nastavitve širin rež monokromatorjev in nastavitve napetosti PMT bom privzeli iz začetnega eksperimenta.

Merimo v načinu »Simple Reads«. Izberemo »Setup«. Pri »Data Mode« izberemo možnost »Fluorescence«. Označimo možnost »User Collect« in nastavimo parametre na »READ(250,450)/READ(350,450)«. Nastavimo druge pogoje meritve, kot smo to delali doslej. Izničimo ozadje slepe in izmerimo fluorescenco raztopine kinin sulfata. Zapišite rezultate.



Sami zasnujte in naredite poskus, pri katerem boste z dvema zaporednima meritvama po načinu, kot ste ga uporabljali pri predhodnih poskusih dosegli isto kot pri prejšnjem eksperimentu. Zapišite pogoje in rezultate meritev in izrazite rezultat še v načinu »Ratiometric«! Komentirajte!



### **2.1-5/5 Snemanje emisijskega in vzbujevalnega spektra**

Pri določanju ustreznih pogojev za merjenje fluorescence neke snovi posnamemo emisijski in vzbujevalni spekter. Postopke, ki jih boste v tej vaji spoznali ob primeru kinin sulfata, boste pri naslednji vaji uporabili pri iskanju ustreznih pogojev za merjenje fluorescence neznane snovi.

Emisijski spekter posnamemo tako, da izberemo možnost »Scan«, nato »Setup«. Na strani Cary nastavimo parametre. Pri »Data Mode« izberemo možnost »Fluorescence« in nato

»Emission«. Vzbujevalno valovno dolžino in nastavitve širin rež monokromatorjev in izbiro napetosti za PMT privzamemo iz prvega eksperimenta.

Za določitev območja valovnih dolžin, v katerem bomo posneli emisijski spekter, med  $\lambda_{\text{emis\_začetna}}$  ali »Start (nm)« ter  $\lambda_{\text{emis\_končna}}$  ali Stop (nm)« uporabimo pravili izraženi z enačbama 1 in 2.

$$\lambda_{\text{emis\_začetna}} = \lambda_{\text{eksit}} + \Delta\lambda_{\text{eksit}} + \Delta\lambda_{\text{emis}} \quad (1)$$

$$\lambda_{\text{emis\_končna}} = \lambda_{\text{emis\_začetna}} + (150 \text{ do } 200) \text{ nm} \quad (2)$$

**Emisijski spekter** kinin sulfata posnamemo proti delovni raztopini  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50 mmol/L.

Ko se spekter izriše na zaslonu, zagotovimo, da se k vrhovom izpišejo valovne dolžine maksimumov fluorescence in meritve fluorescence, če te niso že izpisane. Da to dosežemo, mora biti vrednost parametra »**Threshold**«, ki določi mejo razlikovanja med signalom in šumom, nižja od najnižjega maksimuma fluorescence vrha, ki ga še želimo ovrednotiti. Ta parameter lahko nastavimo, če pritisnemo gumb, ki je v orodni vrstici (vrh z oznako) ali pa, če spodaj levo pritisnemo gumb Create Report. **Skali** obeh osi prilagodimo tako, da so podatki, ki so pripisani k vrhovom, vidni. To omogoča gumb, ki je v orodni vrstici (dve prekržani ravnili). **Izgled grafa** lahko spremenimo, če uporabimo gumb, ki je v orodni vrstici drugi z leve proti desni. Izberite način, ki spekter izriše z merilnimi točkami in s črto.

Spekter natisnemo s pritiskom gumba »**Print**«. Spekter se natisne na tiskalniku, ki je na hodniku katedre.

Izpišite valovno dolžino maksimuma emisije!



Spekter na zaslonu zberemo tako, da v zgornji vrstici menija izberemo »Graph« in nato »**Remove graph**«.

Nato na podoben način, kot pri prejšnjem spektru, posnamemo **vzbujevalni (eksitacijski) spekter** tako, da izberemo »Excitation«. Za snemanje vzbujevalnega spektra uporabimo valovno dolžino maksimuma emisije prejšnjega spektra. Spekter posnamemo proti delovni raztopini  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50 mmol/L. Valovna dolžina  $\lambda_{\text{eksit\_začetna}}$  naj bo 200 nm,  $\lambda_{\text{eksit\_končna}}$  naj bo   enaka ( $\lambda_{\text{emis}} - \Delta\lambda_{\text{eksit}} - \Delta\lambda_{\text{emis}}$ ).

Ko se spekter izriše na zaslonu, ga prilagodimo, kot smo opisali pri prejšnjem spektru in nato natisnemo.

Izpišite valovno dolžino vzbujevalnega maksimuma!



Spekter na zaslonu zberemo z »**Remove graph**«.

## 2.2 Določitev pogojev za merjenje fluorescence neznane snovi

Pogoje za merjenje fluorescence neznane snovi določimo v več korakih:

1. Na UV-VIS spektrometru posnamemo absorpcijski spekter snovi. Za to moramo uporabiti raztopino z višjo koncentracijo, kot jo bomo kasneje uporabljali pri merjenju fluorescence, ker imata obe metodi različni dinamični območji. Določimo valovno dolžino maksimuma absorpcije.
2. Valovno dolžino maksimuma absorpcije uporabimo kot valovno dolžino vzbujanja pri snemanju emisijskega spektra. Za to in vse nadaljnje stopnje uporabljamo raztopino snovi z nižjo koncentracijo. Določimo valovno dolžino maksimuma emisije.
3. Valovno dolžino maksimuma emisije uporabimo pri snemanju vzbujevalnega spektra in določimo optimalno vzbujevalno valovno dolžino, ki se lahko razlikuje od maksimuma absorpcije.
4. Preverimo, če sta nastavitvi širin izstopnih rež monokromatorjev ustrezni.

### 2.2-1/1 Določitev ustreznih pogojev za merjenje fluorescence neznane snovi

Sledite opisanim stopnjam postopka in določite ustrezne pogoje za merjenje fluorescence neznane snovi. Uporabite že pridobljeno znanje in izkušnje. Širini izstopnih rež monokromatorjev pri fluorescenčnem spektrometru nastavite na 5 nm. V 4. koraku postopka preverite, če je treba ti nastavitvi korigirati. To naredite v načinu »Simple Reads«, kjer uporabite optimizirani valovni dolžini, spreminjate širini rež monokromatorjev in merite fluorescenco.

V nadaljevanju bomo opisali le postopek za **snemanje absorpcijskih spektrov** na UV – VIS spektrometru Cary 50, ki je lavo od fluorescenčnega spektrometra. Druge postopke že poznate. Računalnik prižgemo in na namizju odpremo program »WinUV«. Izberemo »Scan« in »Setup«. Pod zavihkom Cary nastavimo »Start« na 700 nm in »Stop« na 200 nm. Pri »Y - mode« nastavimo »Y max« na 3,00 in izberemo »Dual – Beam« ter pod »Display options« možnost »Individual data«. Pod zavihkom Baseline označimo »Baseline correction« in potrdimo z »OK«. V nosilec za kiveto v spektrometru vstavimo slepo in v programu pritisnemo gumb »Baseline«, ki je v levo zgoraj, pod gumboma »Setup« in »Zero«, ter potrdimo z »OK«. Slepo raztopino zamenjamo z raztopino neznane snovi s koncentracijo 20 mg/L in sprožimo »Start«. Počakamo, da se izriše spekter. Označevanje vrhov, prilagoditev osi in izgleda spektra dosežemo podobno kot pri fluorescenčnem spektrometru. Natisnite spekter in k prvi stopnji v tabeli 5 prepisite pogoje snemanja absorpcijskega spektra in valovno dolžino maksimuma absorpcije!



Določanje ustreznih pogojev za snemanje fluorescence neznane snovi nadaljujte na fluorescenčnem spektrometru. Za to uporabite raztopino snovi s koncentracijo 2 mg/L. Sproti izpolnajte tabelo 5. Kot rezultat priložite tudi vse tri spektre.

Tabela 5. Optimizacija pogojev za merjenje fluorescence neznane snovi

1.			$\lambda_{\text{začetna}}$ (nm)	$\lambda_{\text{končna}}$ (nm)		$\lambda_{\text{maks}}$ (nm)
2.	$\lambda_{\text{eksit}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{eksit}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{emis}}$ (nm)	$\lambda_{\text{začetna}}$ (nm)	$\lambda_{\text{končna}}$ (nm)	PMT $\lambda_{\text{emis}}$ (nm)
3.	$\lambda_{\text{emis}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{eksit}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{emis}}$ (nm)	$\lambda_{\text{začetna}}$ (nm)	$\lambda_{\text{končna}}$ (nm)	PMT $\lambda_{\text{eksit}}$ (nm)
4.	$\lambda_{\text{eksit}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{eksit}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emis}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{emis}}$ (nm)		PMT Fluorescenca



### 2.3 Določitev koncentracije klorida ali bromida v vzorcu

Kloridni ali bromidni ioni v raztopini dušijo fluorescenco kinin sulfata. Pri enaki koncentraciji kinin sulfata se z zviševanjem koncentracije kloridnih ali bromidnih ionov v raztopini znižuje fluorescenčni signal. Odvisnost intenzitete fluorescence od koncentracije kloridnih ali bromidnih ionov predstavlja kalibracijski graf za določitev teh ionov v preiskovani raztopini. Zveza je padajoča in ni linearna. Opišemo jo lahko s polinomom drugega reda. Rezultat določitve izračunamo iz kvadratne enačbe.

#### 2.3-1/1 Določitev koncentracije klorida ali bromida v vzorcu

V oštevilčene, suhe ali z žveplovo kislino 50 mmol/L oplaknjene 25 mL volumetrične steklenice in v 25 mL volumetrično steklenico z vzorcem z batno pipeto odpipetiramo 4 mL delovne raztopine kinin sulfata z masno koncentracijo 2 mg/L v 50 mmol/L raztopini H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nato v posamezne volumetrične steklenice, dodamo odmerke osnovne raztopine NaCl ali KBr ( $V_{\text{sol}})$  z množinsko koncentracijo 18 mmol/L pripravljeno v 50 mmol/L raztopini H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, kot je predpisano v preglednici (tabela 6). Raztopine v vseh bučkah dopolnimo do oznake z delovno raztopino H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> koncentracije 50 mmol/L.

