



 FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO 

Darinka Brodnjak Vončina

ANALIZNA KEMIJA II

Zbrano gradivo

Maribor, maj 2006

Instrumentalna kemijska analiza:

Fizikalno kemijske metode (signal: optična gostota, potencial, tok...). Ker potrebujemo za meritve instrumente, je to Instrumentalna kemijska analiza:

- 1. Elektrokemijske analizne metode – zasledujemo spremembe elektrokemičnih lastnosti**
- 2. Optične metode**

Spektrometrične analizne metode – proučevanje spektrov vzorčnih raztopin, kvali- in kvantitativni rezultati. Podatki o zgradbi, strukturi spojin in o lastnostih spojin:

Natančnejša identifikacija: IR ,
UV/VIS spektrofotometrija,
plamenska emisijska spektroskopija
atomska absorpcijska spektroskopija,
NMR, masna spektroskopija (MS) itd.

3. Separacijske metode

Komponente v vzorcu je potrebno predhodno ločiti, da lahko nato vsako posebej kvantitativno določimo.

– KLASIČNA ANALIZA:

Klasične ali mokre kemijske analize kot n.pr. titrimetrija in gravimetrija se še vedno precej uporabljajo. Te metode uporabljamo pri analizi referenčnih standardnih materialov, kadar je zahtevana velika natančnost in točnost ali pa kadar imamo na razpolago malo vzorca.

Klasična analiza je dolgotrajna, potrebno veliko spretnosti, koncentracije do 10^{-3} mol/L,

Absolutna metoda-

rezultat izhaja iz stehiometrijskega razmerja, dobimo ga direktno iz ml porabe-volumetrija ali iz iztehte ob uporabi gravimetričnega faktorja-gravimetrija.

Instrumentalna analiza

- široko koncentracijsko območje od 10^{-1} mol/L do 10^{-10} mol/L.

Relativna metoda

Kalibracija je eden najvažnejših postopkov v kemijski analizi. Razen v nekaj primerih (n.pr. elektrogravimetrija) koncentracije vzorca ne merimo direktno, ampak jo določimo z merjenjem neke druge fizikalne količine, y . Pogoji za to je, da obstaja empiričen ali teoretičen odnos med to količino in koncentracijo. Kalibracijsko krivuljo lahko dobimo, da postavimo matematični model, ki se prilega k eksperimentalnim podatkom. Najbolj običajna in uporabna kalibracijska krivulja je linearna, ki gre skozi središče in je uporabna v širokem dinamičnem

območju. V praksi pa so seveda odstopanja od te idealne kalibracijske premice. Dobro znana je n. pr. ukrivljenost kalibracijske premice proti x osi v zgornjem koncentracijskem območju pri spektroskopskih metodah.

Ni dvoma, da se danes večina analiz opravi z instrumentalnimi metodami. Tehnike kot absorpcijska in emisijska spektroskopija, različne elektrokemijske metode, masna spektrometrija, plinska in tekočinska kromatografija, termične in radiokemijske metode zavzemajo več kot 90% analitskega dela. Za to je več vzrokov: Instrumentalne metode so mnogo bolj občutljive kot klasične. Z ICP spektrometrijo lahko določimo več elementov istočasno v zelo nizkih koncentracijah, s kombinacijo kromatografije in masne spektrometrije pa lahko v nekaj minutah določimo veliko komponent v kompleksni organski mešanici. Območje je pri klasični analizi 2 do 3 rede velikosti, pri instrumentalnih metodah pa 6 ali več. Instrumentalne metode so v splošnem hitrejše in cenejše kot klasične metode. Tako je potrebno n.pr. v ekologiji večkrat analizirati na stotine vzorcev dnevno, zato je večina instrumentalnih metod tudi avtomatizirana. Takšno delo zahteva tudi računalniško obdelavo podatkov, zato je večina instrumentov povezana z računalniki.

Postopek kalibracije

temelji na merjenju signala standardnih raztopin, katerih koncentracijo poznamo, nato pa izmerimo na instrumentu pri enakih pogojih še signal za vzorec. Koncentracija vzorca mora biti med najnižjo in najvišjo koncentracijo standardnih raztopin, tako da lahko določimo vrednost koncentracije z interpolacijo.

REGRESIJSKA ANALIZA:

Pri regresijski analizi proučujemo odnos med spremenljivko x in y . X je kontrolirana ali neodvisna spremenljivka, koncentracija standarda, y pa odvisna spremenljivka ali odgovorna spremenljivka, ki predstavlja merjeni signal. Sprejeli smo prvo predpostavko in sicer, da x vrednosti nimajo napake. Napake pri pripravi standardov so v resnici mnogo manjše od napak, ki jih naredimo pri merjenju signala. Vrednosti neznanih parametrov odseka in naklona regresijske krivulje b_0 in b_1 moramo ugotoviti na tak način, da se model prilaga k eksperimentalnim točkam kot je najbolj mogoče.

Signal je sestavljen iz determinirane komponente, predstavljene z linearnim modelom in slučajne komponente e_i . Treba je izračunati vrednosti b_0 in b_1 za β_0 in β_1 tako, da je $\sum e_i^2$ minimalna. To metodo imenujemo : **metoda najmanjših kvadratov**.

Če je odnos med x in y linearen, velja:

$$y_i = \eta_i + \varepsilon_i$$

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \varepsilon_i$$

β_0 in β_1 sta neznani \rightarrow določimo jih z b_0 in b_1

$$\hat{y} = b_0 + b_1 x$$

Komponente e_i predstavljajo razlike med opazovanimi y_i vrednostmi in \hat{y} vrednostmi, predpostavljenimi z modelom; e_i imenujemo ostanke.

$$e_i = y_i - \hat{y} = (y_i - b_0 - b_1 x_i)$$

$$e_i^2 = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 = \sum (y_i - b_0 - b_1 x_i)^2$$

$$b_1 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2} = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x} = \frac{\sum y_i \sum x_i^2 - x_i \sum x_i y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

$$s_{y|x}^2 = \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} = s_e^2 = \frac{\sum e_i^2}{n - 2}$$

STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

1. NATANČNOST IN TOČNOST

Namen:

Če želimo izmeriti pravo vrednost, je pri izbiri analizne metode važna natančnost in točnost.

2. NAPAKE v kvantitativni analizi

Rezultati nimajo nobene vrednosti, če ne podajajo tudi velikosti napake.

Natančnost je povezana s slučajno napako, ki je tudi znana kot nedoločljiva napaka (ne glede ali je srednja vrednost pravilna).

Primer slučajne napake:

srednja vrednost 100

set meritev 98, 101, 99 in 100

Natančnost opisuje sipanje posameznih ponovitev meritev okrog srednje vrednosti.

SLIKA 1

Normalna porazdelitev slučajne napake

DEFINICIJA NATANČNOSTI

\bar{X} : povprečje x_i

$$e_i = x_i - \mu$$

$$e_i = x_i - \bar{X}$$

$\bar{X} = \mu$ za končno število meritev

DEFINICIJA TOČNOSTI

Točnost je povezana s sistematsko napako, ki je tudi znana kot določljiva napaka.

Primer sistematske napake:

prava vrednost 100

set meritev 110, 108, 109 in 111

$$e_i = \mu - \mu_0$$

$$e_i = \bar{X} - \mu_0$$

Totalna napaka je vsota sistematskih in slučajnih napak.

$$e_i = x_i - \mu_0$$

$$e_i = x_i - \mu + \mu - \mu_0$$

slučajna napaka sistematska napaka

$\bar{X} = \mu$ za končno število meritev

Primer:

5 meritev daje vrednosti:

Metoda A

2.8, 2.7, 3.0, 3.2 in 3.3

$$\bar{X}_1 = 3.0$$

$$e_{11} = 2.8 - 3.0 + 3.0 - 3.0$$

slučajna napaka sistematska napaka = 0

Metoda B

4.8, 4.7, 5.0, 5.2, in 5.3

$$\bar{X}_2 = 5.0$$

$$e_{12} = 4.8 - 5.0 + 5.0 - 3.0$$

slučajna napaka sistematska napaka = 2

Navadno najprej proučujemo natančnost, ker lahko sistematske napake določimo šele, ko so slučajne napake dovolj majhne in je njihova velikost znana.

Če analitik izvaja večje število ponovitev določitve istega vzorca ob uporabi istega postopka, reagentov itd, dobimo rezultate, ki so podvrženi slučajju in imajo normalno porazdelitev napake.

3. Tipi napak

3.1 Velika napaka

3.2 Sistematske napake

3.3 Slučajne napake

Primer:

Analistik	Rezultat	Vrsta napake
-----------	----------	--------------

A	10.08	Natančno, toda netočno
	10.11	
	10.09	
	10.10	
	10.12	
B	9.88	Točno, toda nenatančno
	10.14	
	10.02	
	9.80	
	10.21	
C	10.19	Netočno in nenatančno
	9.79	
	9.69	
	10.05	
	9.78	
D	10.04	Točno in natančno
	9.98	
	10.02	
	9.97	
	10.04	

SLIKA 2

Grafični prikaz natančnosti in točnosti

SLUČAJNA NAPAKA - NATANČNOST

Kvantitativno ovrednotenje natančnosti:

OBMOČJE

je razlika med največjo in najmanjšo vrednostjo

$$R = x_{\max} - x_{\min}$$

MEDIANA

Kadar imamo le nekaj meritev in kadar je prisotna asimetrija, uporabljamo mediano. Mediana je vrednost, ki razpolavlja set n po vrstnem redu urejenih meritev

- če je n liho število, imamo $(n-1)/2$ meritev manjših od mediane, naslednja meritev je mediana.

Primer: $n = 9$; $x_i = 4, 5, 5, 6, 7, 8, 8, 9, 9$; $x_m = 7$

- če je n sodo število, vzamemo povprečno vrednost srednjih dveh meritev

Primer: $n = 8$; $x_i = 4, 5, 5, 6, 7, 8, 8, 9$; $x_m = 6.5$

Mediana ima majhen vpliv na vrednosti, ki so ekstremne, je torej robustne narave.

SREDNJA VREDNOST

$$\bar{x} = \sum_i x_i / n$$

Primer: set meritev urejen po vrstnem redu:

$x_i = 4, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 6, 6, 7, 7, 8, 9, 9, 17$

prvih 14 vrednosti: $x_m = 6$ $\bar{x} = 6.143$

vseh 15 vrednosti: $x_m = 6$ $\bar{x} = 6.867$

STANDARDNI ODMIK

$$s = \sqrt{\sum_i \frac{(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

VARIANCA

$$V = s^2$$

Relativni standardni odmik $RSD = s/\bar{x}$

Koeficient variabilnosti $Cv = RSD \times 100\%$

ODMIK srednje vrednosti

$$\sigma_x = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

VRSTE NATANČNOSTI

Ponovljivost je natančnost dobljena pri optimalnih pogojih

Ista metoda, isti analitik, isti dan, isti set vzorcev, isti laboratorij

- mejni pogoji kontrolirani

Kvantitativno ovrednotenje: standardni odmik dobljen ob uporabi SOP.

Ponovitve naj bodo prave ponovitve, lahko pa testiramo tudi ponovljivost dela analiznega postopka (n.pr. ponovljivost injiciranja)

(Lahko se izboljša le s spremembo metode - druga kolona, drugo topilo...)

OBNOVLJIVOST (reproducibilnost) je natančnost, dobljena pri najbolj različnih možnih pogojih

Ista metoda, različni analitiki, različni dnevi analize, različni laboratorij, različne kemikalije, druga oprema, različna temperatura, vlažnost... Možne so vmesne situacije (intralaboratorijske primerjave in interlaboratorijske primerjave).

Velikost napake pri ponovljivosti je manjša kot pri obnovljivosti.

$$V_{\text{reprod}} = V_{\text{ponov.}} + V_{\text{temp.}} + V_{\text{op.}} + V_{\text{lab.}} \dots$$

SLIKA 3

Primerjava velikosti standardnih odklonov za ponovljivost in obnovljivost

ODPRAVLJANJE slučajnih napak

Poiskati je potrebno tisti del analitskega postopka, kjer je slučajna napaka največja in posvetiti posebno pazljivost temu delu.

SLIKA 4

RSD v odvisnosti od koncentracije

SISTEMATSKE NAPAKE - TOČNOST

a) Konstantne (absolutne):

Neodvisne od koncentracije (enota ista kot merjena komponenta - konc.)

Vzroki:

1. Slaba selektivnost (interferenca), reagira tudi druga komponenta - dobimo napačno previsoke rezultate.
2. Efekti matrične raztopine - opazimo povečanje ali zmanjšanje signala.
3. Slaba, nepravilna korekcija slepega vzorca.

b) Proporcionalne (relativne):

Napaka je proporcionalna koncentraciji analita, izraža se v relativnih enotah (%).

- vzrok napake pri kalibraciji

1. Različni nakloni kalibracijskih krivulj za vzorec in standard.
2. Nepravilno upoštevanje linearnosti v preširokem koncentracijskem območju.

Drugi vzroki: pri avtomatski kontinuirni analizi kontaminacija s prejšnjimi vzorci (napaka ni konstantna niti proporcionalna).

ODPRAVLJANJE sistematskih napak:

Ne moremo jih zmanjšati s povečanjem števila meritev in ker ne poznamo prave vrednosti, so večkrat skrite.

1. Glavni način je uporaba standardnih referenčnih materialov
2. Preverjanje kontaminacije vzorca
3. Preverjanje točnosti analitskega aparata - (n.pr. točnost valovne dolžine)
4. Človeška napaka (barvna slepota, neobčutljivost za barve, astigmatizem in ostale napake očesa, tendenca k zapisovanju določenih števil)

Pred izvedbo analize preveriti vsako stopnjo eksperimenta (vzorčenje, aparat, steklovina, tehtanje...)

Predpisati eksperiment v vsaki stopnji - planiranje

(diferenčno tehtanje, namesto določitve ε - umeritvena krivulja)

Kompleksno optimiranje procedure- proučevanje medsebojnih vplivov spremenljivk

PODAJANJE REZULTATOV

Število decimalnih mest označuje natančnost eksperimenta

Primer:

0.102563 M raztopina - potrebna natančnost je 0.001% - ni dosegljivo.

Primer: Vrednosti: 10.09, 10.11, 10.09, 10.10, in 10.12

$\bar{X} = 10.102$ - nezanesljivost na drugem decimalnem mestu

$s = 0.0130$

$\bar{X} = 10.10 \pm 0.01$ ($n = 5$)

Pravilo: obdržimo eno decimalno mesto več, kot lahko natančno izmerimo, zaokrožimo pa le končni rezultat.

Zaokroževanje zadnje številke

Primer :

Določitev sistematske in slučajne napake v titrimetriji:

Postopek vsebuje:

1. Gravimetrija:

tehtanje primarnega standarda

2. Volumetrija:

raztapljanje primarnega standarda in razredčevanje v bučki

pipetiranje (odčitavanje pipete, polnjenje, praznjenje)

titracija (polnjenje birete, določanje meniska na bireti, določitev ekvivalentne točke)

	Toleranca
Teža (razred 1)	
100 g	± 0.25 mg
1 g	0.034 mg
10 mg	0.010 mg
Teža (razred 3)	
100 g	± 1.0 mg
1 g	0.10 mg
10 mg	0.030 mg
Steklovina (razred A)	
50 ml valj	0.25 ml
250 ml merilna bučka	0.12 ml
25 ml pipeta	0.03 ml
50 ml bireta	0.05 ml

Sistematske napake pri tehtanju:

nepopolno ohlajanje, absorbcija vlage na tehtiču, korodirane, prašne uteži, različna teža v zraku in vakuumu

Slučajne napake pri tehtanju:

- majhne ± 0.0001 g/1g

Gravimetrična napaka je zanemarljivo majhna v primerjavi z volumetrično napako.

Odprava: diferenčno tehtanje, velika M primarnega standarda.

Sistematske napake pri volumetričnih postopkih:

praznjenje pipet, bimet, vpliv temperature

Slučajne napake pri volumetričnih postopkih:

odčitavanje meniska (bučka ± 0.03 cm \sim 0.012 ml, pipeta ± 0.03 cm \sim 0.006 ml,)

Indikatorske napake, napaka zadnje kapljice

NATANČNOST IN TOČNOST kot kriterij

Kako natančno in točno analizo potrebujemo?

Če je vzorčenje del analize, je treba upoštevati napako pri vzorčevanju.

(Primer: Določitev kalija v rastlinskih vzorcih - 87% napake pri jemanju vzorcev, vzorčevanju, 9.4% medlaboratorijska napaka, 1.4% priprava vzorcev, 1.4% natančnost meritve)

Diskretne in zvezne slučajne spremenljivke:

Primer:

zvezna spremenljivka - temperatura, dolžina, koncentracija

diskretna spremenljivka - število vrhov na kromatogramu

SPEKTROSKOPSE METODE – OPTIČNE METODE

Na osnovi posnetih spektrov lahko ugotavljamo kvalitativno in kvantitativno sestavo vzorca.

Spektri nastanejo z vzbujevanjem atomov oziroma molekul.

Poznamo:

Elektronske spektre

Vibracijske spektre

Rotacijske spektre

Elektronski spektri nastanejo, če elektroni iz osnovnega energetskega nivoja preskakujejo v višji energetske nivo. Pri tem se vračajo in oddajo energijo v obliki elektromagnetnega valovanja. V pitno vodo ali v raztopino NaCl pomočimo Pt žičko in jo damo nad gorilnik. Plamen se obarva rumeno. Zunanji elektron Na je na 3s nivoju oziroma orbitali. Na stanje elektrona vplivajo privlačne sile med elektronom in jedrom in odbojne sile. Rezultanta sil predstavlja energetske stanje elektronov, zato je stanje elektronov točno določeno (v našem primeru 3s). Najlažje spravimo elektrone v višji nivo (v našem primeru 3p). To stanje ni obstojno in v delcu sekunde pride do prehoda v osnovno stanje 3s, razlika v energiji se sprosti v obliki svetlobe z valovno dolžino 589 nm – vidni del spektra-rumeno področje.

$$\Delta E = h\nu$$

$$\Delta E = hc/\lambda$$

Kalijevi ioni dajejo vijoličasto obarvanje

Litijevi ioni dajejo karmin rdečo obarvanje

Kalcijevi ioni dajejo oranžno obarvanje

Bakrovi ioni dajejo zeleno obarvanje

Spektroskop ali spektrograf je naprava za ločevanje različnih valovanj.

Spekter pokaže iz katerih elementov je snov sestavljena.

Z električno iskro vzorec lahko segrevamo in elektron na zadnji orbitali sprejme neko določeno energijo in skoči na višji nivo –vzbujeno stanje – ni obstojno, v 10^{-4} sekunde to energijo odda v obliki elektromagnetnega valovanja., emitira. Za vsako energijo je značilno, da se giblje skozi prostor v obliki valovvalovanje je karakterizirano z valovno dolžino in z amplitudo ν , je število nihajev na sekundo.

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu$$

$$\nu\lambda = c$$

$$c = 3.10^8 \text{ ms}^{-1}$$

h je planckova konstanta in ima vrednost $6.62.10^{-27}$ erg sec

ΔE je energetske paket , ki ga elektron sprejme in ga potem spet odda. To imenujemo kvant in je specifično za določeno molekulo ali atom.

Vsaki orbitali odgovorja določen energetske nivo.,je specifičen za določeno molekulo ali atom. Različni so

ker je energija energetskega nivoja odvisna od:

privlačne sile med elektronom in jedrom, ta pa je odvisna od nabojev.

Jedro ima različni pozitivni naboj, zato so privlačne sile atomov različne in specifične. energetska stanja je odvisno od odbojnih sil med določenimi e- in med ostalimi e-.

Kvanti so karakteristika za vsak element ali vsako spojino. Elektron lahko gre še v višje nivoje, ki so prazni. Pri tem mu moramo dodati dovolj veliko energijo. e- lahko sprejme samo diskontinuirne vrednosti energije, to je v mikro svetu. Energija mora biti vsaj tako velika, kot je razlika med energijskimi nivoji, zato je sprejemanje nezvezno in energije, ki jih lahko elektron sprejme, so kvantizirane in specifične za določeno molekulo/ atom. Dve bakreni palčki, vmes dodamo napetost 100 V. Električna iskra povzroči, da elektroni skačejo, najprej preidejo v višje stanje, nato pa v nižje.

Vsakemu kvantu, ki emitira, odgovarja določeno elektromagnetno valovanje in to projiciramo skozi optično prizmo. Optična rešetka je monokromator.

Optično rešetko dobimo tako, da na stekleno ploščo nanese plastiko in potem se nanjo napari tekoči Al in s posameznimi noži se napravijo zareze do stekla.

Svetloba se odbija pod lomnim kotom in je – za različne valovne dolžine odgovarja različnim lomnim kotom.

400 –700 nm –vidnoelektromagnetno valovanje.

Na fotografski plošči pride do počrtnitve za vsak posamezni element.

Na ta način ugotovimo, kakšni elementi nastopajo v vzorcu.

$\lambda_{\text{Na}} = 589.8 \text{ nm}$.

Več je elektronov na zadnji orbiti, bolj kompliciran je spekter. Alkalijske in zemljealkalijske kovine imajo enostavne spektre.

To so t. im. elektronski spektri. Imajo največjo energijo, kvanti so pri preskoku največji. Vibracijski spektri se pojavljajo samo pri molekulah. Nihajni spektri so posledica nihanj v molekuli. Te molekule lahko vzbujamo in povzročimo različna nihanja: simetrično, asimetrično nihanje v ravnini in izven ravnine. Nihanja so odvisna od vrste molekule. Tudi energije nihanja so različne in odvisne od mase posameznih atomov in od vezi med posameznimi atomi. tudi ta nihanja so kvantizirana. če želimo spraviti molekulo iz ene energije v drugo, ji moramo dodati energijo, to je vibracijski kvant, ki je manjši od elektronskega kvanta.

spekter je dosti bolj gost

IZPELJAVA BEER-LAMBERTOVEGA ZAKONA

Ta zakon nam podaja zvezo med intenziteto absorbirane svetlobe in koncentracijo absorbirajoče snovi. Velja samo za monokromatsko svetlobo in za homogeno trdno snov.

I_0 = intenziteta vpadne svetlobe

I = intenziteta prepuščene svetlobe

K = konstanta

- predznak pomeni, da se intenziteta manjša

$$dI/dl = -kI$$

$$dI/I = -kdl$$

integriramo:

$$\int \frac{dI}{I} = -k \int dl$$

$$\ln I/I_0 = -kl$$

Beer- Lambertov zakon velja za raztopine

$$\ln I/I_0 = -kcl$$

$$\log I/I_0 = -kcl/2.303$$

A = εcl – najbolj uporabna oblika Beer-Lambertovega zakona

A = absorbanca

ε = molarni absorpcijski koeficient

Za fotometrične meritve uporabljamo tiste svetlobne izvore, ki emitirajo elektromagnetne valove s kontinuiranim spektrom v tistem spektralnem območju, v katerem poteka fotometrična analiza.

Devterijevo žarnico uporabljamo za merjenje v območju od 195 nm do 375 nm, volframovo žarnico pa uporabljamo za merjenje v območju od 350 nm do 1000 nm.

MONOKROMATOR

Monokromator uporabljamo zato, da bi iz kontinuiranega spektra dobili monokromatorsko svetlobo.