Skladno z dobro laboratorijsko prakso ravnamo, če bučke pred pripravo raztopin razvrstimo v vodoravno vrsto od leve proti desni v zaporedju, kot so navedena v preglednici. Dodatke prve raztopine dodajamo od leve proti desni. Vsakič, preden v bučko prenesemo odmerek, preverimo oznako bučke in dodatek. Po vsakem dodatku bučko odložimo tako, da je glede na preostalo vrsto nekoliko zamaknjena nazaj. Tudi, če nas bo pri delu kdo zmotil, ne bomo naredili napake, da bi v neko bučko odmerka ne dodali ali pa bi ga dodali dvakrat, saj imamo v vsakem trenutku jasen pregled nad tem, kar smo že naredili. To sicer pri majhnih volumskih odmerkih težko presodimo.

Pri nadaljnjih dodatkih ravnamo enako. Če v nekatere bučke odmerka ne bomo dodali, se morebitni napaki izognemo tako, da te bučke že pred začetkom odmerjanja zamaknemo nazaj.

Tabela 6. Priprava kalibracijskih raztopin in raztopine vzorca v 25 mL bučkah

Oznaka	1	2	3	4	5	Vzorec
$V_{\text{kinina}}$ (mL)	4	4	4	4	4	4
$V_{\text{sol}} (mL)$	0	0,5	1	2	3	0
$c_{\text{sol}} (mmol/L)$	0	0,36	0,72	1,44	2,16	?
$F_{i1}$ (AU)						
$F_{i2}$ (AU)						
$F_{i3}$ (AU)						
$\bar{F}_i$ (AU)						
$\bar{F}_i / \bar{F}_0$						

Pri tej vaji bomo uporabili napreden način merjenja fluorescence, ki omogoča meritve nizov raztopin z želenim številom ponovitev.

Izberemo možnost »Advanced Reads« in »Setup«. Na strani Cary nastavimo parametre enako kot pri prvem eksperimentu. Ne pozabite preveriti, če je nastavev napetosti PMT ustrezna. Na strani Samples izberemo »No. of samples« 6 ter določimo število ponovitev »Replicates« 3. Raztopine poimenujemo: Kalibr. 1, Kalibr. 2, Kalibr. 3, Kalibr. 4, Kalibr. 5 in Vzorec. Potrdimo z »OK«. Seznam, ki se odpre novemu oknu, tudi potrdimo z »OK«.

Kiveto s slepo (50 mmol/L raztopina  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) vstavimo v nosilec fluorescenčnega spektrometra in izničimo fluorescenco slepe. Kiveto zamenjamo s kiveto napolnjeno s prvo kalibracijsko raztopino in v programu pritisnemo gumb »Start«. Sledimo navodilom na zaslonu in nadaljujemo z meritvami. Rezultate natisnemo.

V tabelo 6 vpišemo meritve fluorescence  $F_{ij}$  in njihovo aritmetično sredino ter izračunamo  $\bar{F}_i / \bar{F}_0$  tako, da aritmetično sredino vsake raztopine delimo z aritmetično sredino prve raztopine kinin sulfata brez dodanega klorida ali bromida.

V MS Excelu narišite kalibracijski graf. Za trendno črto izberite polinom druge stopnje s prikazom enačbe in kvadrata korelacijskega koeficienta. Po kvadratni enačbi izračunajte rezultat določitve klorida ali bromida v vzorcu.



Ali bi lahko raztopine kinin sulfata pripravili v klorovodikovi kislini namesto v žveplovei kislini? Odgovor utemeljite!



Na koncu zbršite poročilo.

## 2.4 Vpliv pogojev shranjevanja fluorescenčnega reagenta na rezultate meritev fluorescence

Z ANOVO (Analysis of Variance) lahko ločimo in ovrednotimo različne vire variacij in primerjamo več srednjih vrednosti ter presodimo ali je med njimi statistično pomembna razlika. Presodili bomo vpliv naključnih dejavnikov in vpliv nadzorovanega dejavnika na rezultate meritve fluorescence za tri odmerke iste raztopine kinin sulfata, ki smo jih med vajo shranjevali pri različnih pogojih. V našem primeru je nadzorovani dejavnik način shranjevanja raztopine fluorescenčnega reagenta, kot je povzeto v preglednici (Tabela 7). V prvo vrsto tabele prepisite rezultate iz tabele 1.

Tabela 7. Rezultati meritev fluorescence za raztopine hranjene pri različnih pogojih

Vzorci ( $h = 4$ )		Ponovitve meritev fluorescence ( $n = 5$ )					$\bar{x}_i$	$s_i^2$
		$j = 1$	$j = 2$	$j = 3$	$j = 4$	$j = 5$		
Tema - takoj	$i = 1$							
(Rezultati iz Tabele 1)								
Tema	$i = 2$							
Sobna	$i = 3$							
Svetilka	$i = 4$							
						$\Sigma$	$\Sigma$	

### 2.4-1/1 Vpliv pogojev shranjevanja fluorescenčnega reagenta na rezultate meritev fluorescence

Uporabite način merjenja »Advanced Reads« in proti 50 mmol/L žvepovi kislini kot slepi izmerite fluorescenco vseh treh vzorcev s petkratnimi ponovitvami meritev. Rezultate natisnite in vpišite v preglednico. Izklopite instrument pomijte in pospravite za seboj ter vrnite pribor tehniku.

Način ročnega računanja parametrov za ANOVO je opisan v nadaljevanju. Namesto tega lahko uporabite tudi možnost, ki jo ima MS Excel za analizo podatkov (Data Analysis, Anova: Single Factor).

Variacije znotraj vzorcev (within-sample estimate) ocenimo po formuli 3.

$$\sigma_0^2 = \frac{\sum_i s_i^2}{h} = \frac{\sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{h \cdot (n-1)} \quad \text{Prostostne stopnje: } \nu = h \cdot (n-1) \quad (3)$$

Variacije med vzorci (between-sample estimate) ocenimo po formuli 4.

$$\sigma_0^2 = \frac{n \sum_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{h-1} \quad \text{Prostostne stopnje: } \nu = h-1 \quad (4)$$


Srednjo vrednost vseh rezultatov izračunamo po formuli  $\bar{x} = \sum \bar{x}_i / h$ .

Izračunamo  $F_{3/16}$  in ga primerjamo s tabelarično vrednostjo za enostranski  $F$ -test, ki je 3,239 ( $P = 0,05$ ). Če je tabelarična vrednost presežena, je med srednjimi vrednostmi statistično pomembna razlika, kar pomeni, da ima nadzorovani faktor, ki je v našem primeru način shranjevanja fluorescenčnega reagenta, statistično pomemben vpliv.

Vzroka sta lahko, da ena srednja vrednost izrazito odstopa od drugih treh, da se dve vrednosti izrazito razlikujeta od drugih dveh, ali pa se vse tri srednje vrednosti statistično pomembno razlikujejo med seboj. To lahko presodimo, če srednje vrednosti uredimo po velikosti v naraščajočem vrstnem redu in za vsak par sosednjih vrednosti izračunamo razliko med njima. Te vrednosti primerjamo z najmanjšo statistično pomembno razliko (least significant difference; LSD), ki jo izračunamo po formuli (5).

$$LSD = s \sqrt{2/n} \cdot t_{h(n-1)} \quad (5)$$

Tabelarični  $t_{16}$  za dvostranski  $t$ -test je 2,12 ( $P = 0,05$ ). Vrednost za  $s$  izračunamo iz variance za oceno variacij znotraj skupin (within-sample estimate). Če razlike med dvema sosednjima srednjima vrednostma preseže LSD, se srednji vrednosti statistično pomembno razlikujeta med seboj.

Uporabite ta postopek in v preglednici z zvezdicami ponazorite ugotovljeno. 

$i = 1$	Tema - takoj	
$i = 2$	Tema	
$i = 3$	Sobna	
$i = 4$	Svetilka	

Oblikujte sklepe glede vpliva načina shranjevanja fluorescenčnega reagenta na merjenje fluorescence.

R

### 3. PLAMENSKA EMISIJSKA SPEKTROMETRIJA

Pri tej vaji boste z večtočkovno kalibracijo določili koncentracijo natrijevih in kalijevih ali natrijevih in kalcijevih ionov v modelni raztopini, ki po koncentracijah teh ionov posnema serum. Za pravilno določanje natrija, kalija in kalcija v serumu je potreben tako imenovani matrični kalibracijski material, za katerega je značilno, da je njegova sestava v celoti zelo podobna vzorcu. Sami pa boste pri tej vaji preverili, kako vpliva na rezultat določitve zamenjava predpisanega matričnega kalibracijskega materiala z neustrezno kalibracijsko raztopino, to je s čisto raztopino NaCl oz. KCl oz. CaCl<sub>2</sub>. Določitev boste enkrat opravili z matričnim drugič pa z nematričnim kalibracijskim materialom in presodili vpliv na rezultat določitve. Kalibracijski premici  $y = a_1 + b_1 x$  in  $y = a_2 + b_2 x$ , dobljeni za posamezen ion z dvema načinoma kalibracije boste primerjali s  $t$ -testom in presodili ali je med njima statistično pomembna razlika. Matematične zveze, ki jih uporabljamo za to, so povzete v nadaljevanju (enačbe 6 do 9).