Zgradba monokromatorja :

Sestavljen je iz vhodne in izhodne reže, optične rešetke in zrcala. Monokromator je lahko optični filter, prizma ali difrakcijska rešetka. Spektrofotometri imajo optične rešetke ali prizme. Za UV/VIS območje morajo biti optične rešetke ali prizme iz kvarčnega stekla. Rešetka je steklena plošča, ki je prevlečena s plastičnim materialom. Na rešetki so vrezane tanke paralelne črte. Monokromator v spektrofotometru Perkin Elmer je konkavna halografična rešetka z 1053 črtami/mm. Da se svetloba lahko odbije je površina prevlečena s slojem aluminija. Monokromator je sposoben zaznati dve spektralni liniji, ki sta med seboj

razmaknjeni. Tej lastnosti oziroma sposobnosti spektrofotometra pravimo resolucija. Spremembo resolucije dosežemo s spremembo širine vhodne in izhodne reže.

Sposobnost instrumenta, da razlikuje elemente in eliminira spektralno interferenco, ni odvisna od monokromatorja. Tu sodelujejo tudi drugi deli instrumenta.

KIVETA

Kivete morajo biti iz materiala, ki prepušča sevanje željene valovne dolžine in je inerten za merjenje raztopin. Biti morajo tako po obliki kot po konstrukciji enostavne. Imeti morajo konstantno debelino in površino. Morajo biti tudi optično gladke.

Kivete uporabne za UV območje so narejene iz kvarčnega stekla, za VIS področje pa so lahko iz navadnega stekla.

Običajno so dolge 1 cm. Lahko pa so tudi drugačne (dolžine do 0,1 cm ali do 10 cm). Kivete imajo gladki strani tam, kjer gre žarek svetlobe skozi, to pa zato, da zmanjšamo izgube zaradi odboja žarka. Drugi dve steni pa sta manj gladki. To pa je zato, ker je zelo

pomembno, da kiveto primemo le na tisti strani, ki je groba, saj čistost kivet vpliva na točnost merjenja.

DETEKTOR

Detektor je instrument, ki meri intenziteto prepuščene svetlobe skozi vzorec. Pri tem pretvori svetlobno energijo v električni signal. Za merjenje nizke svetlobne intenzitete uporabljamo fotopomnoževalke. Drugače pa se uporabljajo tudi fotodiode.

Delovanje detektorja:

Foton vpadne svetlobe izbije elektron iz katode in se usmeri k naslednji elektrodi pod vplivom pozitivne napetosti od 100V do 200V. Pri tem dobi elektron veliko kinetične energije (vpliv električnega polja). Ta elektron je nato sposoben pri udarcu v elektrodo iz njene površine izbiti 2-3 sekundarne elektrone. Le-ti se prav tako pod vplivom električnega polja usmerjajo naprej k naslednji elektrodi.

Ti procesi se nato ponavljajo.

Glede na število elektrod in napetosti, se lahko fototok multiplicira tudi stotisočkrat. Kot posledica potencialne energije med elektrodama, se pojavijo tako imenovani tavajoči elektroni, zato skozi detektor teče tok, tudi če ta ni osvetljen.

SKICA DETEKTORJA

Podatke in rezultate spektrofotometra dobimo s pomočjo računalniškega programa, ker je spektrofotometer povezan z osebnim računalnikom.

S to metodo določimo : - časovno območje, v katerem moramo izmeriti absorbanco.

- določimo maksimalno absorbanco vzorca in s tem dobimo valovno dolžino pri kateri bodo potekale nadaljne meritve.

- pripravimo si standardne rastopine in izmerimo absorbanco ter s tem dobimo umeritveno ali kalibracijsko krivuljo

- izmerimo vzorec in dobimo direktno koncentracijo analizirane substance v vzorcu iz umeritvene krivulje.

ATOMSKA SPEKTROSKOPIJA

V atomski absorpcijski spektroskopiji se vršijo merjenja za številne atome, ki so v nevzbujenem stanju. Ta metoda se uporablja za kvantitativno določanje približno 70 kemijskih elementov in temelji na absorpciji valovanja določene valovne dolžine, ki ga lahko absorbirajo samo atomi tistih elementov, katerih vzbujene energije ustrezajo dovedeni energiji.

Fenomen atomske absorpcije je poznan že iz devetnajstega stoletja, to je od dobe odkritja Fraunhoferovih linij v sončevem spektru, vendar se ni praktično uporabljal do leta 1955, ko je avstralski znanstvenik Welsh pokazal, da lahko atomsko absorpcijo uporabljamo za dokazovanje velikega števila kovinskih elementov.

POMEMBNE ZNAČILNOSTI ATOMSKEGA ABSORPCIJKEGA SISTEMA

Praktičen sistem za eksperimentalno delo v atomski absorpcijski spektroskopiji je sestavljen iz treh delov:

- iz izvora žarčenja,
- iz naprave za razgradnjo vzorca, ki ga raziskujemo
- (atomizerja) in
- iz sistema za merjenje absorbiranega žarčenja.

IZVOR ŽARČENJA

Izvor žarčenja mora imeti naslednje značilnosti :

- iz izvora žarčenja se mora raztezati snop žarčenja čigar valovna dolžina mora odgovarjati sredini absorpcijske črte za preiskovani element in
- polovična širina snopa ne sme biti večja od polovice širine absorpcijske črte za preiskovani element.

GRAF PREPUSTNOSTI MONOKROMATORJA

HEMA DVOJNO SNOPNEGA

SPEKTROFOTOMETRA Z MONOKROMATORJEM

V atomski absorpcijski spektroskopiji se uporabljajo posebni izvori žarčenja. Le ti morajo dati emitirano svetlobo z ozkim snopom. S tem odstranimo interferenco drugih črt iz izvora.

Svetlobni izvori so v glavnem votle katode, ki so namenjene določitvi večih elementov hkrati.

Svetlobni izvor je sestavljen iz katode in anode. Katoda je prevlečena ali izdelana iz elementa, ki se analizira in je oblikovana v obliki valjčka, anoda pa je v principu kovinska žica.

SHEMA KATODNE ŽARNICE

Premer katode, kot tudi njena višina je približno 10 mm. Katodna žarnica je napolnjena z neonom ali argonom pod nizkim tlakom. Steklo svetlobnega izvora, skozi katerega prehaja svetloba, je izdelano iz kvarca. Optimalni tok, ki ga usmerimo na katodo, je odvisen od elementa, ki ga raziskujemo. Optimalni tok se giblje od 5 do 100 mA pri napetosti od 100 do 300 V.

PLAMEN

Najbolj uporabljen in najbolj učinkoviti način za pridobivanje atomske plazme predstavlja plamen. Temperatura plamena, kot tudi same reakcije lahko kontroliramo tako, da dosežemo najboljše kemijske pogoje za razgradnjo spojin v atome različnih elementov. Za to nam služi atomizer.

Plamen pridobljen z izgorevanjem propana v zraku ima temperaturo 1950° C ali 2223° K. Ta temperatura omogoča meritve za določene alkalijske kovinske elemente. Svetel plamen zrak/acetilen temperature 2450° C ali 2723° K predstavlja najboljši plamen za večino rutinskih dokazov, predvsem za elemente kot so: magnezij, kalcij, prehodne kovinske elemente.

Svetel plamen zrak/acetilen omogoča redukcijske pogoje, ki jih potrebujejo elementi, ki dajejo stabilne okside pri povišani temperaturi. To so na primer naslednji elementi: barij, krom, molibden. Mnogi drugi elementi, ki dajejo najtežje topne okside, pa potrebujejo mnogo višje temperature. Plamen, ki se uporablja pri tem, je pridobljen z izgorevanjem acetilena v didušikovem oksidu (NO₂), kjer temperatura plamena doseže okoli 3000° C ali 3273° K. Ti elementi pa so na primer naslednji: aluminij, titan, vanadij, tantal in drugi

ATOMIZER

Elektrotermični atomizerji so se prvič pojavili na tržišču v 70-ih letih. Ta metoda ima določene prednosti pred ostalimi metodami. Z njo lahko analiziramo tako tekoče kot trdne substance. Pri tem potrebujemo izredno majhne količine vzorca, meje detekcije pa so zelo nizke. Ravno zaradi tega je grafitna kiveta uporabna v biokemiji.

SHEMA RAZGRADNEGA ATOMIZERJA

Princip delovanja metode z grafitno kiveto:

- svetlobni žarek iz votle katode prehaja skozi grafitno cev,
- v sredini grafitne cevi, na L'vov-ojevi plošči, se nahaja analizirana spojina,
- nekaj mikrolitrov vzorca segrevamo do temperature 2000°C ali 2273°K . Pri tej temperaturi poteče atomizacija v nekaj milisekundah do ene sekunde in
- absorbanca atomiziranih delcev se nato izmeri v območju nad ogrevano površino.

Vzorec v grafitni kiveti disociira na atome in množina absorbirane svetlobe se meri s fotopomnoževalko.

Določeni element absorbira le tiste resonančne linije, katerih valovna dolžina odgovarja prehodu iz najnižjega energetskega nivoja na višji energetski nivo. Zaradi odstranjevanja nezaželenih valovanj prehaja svetlobni žarek skozi filter ali monokromator, ki prepušča le določeno resonantno linijo, ki jo nato fotodetektor zazna.

Na vzorec v kiveti deluje toplotna, elektromagnetna, kemijska in celo električna energija. Energije se pretvarjajo iz ene oblike v drugo. V našem primeru se oblike energije pretvarjajo v svetlobno energijo, ki se izraža kot spekter, sestavljen iz valovanj določenega števila diskretnih valovnih dolžin. Dovedena energija del atomov dovede v višja energetska stanja. V trenutku ko so atomi v vzbujenem stanju se pričnejo le ti vračati v osnovno stanje - nižje energetske stanje pri čemer se sprošča energija, dovedena iz toplotnega izvora. Del sproščene energije se sprošča kot svetlobna energija in predstavlja emisijski spekter opazovanega atoma.

Če se za vzbujanje atoma na višji energetski nivo uporabi svetlobna energija, katere valovna dolžina je ekvivalentna energiji, ki je potrebna, da se atom vzbudi na višji energijski nivo, je rezultat isti. Atom absorbira svetlobo iste valovne dolžine, kot jo emitira, če je v vzbujenem stanju. Če se usmeri svetlobo točno določene valovne dolžine v skupino prostih, neioniziranih in nevzbujenih atomov, bodo le ti svetlobo absorbirali. Z detektorjem bomo lahko izmerili količino absorbirane svetlobe.

ATOMSKI ABSORPCIJSKI SPEKTROFOTOMETER

Prve instrumente za atomsko absorpcijsko spektrofotometrijo so izdelali leta 1960. Razvoj instrumentov je iz leta v leto napredoval. Kmalu je atomski absorpcijski spektrofotometer postal eden najbolj natančnih in najpogosteje uporabljenih analiznih instrumentov v analizi kemiji. V 70-ih letih so začeli raziskovati, ali bi lahko atomizacija potekla brez plamena in ali bi bila možna analiza tudi trdnih delcev. Takrat so prišli na tržišče elektrotermični atomizerji in s tem grafitne kivete.

Zgradba atomskega absorpcijskega spektrofotometra

- svetlobni izvor
- atomizer ali absorpcijski člen,
- monokromator,
- detektor in
- instrument za zapis signala.

SHEMA ATOMSKEGA ABSORPCIJSKEGA

SPEKTROFOTOMETRA

GRAFITNA KIVETA

Grafitna kiveta je cilindrična grafitna cev, ki je odprta na obeh straneh in ima odprtino za vzorec. Prečni prerez grafitne kivete v elektrotermičnem atomizerju:

L'vov-ova plošča in njen položaj v grafitni kiveti

PREČNI PREREZ GRAFITNE KIVETE V ELEKTROTERMIČNEM ATOMIZERJU

Cev je dolga okrog 5 cm in ima notranji premer manj kot 1 cm. Grafitna cev se tesno prilega dvema cilindričnima grafitnima električnima stikoma, ki se nahajata na obeh koncih cevi. Ta stika se nahajata v z vodo hlajenim kovinskem ohišju. Zagotovljena sta dva toka inertnega plina. Zunanji tok inertnega plina preprečuje dovod zraka in s tem izžaritev cevi. Notranji tok teče noter na obeh konceh cevi in ven

skozi odprtino za vzorec. Ta tok plina ne preprečuje le dotok zraka, temveč odnaša tudi hlapce vzorca proizvedenega v prvih treh fazah segrevanja.

L'VOV-OVA PLOŠČA IN NJEN POLOŽAJ V GRAFITNI KIVETI

L'vov-ovo ploščo uporabljamo v grafitni kivetu. Tudi ta plošča je grafitna. Nahaja se pod odprtino za vzorec. Vzorec na tej plošči izpari in atomizira. Atomizacija poteče takrat, ko se temperatura ustali, to je pri 2000° C ali 2273° K. Ne sme biti dotoka inertnega plina, saj le tako dobimo boljše vrhove.

INTERPRETACIJA ČITANJA

Po vključitvi instrumenta počakamo nek določen čas, da se žarnica segreje. Na monokromatorju se prebere valovna dolžina in širina snopa. Postavimo kazalček galvanometra na ničlo. Potem skozi plamen pošiljamo standardne raztopine, ki so iz čistih soli elementov, ki jih želimo analizirati. Narišemo umeritveno ali kalibracijsko krivuljo, ki predstavlja odnos vseh koncentracij v odnosu z odčitano absorbanco. Po teh postopkih se vnesejo v plamen vzorci za katere želimo narediti analizo. Na podlagi odčitanih rezultatov absorbanco in odčitavanja v umeritveni krivulji dobimo njihovo koncentracijo.

1. Standardna raztopina Mn, ki ga določujemo kot MnO_4^- , nam pri dolžini kivete 5.0 cm absorbira 10% svetlobe ($T = 90\%$). Raztopina neznanega vzorca v 1 cm kivetu pa absorbira 50% svetlobe ($T = 50\%$). Standardna raztopina vsebuje 2 mg/L. Koliko je Mn v neznanem vzorcu?

$$l_s = 5.0 \text{ cm} \quad T_s = 90\%$$

$$l_x = 1.0 \text{ cm} \quad T_x = 50\%$$

$$A_s = -\log T_s = -\log (0.9) = 0.045$$

$$A_s = \epsilon l_s c_s$$

$$A_x = -\log T_x = -\log (0.5) = 0.300$$

$$\frac{c_x l_x}{c_s l_s} = \frac{A_x}{A_s}$$

$$\frac{c_s l_s A_x}{A_s l_x} = \frac{0.300 * 5.0 * 2.0}{0.045 * 1.0} = 60.7 \text{ mg / L}$$

2. Monokromatska svetloba pri prehodu skozi 4 cm kiveto ima propustnost 70%. Koloikšna je T, če je kiveta 1 cm?

$$A_1 = -\log T_1 = -\log (0.7) = 0.154$$

$$A_x = A_1 * 0.25 = 0.0385$$

$$A_x = -\log T_x$$

$$\log T_x = -0.0385$$

$$T_x = 91\%$$

Potrebno je določiti sledove kobalta. Ali je to mogoče z merjenjem kompleksa $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ pri $\lambda = 530 \text{ nm}$ z

$\epsilon = 10 \text{ cm}^{-1}\text{Lmol}^{-1}$ in pri debelini kivete $l = 1 \text{ cm}$. Minimalna absorbanca, ki jo lahko merim, je 0.010.

$$A = \epsilon lc$$

$$c = \frac{A}{l\epsilon} = \frac{0.01}{0.1} = 10^{-3} \text{ mol/L}$$

Pri tej dolžini lahko merimo sledove kobalta $c \leq 10^{-5} \text{ mol/L}$.

Kako je z dsoločitvijo Co pri merjenju absorbance modrega kompleksa pri $\lambda = 640 \text{ nm}$ in $\epsilon = 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{Lmol}^{-1}$ in pri debelini kivete $l = 1 \text{ cm}$ pri minimalni absorbanci 0.01.

$$c = \frac{A}{l\epsilon} = \frac{0.01}{0.1 * 10^3} = 10^{-5} \text{ mol/L}$$

Lahko merimo dosti manjše koncentracije in lahko določimo sledove Co.

Substanca ima $\epsilon = 6.74 * 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{Lmol}^{-1}$. Kolikšna koncentracija odgovarja propustnosti $T = 7.77\%$ v 2.5 cm kiveti

$$A = -\log T = -\log 0.077 = 1.1099$$

$$A = \epsilon lc$$

$$c = \frac{A}{l\epsilon} = \frac{1.1099}{2.5 * 6.74 * 10^3} = 6.6 * 10^{-5} \text{ mol/L}$$

Pri 580 nm in pri λ_{max} . ima kompleks FeSCN^{2+} $\epsilon = 7 * 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{Lmol}^{-1}$. Izračunaj absorbanco za $3.77 * 10^{-4} \text{ M}$ raztopino kompleksa v 0.75 cm kiveti.

izračunaj propustnost $2.85 * 10^{-4} \text{ M}$ raztopine v isti kiveti. izračunaj propustnost, ki odgovarja prvotni absorbanci.

$$A = 1.979$$

$$T_x = 3.91$$

$$T = 2.83\%$$

Raztopina je $1.54 * 10^{-4} \text{ M}$ z ozirom na spojino x in ima propustnost 0.0874 v 2 cm kiveti.

Kolikšna koncentracija spojine x odgovarja 3x večji propustnosti zmerjeni v 1 cm kiveti

$$c_s = 1.54 * 10^{-4} \text{ M}$$

$$C_x = ?$$

$$T_s = 0.0874$$

$$T_x = 3T_s$$

$$l_s = 2.0 \text{ cm}$$

$$l_x = 1 \text{ cm}$$

$$A_s = -\log T_s = -\log(0.0874) = 1.0584$$

$$A_x = -\log T_x = -\log 3T_s = -\log(3 \cdot 0.0874) = 0.5813$$

$$A_x = \epsilon l_x c_x$$

$$A_s = \epsilon l_s c_s$$

$$c_x = \frac{A_x c_s l_s}{A_s l_x} = \frac{0.5893 \cdot 1.54 \cdot 10^{-4} \cdot 2}{1.0584 \cdot 1} = 1.69 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$$

Začetek spektrofotometrije je kolorimetrija, kjer gre za primerjanje intenzitete obarvanja.

Uporabljajo se Hohnerjevi cilindri, ki so sestavljeni iz dveh cilindrov, ki imata na koncu pipico, da lahko spuščamo raztopino. Raztopino spuščamo, dokler nista enako obarvani.

Uporaba: v metalurški industriji- Dubosque kolorimeter.

Svetloba prihaja od spodaj in pada na ogledalce. V posodi imamo našo raztopino. v njej imamo še potopljena prazna cilindra, ki ju lahko mehansko premikamo.

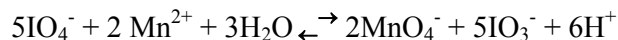
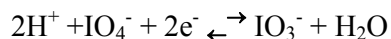
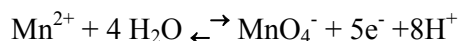
$$A_s = \epsilon l_s c_s$$

$$A_x = \epsilon l_x c_x$$

$$l_s c_s = l_x c_x$$

$$c_x = \frac{c_s l_s}{l_x}$$

0.600 g zlitine raztopimo v kislini in dodamo prebitek KIO_4 ter segrevamo. Mn^{2+} se oksidira do MnO_4^- po enačbi:



Dobljeno raztopino razredčimo na 250 mL. V kolorimetru se izmeri in izenači absorbanca:

$$l_s c_s = l_x c_x$$

$$c_x = \frac{c_s l_s}{l_x} = \frac{8.25 * 10^{-4} * 6.5}{5.2} = 10.31 * 10^{-4} M$$

mg Mn = $10.31 * 10^{-4} * 54.94 * 1/4 = 1.41 * 10^{-2}$ g v vzorcu

$$\% = \frac{1.416 * 10^{-2}}{0.600} * 100 = 2.36\%$$

SPEKTROFOTOMETER

MONOKROMATOR:

Optična rešetka:

Žarka se razlikujeta v optični poti:

$$n\lambda = MO + OP$$

$$MO = d \sin\theta$$

$$OP = d \sin \varphi$$

$$n\lambda = MO + OP = d \sin\theta + d \sin \varphi$$

vpadni kot lomni kot

λ se spreminja, ker na optično celico padajo različna valovanja. θ je konstantna, če se λ veča, se tudi φ veča. Svetloba se na optičnih rešetkah razprši po valovnih dolžinah. Režo lahko premikamo

$$n\lambda = d (\sin\theta + \sin \varphi)$$

$$\frac{d\varphi}{d\lambda} = \frac{n}{d \cos \varphi}$$

$\frac{d\varphi}{d\lambda}$ = pomeni, za koliko se spremeni lomni kot. Več zarez je na dolžini, bolj kvaliteten jwe

monokromator in zagotovljena je večja natančnost.

Ločljivost:

$$\frac{\lambda}{d\lambda} =$$

λ je valovna dolžina monokromatske svetlobe λ_1, λ_2 –področje nižje oziroma višje valovne dolžine, kjer še zaznamo razliko. Da lahko ločimo valovanje 588 nm, 589 nm in 590 nm. Ločljivost je tem večja, čim manjši je $\Delta\lambda$.