Preverjanje signifikantnosti razlik standardnih napak v  $y$ -smeri:

$$F = \frac{s_{y/x\_več}^2}{s_{y/x\_manj}^2} \quad (6) \quad \text{Število prostostnih stopenj je: } n_1 - 2 \text{ in } n_2 - 2.$$

Preverjanje signifikantnosti razlik v odsekih na ordinatni osi:

$$t_a = \frac{|a_1 - a_2|}{K \left( \frac{s_{a1}^2}{s_{y/x_1}^2} + \frac{s_{a2}^2}{s_{y/x_2}^2} \right)^{1/2}} \quad (7) \quad K = \left( \frac{s_{y/x_1}^2(n_1 - 2) + s_{y/x_2}^2(n_2 - 2)}{n_1 + n_2 - 4} \right)^{1/2} \quad (8)$$

Preverjanje signifikantnosti razlik v smernih koeficientih:

$$t_b = \frac{|b_1 - b_2|}{K \left( \frac{s_{b1}^2}{s_{y/x_1}^2} + \frac{s_{b2}^2}{s_{y/x_2}^2} \right)^{1/2}} \quad (9) \quad \text{Število prostostnih stopenj je: } n_1 + n_2 - 4.$$

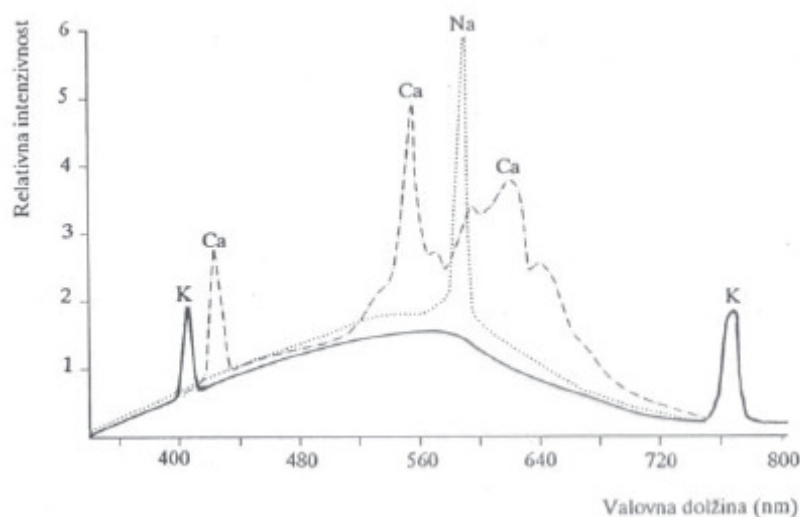
Računanje si lahko zelo olajšamo z uporabo orodja za analizo podatkov v programu MS Excel (Data Analysis/Regression). K seznanitvi s tem orodjem smo vas vzpodbudili že pri Analizni kemiji I. Zamislite si primer podatkov za izračun enačbe premice, uporabite Excelovo orodje za linearno regresijo in v Excel-ovem izpisu označite vse tiste parametre, ki jih rabimo pri presoji dveh enačb premice.



Pojav emisije svetlobe, ki je pri plamenski emisijski spektrometriji osnova kvantitativne analize, ste pri kvalitativni analizi uporabljali za identifikacijo nekaterih kationov. Katere katione ste lahko prepoznali na ta način in kako se je v prisotnosti posameznih obarval plamen?



Nekoliko si osvežimo spomin na osnove plamenske emisijske spektrometrije. Če v plamenu atomi sprejemajo zadostno količino energije, preidejo za kratek čas v vzbujeno in energijsko višje stanje. Ko pa se povrnejo spet v začetno, oddajo energijo v obliki svetlobe. Na sliki 1 so prikazani spektri oddane svetlobe za elemente Na, K in Ca.



Slika 1. Spektri za emisijo Na, K in Ca v plamenu.

Intenzivnost sevane svetlobe za posamezen element je zelo odvisna od fizikalnokemijskih pojavov v plamenu. Odvisnost med koncentracijo in intenzivnostjo emitirane svetlobe, ki ima za posamezen element značilno valovno dolžino ( $\lambda$ ), je linearna le v določenem predelu plamena, pri določenih pogojih v plamenu in le v omejenem koncentracijskem območju. Zato moramo za določanje koncentracij ionov vedno opraviti predpisano kalibracijo.

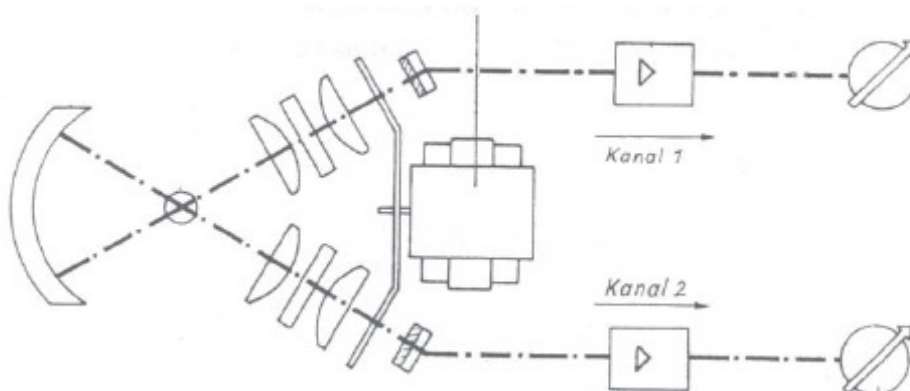
Na primeru starejšega plamenskega spektrometra FLAPHO 4, bomo razložili zgradbo in delovanje dvokanalnega instrumenta. Ta primer uporabljamo zaradi nazornosti gradnje (sliki 2 in 3). Pri delu boste uporabljali manjši, sodobnejši, štirikanalni instrument, ki je priključen na laboratorijsko plinsko omrežje; za dovod zraka pa uporablja vgrajeni kompresor.

Ob slikah 2 in 3 bomo na kratko razložili vlogo posameznih komponent plamenskega spektrometra: Vloga razpršilne komore (1) je, da se v njej ustvari pravilna zmes zraka, acetilena in zelo majhnih kapljic vzorca. Tok zraka je usmerjen v vrh kapilare, skozi katero prehaja vzorec, ki se tako razpršuje. Zmes acetilena in zraka, v katerem je razpršen vzorec, prehaja skozi cev gorilnika. Večji del vzorca kondenzira na stenah komore in izteka skozi sifon.

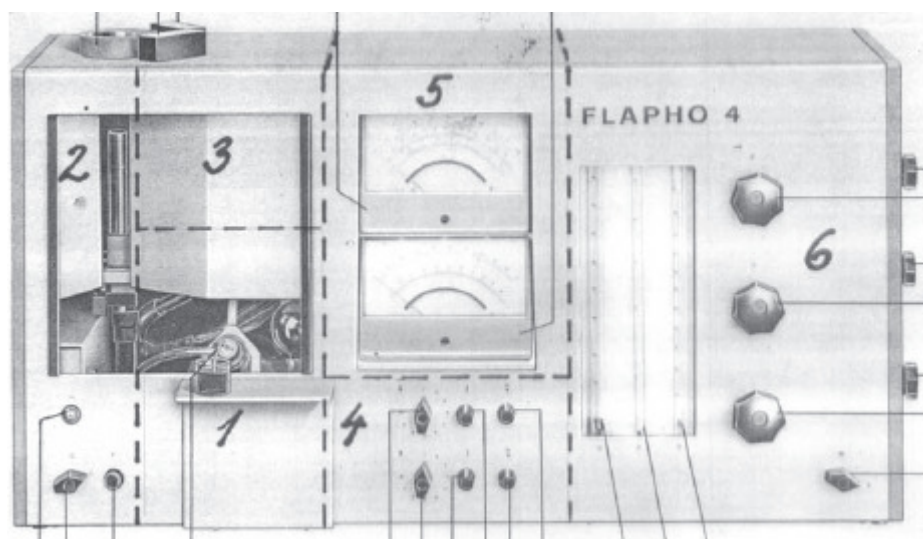
Iz plamena gorilnika (2) ob prisotnosti atomov alkalijskih oz. zemelejskoalkalijskih kovin izhaja svetlobo značilnih valovnih dolžin. Acetilen in zrak morata biti v gorilniku v takem razmerju, da dobimo temperaturo plamena 2250 °C. Del svetlobe plamena, v katerem je doseženo najintenzivnejše vzbujanje, usmerimo v filterski monokromator (3). Za vzdrževanje plamena je potrebna določena zmes zraka in acetilena. Uravnamo jo z enoto za fino regulacijo pretoka acetilena in zraka (6). Acetilen in zrak sta v jeklenkah shranjena pod zvišanim tlakom. Da lahko sočasno merimo intenzivnost sevane svetlobe dveh različnih valovnih dolžin,

uporabimo za vsak določen element ustrezen interferenčni filter. Interferenčni filtri imajo to lastnost, da prepuščajo svetlobo v ozkem pasu okrog nazivnih valovnih dolžin (Na 588 nm, K 767 nm in Ca 621 nm). V detektorju (4) plamenskega spektrometra sta dva senzorja - fotoelementa s pripadajočim ojačanjem nastalega električnega signala. Enota za pretvorbo signala in prikaz rezultatov meritev (5) dobljene električne signale preoblikuje tako, da dobimo sočasno na skalah rezultate za dva elementa. Rezultati so v arbitrarnih enotah.

Kako bi razložili, kaj je arbitrarna enota?



Slika 2. FLAPHO 4 - dvokanalni plamenski spektrometer s filtrskim monokromatorjem.



Slika 3. Plamenski spektrometer sestavljajo te enote: 1 - razpršilna komora, 2 - gorilnik, 3 - filtrski monokromator, 4 - detektor z ojačitvijo signala, 5 – enota za pretvorbo signala in prikaz rezultata meritve, 6 - enota za fino regulacijo pretoka acetilena in zraka.

Na sliki 2 označite: konkavno zrcalo, plamen, interferenčni filter, senzorja z elektronskim ojačevalnikom in prikazovalnik rezultatov meritev.