Absorbance so aditivne. Absorbanca v raztopini pri isti valovni dolžini je vsota posameznih absorbanc

$$A_1 = A_{11} + A_{12}$$

$$A_2 = A_{21} + A_{22}$$

$$A_{11} = \epsilon_{11} c_1$$

$$A_{12} = \epsilon_{12} c_2$$

$$A_{21} = \epsilon_{21} c_1$$

$$A_{22} = \epsilon_{22} c_2$$

$$A_1 = \epsilon_{11} c_1 + \epsilon_{12} c_2$$

$$A_2 = \epsilon_{21} c_1 + \epsilon_{22} c_2$$

$$\epsilon_{11} = \frac{A_{11}}{c_1}$$

$$\epsilon_{12} = \frac{A_{12}}{c_2}$$

$$\epsilon_{21} = \frac{A_{21}}{c_1}$$

$$\epsilon_{22} = \frac{A_{22}}{c_2}$$

Za raztopino, ki vsebuje dve substanci X in Y so znani naslednji podatki (l = 1 cm)

	c (mol/L)	A ₃₂₀	A ₄₆₀
X	4.6*10 ⁻³	0.965	0.106
Y	5.11*10 ⁻³	0.094	1.213

Izračunaj

$$\epsilon_{11} = \frac{A_{11}}{c_1} = \frac{0.965}{4.6 * 10^{-3}} = 209.8 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$$

$$\epsilon_{12} = \frac{A_{12}}{c_2} = \frac{0.094}{5.11 * 10^{-3}} = 18.4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$$

$$\varepsilon_{21} = \frac{A_{21}}{c_2} = \frac{1.06}{4.6 * 10^{-3}} = 23.0 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$$

$$\varepsilon_{22} = \frac{A_{22}}{c_2} = \frac{1.213}{5.11 * 10^{-3}} = 237.4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$$

Določamo Co in Ni kot kompleks. Pri λ max so ε naslednji:

	λ_{365}	λ_{700}
ε_{Co}	3529	428.9
ε_{Ni}	3228	0.0

Izračunaj koncentracije Co in Ni na osnovi podatkov:

Raztopina	A_{365}	A_{700}
1	0.816	0.074
2	0.516	0.033

$$A_1 = A_{11} + A_{12}$$

$$A_2 = A_{21} + A_{22}$$

$$0.816 = 3529 c_{\text{Co}} + 3228 c_{\text{Ni}}$$

$$0.074 = 428.9 c_{\text{Co}}$$

$$c_{\text{Co}} = 7.694 * 10^{-5}$$

$$c_{\text{Ni}} = 7.558 * 10^{-5}$$

Podatki za kompleks Co in Ni so sledeči:

	λ_{510}	λ_{656}
ε_{Co}	36400	1240
ε_{Ni}	5520	17500

0.376 g vzorca raztopimo in razredčimo na 50 mL. K 25 mL te raztopine dodamo reagent in dopolnimo do 50 mL

$$A_{510} = 0.467$$

$$A_{656} = 0.347$$

$$0.467 = 36400 c_{\text{Co}} + 5520 c_{\text{Ni}}$$

$$0.347 = 1240 c_{\text{Co}} + 17500 c_{\text{Ni}}$$

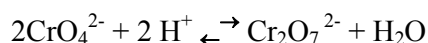
$$c_{\text{Co}} = 9.92 * 10^{-6} \text{ M}$$

$$c_{Ni} = 1.92 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

$$\%Co = \frac{9.92 \cdot 10^{-6} \cdot 2 \cdot 58.93}{20 \cdot 0.376} \cdot 100 = 0.0155$$

$$\%Ni = \frac{1.92 \cdot 10^{-5} \cdot 2 \cdot 58.70}{20 \cdot 0.376} \cdot 100 = 0.0299$$

Konstanta ravnotežja za reakcijo:



$$K_{rav.} = 4.2 \cdot 10^{-4}$$

λ nm	$\epsilon_1(CrO_4^{2-})$	$\epsilon_1(Cr_2O_7^{2-})$
345	$1.84 \cdot 10^3$	$10.7 \cdot 10^2$
370	$4.81 \cdot 10^3$	$7.28 \cdot 10^2$
400	$1.88 \cdot 10^3$	$1.89 \cdot 10^2$

Pripravljene so bile 4 raztopine $K_2Cr_2O_7$ pri pH vrednosti 5.40 (pufer) s koncentracijami:

$$4 \cdot 10^{-4}, 3 \cdot 10^{-4}$$

$$2 \cdot 10^{-4} \text{ in } 1 \cdot 10^{-4}$$

Izračunaj vrednosti absorbcanc v 1 cm kiveti za vsako raztopino posebej. in podaj rezultat za 345nm, 370 nm in 400 nm.

$$K_{rav} = \frac{[Cr_2O_7^{2-}]}{[CrO_4^{2-}]^2 [H^+]^2} = 4.2 \cdot 10^{14}$$

$$[H^+] = 4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$\frac{[Cr_2O_7^{2-}]}{[CrO_4^{2-}]^2} = 4.2 \cdot 10^{14} \cdot (4 \cdot 10^{-6})^2 = 6.72 \cdot 10^3$$

$$4 \cdot 10^{-4} = [Cr_2O_7^{2-}] + \frac{[CrO_4^{2-}]}{2}$$

$$[Cr_2O_7^{2-}] = 2.95 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

$$[CrO_4^{2-}] = 2,10 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

$$A_{345} = 1.84 \cdot 10^3 \times 2.1 \cdot 10^{-4} + 10.7 \cdot 10^2 \times 2.95 \cdot 10^{-4}$$

$$A_{345} = 0.702$$

$$A_{370} = 4.81 \cdot 10^3 \times 2.1 \cdot 10^{-4} + 7.28 \cdot 10^2 \times 2.95 \cdot 10^{-4}$$

$$A_{370} = 1.225$$

$$A_{345} = 1.88 \cdot 10^3 \times 2.1 \cdot 10^{-4} + 1.89 \cdot 10^2 \times 2.95 \cdot 10^{-4}$$

$$A_{400} = 0.451$$

Rezultati merjenj:

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
P ₀	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
X ₀	0	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008	0.009
A	0.213	0.303	0.394	0.484	0.574	0.663	0.752	0.840	0.926	1.000
X(M)	0	4.42 · 10 ⁻⁶	9.1 · 10 ⁻⁶	1.6 · 10 ⁻⁵	2.47 · 10 ⁻⁵	3.57 · 10 ⁻⁵	5.52 · 10 ⁻⁵	8.2 · 10 ⁻⁵	1.42 · 10 ⁻⁴	2.69 · 10 ⁻⁴

Izračunaj po Scathardovi metodi K

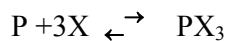
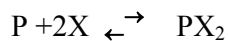
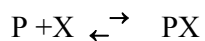
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ΔA	0.090	0.181	0.271	0.361	0.450	0.539	0.627	0.713	0.793	0.85
ΔA/ X	20360	19890	16940	14620	12610	19764	7646	5021	2248	1453

Te podatke nanašamo v diagram

Naklon krivulje
$$\frac{d\left(\frac{\Delta A}{[X]}\right)}{d(\Delta A)} = -K$$

$$K = 2.72 \cdot 10^4$$

Jobova metoda:



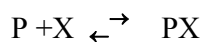
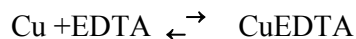
Vzamemo P in X koncentracije, ki sta enaki in vsota obeh koncentracij je zmeraj konstantna.

Primer:

2,50 mmola/ml pripravim P in X iz iste koncentracije.

$$X = \frac{moliX}{moliX * moliP}$$

ml P	ml x	x/P	$X = \frac{moliX}{moliX * moliP}$
1,00	9,00	9:1	0,900
2,00	8,00	4:1	0,800
2,50	7,50	3:1	0,750
3,33	6,67	2:1	0,667
4,00	6,00	2,5:1	0,600
5,00	5,00	1:1	0,500
6,00	4,00	1:1,5	0,400
6,67	3,33	1:2	0,333
7,50	2,50	1:3	0,250
8,00	2,00	1:4	0,200
9,00	1,00	1:9	0,100



Koncentracija se večja in absorpcija sprva narašča, potem pa pada. Maksimum je tam, kjer je ustrezno molsko razmerje, ki odgovarja formuli. Lahko nanašamo molski ulomek.

$$X:P = 1:1$$

$$X:P = 2:1$$

$$X:P = 3:1$$

ELEKTROKEMIJSKE ANALIZNE METODE

Se vršijo v elektrokemijskem elementu- lahko galvanski člen, elektrolitska celica

Galvanski člen:

reakcija poteka samodejno in daje električni tok oziroma napetost celice

Elektrolitska celica:

Proces poteka prisiljeno, napetost dajemo od zunaj, da reakcija poteče.

Elektrokemijski element tvorita dve elektrodi in raztopina elektrolita. Elektrodi sta potopljeni v raztopino elektrolita.

Elektrode delimo na:

Inertne, niso v ravnotežju z ioni v raztopini

Aktivne- so vedno v ravnotežju z lastnimi ioni v raztopini.

Indikatorske elektrode- kadar indicira koncentracijo določenih ionov v raztopini. Njen potencial je odvisen od ionov v raztopini. N.pr. ionoselektivne elektrode. Bakrova elektroda je indikatorska za Cu ione, steklena elektroda za H⁺ ione.

Referenčne (primerjalne) elektrode – potencial se v raztopini ne spremeni, tudi če se spremeni koncentracija ionov v raztopini (kalomelova. Anoda ali katoda je lahko referenčna ali indikatorska.

Katoda je elektroda, na kateri poteče redukcija- ne glede na to ali imamo opravka z galvanskim členom ali elektrolitsko celico. Anoda pa je elektroda, na kateri poteka oksidacija.

V elektrokemijskem elementu imamo opravka z redoks reakcijo:



$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[A]^a [B]^b}{[C]^c [D]^d}$$

E = potencial

E⁰ = standardni potencial

ln = 2.303 log

R = 8310 J K⁻¹ mol⁻¹ = 8310 VAs K⁻¹ mol⁻¹

T = 298.16 K = 25°C

POTENCIOMETRIJA

Gre za merjenje potenciala v galvanskem členu. potencial galvanskega členu izmerimo tako, da od zunaj uporabimo enako velik in nasprotno usmerjen potencial, ki je znan. V tem trenutku teče skozi galvanski člen tok z vrednostjo 0, saj smo od zunaj dali obratno napetost galvanskega členu. Potenciale merimo pri toku 0 pri galvanskem členu.

DIREKTNA POTENCIOMETRIJA

S pomočjo izmerjenega potenciala določimo koncentracije ionov v raztopini. Potential je povezan z Nernstovo enačbo.

POTENCIOMETRIČNA TITRACIJA

S potenciometrično titracijo izmerimo spremembo potenciala členu in na ta način določimo končno točko titracije. Dobimo titracijsko krivuljo. Sprememba potenciala je v končni točki največja.

Spremembo potenciala merimo n.pr. med platinsko in kalomelovo elektrodo.

Naloge:

1.)

Imamo galvanski člen, ki je sestavljen iz srebrove in nasičene kalomelove elektrode (NKE). Elektrodi sta potopljeni v raztopino srebrovih ionov. S potenciometrom izmerimo potencial členu $\Delta E = 0.400$ V. Kakšna je koncentracija Ag^+ ionov v raztopini?

Ag elektroda je katoda

$$E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}}^0 = +0.799 \text{ V}$$

$$E_{\text{NKE}} = +0.242 \text{ V}$$

$$\Delta E = E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}} - E_{\text{NKE}} = E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}}^0 + 0.0591 \log[\text{Ag}^+] - E_{\text{NKE}}$$

$$\log[\text{Ag}^+] =$$

$$\log[\text{Ag}^+] = \frac{\Delta E + E_{\text{NKE}} - E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}}^0}{0.0591} = \frac{0.400 - 0.799 + 0.242}{0.0591} = 2.59$$

$$[\text{Ag}^+] = 2.57 \cdot 10^{-3}$$

2.)

Izračunaj delež feri (trivalentnih Fe ionov v raztopini FeSO₄. V raztopino pomočimo platinsko in NKE elektrodo. Pt elektroda je indikatorska elektroda. Izmerili smo ΔE= 0.395 V. Katoda je platinska elektroda.

$$E^0_{Fe^{3+}/Fe^{2+}} = +0.771 \text{ V}$$

$$E_{NKE} = +0.242 \text{ V}$$

$$\Delta E = E_{Fe^{3+}/Fe^{2+}} - E_{NKE} =$$

$$E^0_{Fe^{3+}/Fe^{2+}} + 0.0591 \log \frac{[Fe^{3+}]}{[Fe^{2+}]} - E_{NKE}$$

$$\log \left[\frac{Fe^{3+}}{Fe^{2+}} \right] = \frac{\Delta E - E^0_{Fe^{3+}/Fe^{2+}} + E_{NKE}}{0.0591} = \frac{0.395 - 0.771 + 0.242}{0.0591} = 2.20$$

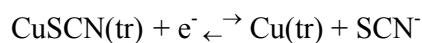
$$\left[\frac{Fe^{3+}}{Fe^{2+}} \right] = 6.3 * 10^{-3}$$

V soli je od 100 do 1000 krat manj Fe³⁺ od Fe²⁺.

$$e = \left[\frac{[Fe^{3+}]}{[Fe^{3+}] + [Fe^{2+}]} \right] * 100 = 0.63\%$$

3.)

Izračunaj standardne potencialne za reakcijo:



Shematsko predstavi člen, pri čemer je NKE katoda, bakrena elektroda pa anoda. Izpelji enačbo, ki nam predstavlja zvezo med izmerjenim potencialom člena in pSCN = - log SCN

$$E_{Cu^+/Cu} = E^0_{Cu^+/Cu} + 0.0591 \log [Cu^+]$$

$$Lp_{(CuSCN)} = [Cu^+][SCN^-]$$

$$E_{Cu^+/CuSCN} = E^0_{Cu^+/Cu} + 0.0591 \log \left[\frac{Lp}{[SCN^-]} \right]$$

$$E_{Cu^+ / CuSCN} = E_{Cu^+ / Cu}^0 + 0.0591 \log Lp_{CuSCN} - 0.0591 \log [SCN^-]$$

$$E_{Cu^+ / CuSCN}^0$$

b.

Cu | [SCN⁻] = xM, CuSCN(tr) || NKE

c.

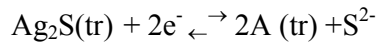
$$\Delta E = E_{NKE} - E_{Cu^+ / CuSCN} = E_{NKE} - E_{Cu^+ / CuSCN}^0 + 0.0591 \log [SCN^-] =$$

$$E_{NKE} - E_{Cu^+ / CuSCN}^0 - 0.0591 \text{ pSCN}$$

$$\text{pSCN} = \frac{E_{NKE} - E_{Cu^+ / CuSCN}^0 - \Delta E}{0.0591}$$

4 a.)

Izračunaj standardni potencial za reakcijo:



b.)

Shematsko predstavi člen, tako da je Ag elektroda katoda.

c.)

Izpelji enačbo, ki nam predstavlja zvezo med potencialom člena in pS.

a)

$$E_{Ag^+ / Ag} = E_{Ag^+ / Ag}^0 + 0.0591 \log [Ag^+]$$

$$Lp_{(Ag_2S)} = [Ag^+]^2 [S^{2-}]$$

$$[Ag^+] = \sqrt{\frac{Lp_{Ag_2S}}{[S^{2-}]}}$$

$$E_{Ag^+ / Ag_2S} = E_{Ag^+ / Ag}^0 + 0.0591 * 1/2 \log Lp_{(Ag_2S)} - 0.0591 * 1/2 \log [S^{2-}]$$

$$E_{Ag^+ / Ag_2S} = E_{Ag^+ / Ag_2S}^0 - 0.0591 * 1/2 \log [S^{2-}]$$

b)

NKE || [S²⁻] = xM, Ag₂S(tr) | Ag

c)

$$pS = -\log [S^{2-}]$$

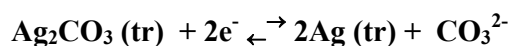
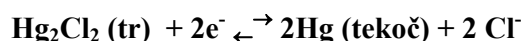
$$\Delta E = E_K - E_A = E_{Ag/Ag_2S} - E_{NKE} = E^0_{Ag/Ag_2S} + 0.0591 \cdot 1/2 pS - E_{NKE}$$

$$pS = \frac{(\Delta E - E^0_{Ag/Ag_2S} + E_{NKE}) \cdot 2}{0.0591} =$$

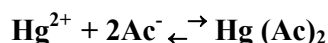
5.)

Za naslednja dva člena napiši shemi in izvedi formuli, ki predstavljata zvezo med potencialom členu in pX. Indikatorska elektroda je katoda z Hg indikatorsko elektrodo za določitev pCl

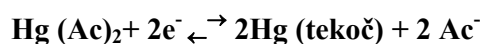
Z Ag kot indikatorsko elektrodo pCO₃



Konstanta stabilnosti topnega Hg(Ac)₂ je 2.5*10⁸



$$K_{st.} = \frac{[Hg(Ac)_2]}{[Hg^{2+}] [Ac^-]^2} = 2.5 \cdot 10^8$$



$$E_{Hg^{2+}/Hg} = E^0_{Hg^{2+}/Hg} + \frac{0.0591}{2} \log [Hg^{2+}]$$

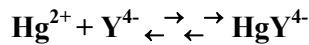
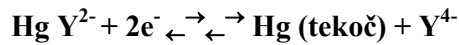
$$[Hg^{2+}] = \frac{[Hg(Ac)_2]}{K_{st} \cdot [Ac^-]^2}$$

$$E_{Hg^{2+}/Hg(Ac)_2} = E^0_{Hg^{2+}/Hg} - 0.0591 \log K_{st} + \frac{0.0591}{2} \log \frac{[Hg(Ac)_2]}{[Ac^-]^2}$$

$$E^0_{\text{Hg}^{2+} / \text{Hg}(\text{Ac})_2} = E^0_{\text{Hg}^{2+} / \text{Hg}} - 0.0591 \log K_{st}$$

7.)

Izračunaj standardni potencial za reakciju



Y^{4-} je anion EDTA

$$K_{st.} = \frac{[\text{HgY}^{4-}]}{[\text{Hg}^{2+}] [\text{Y}^{4-}]^2} = 6.3 * 10^{21}$$

$$E_{\text{Hg}^{2+} / \text{Hg}} = E^0_{\text{Hg}^{2+} / \text{Hg}} + \frac{0.0591}{2} \log [\text{Hg}^{2+}]$$

$$E_{\text{Hg}^{2+} / \text{HgY}^{2-}} = E^0_{\text{Hg}^{2+} / \text{Hg}} + \frac{0.0591}{2} \log K_{st} + \frac{0.0591}{2} \log \frac{[\text{HgY}^{4-}]}{[\text{Y}^{4-}]}$$

$$E^0 = 0.210 \text{ V}$$

$$E^0_{\text{Hg} / \text{HgY}^{4-}} = E^0_{\text{Hg}^{2+} / \text{Hg}} + \frac{0.0591}{2} \log K_{st}$$

8.)

Izračunaj potencial člana



$$K_{st.} = 6.3 * 10^{21}$$

$$\Delta E = E_K - E_A$$

$$\Delta E = E_{\text{NKE}} - E_{\text{Hg} / \text{HgY}^{2-}} = E_{\text{NKE}} - E^0_{\text{Hg} / \text{HgY}^{2-}} - \frac{0.0591}{2} \log \frac{[\text{HgY}^{4-}]}{[\text{Y}^{4-}]}$$

$$\Delta E = 0.242 + \frac{0.0591}{2} \log \frac{7.24 * 10^{-4}}{2.0 * 10^{-1}} = 0.210$$

$$[Y^4] = 2 * 10^{-3} \text{ M}, 2 * 10^{-5} \text{ M}$$

9.)

Predstavljeni člen ima potencial 0.971V

Cd | CdX₂(tr), [X⁻]=0.010M, || NKE

Izračunaj L_pCdX₂

$$E_{Cd^{2+} / Cd} = E_{Cd^{2+} / Cd}^0 + \frac{0.0591}{2} \log [Cd^{2+}]$$

$$L_{p(CdX_2)} = [Cd^{2+}][X^-]^2$$

$$[Cd^{2+}] = \frac{Lp}{[X^-]^2}$$

$$E_{Cd / CdX_2} = E_{Cd^{2+} / Cd}^0 + \frac{0.0591}{2} \log Lp - 0.0591 \log [X^-]$$

$$\Delta E = E_{NKE} - E_{Cd / CdX_2} =$$

$$E_{NKE} - E_{Cd^{2+} / Cd}^0 - \frac{0.0591}{2} \log Lp + 0.0591 \log [X^-]$$

$$\log Lp = \frac{\left(E_{NKE} - E_{Cd^{2+} / Cd}^0 - \Delta E + 0.0591 \log [X^-] \right) * 2}{0.0591}$$

$$\log Lp = \frac{(0.242 + 0.403 - 0.971 + 0.0591 \log(10^{-2})) * 2}{0.0591} =$$

$$= \frac{(0.242 + 0.403 - 0.971 - 0.1182)2}{0.0591} = -15.03$$

$$Lp_{CdX2} = 9.33 * 10^{-16}$$

10.)

Za naslednji člen je izmerjeni potencial

$$\Delta E = 0.741 \text{ V.}$$

Pt, H₂(1atm.) | HA(0.300M), NaA(0.200M), | | NKE

Izračunaj disociacijsko konstanto šibke kisline.

$$\Delta E = E_{NKE} - E_{H^+/H_2} = E_{NKE} - 0.0591 \log [H^+] =$$

$$E_{H^+ / H_2} = \frac{0.0591}{2} \log \left[\frac{[H^+]^2}{pH_2} \right] = 0.0591 \log [H^+]$$

$$[H^+] = K_{HA} * c_k / c_s$$

$$E_{H^+ / H_2} = \frac{0.0591}{2} \log \left[\frac{[H^+]^2}{pH_2} \right] = 0.0591 \log [H^+]$$

$$\log K_{HA} = \frac{E_{NKE} - 0.0591 \log \frac{c_k}{c_s} - \Delta E}{0.0591} =$$

$$\frac{0.242 - 0.0591 \log \frac{3}{2} - 0.741}{0.0591} = -8.62$$

$$\log K_{HA} = -8.62$$

$$K_{HA} = 2.4 \cdot 10^{-9}$$

$$E^0_{Hg/HgY2-} = E_{NKE} - E^0_{Hg/HgY2-}$$

$$L_p Hg_2Cl_2 = [Hg_2^{2+}] [Cl^-]^2$$

$$\log [Ag^+] = \frac{\Delta E + E_{NKE} - E^0_{Ag^+/Ag}}{0.0591} = \frac{0.400 - 0.799 + 0.242}{0.0591} = 2.59$$

$$E_{Hg_2^{2+}/Hg} = E^0_{Hg_2^{2+}/Hg} + \frac{0.0591}{2} \log [Hg_2^{2+}]$$

ELEKTROLIZA:

ELEKTROLIZA je prisiljen proces. Katodo najprej speremo z destilirano vodo in etanolom, damo v sušilnik. Prazno elektrodo stehamo Pri fizikalnokemijskih analiznih

POLAROGRAFIJA

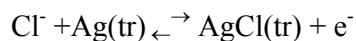
KONCENTRACIJSKI ČLEN

Je sestavljen iz dveh enakih polčlenov, ki se razlikujeta samo v koncentraciji določene ionske vrste. Vzamemo dva enaka polčlena.

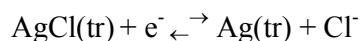


A

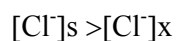
K



kloridni ioni se porabljajo (Anoda)



kloridni ioni nastajajo (katoda)



ravnotežje je, ko se potenciala izenačita in takrat

$$E_K = E_{Ag/AgCl}^0 - 0.0591 \log[Cl^-]_x$$

$$E_A = E_{Ag/AgCl}^0 - 0.0591 \log[Cl^-]_s$$

$$\Delta E = E_K - E_A = E_{Ag/AgCl}^0 - 0.0591 \log[Cl^-]_x$$

$$-E_{Ag/AgCl}^0 + 0.0591 \log[Cl^-]_s$$

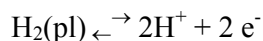
$$\Delta E = 0.0591 \log \frac{[Cl^-]_s}{[Cl^-]_x}$$

$\Delta E > 0$ za galvanski člen

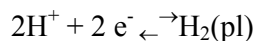
S takšnim galvanskim členom lahko merimo pH raztopine ali koncentracijo vodika



Na desni je koncentracija H^+ konstantna, na levi pa se spreminja.



$$E_x = 0.0591 \log \frac{[H^+]}{pH_2^{1/2}}$$



$$E_{sH^+/H_2} = \frac{1}{2} 0.0591 \log \frac{[H^+]^2}{pH_2} = 0.0591 \log \frac{[H^+]}{pH_2^{1/2}}$$

$$\Delta E = E_K - E_A = 0.0591 \log \frac{[H^+]_s}{[H^+]_x} = K - 0.0591 \log [H^+]_x$$

$$K = 0.0591 \log [H^+]_s$$



$$\Delta E = E_K - E_A = E_{SHE} - 0.0591 \log [H^+]_x$$

$$\Delta E = 0.0591 \text{ pH}$$

Potencial je premo sorazmeren s koncentracijo raztopine (s pH raztopine).

Vodikova elektroda je bolj pomembna iz teoretičnega stališča kot iz praktičnega stališča.

V praktičnem pogledu uporabljamo za merjenje pH stekleno elektrodo. Je zelo selektivna in senzitivna (občutljiva na spremembo koncentracije vodika v intervalu od pH 2 do pH 10). Selektivnost pomeni, da loči H^+ ione od ostalih. Potencial se spreminja samo, če se spreminja koncentracija H^+ ionov, drugi ioni na spremembo potenciala ne vplivajo.

$$E_m = V_1 - V_2 = 0.0591 \log \frac{[H^+]_1}{[H^+]_2} - 0.0591 \log \frac{[H^+]_1}{[H^+]_2} =$$

$$0.0591 \log \frac{[H^+]_1}{[H^+]_2} - 0.0591 \log \frac{[H^+]_1}{[H^+]_2} =$$

$$E_m = K + 0.0591 \log [H^+]_1 \quad \text{membranski potencial}$$

$$K = 0.0591 \log \frac{[H^+]_2}{[H^+]_1} - 0.0591 \log \frac{[H^+]_1}{[H^+]_2}$$

$$\Delta E = E_{Ag/AgCl} - E_{NKE} + E_m + E_{As}$$

E_{As} upošteva, da j_1 in j_2 nista enaka.

$$L = E_{Ag/AgCl} - E_{NKE} + E_{As}$$

$$\Delta E = L' + 0.0591 \log [H^+]_1 = L' - 0.0591 \text{ pH}$$

$$L' = L + K$$

Potencial steklene elektrode je potencial membrane, potencial, ki ga lahko izmerimo. Če je koncentracija notranje raztopine enaka koncentraciji zunanje raztopine, bi lahko takoj izmerili potencial. Asimetrični potencial se od elektrode do elektrode spreminja. Vsaka steklena elektroda ima svoj asimetrični potencial. Je specifičen za elektrodo in se tudi spreminja, zato je potrebno elektrodo umeriti. Umerimo jo s pufernimi raztopinami, ki imajo znane pH vrednosti.

pH = 4.01 ftalatni pufer

pH = 6.98 fosfatni pufer

pH = 9.22 $Na_2B_4O_7$

Meritve morajo biti med dvema puferskima zmesema, puferno območje mora biti vedno tako, da je pH merjene raztopine vedno v tem območju.

Strmina elektrode:

$$\Delta E = E' - 0.0591 \text{ pH}$$

$$\frac{d\Delta E}{dpH} = 59.1 \text{ mV} / \text{pH}$$

Steklena elektroda na sme biti na zraku, ampak vedno v vodi, da se membrana ne posuši, ker se odzivni čas (čas, ki je potreben, da se potencial ustali) večja. Normalni odzivni čas je nekaj sekund. Po vsaki meritvi damo elektrodo v vodo.

Nad pH 10 ne moremo meriti, ker je zelo malo H^+ ionov v raztopini (10^{-10} H^+ ionov na 1 L raztopine).

Če v steklu zamenjamo CaO z Al_2O_3 , pride do spremembe elektrode in dobimo membrane, ki niso senzitivne na H^+ ione, ampak tudi na druge ione. Poznamo steklene elektrode za merjenja Na, K, Li, Ag ionov, vendar niso tako selektivne kot steklena elektroda za merjenje H^+ .

Al_2O_3 ima veliko afiniteto do klora. Bolj občutljiva za alkalijske ione kot za vodikove. Uporabljamo enačbe, ki nam kažejo napake. Uvedemo pojem koeficient selektivnosti, ki nam pove motnjo drugega iona. Upoštevan je v kompletnejši Nernstovi enačbi

$$E_i = K + 1/n_i * 0.0591 \log \left\{ [X]_i + \sum_{j=1}^n K_{ij} [Y]_j^{n_i/n_j} \right\}$$

Konstanta selektivnosti nam pove, kako nek drug ion vpliva na potencial.

$$E_{\text{Na}} = K + 0.0591 \log \left\{ [\text{Na}^+] + K_{\text{Na}^+, \text{K}^+} [\text{K}^+] \right\}$$

Nikolsky

$$K_{\text{Na}^+, \text{K}^+} = 10^{-3} = 1/1000$$

Elektroda je tisoč krat manj občutljiva za kalij kot za natrij. Koeficient selektivnosti se lahko izmeri, tako da spreminjamo koncentracijo motečih ionov.

$$E_i = K + 0.0591 \log [X]_i$$

$$[X]_i = \text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Li}^+, \text{Ag}^+$$

$$\Delta E = E_i - E_{\text{NKE}} = K - 0.0591 \text{pX} - E_{\text{NKE}}$$

Karakteristike nekaterih ionoselektivnih elektrod

Kation	sestava stekla %	K_{ij}
Li^+	11% Li_2O , 25% Al_2O_3 , 60% SiO_2	$K_{\text{Li}^+, \text{Na}^+} \leq 0.33$ $K_{\text{Li}^+, \text{K}^+} < 10^{-3}$
Na^+	11% Na_2O , 18% Al_2O_3	$K_{\text{Na}^+, \text{K}^+} < 3 * 10^{-3}$

	71%SiO ₂	
K ⁺	27%Na ₂ O, 5%Al ₂ O ₃ 68%SiO ₂	K _{K⁺,Na⁺} = 5*10 ⁻²

IONOSELEKTIVNE elektrode s trdno kristalno membrano

fluoridna elektroda:

Ag/AgCl

0.1 M NaF

V₂

V₁(F)_x

L_p = 10⁻¹⁸

ob elektrodi imamo topnostni produkt

Membranski potencial je različen, če se koncentracije lantanovih in fluoridnih ionov spreminjajo.

$$E_{La} = K + \frac{1}{3} 0.0591 \log [La^{3+}]$$

$$E_F = K + \frac{1}{3} 0.0591 \log Lp_{LaF_3} - 0.0591 \log [F^-]$$

$$K' = K + \frac{1}{3} 0.0591 \log Lp_{LaF_3}$$

$$E_F = K' - 0.0591 \log [F^-]$$

Elektrode merijo aktivnost in ne koncentracije ionov.

a = c*f

Če so raztopine razredčene, lahko rečemo, da je aktivnostni koeficient enak koncentraciji, pri bolj koncentriranih raztopinah pa je aktivnostni koeficient manjši od 1.

$$\log f = \frac{0.5z^2 \sqrt{\mu}}{1 + \sqrt{\mu}}$$

Pripravimo si 10⁻¹M NaF in jo 10 krat razredčimo.

10⁻²M

10⁻³M

10⁻⁴M

10^{-5}M

Če bi šli merit potencial med posameznimi raztopinami, ne bi dobili linearne odvisnosti.

Pripravimo si raztopine tako, da imajo enako ionsko moč.

$$E_F = K' - 0.0591 \log a_F$$

$$E_F = K' - 0.0591 \log [F^-] * f_{F^-}$$

$$E_F = K' - 0.0591 \log f_{F^-} - 0.0591 \log [F^-]$$

$$L = K' - 0.0591 \log f_{F^-}$$

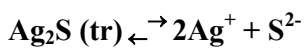
$$E_F = L - 0.0591 \log [F^-]$$

$$\text{pF} = -\log[F^-]$$

ΔE

pF

Iz grafa lahko odčitamo pF



$$L_{\text{pAg}_2\text{S}} = [\text{Ag}^+]^2 [\text{S}^{2-}] = 10^{-50}$$

Ima defektno kristalno strukturo in je zato elektroprevoden.

Nekaj ionov je v višku in se nahajajo v vmesnih prostorih. Zaradi tega je zagotovljena

el. prevodnost skozi takšno membrano Ag_2S

Ag / AgCl

0.1M AgNO_3

Ag_2S

$$E_{Ag} = K + 0.0591 \log[Ag^+]$$

$$E_{Ag} = K - 0.0591 pAg$$

Območje je linearno od pAg 0 do 7

ΔE

$$E_S = K + 0.0591 \log \left(\frac{Lp_{Ag_2S}}{[S^{2-}]} \right)^{1/2}$$

$$E_S = K + \frac{1}{2} 0.0591 \log Lp_{Ag_2S} - \frac{0.0591}{2} \log [S^{2-}]$$

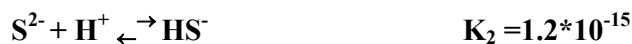
K'

$$E_S = K' + 0.02955 pS$$

Sulfidne ione lahko merimo v alkalni raztopini (pH>10), Ag⁺ ione pa v celem pH

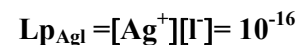
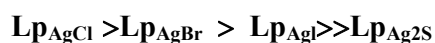
območju.

Sulfid tvori H₂S, ke je slabo disociirana.



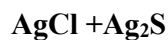
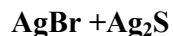
Sulfidne ione elektroda zazna, HS⁻ ione pa elektroda ne zazna in tako ne moremo določiti prave koncentracije, če nimamo alkalne raztopine.

Ali lahko s tako elektrodo merimo tudi kloridne in bromidne ione?



Ne dosežemo tega topnostnega produkta.

Morali bi imeti ogromne količine iodidnih ionov. Iz tega sledi, da s to elektrodo ne moremo meriti teh ionov. Sestavimo zmes halogenida in sulfida $\text{AgI} + \text{Ag}_2\text{S}$



$$E_I = K - 0.0591 \log[I^-]$$

$$E_{\text{Ag}} = K + 0.0591 \log[\text{Ag}^+]$$

$$E_I = K + 0.0591 L_{\text{pAgI}}$$

$$E_I = K' - 0.0591 \log[I^-]$$

$$E_{\text{Br}^-} = K' - 0.0591 \log[\text{Br}^-]$$

$$E_{\text{Cl}^-} = K' - 0.0591 \log[\text{Cl}^-]$$

Ali moti določevanje sulfidnih ionov z Ag_2S elektrodo prisotnost Br^- , Cl^- , I^- ionov?

Določanje sulfida ne motijo Br^- , Cl^- , I^-

Ali motijo sulfidni ioni iodidne ione? Motijo, če jih bo malo se bo oboril, ker je topnostni produkt prekoračen ($L_{\text{pAgI}} \gg L_{\text{pAg}_2\text{S}}$)

Bromidni ioni ne motijo iodidnih ionov.

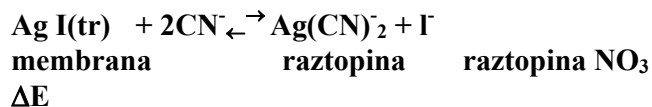
Kloridna elektroda je najmanj selektivna, motijo jo vsi ostali.

Hg^{2+} obarja sulfidne ione in moti.

Pri določevanju neke ionske vrste motijo vsi tisti ioni, ki dajejo soli z manjšim topnostnim produktom.

Br^- , Cl^- , I^- lahko določamo do 10^{-6} M.

Iodidno elektrodo lahko uporabljamo za določanje CN^- ionov.



pCN

Imenujejo jo tudi korozivna elektroda.

Elektrode s tekočinsko membrano

Kalcijeva ionoselektivna elektroda

Ag/AgCl

CaCl₂ 0.1M

ionit

membrana

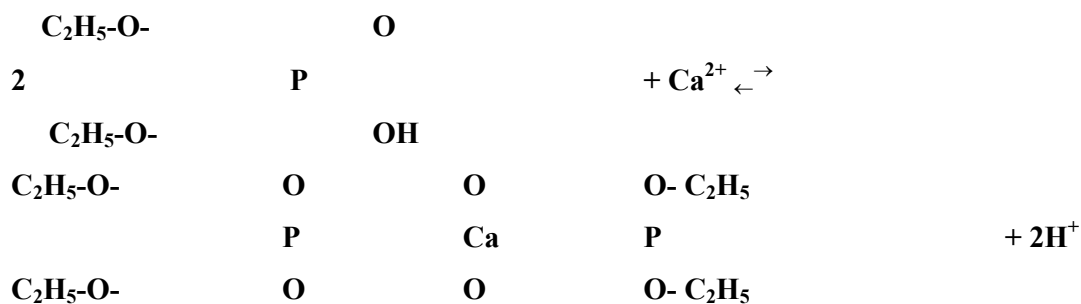
[Ca]X

Membrana je iz porozne plastične snovi in je nasičena z raztopino, ki jo sestavljata dve substanci. Kot topilo je izrazito nepolarna snov, v kateri je raztopljen snov, ki reagira z ioni, ki jih določujemo (v našem primeru dietil fosforjeva kislina- ionit).

Nepolarno topilo je hidrofobno in vode ni v membrani.



Anorganski del gleda ven, proti vodi, organski del pa v membrano.



$E_m = V_1 - V_2$

$$E_{Ca} = K + \frac{0.0591}{2} \log [Ca^{2+}]$$

$$E_{Ca} = K - 0.02955 \text{ pCa}$$

$$\Delta E = E_{NKE} - E_{Ca} = K' + 0.02955 \text{ pCa}$$

$$K' = E_{NKE} - K$$

$$\frac{d\Delta E}{dpCa} = 29.55mV / pCa$$

Gre za tvorbo kompleksa, ki nastaja ob membrani pH v mejah 10 > pH > 5. Ravnotežje je pomaknjeno v desno.

Kalijeva elektroda: nepolarna topila

Valinomicin je nepolaren, ima grozdasto strukturo. K^+ ni kemično vezan na valinomicin, ampak je v bistvu v kletki. naklon je 59.1 mV/pK. Pomembna je v medicini za merjenje krvi.

znane elektrode so še:



PLINSKA ELEKTRODA

Elektroda za določanje CO_2 . Sestavlja jo galvanski člen za določanje pH.

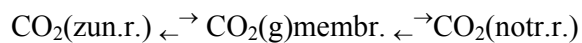
NKE standardna elektroda

raztopina $NaHCO_3$

CO_2 notranja raztopina

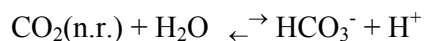
Membrana je porozna samo za pline.

$[CO_2]$ notranja raztopina



$$K = \frac{[CO_2]_{\text{zun.razt.}}}{[CO_2]_{\text{notr.razt.}}}$$

Ravnotežje v notranjosti:



$$K_{\text{hidr.}} = \frac{[HCO_3^-][H^+]}{[CO_2]_{\text{not.razt.}}} = \frac{[HCO_3^-][H^+]}{[CO_2]_{\text{z.razt.}}} K$$

$$K_1 = \frac{K_{hidr}}{K}$$

$$K_1 = \frac{[HCO_3^-][H^+]}{[CO_2]_{z.razt.}}$$

Če je koncentracija HCO_3^- v notranji raztopini visoka, tako da se ne spreminja glede na CO_2 v vzorcu, velja:

$$K_B = \frac{[H^+]}{[CO_2]_{z.razt.}} = \frac{K_1}{[HCO_3^-]}$$

$$[H^+] = K_B \cdot [CO_2]_{z.razt.}$$

Torej je potencial steklene elektrode funkcija aktivnosti CO_2 zunanje raztopine

$$E_{st.el} = L + 0.0591 \log [H^+] =$$

$$L + 0.0591 \log K_B [CO_2]_{z.razt.} =$$

$$L' + 0.0591 \log [CO_2]_{z.razt.}$$

METODA STANDARDNIH DODATKOV

Uporablja se pri nekomplikiranih snoveh. Ioni med seboj reagirajo in pride do interakcije. Da te vplive

upoštevamo, uporabljamo metodo standardnih dodatkov. Vzorčni raztopini dodamo standardno raztopino n.pr fluoridnih ionov. Vplivi ostalih ionov so isti v vzorčni raztopini in v vzorčni raztopini, ki smo ji dodali standardno raztopino.

Matriks = kompletna sestava vzorca vključno z komponento, ki jo določujemo.

Pri metodi standardnih dodatkov ne spreminjamo sestave vzorca. Najprej izmerimo potencial vzorca, dodamo nekaj standardne raztopine (standardnega dodatka) in spet izmerimo potencial.

Iz standardne raztopine KBr 0.1 mol L^{-1} si pripravimo raztopine, ki bodo imele koncentracije od 10^{-1} do $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Raztopine si pripravimo tako, da bodo imele vse enako ionsko moč

(v vsako bučko razen prve odpipetiramo po 10 ml KNO_3 1 mol L^{-1}). Raztopine si pripravimo z zaporednim razredčevanjem raztopine KBr 0.1 mol L^{-1} .

Merjenje koncentracije neznanega vzorca z metodo standardnega dodatka.

Pripravimo si standardno raztopino, ki naj bo približno 10 krat bolj koncentrirana kot vzorec.

Izmerimo potencial 100 ml vzorčne raztopine.

100 ml vzorčne raztopine dodamo 10 ml standardne raztopine, ki je približno 10 krat bolj koncentrirana od vzorca ter po vzpostavitvi ravnotežja ponovno izmerimo potencial.

Raztopino je treba med merjenjem mešati.

Izračunamo ΔE in s pomočjo ΔE izračunamo koncentracijo vzorca.

$$E_1, V_x, C_x$$

$$E_2, V_x, C_x + V_s, C_s$$

$$E_1 = \Delta E = E_{NKE} - E_M$$

$$E_M = K + \frac{0.0591}{n} \log [M^{n+}]$$

v našem primeru:

$$E_M = K + \frac{0.0591}{n} \log C_x$$

$$E_1 = E_{NKE} - E_M = E_{NKE} - K - \frac{0.0591}{n} \log C_x$$

Dodamo V_s s koncentracijo C_s in izmerimo potencial

$$E_2 = E_{NKE} - K - \frac{0.0591}{n} \log \frac{V_x C_x + V_s C_s}{V_x + V_s}$$

$$\Delta E = E_2 - E_1 = -\frac{0.0591}{n} \log \frac{V_x C_x + V_s C_s}{V_x + V_s} + \frac{0.0591}{n} \log C_x$$

$$\Delta E = -\frac{0.0591}{n} * \log \frac{V_x C_x + V_s C_s}{(V_x + V_s) C_x}$$

s preureditvijo dobimo:

$$-\frac{n\Delta E}{0.0591} = \log \frac{V_x C_x + V_s C_s}{(V_x + V_s) C_x}$$

antilogaritmiramo:

$$10^{-\frac{n\Delta E}{0.0591}} = \frac{V_x C_x + V_s C_s}{(V_x + V_s) C_x} = \frac{V_x}{V_x + V_s} + \frac{V_s C_s}{(V_x + V_s) C_x}$$

$$10^{-\frac{n\Delta E}{0.0591}} - \frac{V_x}{V_x + V_s} = \frac{V_s C_s}{(V_x + V_s) C_x}$$

$$\left(10^{-\frac{n\Delta E}{0.0591}} - \frac{V_x}{V_x + V_s}\right)^{-1} = \frac{(V_x + V_s) C_x}{V_s C_s}$$

$$C_x = \frac{V_s C_s}{(V_x + V_s)} * \left(10^{-\frac{n\Delta E}{0.0591}} - \frac{V_x}{V_x + V_s}\right)^{-1}$$

Naloge:

Izmerjeni potencial člena v 10 ml vzorčne raztopine je 0.2331 V, po dodatku 1 ml standardne raztopine Na s koncentracijo $2 \cdot 10^{-2}$ M pa potencial pade na vrednost 0.1646 V. Izračunaj koncentracijo Na v vzorcu.

$$E_1 = 0.2331 \text{ V}$$

$$V_x = 10.0 \text{ ml}$$

$$V_s = 1.0 \text{ ml}$$

$$C_s = 2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$$

$$E_2 = 0.1646 \text{ V}$$

$$\Delta E = E_2 - E_1 = 0.1646 - 0.2331 = -0.0685 \text{ V}$$

$$C_x = \frac{V_s C_s}{(V_x + V_s)} * \left(10^{-\frac{n\Delta E}{0.0591} - \frac{V_x}{V_x + V_s}} \right)^{-1}$$

$$C_x = \frac{1 \text{ ml} * 2 \cdot 10^{-2}}{(10 + 1) \text{ ml}} * \left(10^{-\frac{0.0685}{0.0591} - \frac{10}{11}} \right)^{-1} = 3.19 * 10^{-4} \text{ M}$$

2. Kalcij določamo z elektrodo s tekočinsko membrano. V 25 ml vzorčne raztopine smo izmerili potencial člena 0.4965 V. Po dodatku 2 ml $5,45 \cdot 10^{-2}$ M raztopine CaCl_2 pa smo izmerili potencial $E_2 = 0.4117$ V.

$$C_x = \frac{2 \text{ ml} * 5.45 \cdot 10^{-2}}{(25 + 2) \text{ ml}} * \left(10^{-\frac{(-0.0848)2}{0.0591} - \frac{25}{27}} \right)^{-1} = 5.45 * 10^{-6} \text{ M}$$

3.

Če fluoridno elektrodo potopimo v standardno raztopino fluoridnih ionov s konstantno ionsko močjo, izmerimo proti NKE naslednje potenciale:

[F ⁻]	M	ΔE (mV)
-------------------	---	---------

1.10 ⁻⁵		100
--------------------	--	-----

$$1 \cdot 10^{-4} \quad 41.5$$

$$1 \cdot 10^{-3} \quad -17$$

Če je ionska moč konstantna, je odziv elektrode odvisen samo od logaritma koncentracije fluoridnih ionov. Kolikšen bo potencial pri $[F^-] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ in kolikšna je koncentracija fluorida v raztopini, če je $\Delta E = 0 \text{ V}$.

$$\Delta E = K' - 0.0591 \log[F^-]$$

$$\Delta E = K' - 58.5 \log[F^-]$$

$$100 = \Delta E = K' - 58.5 \log[F^-]$$

$$100 = \Delta E = K' - 58.5 \log 10^{-5}$$

$$K' = -192.5 \text{ mV}$$

$$\Delta E_1 = -192.5 - 58.5 \log 5 \cdot 10^{-5} = 59.1 \text{ mV}$$

$$0 = -192.5 - 58.5 \log [F^-]_x$$

$$[F^-]_x = 5.1 \cdot 10^{-4}$$

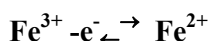
POTENCIOMETRIČNE TITRACIJE

Nimamo indikatorja. Izvedemo jih tako, da merimo potencial člana. V raztopini imamo elektrodni par, ena je referenčna, druga indikatorska. Važen je ustrezeni elektrodni par.

1. titracije kislin z bazami (pH titracije)

pH je premo sorazmeren s potencialom. Steklena elektroda nam bo merila potencial.

2. redoks titracija (Fe po Zimmerman- Reinhardt)



Kot indikatorsko elektrodo uporabljamo platinsko elektrodo.

E sist. meri Pt elektroda, nasičena kalomelova pa je primerjalna elektroda. Pt je povezana s potenciometrom z NKE (univerzalna Pt elektroda).

3. Obarjalne titracije (določevanje Cl^- , Br^- , I^-) z AgNO_3 . Lahko jih izvajamo, če imamo ustrezne elektrode, ionoselektivne elektrode (kloridna, bromidna) za določevanje vseh pa lahko uporabimo srebrovo elektrodo. Kot primerjalno elektrodo uporabljamo NKE.



Cu ioni se sproti porablajo. To lahko določimo z odgovarjajočo ionoselektivno elektrodo. Kako lahko določimo končno točko pri potenciometričnih titracijah ?