**3.-1/2 Določanje natrija s plamenskim emisijskim spektrometrom**

Pri tej vaji bo način določanja Na in K ali Na in Ca enak kot za serum, ne bomo pa uporabljali biološkega materiala. Serum bomo simulirali z raztopino anorganskih soli, v kateri bodo koncentracijske ravni posameznih sestavin podobne kot v serumu. Rezultate boste izrazili kot masne koncentracije ionov določene v razredčenih raztopinah vzorcev.

Odmerek vzorca boste dobili v 100 mL volumetrični steklenici z oznako »vzorec« in s pripisom  $K^+$  ali  $Ca^{2+}$ . Raztopino dopolnite z deionizirano vodo do oznake in premešajte. Ta raztopina je neposredno primerna za določitev koncentracije teh dveh ionov, za določitev  $Na^+$  jo morate desetkrat razredčiti.

Kalibracijo in meritev za vzorec boste za vsak ion najprej naredili z ustreznim matričnim kalibracijskim materialom. Nato boste celoten postopek ponovili še z neustreznim nematričnim kalibracijskim materialom, ki je pripravljen iz ene same soli. Natehte za pripravo osnovnih standardnih kalibracijskih raztopin povzema tabela 8.

Tabela 8. Primerjava med predpisanim in neustreznim kalibracijskim materialom, natehte veljajo za en liter raztopine

	Matrični	Samo NaCl	Samo KCl	Samo $CaCl_2$
NaCl	8,386 g	8,386 g	-	-
KCl	0,320 g	-	0,320 g	-
$CaCl_2$	0,550 g	-	-	0,550 g

Za pripravo standardnih kalibracijskih raztopin za določitev natrija pripravimo pet oštevilčenih 100 mL volumetričnih bučk. V vsako bučko z batno pipeto odmerimo volumen osnovne standardne kalibracijske raztopine z matrično sestavo, kot zahteva tabela 9. Raztopine razredčimo z dvakrat deionizirano vodo do oznake.

Tabela 9. Volumski odmerki osnovne kalibracijske raztopine za pripravo kalibracijskih raztopin za določanje  $Na^+$  v 100 mL volumetričnih steklenicah

Oznaka bučke	1	2	3	4	5
V (mL)	0,300	0,400	0,500	0,600	0,700

Pripravimo si posodice za Coulterjev števec, nanje napišemo oznake in vanje prelijemo pripravljene kalibracijske raztopine in raztopino vzorca.

Naj opozorimo še, kako moramo ravnati pri zamenjavah raztopin, ki jih razpršujemo v plamen, da ne povzročimo kontaminacije ali navzkrižne kontaminacije. Kapilaro vedno potopimo v raztopino do čim manjše globine. Zavedati se je treba, da imamo na koži natrijeve in kalijeve ione. Če se z roko dotaknemo kapilare na delu, ki ga potopimo v raztopino, lahko to vpliva na rezultat meritve. Na rezultat lahko vplivamo tudi, če nepravilno prijemljemo posodice z deionizirano vodo ali raztopinami tako, da se dotikamo notranjih sten. Prenose ali navzkrižno kontaminacijo med raztopinami preprečimo, če pred začetkom dela in po vsaki meritvi s curkom vode iz pihalke oplaknemo kontaminirani konec kapilare nad primerno posodo. Pazimo, da se s konico pihalke ne dotaknemo kapilare. Vodo z zunanjih sten kapilare popivnemo s koščkom vpojnega papirja. Nato kapilaro uvedemo v slepo ali naslednjo raztopino.




**Delo s plamenskim spektrometrom BWB-XP, Flame photometer**


Zaradi varnosti bo vklop plamenskega spektrometra na vajah opravil tehnik, ki bo tudi preverila, ali je posoda za kondenzirano vodo pravilno napolnjena z vodo in je mogoč iztok za nastali kondenz.

Plamenski spektrometer vklopimo s stikalom, ki je zadaj levo. Odpremo dotok plina. Na desni strani instrumenta je cev z odprtino, v katero s puhalko dolijemo toliko dvakrat deionizirane vodo, da začne ta iztekati iz cevi. Kapilaro oplaknemo, kot smo opisali. V posodico za Coulterjev števec nalijemo dvakrat deionizirano vodo in vanjo potopimo cevko za vsrkavanje raztopine v plamenski spektrometer. S tipko 1 prižgemo plamen v spektrometru.


1. Na zaslonu vidimo štiri možnosti. Med njimi se premikamo z navpičnima puščicama. Izberemo »Calibration« in potrdimo s tipko »Accept«. Tudi vse nadaljnje izbire potrjujemo s to tipko, zato je ne bom vselej posebej omenjali.
2. Izberemo »Calibrate Ion(s)«, potrdimo in ion, ki ga želimo določiti (Na, K ali Ca) ter potrdimo. Vpišemo število kalibracijskih raztopin in potrdimo.
3. Na ekranu se izpiše navodilo, da naj pripravimo slepo in začnemo kalibracijo. Podstavimo slepo in s tipko »Blank« sprožimo postopek nastavitve ničelne vrednosti ter počakamo.
4. Po zaključeni stopnji sistem zahteva prvo kalibracijsko raztopino (»Please apply sample«). Naredimo vse, kar smo prej opisali kot primerno ravnanje pri zamenjavah raztopin in nato podstavimo prvo kalibracijsko raztopino. Vtipkamo koncentracijo raztopine in dvakrat potrdimo, da sprožimo meritev.
5. Ko sistem opravi kalibracijo za prvo kalibracijsko raztopino, zahteva drugo. Pri tej in vseh nadaljnjih kalibracijskih raztopinah ravnamo enako, kot smo že opisali.
6. Po sklenitvi kalibracije, dobimo možnost nadaljnjih izbir. Izberemo »View Calibration«, potrdimo in opredelimo ion, za katerega smo naredili kalibracijo, potrdimo ter prepisemo merilne vrednosti kalibracije. Med meritvami se premikamo z navpičnima puščicama.
7. Raztopino vzorca pripravimo za merjenje. Z večkratnim pritiskom rdeče tipke »Back«, se vrnemo v začetni meni. Izberemo »Read Ion Levels«, pritisnemo zeleno tipko »Read« in prepisemo podatka o merilni vrednosti in koncentraciji iona v vzorcu.
8. Ko končamo vse meritve, se s tipko »Back« vrnemo do vprašanja »Turn of Flame«. Speremo kapilaro, podstavimo deionizirano vodo in pustimo, da se sistem spira vsaj dve minuti. Javimo tehniku, da smo z merjenjem končali.

Tehnik ugasne plamen s pritiskom tipke Accept in plamenski spektrometer elektronsko izklopi s preklopom glavnega stikala ter zapre dovod plina.


 Rezultati za matrični kalibracijski material

Oznaka	1	2	3	4	5	Vzorec
$\kappa_{\text{Na}}$ (mg/L) 						
Meritev (AU)						

Kalibracijo in analizo vzorca ponovimo še z nizom kalibracijskih raztopin, ki jih pripravimo iz osnovne standardne raztopin, ki vsebuje samo NaCl. Način priprave kalibracijskih raztopin in postopek merjenja je enak kot pri matričnem kalibracijskem materialu.

 Rezultati za nematrični kalibracijski material

Oznaka	1	2	3	4	5	Vzorec

$\chi_{\text{Na}}$ (mg/L) 						
Meritev (AU)						

### **3.-2/2 Določanje kalija ali kalcija s plamenskimi emisijskim spektrometrom**

Ker je kalija in kalcija v serumu bistveno manj kot natrija, ne moremo uporabiti istih matričnih kalibracijskih raztopin, kot za določitev natrija, temveč moramo iz osnovne standardne matrične kalibracijske raztopine pripraviti drugi niz matričnih kalibracijskih raztopin z manjšimi faktorji redčenja osnovne standardne raztopine. Matrične kalibracijske raztopine za določitev kalija ali kalcija pripravimo iz osnovne standardne kalibracijske raztopine z matrično sestavo tako, kot zahteva tabela 10.


Tabela 10. Volumski odmerki osnovne kalibracijske raztopine za pripravo kalibracijskih raztopin za določanje  $\text{K}^+$  ali  $\text{Ca}^{2+}$  v 100 mL volumetričnih steklenicah

Oznaka bučke	1	2	3	4	5
V (mL)	3,000	4,000	5,000	6,000	7,000

Določitev kalija ali kalcija z matričnim kalibracijskim materialom naredimo po enakem postopku, kot smo ga uporabili za natrij.

#### Rezultati za matrični kalibracijski material


Določeni ion:

Oznaka	1	2	3	4	5	Vzorec
$\chi_{\text{ona}}$ (mg/L) 						
Meritev (AU)						

Določitev kalija ali kalcija naredimo še z nematričnim kalibracijskim materialom.

#### Rezultati za nematrični kalibracijski material

Določeni ion:

Oznaka	1	2	3	4	5	Vzorec
$\chi_{\text{ona}}$ (mg/L) 						
Meritev (AU)						

Za vsak ion v MS Excelu narišite graf in na njem primerjalno prikažite kalibracijski premici dobljeni z matričnim in nematričnim kalibracijskim materialom. Dodajte trendni črti in enačbi premic ter kvadrata korelacijskih koeficientov. K poročilu priložite oba grafa.



Za vse štiri nize meritev z uporabo orodja za linearno regresijo v MS Excelu izračunajte parametre kalibracijske premice. V izpisu označite vse podatke, ki jih rabite za primerjavo parov premic s  $t$ -testom! K poročilu priložite izpise.



Poiščite tabelarni  $F$  in tabelarni  $t$  za ustrezno število prostostnih stopenj, ki ju boste rabili pri vaji.



Uporabite  $F$ -test in  $t$ -test in za vsak ion presodite ali je med kalibracijsko premico dobljeno z matričnim in tisto dobljeno z nematričnim kalibracijskim materialom statistično pomembna razlika!

R

Oblikujte sklepe, ki sledijo iz  $t$ -testa in razložite ugotovitve!

R

Izračunajte relativno napako, ki jo naredimo pri določanju Na in K ali Ca v vzorcu, če instrumenta ne kalibriramo s predpisanim matričnim kalibracijskim materialom, temveč s takim, ki vsebuje samo NaCl ali KCl ali CaCl<sub>2</sub>.



Komentirajte in razložite!

R

## 4. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Pri tej vaji boste s plinsko kromatografijo s plamensko ionizacijskim detektorjem določili koncentraciji dibutil ftalata (DBP) in dioktil ftalata (DOP) v vodovodni in ustekleničeni vodi. Ker je kromatografska analiza kar dolgotrajna, se bomo omejili na tritočkovno kalibracijo.

Ftalati so estri ftalne kisline, ki jih dodajajo plastiki za izboljšanje lastnosti. Ker v plastiki niso kovalentno vezani, se iz embalaže razmeroma lahko sproščajo v vodo, živila, zdravila ali kozmetične izdelke. Različne študije kažejo, da so ftalati zdravju škodljivi.

Koncentracije ftalatov v vodi so zelo nizke. V plinski kromatograf pa tudi ne smemo vnesti vode, zato 200 mL vzorca vode v liju ločniku ekstrahiramo z 10 mL heksana. Nadaljnje koncentriranje vzorca zagotovimo z odparitvijo heksana do suhega. Suhemu ostanku nato dodamo odmerek 0,1 mL heksana. V plinski kromatograf injiciramo 1  $\mu$ L tako pripravljenega vzorca.

Za kolikokrat po opisanem postopku koncentriramo vzorec vode?



Narišite blokovno shemo plinskega kromatografa!



Na kakšni osnovi deluje plamenski ionizacijski detektor (FID) in kakšna je njegova uporabnost?



Plinski kromatograf, ki ga boste uporabljali pri vaji, je na sliki 4. Označena sta položaja injektorja (A) in plamenskoionizacijskega detektorja (B).



Slika 4. Plinski kromatograf Hewlett Packard HP 5890 Series II GC z oznakama položaja injektorja (A) in plamenskoionizacijskega detektorja (B).

**4.-1/1 Določanje ftalatov v vodi s plinsko kromatografijo**

**Osnovno standardno raztopino dibutil ftalata (DBP)** z masno koncentracijo 1 g/L pripravimo tako, da v suho 100 mL volumetrično steklenico s pomočjo kapalke točno natehtamo približno 0,10 g DBP in z acetonom raztopino dopolnimo do oznake ter premešamo.

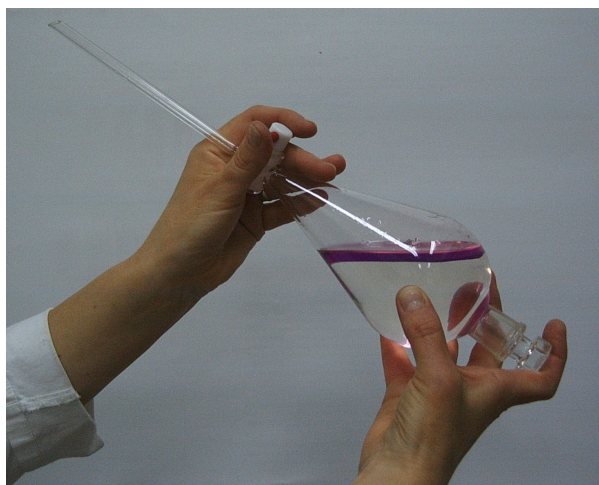
**Osnovno standardno raztopino dioktil ftalata (DOP)** z masno koncentracijo 1 g/L pripravimo tako da, v suho 100 mL volumetrično steklenico s pomočjo kapalke točno natehtamo približno 0,10 g DOP in z acetonom raztopino dopolnimo do oznake ter premešamo.

**Kombinirane standardne kalibracijske raztopine** dibutil ftalata in dioktil ftalata v heksanu pripravimo v suhih 10 mL volumetričnih steklenicah z odmerjanjem osnovnih standardnih raztopin DBP in DOP s koncentracijo 1 g/L, kot je povzeto v tabeli 11. Raztopine v bučkah s heksanom dopolnimo do oznake in premešamo.

Tabela 11. Priprava kombiniranih standardnih kalibracijskih raztopin v 10 mL volumetričnih steklenicah

Kalibracijska raztopina	1	2	3
$V_{\text{DBP}_1\text{ g/L}}$ (mL)	0,2	0,5	1
$c_{\text{DBP}}$ (mg/L)	20	50	100
$V_{\text{DOP}_1\text{ g/L}}$ (mL)	0,2	0,5	1
$c_{\text{DOP}}$ (mg/L)	20	50	100

**Vzorec vode** pripravimo za analizo tako, da v 500 mL lij ločnik s 100 mL polnilno pipeto prenesemo 200 mL vzorca vode in z 10 mL polnilno pipeto dodamo 10 mL heksana. Vzorec ekstrahiramo s pet-minutnim stresanjem lija ločnika. Ker se v liju ločniku med stresanjem dveh tekočin, ki se ne mešata, povečuje tlak, stresanje večkrat prekinemo in izravnamo tlak z zunanjim zračnim tlakom tako, da odpremo ventil v položaju, ki ga prikazuje slika 5.



### Slika 5. Izravnavanje tlaka v liju ločniku na zunanji zračni tlak

Po končanem stresanju odložimo lij ločnik v obroč na stojalu in počakamo, da se fazi ločita. Vodno fazo ločimo od heksanske tako, da jo izpustimo iz lija ločnika skozi iztočno cevko v čašo in zapremo ventil tik predenj bi začela iztekati heksanska faza. Vodno fazo zavržemo. Heksansko fazo iztočimo v 50 mL čašo in ji za odstranitev ostankov vode dodamo 1 do 2 žlički  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Nato brezvodno heksansko fazo oddekantiramo v epruveto z obrušom in jo zapremo z zamaškom. Postopek ponovimo še z drugim vzorcem vode.

Epruveti z obema vzorcema, damo v čašo z vročo vodo in v vsako epruveto uvedemo cevko za prepihanje z dušikom tako, da cevki ne segata v tekočino. Dušik dovajamo toliko časa, da ves heksan izhlapi in ostane samo suh ekstrakt. Potem odstranimo cevke za prepihanje, epruveti dvignemo iz kopeli in obrišemo njuni zunanji steni. V vsako epruveto odmerimo 0,1 mL heksana in jo takoj zapremo.

### **Delo s plinskim kromatografom Hewlett Packard HP 5890 Series II GC**

Aparaturo vklopi in pripravi za delo strokovno usposobljena oseba.

Najprej odpremo jeklenko z dušikom, nato vklopimo plinski kromatograf ter nato prižgemo računalnik.

Začetno temperaturo kolone 50 °C nastavimo na plinskem kromatografu z zaporedjem tipk »OVEN TEMP«, »5«, »0«, »ENTER«. Segrevanje detektorja in injektorja na delovno temperaturo sprožimo s tipkami »DET A TEMP«, »ON«, »INJ A TEMP«, »ON«.

Na namizju odpremo program Instrument 3 (Online).

Ko se detektor in injektor segrejeta na delovno temperaturo, najprej odpremo jeklenko s komprimiranim zrakom in nato pa še jeklenko z vodikom. V skrajnem levem zgornjem kotu kromatografa so trije ventili za dovod plinov v kapilarno kolono kromatografa. Ventile »AUX GAS«, »AIR« in »HYDROGEN« odvijemo v levo, do konca.

Plamen plamenskoionizacijskega detektorja, ki je desno pod pokrovom kromatografa, prižgemo z vžigalnikom ob pritiku gumba »FID IGNITION«. Na tipkovnici kromatografa dvakrat pritisnemo »SIG 1«. Na digitalnem prikazu na plinskem kromatografu, se izpiše »SIGNAL 1«. Vrednost mora biti približno 10.

Šele, ko se v programu Instrument 3 (Online) levo zgoraj izpiše »Ready« in se polje okrog napisa obarva zeleno, lahko začnemo z injiciranjem. Raztopino za injiciranje v plinski kromatograf odmerimo z brizgo tako, da brizgo najprej večkrat zapored popolnoma napolnimo z raztopino in jo izpraznimo ter šele nato odmerimo točno 1  $\mu\text{L}$  raztopine, kar naredimo tako, da bat najprej premaknemo do oznake 3  $\mu\text{L}$  in šele nato iglo potopimo v raztopino ter bat potegnemo do oznake 4  $\mu\text{L}$ . Potem iglo dvignemo iz raztopine in bat premaknemo še vsaj za eno oznako višje ter preverimo, če je odmerek res točno 1  $\mu\text{L}$ .

V injektor desničar injicira odmerek tako, da zgornji del brizge prime z levo roko in z mezinco iste roke podpre spodnji del ter previdno prebode septo injektorja, pri čemer si

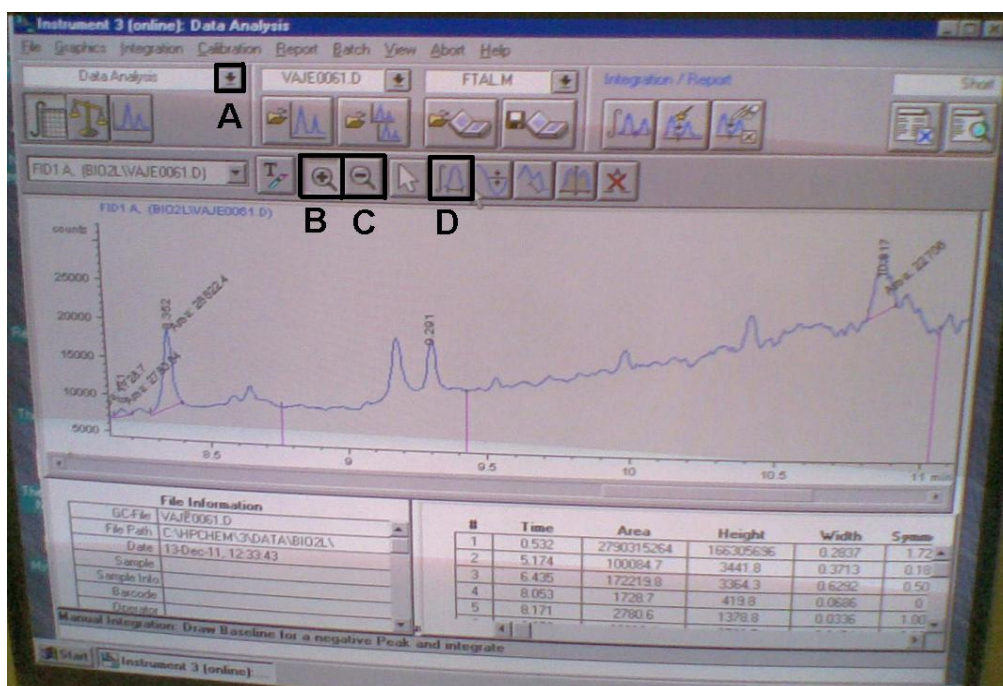
lahko pomaga še z drugo roko. Nato umakne meziniec in iglo potisne do skrajne mogoče lege. Z desnico nato previdno potisne bat igle navzdol.