Vse krivulje imajo klasično S obliko.

Šibkejša je kislina, krajši je potek po ekvivalentni črti. Večja je razlika potencialov, daljši je potek krivulje po ekvivalentni črti.

Obarjalne titracije – topnostni produkt je tisti, ki nam pove potek po ekvivalentni črti. Manjši je Lp, daljši je potek po ekvivalentni črti.

4. Odvisen je od K stabilnosti, čim manjša je, tem krajši je potek po ekvivalentni črti.
5. Mikrobirete so birete, kjer lahko odmerimo majhne volumske dodatke (0.02 ml). Ko se bližamo ekvivalentni točki, dodajamo večje volumne, ko smo čisto ob ekvivalentni točki, dodajamo majhne volumske dodatke.

Pomagamo si z metodo drugega odvoda – za natančno določitev ekvivalentnega volumna.

Drugi odvod v ekvivalentni točki spremeni predznak, torej ima vrednost 0.

Ag ione titriramo v 100 ml raztopine s koncentracijo $2.068 \cdot 10^{-4}$ M KI

V ml	E proti NKE
3.75	0.2105
4.0	0.1979
4.25	0.1730
4.5	0.0316
4.75	0.0066

$$\frac{V_x}{0.25} = \frac{1165}{1165 + 1032} =$$

$$V_x = 0.133 \text{ ml}$$

$$V_k = 4.25 + 0.133 = 4.383 \text{ ml}$$

$$\text{mmol Ag}^+ = \text{mmol I}^-$$

$$\left[\text{Ag}^+ \right] = \frac{\text{mmol Ag}}{\text{ml KI}} = \frac{4.383 * 2.068 * 10^{-4}}{100} = 9.06 * 10^{-6} \text{ M}$$

0.2479 g brezvodnega Na_2PtCl_6 (natrijev hekso fluoro platinat) smo s hodrazinom razkrojili, proste kloridne ione pa titrirali z AgNO_3 (0.2314 M).

V ml	E proti NKE
13.80	0.172
14.0	0.196

14.2 0.290

14.40 0.326

14.60 0.340

$$V_x/0.2 = 70/(70+58) = 0.547$$

$$V_x = 0.109 \text{ ml}$$

$$V_k = 14.0 + 0.109 = 14.109 \text{ ml}$$

Izračunaj % klorida v Na_2PtCl_6

$$mM(\text{Cl}) = 14.109 * 0.2314$$

$$\% \text{Cl} = (mM(\text{Cl}) M(\text{Cl}) / 247.9) * 100 = (14.109 * 0.2314 * 35.54 / 247.9) * 100 = 46.80\%$$

Točno 100 ml 0.03095 M raztopini NaF titriramo z 0.03318 M $\text{La}(\text{NO}_3)_3$



V ml	E proti NKE
0.0	-0.1046
30.3	+0.0041
30.6	+0.0179
30.9	+0.0410
31.2	+0.0656
31.5	+0.0769
50.0	+0.1118

Izračunaj ekvivalentni volumen in končni volumen, ki ga dobiš iz meritev.

$$V_{\text{NaF}} * M_{\text{NaF}} = V_{\text{La}(\text{NO}_3)_3} * M_{\text{La}(\text{NO}_3)_3}$$

$$100 * 0.03095 = V_{\text{La}(\text{NO}_3)_3} * 0.03318$$

$$V_e = 31.09 \text{ ml}$$

$$V_x/0.3 = 15/(15+133) = 0.03 \text{ ml}$$

$$V_k = 30.9 + 0.03 = 30.93 \text{ ml}$$

To je dejanska vrednost, ker je krivulja asimetrična. Ekvivalentna točka ni v obračalni točki, ampak v zgornji polovici. Imamo razmerje 1:3

(simetrična je $\text{Ag}^+ + \text{Cl}^- \rightarrow \text{AgCl}$) - ekvivalentna točka je na polovici, če je razmerje 1:1

Izračunaj K v enačbi

$$E = K + 0.0591 \text{ pF}$$

$$\Delta E = E_F - E_{NKE} = K' - 0.0591 \log[F^-] = K + 0.0591 \text{ pF}$$

Vzamemo potencial E pri 0 ml

$$[F^-] = 0.03095 \text{ M}$$

$$\text{pF} = 1.5093$$

$$-0.1046 = K + 0.0591 * 1.5093$$

$$K = -0.1938 \text{ V}$$

Določi koncentracijo fluoridnih ionov po 50 ml dodanega titranta.

$$E = K + 0.0591 \text{ pF}$$

$$0.1118 = -0.1938 + 0.0591 \text{ pF}$$

$$\text{pF} = 5.17$$

$$[F^-] = 6.76 * 10^{-6} \text{ M}$$

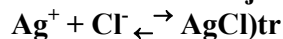
Izračunaj koncentracijo La^{3+} ionov po 50 ml dodanega titranta $\text{La}(\text{NO}_3)_3$.

$$[\text{La}^{3+}] = \frac{\text{mmolLa}}{V(\text{ml})} = \frac{(50 - 31.09) * 0.03318}{100 + 50} = 4.183 * 10^{-3} \text{ M}$$

Izračunaj L_p LaF_3

$$L_p \text{ LaF}_3 = [\text{La}^{3+}][F^-]^3 = 4.183 * 10^{-3} (6.76 * 10^{-6})^3 = 1.29 * 10^{-18}$$

Metoda določevanja končne točke titracije po Granu



$$\Delta E = E_{\text{AgCl}/\text{Ag}} - 0.0591 \log[\text{Cl}^-] - E_{\text{NKE}} = /:0.0591$$

$$\frac{\Delta E}{0.0591} = \frac{E_{\text{AgCl}/\text{Ag}}^0 - E_{\text{NKE}}}{0.0591} - \log[\text{Cl}^-]$$

$$\log[\text{Cl}^-] = \frac{K - \Delta E}{0.0591} = K' - 16.92 \Delta E$$

$$K' = \frac{E_{\text{AgCl}/\text{Ag}}^0 - E_{\text{NKE}}}{0.0591}$$

$$[\text{Cl}^-] = \text{antilog}(K - 16.92E)$$

V_{Cl} - začetni volumen titrirane raztopine

$[\text{Cl}^-]_x$ - iskana začetna koncentracija klorida

V_{Ag^+} - volumen dodanega titranta AgNO_3

[Ag⁺]-koncentracija titranta

[Cl⁻] se med titracijo spreminja

$$[Cl^-] = \frac{V_{Cl^-} * [Cl^-]_x - V_{Ag^+} * [Ag^+]}{V_{Cl^-} + V_{Ag^+}}$$

$$\frac{V_{Cl^-} * [Cl^-]_x - V_{Ag^+} * [Ag^+]}{V_{Cl^-} + V_{Ag^+}} = \text{anti log}(K - 16.9\Delta E)$$

$$V_{Cl^-} * [Cl^-]_x - V_{Ag^+} * [Ag^+] = (V_{Cl^-} + V_{Ag^+}) \text{anti log}(K - 16.9\Delta E)$$

Naloga:

100 ml 0.02M raztopine NaCl titriramo z 0.1 M raztopino AgNO₃. Izračunaj potencial Ag elektrode proti NKE, ko si dodal 1 ml pred ekvivalentno točko, v ekvivalentni točki in 1 ml po ekvivalentni točki (prebitek).

$$E_{AgCl/Ag} = E^0_{AgCl/Ag} - 0.0591 \log[Cl^-]$$

$$[Cl^-] = \frac{100 * 0.02 - 19 * 0.04}{119} = 8.4 * 10^{-4} M$$

$$E_{AgCl/Ag} = 0.222 - 0.0591 \log(8.4 * 10^{-4}) = 0.403 V$$

$$E \text{ proti NKE} = 0.403 - 0.242 = 0.161V$$

$$LpAgCl = [Ag^+][Cl^-] = 1.82 * 10^{-10}$$

$$\text{Vet } E \text{ proti NKE} = 0.403 - 0.242 = 0.161V$$

$$[Cl^-] = \sqrt{1.82 * 10^{-10}} = 1.349 * 10^{-5} M$$

$$E_{AgCl/Ag} = 0.222 - 0.0591 \log(1.349 * 10^{-5}) = 0.510 V$$

$$E \text{ proti NKE} = 0.510 - 0.242 = 0.268V$$

$$[\text{Ag}^+] = 1 \text{ ml} \frac{0.1 \text{ M}}{121 \text{ ml}} = 8.26 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

$$E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}} = E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}}^0 + 0.0591 \log[\text{Ag}^+] =$$

$$0.799 + 0.0591 \log(8.26 \cdot 10^{-4}) = 0.615 \text{ V}$$

$$E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}} = 0.615 \text{ V}$$

$$E \text{ proti NKE} = 0.615 - 0.242 = 0.373 \text{ V}$$

$$0.222 - 0.0591 \log \frac{Lp_{\text{AgCl}}}{[\text{Ag}^+]} = 0.222 - \log \frac{1.8 \cdot 10^{-10}}{8.2 \cdot 10^{-4}} * 0.0591 = 0.615 \text{ V}$$

VOLTAMETRIJA

Voltamperometrija je zasledovanje toka v odvisnosti od potenciala.

Polarografija je posebna vrsta voltametrije (začetnik Heyrovski). Osnova je elektrolitska celica, ki jo uporabljamo pri elektrolizi. Elektrolitska celica pri elektrolizi se razlikuje od normalne el. celice: imamo dve veliki elektrodi iz Pt, ki sta mrežasti in imata veliko površino.

I (A)

E proti NKE (V)

I (μA)

E proti NKE (V)

Tu nimamo dveh elektrod z veliko površino. Katoda ima majhno površino.

I_r je residualni tok-preostali tok. Ko se začnejo ioni izločati, začne tok naglo naraščati. Elektrode so koncentracijsko polarizirane. Katodo spremenimo in to ni več elektroda z veliko površino, ampak elektroda z majhno površino. Anoda je NKE. S tem dobimo pogoje, ki veljajo v voltometriji. Če je katoda živosrebrna elektroda, govorimo o polarografiji.

HgKE= živosrebrna kapalna elektroda.

Med elektrodama ni v začetku nobene napetostne razlike. Počasi se povečuje potencial. Potencial na katodi postaja vedno bolj negativen. Naboj na elektrodi je minus in privlači katione. Tok steče v skladu z Ohmovim zakonom tako dolgo, dokler ni konstanten. Graf imenujemo polarogram.

A- reduciranje nečistot

B- ohmov zakon (depolarizator, ioni, ki jih določujemo).

C-konstanten tok

Elektroda je koncentracijsko polarizirana, koncentracija Cd se ne spreminja. Pridemo v območje, ko se začne Cd reducirati in tvori amalgam. Tok narašča (več elektronov dodamo, večji tok teče).

Ob elektrodi Cd ionov zmanjka, koncentracija pade na nič in takrat teče konstanten tok. V območju B je elektroda koncentracijsko polarizirana. V C se tok ne spreminja, čeprav se potencial spreminja. Nastopi koncentracijski gradient in sicer v skladu z difuzijskim zakonom.

Difuzijski zakon ali Fickov zakon

Pretok ionov na enoto časa

Ioni potujejo iz mesta večje koncentracije na mesto z manjšo koncentracijo. D je difuzijska konstanta, je karakteristična za določene ione. Vodikov ion ima majhno difuzijsko konstanto.

Difuzijska konstanta D nam pove hitrost potovanja. Ioni depolarizatorja v točki C :

tok ne narašča več, čeprav povečujemo napetost. Cd^{2+} smo porabili, ni jih več in zato koncentracija Cd pade na nič, koncentracija se ne spreminja. Zaradi različnih koncentracij nastane difuzija.

$$\frac{dn}{dt} = -D * S * \frac{dc}{dx} \quad 1. \text{ Fickov zakon}$$

D = difuzijska konstanta (cm^2/s)

S = površina Hg kapljice (cm^2)

Pri nespremenjenem koncentracijskem gradientu preide vsako sekundo isto število elektronov k elektrodi, tok je konstanten.

$$I = I_D + I_R$$

$$I_D = 607 \cdot n \cdot D^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6} \cdot c \text{ ILKOVIČEVA enačba}$$

Zveza med I_D in c je linearna $I_D = (\mu A)$

m = masni pretok

t = kapilarni čas, kako dolgo se kapljica zadrži na kapilari

A: elektroliza praktično ne teče, ioni depolarizatorja ne sodelujejo, elektroda je koncentracijsko polarizirana

B: Cd^{2+} se polarizirajo, pri povečani napetosti teče večji tok. Raztopina se ne meša, Cd^{2+} grede od živosrebrne elektrode v amalgam.

C: Vzpostavi se koncentracijski gradient, velja Fickov zakon. Teče konstantni tok, Cd ne prehaja več, difuzijski koeficient je stalen, če je stalna temperatura.



$$I = I_D + I_R$$

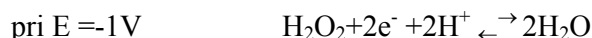
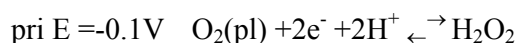
Izpolnjeni pogoji:

V raztopini mora biti nosilni elektrolit (alkalijska sol, močna kislina ali močna baza) s koncentracijo od 0.1M do 1M. To je tisočkrat večja koncentracija kot je koncentracija depolarizatorja v raztopini.

DIREKTNA polarografija

Določamo koncentracije od 10^{-3} do 10^{-7} M M^{n+} ionov. Naboji so različno razporejeni, električno polje je heterogeno v depolarizatorju. Kjer je več Cl^- ionov, je raztopina bolj negativna, kjer pa je več Cd^{2+} , pa bolj pozitivna. Difuzija ni odvisna samo od difuzijskega gradienta, pač pa tudi od električnega polja (heterogenost). Ilkovičeva enačba ne velja za heterogena polja, zato damo v raztopino nove ione (nosilni elektrolit). Sedaj merimo čisti difuzijski tok.

2.) Raztopine ne mešamo. Raztopino močno preprihamo z dušikom, da odstranimo sledove kisika, ker se na elektrodi reducira tudi kisik in tvori dva polarografska vala. Tako moti določevanje pravega difuzijskega toka oziroma željenih ionov.



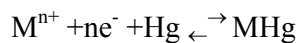
3.) Dodati moramo še za noževno konico želatine, da odstranimo maksimume polarografskih valov. Ravnotežje na Hg kapljici se prepočasi vzpostavlja, želatina je supresor maksimumov.

Hg kapalna elektroda je cevka z ozko kapilaro ($d = 0.2 \text{ mm}$), ki je povezana z rezervoarjem živega srebra, v katerega je vstavljena Cu žica. Vzpostavljen je električni tok.

$m^{2/3} \cdot t^{1/6} = \text{konstanta kapilare oziroma Hg kapalne elektrode. Ioni nosilnega elektrolita (H}^+, \text{K}^+, \text{Na}^+) \text{ ne motijo določitve ionov depolarizatorja, ker se reducirajo pri dosti bolj negativnem potencialu.}$

+0.34V	Cu ²⁺ /Cu		
		0 V	SHE
-0.4 V	Cd ²⁺ /Cd		
-0.76V	Zn ²⁺ /Zn		
-1.3V	Mn ²⁺ /Mn		
-2.0V	Na ⁺ /Na		

S polarografijo lahko določamo kvalitativno in kvantitativno sestavo.



$$E_{HgKE} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[M^{n+}]_{H_2O}}{[M]_{Hg}}$$

$$I = K \{ [M^{n+}]_{H_2O} - [M^{n+}]_{H_2O}^0 \}$$

tok ionov ob elektrodi vrednost je konst.

v raztopini

$$I_d[M^{n+}]_{H_2O} = 0 \quad I = I_d$$

$$I_d = K[M^{n+}]_{H_2O}$$

$$I = I_d - K[M^{n+}]_{H_2O}^0$$

$$[M^{n+}]_{H_2O}^0 = \frac{I_d - I}{K}$$

$I_d = K^2[M]_{Hg}$ konstanta, sorazmerje v amalgamu

$$[M]_{Hg} = I/K^2$$

Potencial na kapljajoči živosrebrni elektrodi

$$E_{HgKE} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\frac{I_d - I}{K}}{\frac{I}{K'}} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{K'}{K} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{I_d - I}{I}$$

$$\frac{K'}{K} = \left(\frac{D'}{D} \right)^{1/2} = \text{pribl 1}$$

D' = difuzijski koeficient atomov v amalgamu

D = difuzijski koeficient ionov v raztopini

$$E_{HgKE} = E^0 + \frac{1}{2} \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{D'}{D} \right) + \frac{RT}{nF} \ln \frac{I_d - I}{I}$$

D'=**D**

Ker je $\ln 1 = 0$.

$$\frac{1}{2} \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{D'}{D} \right) = 0$$

$$E_{HgKE} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{I_d - I}{I}$$

$$E_{HgKE} = E_{1/2} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\frac{I_d}{2}}{\frac{I_d}{2}} = E^0$$

$E_{1/2} = E^0$

Valovi se pojavljajo pri odgovarjajočih standardnih potencialih.

I(μA)

E(proti NKE) V

Valovi so tam, kjer so standardni potenciali.

Metoda standardnih dodatkov

in

metoda umeritvene krivulje –

posnamemio si polarografske vale z raztopino znanih koncentracij

1*10⁻³ M I(μA)

5*10⁻⁴ M

1*10⁻⁴ M

5*10⁻⁵ M

1*10⁻⁵ M

E(proti NKE) V

I(μA)

c mol/L

Kadmij kontroliramo tako, da imamo samo en I_d standardni. Merimo raztopine, ki imajo vrednosti okrog te vrednosti

$$I_{ds} = KC_s$$

$$I_{dx} = KC_x$$

$$\frac{C_x}{C_s} = \frac{I_{dx}}{I_{ds}}$$

$$C_x = \frac{I_{dx}}{I_{ds}} C_s$$

**Standardne raztopine morajo biti tako izbrane, da so koncentracije med C₁ in C₄
METODA standardnih dodatkov**

V_x je volumen vzorčne raztopine, zraven dodamo dodatke: nosilni elektrolit, vodo in vse skupaj razredčimo na 50 ml. To je V in pri tem izmerimo difuzijski tok, višino polarografskega vala. Nato odzvamemo V_x z dano koncentracijo C_x in zraven dodamo še znani volumen V_s z znano standardno koncentracijo C_s .

V_x, C_x	V	h_x
$V_x, C_x, +V_s, C_s$	V	h_s

$$h_x = K \frac{C_x V_x}{V}$$

$$h_s = K \frac{C_x V_x + C_s V_s}{V}$$

$$\frac{h_x}{h_s} = \frac{C_x V_x}{C_x V_x + C_s V_s}$$

$$h_x C_x V_x + h_x C_s V_s = h_s C_s V_s$$

$$C_x V_x (h_s - h_x) = h_x C_s V_s$$

$$C_x = \frac{h_x C_s V_s}{V_x (h_s - h_x)}$$

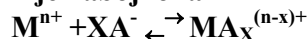
po tej formuli računamo koncentracijo depolarizatorja v neznanem vzorcu.

VPLIV kompleksov na polarografski val

Premik polvalnega potenciala k negativnim vrednostim je tem večji, čim bolj stabilen bo ta kompleks. Čim večja bo koncentracija liganda in čim večja je stabilnost kompleksa, večji je premik v negativno smer. Tako lahko določimo konstante stabilnosti posameznih kompleksnih ionov v raztopini.

X je število ligandov okoli centralnega iona

n je naboj iona



$$K_{st} = \frac{[MA_x^{(n-x)+}]}{[M^{n+}] [A^-]^x}$$

0 pomeni, da imamo opravka s Hg elektrodo (kovina ob Hg kapljici)



Celotna koncentracija $[A^-]$ ionov je

$[A^-]_{\text{celotna}} = [A^-] + [A^-]$ je malo proti ostalim

celotna koncentracija

$[A^-]_{\text{celotna}} = [A^-]$

enačba za potencial proti NKE

$$E = E^0 - E_{NKE} + \frac{0.0591}{n} \log \frac{[M^{n+}]_0}{[M]_{Hg}}$$

$$[M^{n+}] = \frac{[MA^{(n-x)+}]_0}{K_{st} [A^-]^x}$$

$$I = K \{ [MA_x^{(n-x)+}] - [MA_x^{(n-x)+}]_0 \}$$

tok ob elektrodi vrednost je konst.

$$I_d = K [MA_x^{(n-x)+}]$$

$$I = I_d - K [MA_x^{(n-x)+}]_0$$

$$[MA_x^{(n-x)+}]_0 = (I_d - I) / K$$

$$I = K' [MHg]$$

$$[MHg] = I_d / K'$$

$$E = E^0 - E_{NKE} + \frac{0.0591}{n} \log \frac{[MA_x^{(n-x)+}]_0}{K_{st} [A^-]^x [M(Hg)]}$$

$$E = E^0 - E_{NKE} - \frac{0.0591}{n} \log K_{st} - \frac{0.0591}{n} \log [A^-] + \frac{0.0591}{n} \log \frac{[MA_x^{(n-x)+}]_0}{[M(Hg)]}$$

$$E = E^0 - E_{NKE} - \frac{0.0591}{n} \log K_{st} - \frac{0.0591}{n} \log [A^-] \\ + \frac{0.0591}{n} \log \frac{I_d - I}{\frac{K}{K'}}$$

$$E = E^0 - E_{NKE} - \frac{0.0591}{n} \log K_{st} - \frac{0.0591}{n} \log [A^-] \\ + \frac{0.0591}{n} \log \frac{K'}{K} + \frac{0.0591}{n} \log \frac{I_d - I}{I}$$

$$E_{1/2} = E^0 - E_{NKE} - \frac{0.0591}{n} \log K_{st} - \frac{0.0591}{n} \log [A^-]$$

$K' \approx K$

$E_{1/2} \approx E^0$

$$E_{1/2(c)} = E_{1/2} - \frac{0.0591}{n} \log K_{st} - \frac{0.0591x}{n} \log [A^-]$$

$$E_{1/2(c)} - E_{1/2} = -\frac{0.0591}{n} \log K_{st} - \frac{0.0591x}{n} \log [A^-]$$

je premik polvalnega potenciala, ko smo dodali A in je nastal kompleks

$\Delta E_{1/2}$

$\log [A^-]$

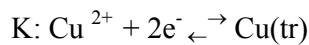
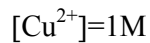
$$\frac{d(\Delta E_{1/2})}{d \log[A^-]} = -\frac{0.0591x}{n}$$

ELEKTROGRAVIMETRIJA

Poteka elektroliza. Na katodi se izloča kovina. Elektroliza poteka tako dolgo, dokler se vsa kovina ne izloči. Elektroliza je prisiljen proces. V elektrolitski celici moramo ione prisiliti, da poteče elektroliza.

Imamo dve veliki mrežasti platinski elektrodi.

Delovna elektroda je katoda in je



I(A)

$$E_{r1} \quad E_{r2} \quad E(V)$$

Ko poteče elektroliza, začne tok naraščati.

$$E_{Cu^{2+}/Cu} = E_{Cu^{2+}/Cu}^0 + \frac{0.0591}{2} \log[Cu^{2+}]_{katoda}$$

$$E_{O_2/H_2O} = E_{O_2/H_2O}^0 + \frac{0.0591}{4} \log[H^+]_{anoda}^4$$

Na katodi potrebujemo negativni potencial tudi za kovine, ki imajo negativne st, potenciale.