Takoj po končanem injiciranju pritisnemo na tipkovnici kromatografa gumb »Start« in počakamo, da se na kromatogramu izriše navpična, rdeča črta. Šele potem previdno izvlečemo iglo iz injektorja in jo večkrat speremo s heksanom.

Počakamo, da se kromatogram v celoti izriše, kar traja 15 minut oz. se izrišejo vrhovi za topilo in obe snovi. Snemanje kromatograma predčasno prekinemo s pritiskom gumba »Stop« na tipkovnici ali v programu, pod napisom »Run in Progress; Data Acquisition«.

Po pritisku gumba »Stop« se v programu Instrument 3 (Online) izpiše »Not Ready« in polje okoli napisa se obarva rdeče. Za naslednje injiciranje moramo počakati, da se levo zgoraj ponovno izpiše »Ready«.

Za **ročno integriranje vrhov** v programu Instrument 3 (Online) v zgornjem levem kotu zraven napisa »Method and Run Control« pritisnemo gumb s puščico navzdol in izberemo možnost »Data Analysis«. Odpre se kromatogram, kot vidimo na sliki 6.



Slika 6: Kromatogram v programu Instrument 3 (Online) in gumbi: za izbiranje možnosti "Method and Run Control" in "Data Analysis", A; za povečavo označenih delov kromatograma, B; za pomanjšavo označenih delov kromatograma, C; za ročno integriranje vrhov D.

Najprej pritisnemo gumb za pomanjšavo, potem gumb za povečavo in označimo območje med osmimi in enajstimi minutami ter povečujemo toliko časa, da sta vrhova pri retencijskih časih 8,2 min (DBP) in 10,8 min (DOP) lepo vidna. Pritisnemo gumb za ročno integriranje in oba vrhova integriramo.

Rezultate meritev zeberite v preglednici, ki je na koncu opisa te vaje.

Po končanem integriranju pritisnemo gumb za izbiranje možnosti zraven napisa »Data Analysis« in izberemo možnost »Method and Run Control«. Če je v levem zgornjem kotu izpisano »Ready« in je polje okoli napisa obarvano zeleno, lahko injiciramo naslednjo raztopino.

Ko je delo s kromatografom končano, počakamo, da se v levem zgornjem kotu izpiše »Ready« in je polje okoli napisa obarvano zeleno. Nato lahko začnemo s **postopkom izklapljanja**. Na tipkovnici plinskega kromatografa pritisnemo tipke »INJ A TEMP«, »OFF«, »DET A TEMP«, »OFF«, »OVEN TEMP«, »3«, »0« in »ENTER« in tako ugasnemo injektor in detektor; kolona pa se začne ohlajati.

Zapremo računalniški program in računalnik ugasnemo.

Najprej zapremo ventil za dovod vodika z vrtenjem gumba do konca v desno (»HYDORGEN«), nato zapremo ventil za komprimiran zrak (»AIR«) in na koncu še za dušik (»AUX GAS«). Potem zapremo še jeklenki z vodikom in komprimiranim zrakom.

Počakamo, da OVEN TEMP pade na 30°C. Ohlajanje spremljamo tako, da na tipkovnici pritisnemo gumb »OVEN TEMP« in se izpiše OVEN TEMP in zraven resnična in nastavljena temperatura. Ko se kolona ohladi na 30°C izklopimo plinski kromatograf s stikalom, ki je desno spodaj. Na koncu zapremo jeklenko z dušikom.

Rezultate meritev zberite v preglednici! V MS Excelu narišite kalibracijski graf s prikazom obeh premic in z njunima trendnima črtama ter kvadratoma korelacijskih koeficientov!



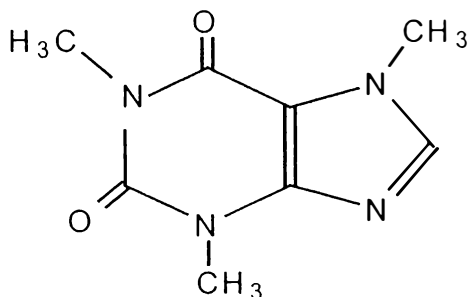
Raztopina	C <sub>DBP</sub> ali DOP (mg/L)	Retencijski čas (min)		Ploščina vrha (AU)	
		DBP	DOP	DBP	DOP
1	20				
2	50				
3	100				
Vzorec 1	?				
Vzorec 2	?				

Izračunajte rezultate določitve koncentracije DBP in DOP v ekstraktu heksana in koncentraciji v vzorcih vod.



## Določanje kofeina s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti

Kofein je alkaloid v kavi, pravem čaju in pripravkih iz nekaterih drugih rastlin (npr. čaj maté, prašek guarana), dodajajo pa ga tudi nekaterim brezalkoholnim pijačam (Coca Cola, Red Bull, ledeni čaji...). Ima poživljajoč učinek, dviga krvni tlak in zmanjšuje občutek utrujenosti. V športu velja za prepovedano poživilo.



*Strukturna formula kofeina*

Tekočinska kromatografija je zelo primerna metoda za določanje kofeina v zgoraj naštetih napitkih in pijačah, kjer je v dovolj visoki koncentraciji, da lahko vzorce direktno analiziramo. Za analizo drugih vzorcev, npr. krvi ali urina pri ugotavljanju dopinga v športu, pa je potrebno vzorec predhodno obdelati in skoncentrirati kofein, za kar se običajno uporablja ekstrakcija.

Pri tej vaji boste torej določali vsebnost kofeina v realnem vzorcu - eni od zgoraj naštetih napitkov ali pijač, ki jih gotovo poznate. V ta namen boste uporabili tekočinsko kromatografijo in se pri tem naučili, kako se v kromatografski sistem pravilno vnaša vzorec, kateri so sestavni deli tekočinskega kromatografa in kako rokujemo z njimi. Hkrati boste spoznali, kako ugotovimo učinkovitost kromatografskega sistema z računanjem nekaterih parametrov. Znanje ves čas nadgrajujete, vendar ne smete pozabljati, kar ste se že naučili, zato boste pri tej vaji tudi obnovili, kako pridobiti podatke za umeritveno premico in kako jo izračunati po metodi najmanjših kvadratov.

Najprej pa poglobljeno spoznajte kromatografijo: je analizna tehnika, ki je pravkar praznovala 100. rojstni dan. Prvič jo je l. 1902 uporabil M. Cvet za ločitev barvil iz rastlinskih listov. Kasnejša nobelovca Martin in Synge sta l. 1941 razvila teorijo porazdelitvene kromatografije. Zavedajoč se, da je le model, ki nam pomaga razumeti dogajanje pri kromatografiji, pojme iz njune teorije uporabljamo še danes.

V letih od prvega poskusa se je kromatografija razcepila v številne veje. Zlasti tekočinska kromatografija visoke ločljivosti pa je v zadnjih tridesetih letih doživela silovit razvoj in se uveljavila kot ena poglobljenih analiznih metod predvsem v laboratorijih farmacevtskih tovarn.

Uporabite že pridobljeno znanje in narišite čimbolj popolno delitev kromatografije na posamezne veje v obliki razvejanega diagrama.



Kromatografija je **separacijska** in določitvena tehnika. Razložite, kaj pri njej ločujemo in kaj določamo.



Pri kromatografiji poznamo **stacionarno fazo** in **mobilno fazo (eluent)**. Razložite oba pojma in razliko med njima. Ali sta izraza *mobilna faza* in *eluent* vedno enakovredna?

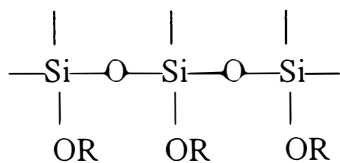


Stacionarna faza so pri tekočinski kromatografiji drobni trdni delci v kovinski cevki. Na vrh te faze nanese vzorec, nakar črpamo skozi cevko tekočino - mobilno fazo. Posamezne sestavine vzorca se ločijo med seboj glede na to, kako hitro potujejo skozi cevko - **kromatografsko kolono**.

Razložite, zakaj posamezne komponente vzorca potujejo skozi kolono z različno hitrostjo. Na podlagi katerih lastnosti se ločijo med seboj?



Najpogosteje je osnova stacionarne faze silikagel (hidratiziran silicijev dioksid), ki je pogosto kemijsko modificiran:



Kakšna je površina delcev stacionarne faze (polarna ali nepolarna), če je R vodikov atom? Kaj pa če je R alkilna veriga, npr.  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ ?



Mobilno fazo izberemo tako, da ima nasprotno polarnost od stacionarne faze. Je mešanica organskih topil ali organskih topil in vode oz. pufnih raztopin.

Razmislite in napišite: če imamo nepolarno stacionarno fazo in polarno mobilno fazo, katere komponente vzorca bodo prve prišle skozi kolono: bolj polarne ali bolj nepolarne?



Kakšna je vloga detektorja v kromatografskem sistemu?



Zakaj je signalni izhod detektorja vezan na računalnik ali integrator?



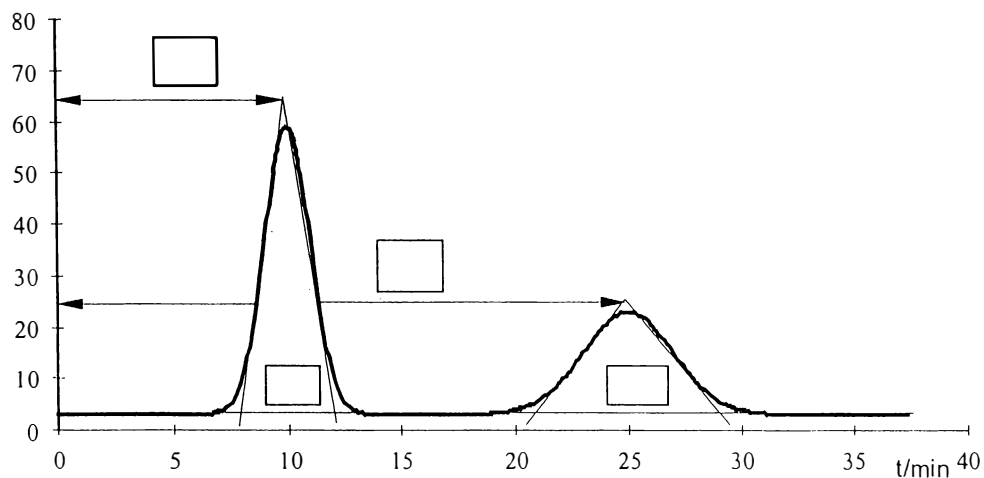
Razložite, kaj je kromatogram.



Kako se na kromatogramu odražajo posamezne komponente, ki prihajajo iz kolone na detektor?



Spodnji kromatogram opremite z ustreznimi oznakami, ki jih vpišite v označene okvirčke.



Kako označimo retencijski čas, kako širino kromatografskega vrha na bazni (osnovni) liniji in kako širino na polovici višine kromatografskega vrha? Pripišite še enote za vse navedene količine.



Kako bi opisali, kaj ponazarja retencijski čas?



Razmislite, kakšne vrhove želimo imeti pri kromatografiji.



Ločenost vrhov ovrednotimo z **ločljivostjo (R)**. Napišite ustrezno formulo zanjo in enote, v katerih jo podajamo.



Izračunajte ločljivost za kromatografska vrha s slike na prejšnji strani.



Teorija porazdelitvene kromatografije, ki smo jo omenili na začetku, primerja porazdeljevanje komponent mešanice med prehodom skozi kromatografsko kolono s procesom destilacije v kolonah. Pri slednjem so v navpični koloni **prekati** ali **pod**, na vsakem izmed njih se na novo vzpostavi ravnotežje med bolj hlapno in manj hlapno komponento. Če več prekatov je v koloni, tem bolje se bosta komponenti ločili med seboj. Pri kromatografski koloni v resnici ni nikakršnih prekatov, vendar kljub temu govorimo o njih za ponazoritev učinkovitosti kolone pri separaciji. Pojma, ki ju uporabljamo, sta **število teoretskih prekatov (N)** in **višina teoretskega prekata (H)**.

Napišite obe formuli za izračun števila teoretskih prekatov na kolono. V kakšnih enotah ga podajamo?



Število teoretskih prekatov velja vedno le za neko določeno spojino pri določenih kromatografskih pogojih (kolona, mobilna faza). Lahko ga podajamo tudi na dolžinsko enoto (npr. meter). V tem slučaju število teoretskih prekatov na kolono delimo z dolžino kolone.

Višino teoretskega prekata označimo s **H** in podajamo v mm. Napišite formulo zanjo.



Iz slike kromatograma na strani 3 izračunajte **N** in **H** za drugi vrh, če je dolžina kromatografske kolone 25 cm.



Narišite blokovno shemo aparature, ki jo potrebujemo za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (*angl. high performance liquid chromatography - HPLC*). Poimenujte posamezne enote.



Razložite vlogo in delovanje **kromatografske črpalke**. Kakšno vrsto črpalk uporabljamo?



Zaradi majhnih premerov kolon in tesno stisnjene stacionarne faze v njih nudijo kolone velik upor pretoku mobilne faze, zato prihaja do visokega tlaka v sistemu (do 400 bar).

Na črpalkah, izdelanih v ZDA, je skala za merjenje padca tlaka pogosto v enotah **psi** (pound per square inch - funt na kvadratni palec):

1 psi ustreza  $6,84 \cdot 10^3$  Pa oz. 0,0684 bara.

Izračunajte, koliko psi bi ustrezalo tlaku 400 barov.



Razložite pojma izokratske elucije in gradientne elucije. Kdaj je primerno uporabiti prvo in kdaj drugo?



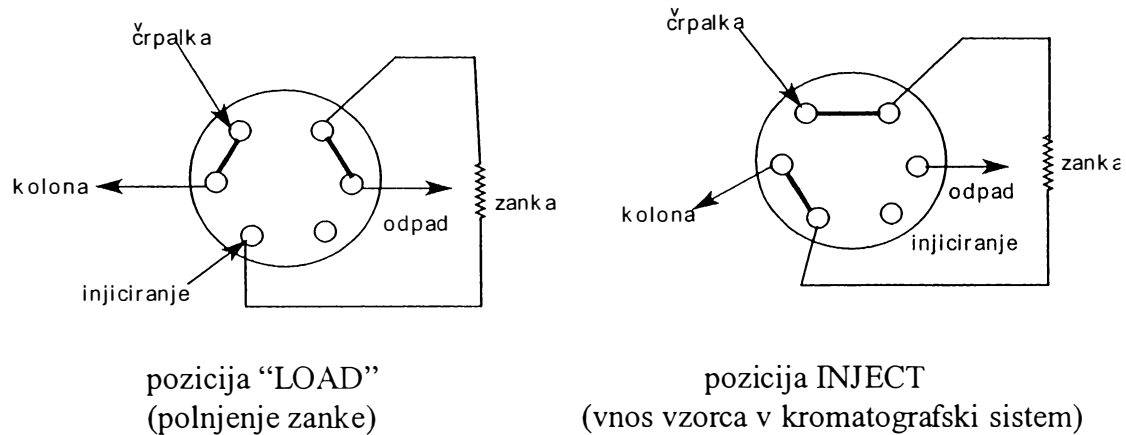
Kako v kromatografskem sistemu zagotovimo gradientno elucijo? Ali jo je možno doseči tudi z uporabo izokratskih črpalk?



Če sestavine mobilne faze pred uporabo sami zmešamo v določenem razmerju, moramo to zmes pred uporabo razpliniti, t.j. odstraniti mehurčke. Ti so namreč v tekočinskih kromatografih velika nadloga, saj se "zataknejo" v njih in se sprehajajo skozi detektor ter tako povzročajo nastanek lažnih vrhov.

Pri črpalkah vedno spremljamo dva parametra: pretok mobilne faze skozi kromatografski sistem, ki ga sami nastavimo, in tlak v kromatografskem sistemu. Ta je odvisen od pretoka in viskoznosti mobilne faze, dolžine kolone, velikosti in oblike delcev stacionarne faze ipd.

Za črpalko je **injektor**, s katerim vnesemo vzorec v kromatografski sistem. Ne pozabimo, s kako visokimi tlaki imamo opraviti pri tekočinski kromatografiji, zato je pač nesprejemljivo, da bi sistem na kakršenkoli način odpirali med vnosom vzorca. Injektor pa je v svojem bistvu ventil z dvema pozicijama. Prva pozicija "LOAD" je namenjena vnosu tekočega vzorca v posebno zanko injektorja, katere prostornina določa, koliko vzorca bo šlo v kolono. Ko injektor obrnemo na pozicijo "INJECT", mobilna faza steče skozi zanko, ki smo jo bili poprej napolnili z vzorcem, in le-tega spere v začetni del kolone.



Shema injektorja

Posebno pozorni moramo biti, da preklope iz ene v drugo pozicijo izvedemo hitro, vendar ne sunkovito. Oglejte si shemo injektorja in poskusite razložiti, zakaj.



Jedro kromatografskega sistema je **kromatografska kolona**, ki je napolnjena s stacionarno fazo. Vsaka kolona je opremljena s podatki o proizvajalcu, tipu stacionarne faze in velikosti delcev le-te ter o dimenzijah kolone.

Za kolono je **detektor**. Poznamo jih več vrst, izberemo pa ga glede na lastnosti spojin, ki jih analiziramo. Pri vaji boste uporabljali detektor, ki meri absorbanco svetlobe v ultravijoličnem ali vidnem območju in je primeren za detekcijo večine organskih spojin. Gre pravzaprav za spektrometer s pretočno celico, ki jo presvetljuje s svetlobo določene valovne dolžine.

Napišite matematični izraz za Beerov zakon in matematično zvezo med absorbanco in transmitanco. Pojasnite vse simbole, ki nastopajo v teh izrazih, in definirajte enote zanje.



Signal z detektorja spremlja **integrator**; namesto njega lahko uporabimo tudi zapisovalnik (rekorder) ali računalnik. Integrator izriše kromatogram, s katerega lahko odčitamo, po kakšnem času se je neka spojina eluirala iz kolone (retencijski čas). Ploščina ali višina vrha za to spojino je sorazmerna absorbanco in s tem koncentraciji te spojine. Po končani analizi sledi izpis, kjer je za vsak vrh na kromatogramu podan retencijski čas, ploščina oz. višina vrha, način, kako jo je integrator izračunal, širina vrha na polovici njegove višine ter delež, ki ga ta vrh predstavlja glede na skupno ploščino vseh vrhov na kromatogramu.