Vode je ob elektrodi vedno dovolj, koncentracija bakra je vedno manjša.

Eravnatežni = $E_K - E_A$ = tam, kjer se elektroliza prične

Ko napetost še malo povečamo, začne skozi celico teči tok. Dodamo dodatni potencial, ki ga imenujemo ohmski potencial IR.

$$E_{\text{prakt.}} = E_{\text{ravnl.}} - IR$$

IR odštejemo, ker je ΔE negativen

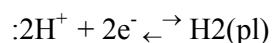
$$\Delta E = E_K - E_A < 0$$

Tudi v zgornjem primeru je tako. Dodati moramo še eno napetost, ki jo imenujemo prenapetost. Pojavlja se, kadar se na eni izmed elektrod izloča plin.

energija el.

η

Osnovna energija



Da se znebimo maksimuma (hriba), moramo dodati nek potencial (η). Prenapetost pomeni povečanje osnovne energije, aktivacija

η je odvisen od potenciala površine electrode. Prenapetost je potrebna, kjer gre za spremembo agregatnega stanja.

$$E_{\text{prakt.}} = E_{\text{ravnl.}} - IR - \eta$$

Elektroliza se ne začne pri ravnotežni napetosti, ampak pri višji napetosti. .

$E(K)$

t (min)

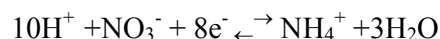
Elektroliza take vrste lahko steče pri konstantni napetosti. Voltmeter nastavimo tako, da je napetost vedno konstantna. Tok začne počasi padati (IR se začne manjšati)

Potencial na anodi je konstanten, potencial na katodi med elektrolizo pada. Po 60 minutah potencial ne pada več, ampak je konstanten. Čim bolj je potencial negativen, več ionov se začne izločati in začnejo se reducirati drugi ioni. Po 60 minutah dosežemo potencial, pri katerem se začne izločati vodik.

$$E_K = + \frac{0.0591}{2} \log \frac{[H^+]}{pH_2} = 0 \quad \text{katoda}$$

Vodik se ne začne izločati pri potencialu 0. ampak pri dosti bolj negativnemu potencialu (-0.4V). Zato vodik ne moti. Če bi se istočasno izločal vodik, bi plast vodika motile izločanje kovine in kovina se ne bi oprijela platine. Če obstaja takšna nevarnost, daoamo nitratne ione v prebitku.

Nitratni ioni so stabilizatorji



amonijevi ioni ne motijo

Takšna elektroliza ni selektivna, ker pobere še druge ione. Zato zelo radi uporabljamo elektrolizo pri kontroliranem potencialu.

Elektroliza pri kontroliranem potencialu

Na katodi kontroliramo napetost, potencial ostaja konstanten in tako lahko iz raztopine selektivno izločimo ione. Kovino še lahko izločimo do 10^{-3} M

AMPEROMETRIČNE TITRACIJE

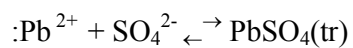
Pri teh titracijah zasledujemo spremembo difuzijskega toka na elektrodi z majhno površino, ki je lahko Hg kapalna elektroda ali rotirajoča platinska elektroda. Druga elektroda je NKE. Med dodajanjem titranta se spreminja koncentracija ionov v raztopini.

Polarografska celica

I(μ A)

E(V)

Difuzijski tok je odvisen od koncentracije. Difuzijski tok pada.



Pb^{2+} so elektroaktivni, zato se reducirajo.

I(μA)

V(ml) Na_2SO_4

I_d z dodajanjem titranta pada. Titrant se na Hg kapljici ne izloča.

I(μA)

V(ml) $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

Lahko pa titriramo $\text{Pb}^{2+} + \text{CrO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{PbCrO}_4(\text{tr})$

I(μA)

E(V)

Najprej izvedemo titracijo, ko imamo v območju A-B. Pb se reducira.

I(μA)

Ve

I v diagramu je I izmerjeni*(V_{ev}/V)

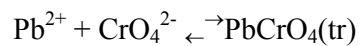
V je začetni volumen titrirane raztopine

v je volumen titranta

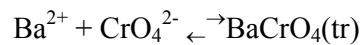
Zaradi razredčenja je tekel manjši tok.. Pb se reducira do ekvivalentne točke. Tok je 0. Potem se reducira CrO₄²⁻ in je elektroaktiven.

Sukcesivna amperometrična titracija

Pb²⁺ in Ba²⁺ titriramo skupaj



$$L_{\text{pPbCrO}_4} = 10^{-18}$$



$$L_{\text{pBaCrO}_4} = 10^{-10}$$

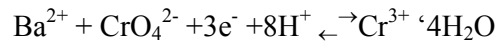
Titracija poteka pri EKHg E proti NKE C-D

Najprej se reducira Pb²⁺. Z Ba ioni se nič ne dogaja. Nato se reducira še kromat.

I(μA)

Ve₁ Ve₂ V(ml) K₂CrO₄

Prva reakcija je potekla do Ve₁. Od Ve₂ poteče redukcija kromatnih ionov.



Iz tega izračunamo

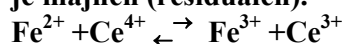
$$m_{\text{MPb}^{2+}} = V_{e1} * M_{\text{K}_2\text{CrO}_4}$$

$$m_{\text{MBa}^{2+}} = (V_{e2} - V_{e1}) * M_{\text{K}_2\text{CrO}_4}$$

Biampermetrične titracije

Imamo dve elektrodi z majhno površino, ki sta lahko koncentracijsko polarizirani. Navadno sta to dve majhni platinski elektrodi. To je neke vrste voltametrična celica. Potencialne razlike na elektrodah so od nekaj 10 do 300-400 mV. Med titracijo opazujemo tok, ki teče skozi takšno celico.

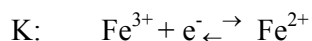
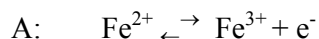
Vzačetku imamo Fe^{2+} v raztopini, Na elektrodo damo 100 mV na elektrodi. Teče tok, ki je majhen (residualen).



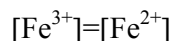
$I(\mu\text{A})$

$V(\text{ml}) \text{Ce}(\text{SO}_4)_2$

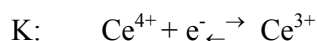
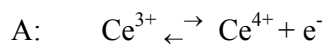
Fe^{2+} ioni, ki bi se radi oksidirali na anodi, se spremenijo v Fe^{3+} . Na obeh elektrodah teče reakcija in tako sta elektrodi koncentracijsko polarizirani.



Tok je čim večji, večja je koncentracija ionov v raztopini, je odvisen od koncentracije.

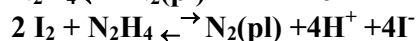
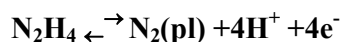
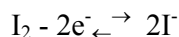


Teče vedno večji tok, maksimalen, nato pa vedno manjši. V raztopini nimamo več obeh ionskih vrst. Fe je reverzibilen redoks par, ker se na anodi oksidira, na katodi pa reducira. po ekvivalentni točki imamo v prebitku Ce ione.



Ce je reverzibilen redoks par. Do mrtve točke zasledujemo nihanje kazalca na ampermetru. Ko je na vrednosti 0, smo v ekvivalentni točki. To je titracijska metoda do mrtve točke- dead stop

Titracija I v alkoholni raztopini s hidrazinom- primer reverzibilnega redoks para.



Do ekvivalentne točke imamo v raztopini jod in jodid redoks par. pri $V_e/2$ je tok maksimalen. Koncentracija jodida je določala o toku. Ko gremo preko, je katoda tista,

ki odloča otoku. Ves jod smo pretvorili v jodid. Jod določa velikost toka. Dušik je inerten in ga pod nobenimi pogoji ne moremo spraviti v amonijak ali hidrazin. Ta redoks par ni reverzibilen, zato je tudi krivulja drugačna.

KULOMETRIJA

Merimo elektrenino, ki se pri elektrolizi porabi, merimo množino ampersekund. Osnova je Faradejev zakon.

$$Q = I * t$$

$F = 96\,500 \text{ As (Cb)}$ – je tista množina elektrenine, ki izloči 1 gram ekvivalent snovi.

$$\frac{I * t}{96500 \text{ As}} = \frac{M}{n}$$

n = število elektronov, ki se pri elektrolizi izmenja na katodi

$$\frac{I * t}{F} = \frac{m}{\frac{M}{n}}$$

$$\frac{I * t}{nF} = \frac{m}{M}$$

Elektroliza pri konstantnem potencialu ali potenciostatska elektroliza. Določamo lahko žlahtne kovine, ki so prisotne v zelo majhnih količinah.

$$I = I_0 * e^{-kt}$$

$$Q = I \int_{t=0}^{t=\infty} dt$$

Tok pada, vendar se nikoli ne dotakne abcise.

$$Q = I \int_{t=0}^{t=\infty} dt = \int_{t=0}^{t=\infty} I_0 * e^{-kt} dt = I_0 \frac{1}{k} \int_{t=0}^{t=\infty} e^a da$$

$$-kt = a$$

$$-k dt = da$$

$$dt = \frac{da}{k}$$

$$= I_0 * \frac{1}{k} e^{-kt} = -\frac{I_0}{k} * \frac{1}{e^{kt}} = -\frac{I_0}{k}$$

$$Q = -\frac{I_0}{k}$$

logaritmiramo

$$I = I_0 * e^{-kt}$$

$$\ln I = \ln I_0 - kt$$

$$\log I = \log I_0 - kt/2.303$$

log I

t(min)

Iz naklona dobimo k.

— EKSTRAKCIJA

je postopek, pri katerem ločujemo topljenec med dvema fazama. Topljenec prehaja iz ene faze (n.pr. vodne raztopine v drugo fazo, ki je organsko topilo in se ne meša z vodo.

$S_{H_2O} \leftrightarrow S_{org}$ ravnotežje med vodno in organsko fazo.

$$K = \frac{[S_{org}]}{[S_{H_2O}]}$$

K je porazdelitveni koeficient in je konstanta.

Če imamo a mmolov topljenca in po ekstrakciji ostane x1 mmolov v vodi, a-x1 pa ga preide v organsko fazo.

$$[S_{org}] = \frac{a - x_1}{V_{org}}$$

$$[S_{H_2O}] = \frac{x_1}{V_{H_2O}}$$

x_1 – koliko ga ostane po ekstrakciji

$$K V_{org} x_1 + V_{H_2O} x_1 = V_{H_2O} a$$

$$x_1 = \frac{V_{H_2O} \cdot a}{K V_{org} + V_{H_2O}}$$

Lahko ločimo organsko fazo od vode, če je ena težja in druga lažja- z lij ločnikom ali pipeto.

Spet naredimo ekstrakcijo:

$$x_1 = \left(\frac{V_{H_2O}}{K V_{org} + V_{H_2O}} \right)^n \cdot a$$

$$x_1 = \left(\frac{100}{85 \cdot 100 + 100} \right) \cdot 0.1$$

$$x_1 = 1.16 \cdot 10^{-3} \text{ mmol}$$

Bolj se splača ekstrahirati večkrat z manjšimi volumni.

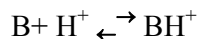
$$q_2 = \frac{x_2}{a} = \left(\frac{5.28 \cdot 10^{-5}}{0.1} \right) = 5.28 \cdot 10^{-4} \%$$

$$q_1 = \frac{x_2}{a} = \left(\frac{5.28 \cdot 10^{-5}}{0.1} \right) = 5.28 \cdot 10^{-4} \%$$

Ekstrakcija v ionski obliki.

Ekstrakcija je odvisna od pH raztopine, ioni ne grejo v organsko topilo.

Bze so snovi, ki sprejemajo elektrone. Anilin se protonira.



K velja zmeraj za substanco, ki ni ionska.

D je porazdelitveni koeficient, ki upošteva pH.

D je dejanski porazdelitveni koeficient,

Čim bolj kisla je raztopina, več BH bo nastalo. Od pH je odvisno, koliko BH bomo spravili v organsko fazo.

Naloge:

K med benzenom in H₂O je 3, konstanta za anilin, ki ga ekstrahiramo, je $1 \cdot 10^{-9}$

50 ml 0.01 M vodne raztopine amina ekstrahiramo s 100 ml organskega toplja benzena.

Kolikšna bo preostala koncentracija amina v vodni fazi?

a) pri pH = 10

b) pri pH = 8

a)

ostane amina v vodni fazi

Tudi kisline lahko ekstrahiramo (fenol)

Večja je koncentracija H^+ , bolj uspešna je ekstrakcija. Ekstrahiramo lahko tudi kovinske ione, tako da jih predhodno zakompleksiramo.

Pri določenih pH lahko prevedemo v organsko fazo ene ione, pri drugem pH pa druge.

porazdelitev za različne ione je odvisna od koncentracije liganda v organski fazi in od pH.

KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je separacijski proces, kjer najprej ločimo posamezne komponente vzorca in jih nato zaznamo z ustrezno detekcijo. V praksi skušamo doseči čim boljšo ločitev v čim krajšem času z optimizacijo vseh parametrov in komponent kromatografskega sistema. Meja optimalnosti je ponavadi določena z zmogljivostjo opreme. Posamezne komponente preiskovanega vzorca se ločijo med seboj na podlagi različnih fizikalnih in kemijskih lastnosti ter na podlagi različnih fizikalnih interakcij z mobilno in stacionarno fazo.

Molekule na svoji poti vzdolž kolone stalno prehajajo med mobilno in stacionarno fazo, pri čemer se premikajo le v mobilni fazi, v stacionarni fazi mirujejo.

Ločitev poteka tako, da mobilna faza stalno potuje vzdolž kolone in prenese komponente vzorca, ki jih nanese (injiciramo) na kolono. Komponente zmesi se porazdelijo med mobilno in stacionarno fazo. Ta porazdelitev se ponavlja vzdolž kolone in končno se komponente ločeno eluirajo iz kolone. Tam jih zaznamo s specifičnimi detektorji. Signali so podani kot kromatografski vrhovi in celotna krivulja kot kromatogram. Površina pod kromatografskim vrhom je proporcionalna koncentraciji in podaja kvantitativno informacijo.

Retenzijski čas je čas, ki je potreben, da se določena nov pri izbranih pogojih eluira skozi kolono. Definiran je kot čas, ko se komponenta zadržuje v koloni in je konstanten za vsako organsko substanco pri določenih kromatografskih pogojih (dimenzija kolone, tip stacionarne faze, pretok in vrsta mobilne faze, velikost delcev v koloni, temperatura). Na osnovi primerjanja teh časov z retenzijskimi časi znanih spojin, ugotavljamo kvalitativno sestavo vzorca. Dve komponenti sta ločeni, če se njun retenzijski čas razlikuje. Retenzijski čas (t_r) je sestavljen iz dveh delov in sicer iz časa, ki ga molekula prebije v mobilni fazi (t_m) in časa, ko se nahaja na stacionarni fazi (t_r')

$$t_r = t_m + t_r' \quad 1)$$

Razmerje med (t_r') in (t_m) je pomembna karakteristika, ki opisuje termodinamsko povezavo med topljencem v določenem kromatografskem sistemu (sistem je mobilna in stacionarna faza). Pri ravnotežnih pogojih je to razmerje relativnega števila molekul topljenca v stacionarni in mobilni fazi. To razmerje se imenuje masno porazdelitveno razmerje ali kapacitivni faktor (k')

$$k' = \frac{t_r'}{t_m} \quad 2)$$

Vrednost kapacitivnega faktorja (k') lahko variira med nič in neskončnostjo. Vrednost nič pomeni, da topljenec preide skozi kolono nezadržan, medtem ko vrednost "neskončno" pomeni, da se je topljenec popolnoma vezal in ga pri danih pogojih ni mogoče eluirati.

Retenzijski čas je za določeno komponento karakteristična vrednost in jo lahko uporabimo pri konstantnem pretoku za njeno identifikacijo

$$t_r = t_m \cdot (k' + 1). \quad 3)$$

Retenzijski čas in kapacitivni faktor sta odvisna od hitrosti mobilne faze (pretoka) in od dolžine kolone. Posledica majhne hitrosti mobilne faze ali daljše kolone je daljši retenzijski čas in zato tudi večji kapacitivni faktor.

Kapacitivni faktor je povezan s porazdelitvenim koeficientom (K) preko razmerja faz. Ta koeficient je definiran kot razmerje koncentracij (c) topljenca v stacionarni fazi (s) in mobilni fazi (m)

$$K = \frac{c_s}{c_m}. \quad 4)$$

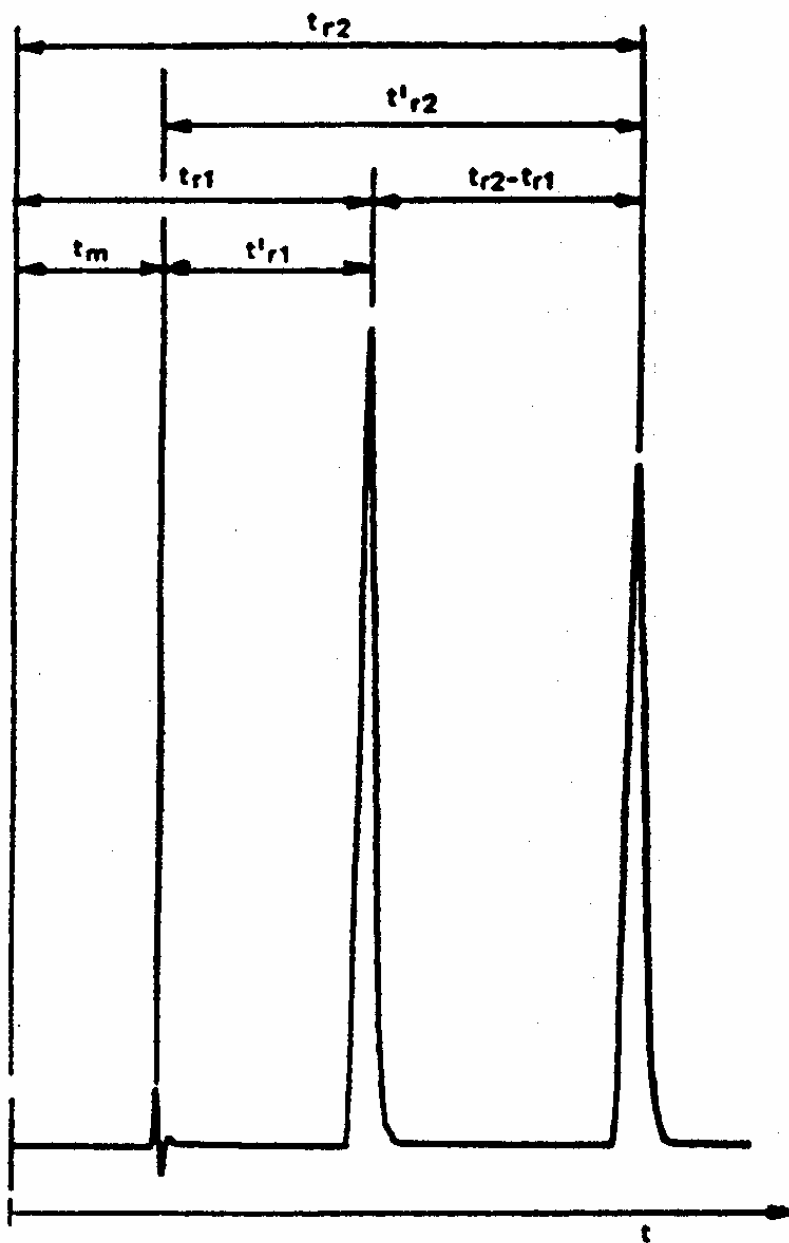
Razmerje kapacitivnih faktorjev dveh topljencev 1 in 2 se imenuje separacijski faktor, ki navadno ustreza selektivnosti (α). Dve komponenti v mešanici se ločita, če je $\alpha \neq 1$ oziroma, če imata različne k' vrednosti. Selektivnost je odvisna od lastnosti stacionarne in mobilne faze

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}, \quad 5)$$

kjer je $k'_2 > k'_1$.

V skladu s sliko 2.1 se separacija med maksimumoma dveh sosednjih komponent povečuje s časom, ustrezno razliki $t_{r1} - t_{r2}$. S preureditvijo enačbe (2.3) za dve zapovrstni komponenti 1 in 2 dobimo :

$$t_{r1} - t_{r2} = t_m \cdot (k'_1 - k'_2).$$



Definicija posameznih kromatografskih časov, kjer je:

t_{r1} - čas zadrževanja komponente 1 med injiciranjem in elucijo - retenzijski čas1,

t_{r2} - čas zadrževanja komponente 2 med injiciranjem in elucijo - retenzijski čas2,

t'_{r1} - razlika $t_{r1} - t_m$,

t'_{r2} - razlika $t_{r2} - t_m$,

t_m - zadrževalni čas, ki je potreben, da se eluira topilo.

Razlika posameznih retenzijskih časov, ki je potrebna za separacijo, narašča z naraščajočo razliko med kapacitivnima faktorjema obeh komponent pri dani hitrosti in z naraščajočo dolžino kolone (l).

Proces separacije je podvržen tudi antagonističnemu efektu širjenja posameznih con med migracijo topljenca skozi kromatografsko kolono. Ta efekt je karakteriziran s širino vrha (W_b) pri njegovi bazi. To širino dobimo, če potegnemo tangente skozi prevojne točke, na presečišču le-teh z bazno linijo ali širino vrha v višini prevojev.

Za Gaussov vrh velja:

$$W_b = 2W_i = 4s,$$

kjer je standardni odklik (s) ustreznega vrha merjen v enotah dolžine, časa ali volumna.

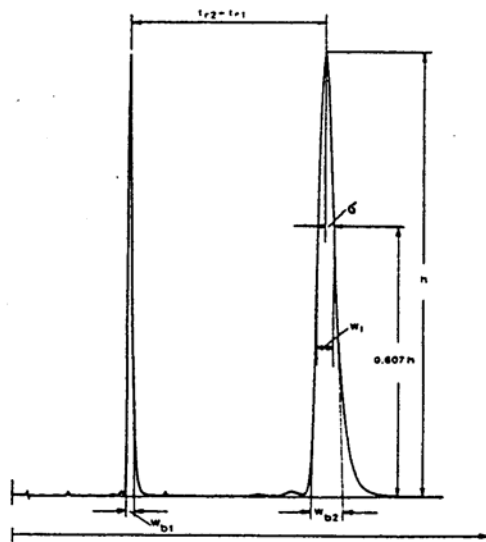
Teorija in praksa kažeta, da narašča širina vrha s kvadratnim korenom razdalje migracije znotraj kolone. Za povsem eluirano komponento je ta razdalja enaka dolžini kolone (l).

$$s \approx \sqrt{l} \quad 6)$$

$$s^2 \approx l \quad 7)$$

Uvedemo proporcionalni faktor (h) in zgornjo zvezo lahko zapišemo:

$$s^2 = h \cdot l \quad 8)$$



Slika: Parametri, ki opisujejo separacijo in disperzijo.

Proporcionalni faktor (h) obsega vse tiste efekte, ki povzročijo, da posamezne molekule iste komponente potujejo skozi kolono z različnimi hitrostmi. Posledica tega je disperzija in redčitev, kar pomeni, da se bo komponenta eluirala iz kolone v večjem volumnu, kot je bila dozirana, in z manjšo koncentracijo. V razvoju kromatografske nomenklature so vpeljali za ta parameter naziv ekvivalentna višina teoretskega poda.

Na disperzijo kromatografskega vrha vplivajo trije osnovni efekti:

- Efekt množične poti. Zaradi vijugaste narave poti v samem polnilu kolone bodo posamezne molekule topljenca opravile različno dolge poti, kar povzroči širitev vrha. Za zmanjšanje tega efekta je potrebno kolono napolniti s čim manjšimi delci z enako velikostjo.
- Naključna molekularna difuzija v aksialni smeri kolone. Ta efekt je relativno majhen, zaradi majhnih difuzijskih koeficientov tekočine. Pomemben postane pri dolgih retenzijskih časih in zelo majhnih pretokih.
- Upor proti difuziji in masnemu prehodu molekul, ki se gibljejo iz ene v drugo fazo in odstopanje od ravnotežja zaradi tega prehoda. Efekt zmanjšamo z zmanjšanjem pretoka in uporabo nosilcev z majhnimi in poroznimi delci, s čimer obdržimo kratke dolžine difuzijskih poti.

Parametri, ki vplivajo na višino poda so: pretok, premer delcev, struktura in geometrija polnitve in difuzijski koeficient. Te parametre imenujemo tudi kinetični parametri.

Kolona je tem bolj učinkovita, čim manjše in enakomernejše delce polnila uporabimo. Z zmanjševanjem delcev je povezan velik padec pritiska na kolonah, kar pomeni, da pretirana majhnost delcev ni več smotna. Pri krajših časih analize dobimo ostre vrhove in s tem tudi večjo občutljivost. Zato naj bi v analizi sledov in nečistoč uporabljali kratke kolone z majhnimi delci. Vendar kolone ne smejo biti prekratke, da se pod sam vrh preiskovane komponente ne bi skrila kakšna druga komponenta, izvirajoča iz nečistot v substanci ali iz sestavin.

Optimizacija kromatografskega procesa mora upoštevati optimizacijo separacije in minimizacijo disperzije. Razmerje teh dveh efektov nas pripelje do izraza, ki se uporablja kot najvišji kriterij kromatografske optimizacije. To imenujemo ločljivost ali resolucija. Ločljivost (R) je definirana kot razmerje med razdaljo med dvema sosednjima vrhovoma in aritmetično sredino njunih širin na bazni liniji:

$$R = \frac{2 \cdot (t_{r1} - t_{r2})}{W_1 + W_2} \quad 9)$$

Ločljivost dveh vrhov je odvisna od selektivnosti (α), števila teoretskih podov (n) in od kapacitivnega faktorja (k'):

$$R = \frac{1}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'}{k' + 1} \cdot \sqrt{n}$$

Enačba vsebuje tri spremenljivke, ki določajo proces:

- topljenci morajo biti retardirani, ($k' > 0$),
- topljenci morajo biti retardirani v različni meri, ($\alpha > 1$),
- kolona mora imeti določeno število teoretskih podov (n).

Resnični ključ separacije je separacijski faktor (α), ki naj bo čim večji, kar dosežemo z izbiro ustreznih faznih sistemov in pogojev.

Prednost tekočinske pred plinsko kromatografijo je v tem, da lahko kapacitivni in separacijski faktor spreminjamo enostavno s spremembo mobilne faze. V praksi izberemo takšne pogoje, da je (k') med 1 in 5. Večja vrednost le malo doprinese k resoluciji in daljša retenzijski čas.

Plinska kromatografija

Plinska kromatografija je analitska metoda za ločitev zmesi hlapnih substanc, ki so hlapne brez razkroja ali so v plinastem agregatnem stanju.

Pri plinski kromatografiji zmes substanc, ki se uplinijo, ali so že v plinastem stanju, vstopa v kolono, ki je napolnjena z adsorbentom ali nosilcem stacionarne faze. Skozi kolono vodimo nosilni plin (mobilna faza), ki se ne veže na stacionarno fazo. Nosilni plin prenese zmes substanc skozi kolono.

Izbira stacionarne faze je najpomembnejša naloga plinske kromatografije in je odvisna od tega, kakšen vzorec analiziramo. Pri izbiri stacionarne faze velja pravilo, da se podobno topi v podobnem. Tako za nepolarne vzorce uporabljamo nepolarno stacionarno fazo in za polarne vzorce polarne stacionarne faze.

Nosilni plin (mobilna faza) ima to nalogo, da nosi vzorec skozi kolono v detektor. Pravilna izbira nosilnega plina je zelo pomembna, predvsem zaradi naslednjih razlogov:

- Nečistote, ki jih vsebuje nosilni plin, lahko spremenijo strukturo tekoče faze v koloni in povzročijo visok nivo bazne linije in s tem se zaznavnost detektorja zmanjša.
- Izbira nosilnega plina je odvisna od detektorja, ki ga uporabljamo.
- Hitrost analize in učinkovitost kolone je odvisna od hitrosti nosilnega plina in difuzije vzorca vanj.

Kot nosilne pline lahko uporabljamo pline, ki se ne vežejo na adsorbent oziroma stacionarno fazo. Zelo pogosto uporabljamo helij in vodik. Uporabljamo lahko tudi argon in dušik. Nosilni plin so shranjeni v jeklenkah, so zelo čisti in ne vsebujejo vlage, kisika in ogljikovodikov. Pri običajnih kolonah s premerom 2 μm zadostuje pretok 50 do 100 mL/min. Pri kapilarnih kolonah znaša pretok od 0,5 do 2,5 mL/min.

Aparatura

Kolona je jedro aparata za plinsko kromatografijo, saj se v njej loči plinska zmes. Ostali deli aparata služijo le za kontrolo. Ločitev je odvisna od polnitve, to je adsorbenta oziroma nosilca s stacionarno fazo in od učinkovitosti kolone.

Temperatura kolone med kromatografijo znaša do 300° C. Temperatura se ravna po substancah, ki jih želimo ločiti in po stacionarni fazi. Kromatografske kolone se nahajajo v termostatu, ki je od okolice dobro izoliran. S pomočjo grelcev in ventilatorja ga je možno ugrejeti do 300° C. Pri vsaki stacionarni fazi je potrebno paziti, da delovna temperatura ne preseže maksimalne dopustne temperature, sicer nam prične iz kolone izhajati stacionarna faza.

Za polnjenje kolon se uporabljamo adsorbenti in nosilci. Adsorbente moramo pred uporabo sprati z nosilnim plinom. Uporabljajo se pri analizi anorganskih plinov in lahkih ogljikovodikov, do C₃. Kot adsorbenta se najpogosteje uporabljata silikagel in različne vrste molekularnih sit. Kadar uporabljamo nosilce, morajo le-ti biti enako veliki in imeti enako obliko. Velikost delcev je 0,1 do 0,2 mm oziroma 0,2 do 0,3 mm. Majhni delci povzročajo velik upor in padeč tlaka v koloni. Najpogosteje se

uporabljajo naslednji nosilci: kieselgur, cromosorb P, cromosorb W, cromosorb G, cromosorb A, DMCS cromosorb.

Kolone so izdelane iz stekla, bakra, jekla, medenine in najlona. Za analitske namene imajo kolone premer 5 do 8 mm, za preparativne namene do 20 mm.

V novejšem času se v glavnem uporabljajo kapilarne kolone s premerom 0,2 do 0,4 mm in dolžino nad 50 m. Takšna kolona je brez polnila, stacionarna faza je nanešena v tankem filmu po notranji steni kapilare. Prednost kapilarne plinske kromatografije je v tem, da je ločljivost izredno velika, čas, potreben za analizo, pa je kratek. Kapaciteta kapilarne kolone je zelo majhna, zato se uporablja indirektno injiciranje vzorca. Injicirani vzorec se meša z nosilnim plinom. Homogena zmes vzorca in nosilnega plina se deli na dva dela. En del zapušča sistem, drugi del pa gre v kolono. To imenujemo linearna delitev vzorca.

Injektor, ki ga bomo uporabljali, je odvisen od kolone. Pri analizi s plinsko kromatografijo je injiciranje in izparevanje odločilnega pomena. Injiciranje in izparevanje je potrebno izvesti v čim krajšem času, tako da vzorec čim prej pride do kolone in se s tem prične širjenje kromatografskega vrha. Nezaželen pojav je povratna difuzija, saj le-ta povzroča pojav lažnih vrhov.

Injicirani volumen je odvisen od izbire kolone. Pri kolonah z nosilno plastjo vstopa v kolono celotna količina vzorca, ki se injicira. Volumen injiciranega vzorca mora biti čim manjši in pretok laminaren. Pri kapilarnih kolonah se izparjen vzorec deli na dva neenaka dela. Manjši del vstopa v kolono, a večji del zapušča sistem. V tem primeru mora biti volumen injiciranega vzorca velik in pretok turbolenten, da pride do temeljitega mešanja med vzorcem in nosilnim plinom pred delitvijo.

Detektor nam zazna spremembe v sestavi iztekajočega plina iz kolone. Detektor mora izpolnjevati naslednje zahteve:

- Njegova reakcija na spremembo v sestavi iztoka iz kolone mora biti hitra.
- Mora biti zelo občutljiv, kar pomeni, da mora registrirati že najmanjše sledove tujih substanc v nosilnem plinu.
- Njegova registracija mora biti kvantitativna.

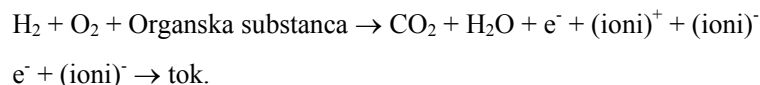
Detektorje delimo v integralne in diferencialne. Največ detektorjev pri plinski kromatografiji je diferencialnega tipa to se pravi, da daje znak ničlo, če teče skozi detektor nosilni plin. Če teče komponenta zmesi, je znak, ki ga daje detektor, sorazmeren njeni koncentraciji. Detektor integralnega tipa daje kontinuirni signal, ki je proporcionalen celokupni množini substance, ki se eluira. Vsi današnji plinski kromatografi so opremljeni z diferencialnimi detektorji.

Mnogi kromatografi so opremljeni z detektorji, ki slonijo na ionizacijski sposobnosti plinov. To so argonov ionizacijski detektor, plamensko ionizacijski detektor, ionizacijski detektor po Ryce in Bryce, detektor za zajetje elektronov ("electron capture" detektor).

Pri plamensko ionizacijskem detektorju se uporablja kot nosilni plin vodik ali je le-ta primešan drugemu nosilnemu plinu. Plin izhaja iz ozke šobe, ki je pri eni vrsti aparatov priključena na negativni

pol. Nasproti je platinska žica, ki je priključena na pozitivni pol. Potencialna razlika, ki jo priključimo na gorilnik in žico je 200 do 300 V.

Kadar zgori vodik v zraku, nastaja relativno malo ionov. Na galvanometru bomo opazili majhen odklon. Če je primešana organska substanca, se močno zveča množina ionov, ne glede na to, ali je substanca gorljiva ali ne. Mehanizem nastanka ionov:



Dokler iz kolone prihaja samo nosilni plin, je ionski tok majhen. Ko pride iz kolone še komponenta (organska snov), se ionski tok ojači in ga je možno s primerno ojačevalno pripravo meriti.

Plamensko ionizacijski detektor deluje pri temperaturah 200 do 400° C, kar preprečuje kondenzacijo vode, ki nastaja pri gorenju, kakor tudi kondenzacijo organskih snovi z višjim vreliščem. Občutljivost detektorja znaša 10⁻¹⁰ g.

Druga vrsta plamensko ionizacijskega detektorja je zgrajena tako, da obdajata plamen dve elektrodi s potencialno razliko 150 do 300 V. Linearno območje aparata je zelo veliko.

Za zapis signala se uporabljajo rekorderji, integratorji in računalniki.

Tekočinska kromatografija

Visokotlačna kromatografija ali tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je kolonska kromatografija, pri kateri za stacionarno fazo uporabljamo zelo majhne delce (od 0,5 do 10 μm). Če želimo, da bo pretok skozi takšno kolono od 0,5 do 5 mL/min moramo mobilno fazo potiskati skozi kolono z visokotlačno črpalko. Značilnost visokotlačne kromatografije je hitra in dobra ločljivost.

Pri visokotlačni kromatografiji raztopino substanc injiciramo na kromatografsko kolono, ki je napolnjena z različnimi polnili. Skozi kolono vodimo topilo (mobilna faza), ki ne reagira s polnilom (stacionarna faza). Topilo prenese zmes substanc skozi kolono.

Izokratska elucija imenujemo postopek, pri katerem uporabimo za kromatografsko ločitev mobilno fazo enake sestave med celotno analizo.

Tako pri HPLC, kot tudi pri plinski kromatografiji, lahko v koloni potekajo različni separacijski postopki: adsorpcija, porazdelitev in ločitev na osnovi velikosti molekul.

Danes je na razpolago mnogo stacionarnih faz za delo v tekočinski kromatografiji. Na razpolago imamo adsorpcijske stacionarne faze kot je silikagel, reverzne faze vseh velikosti delcev z vezanimi različnimi skupinami, ionske izmenjevalce, posebne permeabilne stacionarne faze in kiralne stacionarne faze, ki se uporabljajo za ločitev optično aktivnih snovi. Predhodnik vse te množice stacionarnih faz je bil silikagel in v manjši meri tudi aluminijev oksid. Silikagel se čedalje manj uporablja kot stacionarna faza, vendar služi kot osnova v proizvodnji za množico reverznih in drugih faz.

Uporaba adsorpcijske kromatografije se omejuje na substance, ki so topne v organskih topilih. Ločujemo lahko tudi bolj polarne substance, vendar je za te boljše uporabiti reverzne faze. Silikagel je selektiven za substance s čim bolj različnimi funkcionalnimi skupinami. V načelu je tako, da bolj polarne skupine bolj doprinašajo k retenziji.

Za ločitev komponent v bolj kompliciranih zmesih se moramo uporabiti gradientno elucijo.

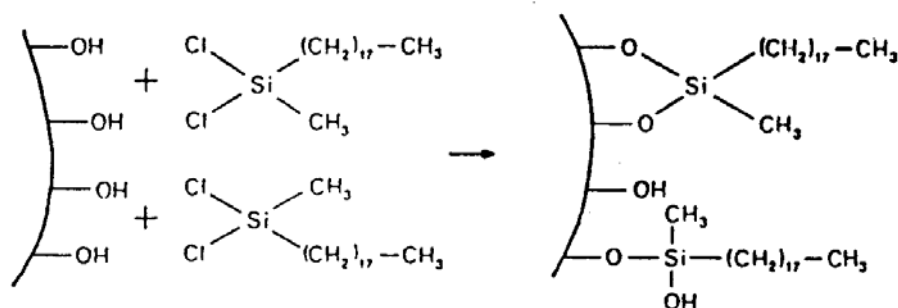
Povišanje temperature povzroči znižanje viskoznosti mobilne faze (večji difuzijski koeficient, večje pretočne hitrosti). Tako je kromatografija boljša (krajši čas analize). Vendar prevelika temperatura lahko povzroči nastajanje mehurčkov, obstaja možnost razkrajanja vzorca ali topila in težja je kontrola ravnotežja.

O reverzni kromatografiji govorimo, kadar imamo nepolarno stacionarno fazo in polarno mobilno fazo, kar je ravno nasprotno adsorpcijski kromatografiji. Polarne topilo (npr. voda) eluira počasneje kot manj polarne topilo (npr. metanol). Nepolarne komponente se eluirajo počasneje kot polarne. Značilen je obraten vrstni red elucije posameznih komponent na reverzni fazi, pri čemer lahko opazimo tudi neprimerno bolj specifično separacijo.

Kromatografija na reverznih fazah se klasificira kot posebna vrsta adsorpcijske in/ali porazdelitvene kromatografije.

Reverzno fazo dobimo tako, da s kemijsko reakcijo med silanolnimi skupinami silikagela s primernimi reagenti spremenimo lastnosti silikagela. Modificiran silikagel ima veliko prednosti pred čistim silikagelom. Predvsem nam omogoča uporabo mešanic polarnih topil, kjer ima voda pomemben delež. Vzpostavitev ravnotežnih pogojev na sami koloni je bistveno hitrejša kot pri silikagelu, čas elucije je ponavadi kratek in predvidljiv, gradientni načini elucije povzročajo manjše probleme. Danes je na trgu izredno veliko število reverzних faz, tako da lahko najdemo za vsak primer ustrezno. Hlapne substance so domena plinske kromatografije, ostale pomenijo delovno območje HPLC, pri čemer vemo, da lahko hlapne substance prav tako analiziramo s HPLC in nehlapne substance lahko analiziramo s plinsko kromatografijo, vendar jih moramo predhodno z derivatizacijo pretvoriti v hlapne. Za material reverzних faz je značilna široka uporaba in dolga življenjska doba (časovna obstojnost), dobra reproducibilnost in visoka mehanska stabilnost.

S kemijsko reakcijo silanolnih skupin na silikagelu in alkilsilanov, ki vsebujejo reaktivne kloro skupine dobimo novo vez na površini. Če poteka reakcija z monoklor-alkil-silani, dobimo monomerna pokritja. Pri reakciji z diklor-alkil-silani pride do istočasnega reagiranja teh skupin s površino. V praksi je težko doseči, da bi reagirale vse proste silanolne skupine. Zasedenost se približuje 50 %, ostale ostanejo proste in s tem seveda bistveno vplivajo na lastnosti tako nastale reverzne faze.



Slika: Kemijska reakcija za pripravo reverzne faze.

Pokritost silikagela z alkilnimi skupinami se izračuna iz vsebnosti ogljika na takem nosilcu. Če je pokritost površine enaka, bo absolutna retencija naraščala sorazmerno z daljšanjem verige (volumen, ki ga zavzamejo daljše vezane nepolarne skupine je večji, k' je sorazmeren volumskemu razmerju med stacionarno in mobilno fazo). Kratke alkilne verige (C_8) so primerne za ločevanje polarnih vzorcev, medtem kot so dolge verige (C_{18}) primerne za separacijo nepolarnih vzorcev.

Največ se uporabljajo C_{18} akili, s katerimi dosežemo visoke absolutne in relativne retencije. Stacionarna faza s C_{18} akili je idealna za kromatografijo na reverzних fazah. Ima odlično kemijsko stabilnost, prenese visoke pritiske, možno je polnjenje HPLC kolon in ima nepolarno površino. Te faze so še zlasti primerne za molekule, ki se slabše raztapljajo v vodi. Če je problem separacija homologne vrste, praviloma uporabimo C_{18} fazo.

Pomemben podatek je gostota polnjenja, ki jih specificirajo proizvajalci. Za reverzne faze je ta višja kot pri samem silikagelu zaradi deleža ogljika v porah. S tem je tudi tesno povezan padec pritiska, ki je pomemben za vzdrževanje pretoka.

Topilo (mobilna faza HPLC), ki ga uporabljamo, je že delno določeno s polnilom v koloni, torej s principom separacije, ki poteka v koloni. Skupno za vsa topila je, da: ne sme reagirati s polnilom, ne sme reagirati s kolonami in kovinskimi deli aparata in biti mora čim bolj čisto. Od topila je odvisen tudi upor kolone.

V kromatografiji na reverzних fazah se kapacitivni faktorji (k') večajo v skladu z večanjem deleža vode v mobilni fazi. Največje vrednosti dobimo seveda s čisto vodo. Za povečanje hitrosti elucije uporabljamo organska topila, ki se z vodo ne mešajo. Katerega od organskih modifikatorjev (topil) bomo uporabili, je odvisno od lastnosti preiskovane substance; predvsem njene topnosti. Topilo, ki ga uporabimo, mora biti ekstremno čisto. Z dodatkom tretje komponente k vodno-organski mobilni fazi lahko reguliramo relativne retenzije posameznih komponent. Zelo uporabna sta tetrahidrofur in diklormetan.

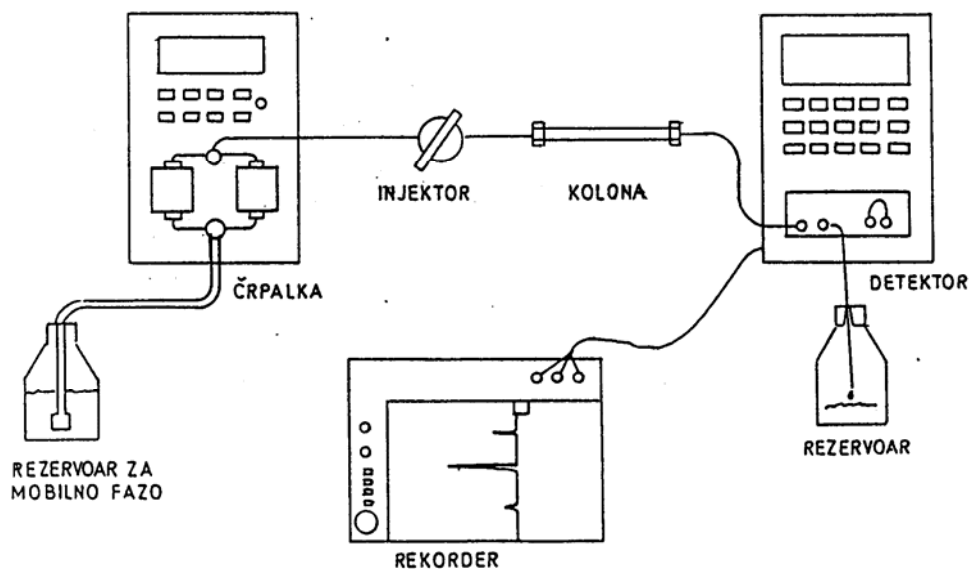
Zelo pomembna je priprava mobilne faze. V literaturi je navedena, kot najboljša varianta za pripravo mobilne faze s tehtanjem, ker je volumsko pripravljanje problematično zaradi spreminjanja volumnov pri mešanju. Pri pripravi mobilne faze se moramo pri isti metodi držati vedno enakega načina priprave mobilne faze.

Različne sestave mešanic topil imajo pogosto različne viskoznosti. To vpliva na padec pritiska na koloni. Viskoznosti lahko zmanjšamo s povišanjem temperature kolone.

Spremembe v temperaturi na splošno vplivajo na retenzijo. Če želimo ponovljive in zanesljive rezultate, je potrebno imeti vse komponente sistema pri konstantni temperaturi. Retencija narašča z manjšanjem topnosti substance v vodi. Molekule z razvejanimi verigami se manj časa zadržujejo v koloni, kot tiste z ravnimi verigami. Nenasičene spojine se prej eluirajo kot nasičene. Ionizirane skupine navadno ne prispevajo k resoluciji. Vendar je vrstni red elucije mogoče obrniti s spremembo pH mobilne faze.

Aparatura

Najenostavnejši HPLC sistem mora imeti naslednje komponente: rezervoar za mobilno fazo, črpalko, injektor, kromatografsko kolono, detektor in instrument za zapis signala.



Slika: Shema najenostavnejšega sistema za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.

Mobilne faze, ki jih uporabljamo v HPLC, so pogoste mešanica toksičnih in vnetljivih topil, zato je pri delu z njimi potrebna določena previdnost. Rezervoarji, kjer jih hranimo in iz katerih jih med delom črpamo, so najpogosteje primerne steklene posode. Te morajo biti dovolj tesno zaprte, ne smemo pa jih popolnoma zatesniti, ker bi nastajal v njih zaradi črpanja podpritisek, kar povzroči motnje v delovanju črpalke.