Za vas so v tem izpisu zanimivi podatki o retencijskem času, ploščini vrha in širini vrha na polovici njegove višine. Iz prvega in zadnjega podatka lahko izračunate število teoretskih prekatov in višino teoretskega prekata za neko spojino ter ločljivost med vrhovi v kromatogramu. Retencijski čas pa je pravzaprav tudi edino merilo za prepoznavanje spojin v kromatografiji, je torej **kvalitativni podatek**, ki ga razberemo s kromatograma. Prepoznavanje poteka s pomočjo standardnih raztopin spojin, ki jih pričakujemo v analiziranem vzorcu. Retencijski časi spojine iz standardne raztopine in spojine v vzorcu se smejo razlikovati največ za standardni odmik retencijskega časa, če naj spojino iz vzorca prepoznamo kot (verjetno) identično tisti iz standarda. "Verjetno" zato, ker zaradi neselektivnosti večine detektorjev pri kromatografiji samo na osnovi retencijskega časa ne moremo biti nikoli povsem prepričani, da gre za isto spojino oz. za eno samo spojino.

Ploščina vrha je **kvantitativni podatek**, saj je v nekem območju premo sorazmerna koncentraciji te spojine v vzorcu. Kakšno je to območje in kakšna je enačba odvisnosti ploščine vrha od koncentracije spojine, pa nam pove umeritvena premica.

Napišite izraze za izračun smernega koeficienta umeritvene premice, odseka na ordinati in korelacijskega koeficienta.



### **Vaja: določanje kofeina v različnih pijačah z metodo tekočinske kromatografije**

Cilj naloge je, da določite koncentracijo kofeina v nekem napitku ali pijači. Najprej boste pripravili pet kalibracijskih raztopin z različnimi masnimi koncentracijami kofeina, ki jih boste nato injicirali v kromatografski sistem in iz kromatogramov odčitali ploščine vrha za kofein. Iz teh podatkov boste izračunali parametre umeritvene premice za kofein ( $a$ ,  $b$  in  $r$ ). V kromatografski sistem boste še trikrat injicirali po potrebi razredčen vzorec pijače, ki vsebuje kofein, izračunali koncentracijo le-tega v vzorcu in podali rezultat s pravilnim številom signifikantnih mest.

#### **Potrebujete:**

##### Aparature:

- kromatografski sistem

##### Pribor:

- 50-mL merilne bučke
- pipete za odmerjanje osnovne standardne raztopine kofeina in vzorca
- brizga za vnos raztopin v kromatografski sistem

##### Kemikalije:

- osnovna standardna raztopina kofeina ( $\gamma = 1 \text{ gL}^{-1}$ )
- posebna prečiščena voda za HPLC (MilliQ)

Za pripravo kalibracijskih raztopin imate na voljo osnovno standardno raztopino kofeina v prečiščeni vodi z masno koncentracijo  $1 \text{ gL}^{-1}$  in 50-mL merilne bučke.

*Izračunajte, koliko mL osnovne standardne raztopine boste odmerili v merilne bučke, da po redčenju do oznake dobite naslednje masne koncentracije kofeina:*

$\gamma \text{ (gL}^{-1}\text{)}$	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10
V (mL)					





*Pripravite kalibracijske raztopine tako, da standardno raztopino, odmerjeno v merilno bučko, dopolnite do oznake s posebno prečiščeno vodo za kromatografijo.*

*Razredčiti je potrebno naslednje vzorce: kava - 20X, pravi čaj - 10X. Ostalih vzorcev ne redčite. Če vsebuje vzorec raztopljen ogljikov dioksid, ga razplinite v ultrazvočni kopeli (10 min).*

*Oglejte si sistem za tekočinsko kromatografijo, s katerim boste delali.*

Kje na črpalki je tipka za nastavitev pretoka in kje prikazovalnik tlaka?



Kolikšen je pretok mobilne faze skozi vaš sistem? Kolikšen je tlak v vašem sistemu? Preračunajte ga v Pa ali bare.



Kolikšen volumen ima zanka injektorja?



Oglejte si kromatografsko kolono in izpišite njene karakteristike.



*Oglejte si detektor. Kje na njem je gumb za nastavitev valovne dolžine merjenja? Pri kateri valovni dolžini merimo absorbanco kofeina?*



*Na detektorju boste med delom uporabljali še zaslon za prikaz absorbance in tipko z oznako "AUTOZERO".*

*Razmislite in napišite: kaj dosežete z uporabo funkcijske tipke "AUTOZERO"?*



*Oglejte si integrator in na njem poiščite tipki "START" in "STOP".*

*Oglejte si brizgo (siringo), ki jo boste uporabljali za injiciranje vzorca v kromatografski sistem. Ima stekleno ohišje z graduacijo in kovinski bat.*

Koliko je nazivni volumen brizge? Koliko lahko z njo najmanj odmerimo?



V tekočinski kromatograf najprej injicirate kalibracijsko raztopino z najnižjo koncentracijo. Razmislite, zakaj.



*V brizgo nekajkrat (4-6x) vsesate raztopino, ki jo boste injicirali, in jo zavržete v čašo za odpad. Nato zopet vsesate raztopino v brizgo: konica igle je potopljena v raztopino, stekleno ohišje držite s palcem in prstancem desne (levičarji leve) roke in s kazalcem ter sredincem iste roke počasi povlečete bat navzgor. V brizgo vsrkate približno dvakrat večji volumen, kot je volumen zanke injektorja. Zatam napolnjeno brizgo previdno primete še z drugo roko in jo obrnete v vodoravni položaj. Medtem ko jo čvrsto držite z levo roko, s sredincem desne roke učvrstite položaj bata tako, da ga ves čas rahlo potiskate iz centra proti stekleni steni brizge. Hkrati brizgo počasi obračate v navpični položaj z iglo navzgor. V tekočini, ki je v brizgi, so verjetno tudi mehurčki zraka, ki jih nikakor ne smete vnesti v kromatografski sistem, zato jih je potrebno iztisniti: medtem ko držite brizgo z iglo navzgor in zlasti pazite, da ne izpade bat, s prsti proste roke nekajkrat narahlo krcnete stekleno ohišje, da se mehurčki odlepijo in splavajo na vrh, nakar jih iztisnete. Iztisnete še kapljico tekočine.*

*Injektor preklopite v položaj "LOAD" in potisnite iglo brizge do konca v odprtino injektorja, pri tem pa s prstom ves čas fiksirate bat. V zanko injektorja iztisnite vso tekočino iz brizge. Odvečna bo stekla v čašo za odpad. Pritisnite gumb "AUTOZERO" na detektorju. Z desno roko obrnite ventil injektorja v položaj "INJECT" in hkrati z levo roko pritisnite tipko "START" na integratorju. Izvlecite brizgo iz injektorja in jo vsaj 10X sperite s prečiščeno vodo.*

*Integrator zapisuje signal, absorbanco pa lahko vidite tudi na prikazovalniku detektorja. Absorbanco mobilne faze, ki prihaja iz kromatografske kolone v detektor, ste pri valovni dolžini detekcije nastavili na nič. Ko iz kolone v detektor pride kofein, se absorbanca zviša, na kar se integrator ustrezno odzove in izriše kromatografski vrh ter ga označi z retencijskim časom. Kadar se izrisovanje kromatograma ustavi, integrator izračuna ploščine, višine in širine na polovici višine vrha za vse kromatografske vrhove. Oglejte si izpis integratorja in poiščite navedene parametre. Sedaj lahko injicirate naslednjo raztopino v kromatografski sistem.*

*Potem ko ste injicirali vse kalibracijske raztopine v zaporedju od tiste z najnižjo koncentracijo do tiste z najvišjo, trikrat injicirajte še vzorec oz. razredčeno raztopino vzorca. Ker vzorec ne vsebuje samo kofeina, boste na kromatogramu dobili večje število vrhov.*

*Po končanem delu pomijte steklovino, ki ste jo uporabljali za pripravo kalibracijskih raztopin in vzorca. Na koncu jo oplaknite s posebno prečiščeno vodo za HPLC. Aparate ugaša asistent!*

## Določanje kofeina v pijačah s tekočinsko kromatografijo (Poročilo o analizi)



### 1) Meritve in računi

Pogoji kromatografske analize:

Tip in dimenzije kolone:

Mobilna faza:

Pretok mobilne faze:

Padec tlaka na koloni:

Prostornina injektorske zanke:

Valovna dolžina detekcije:

Hitrost papirja na integratorju:

*Glede na polarnost mobilne faze presodite, ali je stacionarna faza v vaši koloni polarna ali nepolarna.*

*R*

Umeritvena premica:

$\gamma/\text{gL}^{-1}$	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10
pl. vrha					

*Iz zgornjih podatkov narišite graf odvisnosti ploščine vrha od masne koncentracije kofeina. Presodite, ali gre za linearno zvezo.*

*R*

*Po metodi najmanjših kvadratov izračunajte parametre umeritvene premice: naklon ali smerni koeficient, odsek na ordinatni osi, korelacijski koeficient.*

*R*

Analiza vzorca:

Vrsta vzorca:

Predpriprava vzorca: redčenje \_\_\_\_\_-krat

Ploščina vrha za kofein:

- 1.
- 2.
- 3.

*Iz podatkov za umeritveno premico izračunajte masno koncentracijo kofeina v injicirani raztopini vzorca za vsako ponovitev. Izračunajte povprečno vrednost. Končni rezultat analize podajte z ustreznim številom signifikantnih mest in upoštevajte morebitno razredčitev.*

*R*

Učinkovitost kromatografskega sistema:

*Na osnovi poljubnega kromatograma, ki ste ga danes posneli, izračunajte število teoretskih prekatov ( $N$ ) in višino teoretskega prekata ( $H$ ) za kofein pri uporabljenih kromatografskih pogojih.*

*R*

**2) Rezultat analize**

*Napišite enačbo umeritvene premice in korelacijski koeficient ter končni rezultat določitve masne koncentracije kofeina v vzorcu. Opredelite učinkovitost kromatografskega sistema za ločitev kofeina.*

*R*