Topila so zmeraj nasičena s plinom. Raztopljeni plini utegnejo povzročati precejšnje nevšečnosti, ker se pri črpanju izločijo in s tem povzročajo nihanje pritiska na črpalki, kar nam pokvari separacijo. Še večje nevšečnosti povzroča ujeti mehurček v detektorski celici, ki ga izženemo z nenadnim povečanjem pretoka ali pritiska. Topila je zato potrebno temeljito razpliniti s prepihanjem. Drugi način je degaziranje z ultrazvokom in vodno črpalko, s katero ustvarimo podpritisek. Vse mobilne faze pred uporabo prefiltriramo skozi filter, pri tem se mobilna faza istočasno še degazira.

Črpalka mora zagotavljati enakomeren pretok mobilne faze skozi kolono. Od stabilnosti pretoka je odvisna natančnost analize.

Substanca, ki se eluira, je porazdeljena v določenem volumnu mobilne faze. Ko ta prehaja s hitrostjo pretoka skozi detektor, se registrira kot širina in višina vrha na bazni liniji kromatografskega zapisa. Karakteristike vrha se bodo bistveno spreminjale s fluktuacijami v pretoku, medtem ko substanca prehaja skozi detektorsko celico. Od pretoka je odvisen tudi retenzijski čas. Te efekte lahko razdelimo v šum bazne linije in njen premik. Šumi povzročajo spremembe pretoka, ki so krajše kot povprečni vrh v kromatogramu. Nihanje bazne linije je posledica sprememb pretoka, ki so približno 1 do 10 krat tako dolge kot vrh. Premik bazne linije povzročajo spremembe, ki so mnogo dolgotrajnejše.

To spada med sistemske napake. Le-te lahko zmanjšamo s pogosto kalibracijo in uporabo internih standardov.

Črpalka za analitsko delo mora zadoščati zahtevam po brezpulznem delovanju, konstantnem pretoku in reproducibilnosti pretoka.

Sistemi za zagotavljanje konstantnega in enakomernega pretoka so: plin pod pritiskom, črpalka z rezervoarjem in batom, membranske črpalke in recipročne črpalke z eno, dvema ali več črpalnimi glavami.

Danes se večinoma uporabljajo črpalke, ki so računalniško vodene in imamo možnost neposrednega mešanja mobilne faze v sami črpalci s pomočjo posebnih ventilov. To nam zelo olajša in pospeši delo. Nekatere črpalke imajo že same vgrajene tudi mikroprocesorje, kar nam omogoči programiranje analize ter ponovitve nastavljenih sekvenc.

Injektorji nam morajo omogočati dobro ponovljivost med posameznimi doziranjmi. Kromatografska ločba je kontinuirni proces, kar pomeni, da vsakršen vnos dodatnih količin povzroča motnjo stacionarnih pogojev. Vzorec mora biti injiciran v čim manjšem tekočinskem segmentu, ki mora biti poleg tega dobro definiran in ponovljiv. Kontaminacija med posameznimi, drug za drugim injiciranimi vzorci, mora biti čim manjša. Omogočati nam mora doziranje različnih volumnov in s tem tudi različnih koncentracij vzorca. Biti mora dovolj robusten in enostaven za vzdrževanje ter servisiranje. Še posebno pomembno je, da nam omogoči tudi avtomatizacijo doziranja.

Danes so v uporabi izključno injektorji z dozirnimi zankami (loop type). Z njimi lahko doziramo na dva načina:

- V definirano zanko doziramo samo del njenega volumna; poljubno lahko spreminjamo dozirni volumen in s tem koncentracijo vzorca, seveda v mejah dozirne zanke.
- Definirano zanko napolnimo v celoti z vzorcem; pred doziranjem je zanka popolnoma napolnjena z vzorcem, volumen in koncentracijo vzorca spreminjamo s samo zanko.

Vzorec vnašamo v injektor z dozirnimi iglami ali brizgami.

Kolona je bistveni del HPLC sistema saj se v njej dogajajo najpomembnejši procesi separacije.

Separacija na koloni je odvisna od velikosti in oblike polnila ter od učinkovitosti kolone (oblika, dimenzija). Kolona je izdelana iz primerne inertnega materiala, zaprta in zatesnjena s posebnimi elementi in napolnjena s stacionarno fazo. Material, ki se danes uporablja za HPLC kolone je skoraj izključno nerjavno jeklo. Možne so tudi steklene variante.

Daljša kot je kolona večji, je padec pritiska v HPLC sistemu. Slabost krajših kolon je slabša ločljivost. Pomemben parameter kolone je tudi njen notranji premer. Velikost kolone je odvisna od množine snovi, ki jo želimo separirati v enkratnem poteku. Posebnega pomena je geometrija kolone, ker je od tega odvisen mrtvi volumen kolone. Mrtvi volumen predstavlja prostor, kjer prihaja do vrtinčenja, kar povzroči širjenje vrhov in v hujših primerih cepljenje in popolno deformacijo vrha.

Kapilare služijo za povezavo kolone z injektorjem in detektorjem. Povezave naj bodo čim krajše, tako da se mrtvi volumni zmanjšajo na minimum.

Za različne ločitve se uporabljajo različna polnila. Glavne vrste polnil so: adsorbenti, nosilci z vezanim polarnimi ali nepolarnimi stacionarnimi skupinami, ionski izmenjevalci, polnila za izključitveno kromatografijo. Polnila so praškasti materiali, velikosti delcev so običajno 5 do 10 μm . Ti delci so različno oblikovani. Od oblike delcev in njihove velikosti je odvisen pritisk, s katerim moramo premagati upor kolone, ki ga predstavlja za topilo. Največji upor in s tem največje pritiske zahtevajo najmanjši delci nepravilnih oblik. Danes se v glavnem uporabljajo atestirane kolone.

Pri delu z analitskimi HPLC kolonami se pojavljata dva problema. Prvi je ta, da se stacionarna faza zmeraj malo raztaplja v mobilni fazi, kar vodi do padca ločljivosti in posedanja kolone. Drugi problem je kontaminacija analitske kolone, ki jo povzroča mobilna faza. V kolikor želimo zmanjšati te efekte na minimum, uporabimo predkolone.

Detektor je tisti del HPLC sistema, ki naredi substance, separirane na koloni "vidne". Vsi detektorji bazirajo na tem, da merijo spremembo neke fizikalne količine, ki jo povzroči prehod substance skozi merilno pretočno celico detektorja.

Danes imamo na razpolago veliko detektorjev za delo v HPLC tehniki, kot so: UV-VIS detektor, fluorescenčni detektor, detektor na lomni količnik, detektor na električno prevodnost, voltometrijski in kulometrijski detektor.

Meja zaznavnosti ali meja detekcije je lastnost detektorja samega in se uporablja za vsak posamezni detektor. Meja zaznavnosti je minimalna količina substance, injicirane na kolono, ki še povzroči tak signal, da ga lahko nedvoumno ločimo od šuma. Linearno območje detektorja je razmerje med zgornjo mejo merjenega intervala in spodnjo mejo detekcije, pri čemer je izhodni signal linearen znotraj določenih odstopanj.

Zelo pomembna lastnost detektorja je, da z njim določimo koncentracijo separirane substance, torej kvantitativna določitev. Nekateri detektorji (diode array) imajo še možnost kvalitativnih določitev, ker lahko z njimi opazujemo celotni UV spekter separirane substance, ki prehaja skozi detektorsko celico.

UV absorpcijski detektorji so najbolj uporabljani detektorji, zaradi svoje univerzalnosti, enostavnosti, selektivnosti in občutljivosti. Njihovo delovanje temelji na absorpciji svetlobe v UV in vidnem delu spektra.

Na delovanje detektorja vplivajo naslednji efekti: sprememba kemijskega ravnotežja, raztopljeni plini v mobilni fazi in pulziranje pretoka, spremembe lomnega količnika in temperatura.

Glavne komponente UV detektorja so: izvor svetlobe, monokromator ali filter, detektorska celica ter elektronika za konverzijo svetlobnega v električni signal.

Zadnja stopnja pri razvoju detektorjev je tako imenovani "diode array" detektor. Z njim naenkrat dobimo dva podatka; to je kvantitativen podatek (odzive pri posamezni valovni dolžini) in kvalitativne podatke (odzive pri vseh valovnih dolžinah). Ti detektorji morajo biti nujno opremljeni z računalnikom.

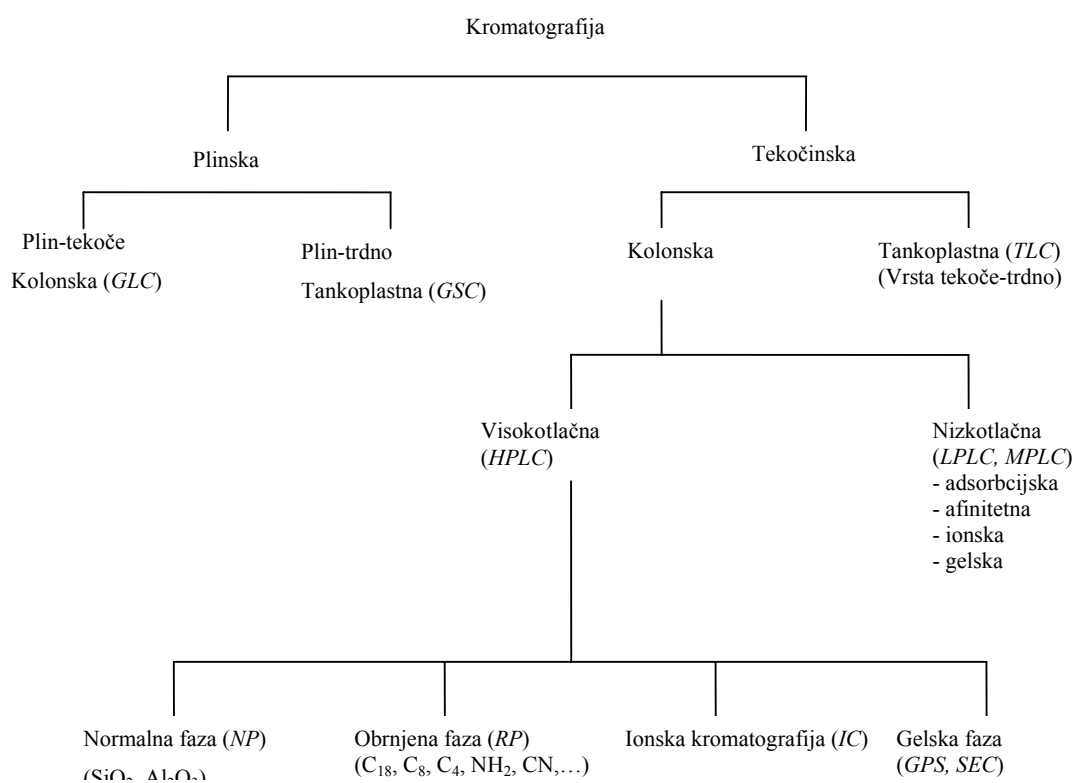
Detektorji so v bistvu vmesniki za pretvorbo časovne spremembe neke fizikalne lastnosti, ki jo povzroči prehod eluenta skozi detektorsko celico, v električni signal. Tega nato s pomočjo ustreznih instrumentov pretvorimo v analogni oziroma digitalni zapis.

Instrumenti za zapis signala:

- rekorder signal zapisuje analogno v obliki kromatografskega zapisa. Pomankljivost rekorderjev je njihova enkratnost zapisa, kar pomeni ponavljanje analize, če parametri niso bili pravilno nastavljeni in je signal ušel iz območja.
- integrator med analizo riše kromatogram in nato izračuna višine in površine posameznih vrhov v kromatogramu, po predhodno nastavljenih parametrih.
- računalniki zmorejo vse, kar zmorejo rekorderji in integratorji, obenem nudijo še neskončno drugih možnosti (neomejeno hranjenje vseh podatkov o pogojih analize, kromatogramov in naknadnih obdelav, do popolne kontrole ne samo kvantizacije, temveč celotnega HPLC sistema).

Kromatografske metode lahko opredelimo na več načinov. Prvi način je razdelitev glede na obliko kromatografske podloge. V kolonski kromatografiji je stacionarna faza vezana na nosilec v koloni, mobilna faza teče skozi kolono pod vplivom gravitacije ali tlaka. V planarni kromatografiji je stacionarna faza vezana na ravno površino ali v porah papirja. Mobilna faza se pomika skozi stacionarno fazo zaradi gravitacije ali pa zaradi kapilarnega delovanja.

Drugi način opredelitve kromatografije je glede na agregatno stanje mobilne faze. Tako poznamo plinsko in tekočinsko kromatografijo ter kromatografijo s superkritičnimi fluidi. Osnova za eno izmed možnih razdelitev kromatografskih metod,



Ionska kromatografija

Moderna ionska kromatografija temelji na treh mehanizmih ločitve, ki dajejo osnovo za poimenovanje tipov ionske kromatografije:

- Ionska izmenjevalna kromatografija visoke ločljivosti, (*High Performance Ion Chromatography – HPIC*),

- Ionska izključitvena kromatografija visoke ločljivosti, (*High Performance Ion Chromatography Exclusion – HPICE*),
- Kromatografija ionskih parov, (*Mobile Phase Ion Chromatography – MPIC*).

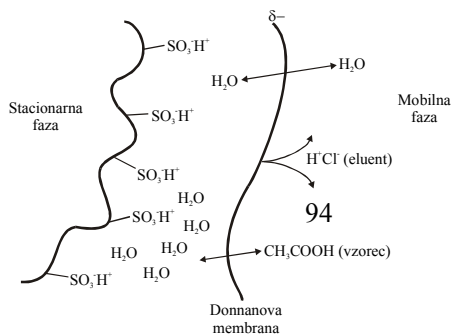
Ionska izmenjevalna kromatografija visoke ločljivosti – (HPIC)

Ionska izmenjevalna kromatografija temelji na procesu ionske izmenjave, ki se pojavi med mobilno fazo in ionsko-izmenjevalnimi skupinami, ki so vezane na substrat (stacionarna faza). Posamezne ionske zvrsti ločimo s pomočjo ionske izmenjave med kovalentno vezanimi ionskimi izmenjevalnimi skupinami na stacionarni fazi in ioni mobilne faze. Posamezni ioni se lahko tudi adsorbirajo na stacionarno fazo. HPIC je uporabna tako za ločitev anorganskih anionov in kationov, kakor tudi za ločitev organskih ionov. Od klasične ionske izmenjevalne kromatografije se razlikuje v načinu in količini vnosa vzorca na kolono (včasih nekaj mL, danes od 10 do 100 μL), v stacionarnih fazah (velikost delcev včasih od 250 do 750 μm , danes 10 do 25 μm) in v načinu detekcije (včasih so ločili posamezne frakcije in jih nato analizirali, danes imamo avtomatsko zasledovanje ionskih zvrsti v eluentu).

Ionska izključitvena kromatografija visoke ločljivosti – (HPICE)

Ob koncu sedemdesetih let so ionsko kromatografijo prvič uporabili tudi za analizo organskih ionov. Zahteva za kvantitativno analizo organskih kislin je privedla do metode ionske kromatografije, ki bazira na procesu ionske izključitve, ki sta ga prva opisala Wheaton in Baumann leta 1953. Ta tip ionske kromatografije služi predvsem za ločitev šibkih organskih kislin, alkoholov, aminokislin, aldehydov in ogljikovih hidratov. S *HPICE* lahko ločimo tudi šibke anorganske kisline s $pK_a > 7$ (npr. ogljikova kislina in metaborova kislina). Kolona je napolnjena s popolnoma sulfonirano kationsko izmenjevalno smolo z visoko kapaciteto. Do ločitve posameznih sestavin na koloni pride zaradi treh procesov: Donnanovega ravnotežja, prostorske izključitve in adsorpcijskih procesov. Kadar teče skozi kolono čista voda se okoli sulfonskih skupin tvori hidratacijska lupina. Tam je voda v višjem redu urejenosti kot v notranjosti mobilne faze. V tem modelu predstavlja vmesno fazo med hidratacijsko lupino in notranjostjo mobilne faze negativno nabita plast, imenovana Donnanova membrana. Popolnoma disociirane kisline kot HCl, ki imajo vlogo eluenta, ne morejo prodreti skozi to membrano zaradi elektrostatskega odboja in se tako dlje zadržijo na koloni.

Uspešnost separacije z *HPICE* tehniko je odvisna od karakteristike separacijske kolone (vrsta ionskega



izmenjevalca v koloni), pH vrednosti eluenta, temperature in izbire detektorja. Prednost *HPICE* je v tem, da lahko ugotovimo sestavo bolj kompleksnih vzorcev. V kombinaciji s *HPIC* lahko določimo vsebnost anorganskih in organskih kislin v manj kot pol ure. Detekcija posameznih zvrsti največkrat temelji na merjenju električne prevodnosti v kombinaciji s primernim supresorjem, ali pa merimo UV absorpcijo pri krajših valovnih dolžinah.

Shematski prikaz procesa ločitve na ionski izključitveni koloni.

Kromatografija ionskih parov – (MPIC)

Kot alternativa procesu ionske izmenjave se razvijajo tudi metode, ki bazirajo na procesu tvorbe ionskih parov, kar omogoča ločitev in določitev tako anionov kot kationov. Prevladujoč mehanizem ločitve pri tem tipu ionske kromatografije je adsorpcija .

V mobilno fazo dodajamo lipofilne ione (npr. kvarterne alifatske amine), ki tvorijo z nasprotno nabitimi ioni vzorca ionske pare in na osnovi stabilnosti tega para pride do ločitve zvrsti na običajni silikatni koloni z obrnjeno fazo (angl. *Reverse Phase Ion Pair Chromatography – RPIPC*). Mehanizem ločitve s stališča fizikalno kemijskih sprememb še ni pojasnjen. Pri *MPIC* je osnovni proces separacije enak kot pri *RPIPC*, le da je tu patentirana uporaba prevodnostnega detektorja s supresorjem, ki zmanjša prevodnost ozadja. Ta tip ionske kromatografije se uporablja predvsem pri ločevanju kationskih in anionskih površinsko aktivnih snovi, kovinskih kompleksov, maščobnih kislin, določamo pa lahko tudi nekatere druge anione, kot so na primer nitrat (III), nitrat (V) in jodid

Poimenovanje ionske kromatografije glede na supresorski sistem

Pri poimenovanju ionske kromatografije glede na supresorski sistem ne upoštevamo predkolone, ker je običajno vključena tako v eno- kot dvokolonskih sistemih. V splošnem ionsko kromatografijo delimo na:

- *dvokolonsko oziroma supresirano ionsko kromatografijo* in
- *enokolonsko oziroma nesupresirano ionsko kromatografijo*.

Visoko ločljiva ionsko izmenjevalna kromatografija - *hpic*

Osnovni separacijski mehanizem te tehnike je ionska izmenjava. Separatorska kolona je napolnjena s posebno obdelanim ionskim izmenjevalcem, ki predstavlja stacionarno fazo. Ioni vzorca in ioni eluenta se zaradi različne afinitete do funkcionalnih skupin izmenjevalca različno močno, a reverzibilno, vežejo na stacionarno fazo.

Glede na število kolon v separacijskem sistemu delimo *HPIC* na enokolonske in dvokolonske sisteme. Dvokolonski sistemi imajo poleg separacijske kolone vgrajeno še supresorsko kolono. Kot supresorsko kolono lahko pri določevanju kationov uporabimo kolono, polnjeno z močno bazičnim ionskim izmenjevalcem, za določevanje anionov pa kolono, polnjeno z močno kislim ionskim izmenjevalcem. Vendar uporaba tovrstnih kolon ni doživela širše uporabe predvsem zaradi neponovljivosti rezultatov in potrebe po pogosti regeneraciji. Tako je prišlo do razvoja

mikromembranskih supresorjev z majhnim volumnom in do razvoja elektrodializne supresorske kolone. Uporaba dvokolonskih sistemov je praviloma manj občutljiva na izbiro eluenta (mobilne faze). Prevodnost ozadja je odvisna od sestave eluenta in bistveno vpliva na možnost detekcije posameznih ionov z detektorjem na električno prevodnost. Prevodnost ozadja se kemijsko odstrani v supresorju. Možnost kemijskega zmanjševanja prevodnosti ozadja nam tako omogoča gradientno separacijo, ki jo uporabljamo v separaciji večkomponentnih zmesi.

Pri enokolonski separaciji je prevodnostna celica takoj za separatorsko kolono. Veliko pozornosti je potrebno posvetiti izbiri polnila separacijske kolone (nizka kapaciteta) in ustreznega eluenta, ki ne sme imeti prevelike prevodnosti, saj lahko to tehniko uporabljamo samo v primerih, ko je mogoče izmeriti dovolj veliko razliko med prevodnostjo ionov vzorca in prevodnostjo eluenta.

Začetki sodobne ionske kromatografije segajo v leto 1975, ko so Small, Stevens in Baumann objavili rezultate raziskave o možnostih uporabe detekcije na električno prevodnost za določevanje anorganskih in številnih organskih ionov. Zaradi občutljivejše detekcije ionov, so eluent iz separacijske kolone vodili še skozi dodatno kolono, ki je služila za kemijsko redukcijo prevodnosti ozadja eluenta in istočasno povečanje prevodnosti analiziranih ionov. To dodatno kolono so sprva poimenovali »stripper« kolona, kasneje pa je dobila naziv supresorska kolona.

Istega leta je družba *Dow Chemical Company*, ki je to novo tehniko patentirala, dala družbi *Dionex* dovoljenje za izdelavo in prodajo tovrstnih instrumentov. Tehniko so imenovali »ionska kromatografija«, prvi ionski kromatograf pa je bil predstavljen jeseni leta 1975 v Chicagu. V kratkem času se je IC razvila v vsestransko analizno tehniko za določanje ionskih zvrsti.

Z rastjo tržišča ionskih kromatografov so se pojavljale razne alternativne metode. Leta 1979 so Gjerde, Fritz in Schmuckler predstavili novo metodo separacije in detekcije anorganskih ionov, kjer je bila separatorska kolona direktno spojena s prevodnostnim detektorjem in torej ni uporabljala supresorja (enokolonska oziroma nesupresirana ionska kromatografija).

Danes pojem ionska kromatografija predstavlja vsako kromatografsko metodo za določevanje ionov. V zadnjih letih so se bistveno razvili ionski izmenjevalci za separatorske kolone z visokimi učinkovitostmi, kar se odraža v krajšem analiznem času. Pojavljajo se novi načini detekcije, kamor štejemo tudi razvoj supresorjev. Obseg uporabnosti IC se je močno povečal z novimi pretočnimi elektrokemijskimi in UV spektrofotometričnimi detektorji. Kot alternativa procesu ionske izmenjave se razvijajo tudi metode, ki temeljijo na procesu ionskih parov.

Osnove ionske kromatografije

Kromatografija je splošni pojem za različne fizikalno – kemične separacijske tehnike, kjer se komponenta porazdeli med topilom (mobilno fazo) in nosilcem (stacionarno fazo). Za vse kromatografske ločitve velja, da je vzorec raztopljen v mobilni fazi, ki je lahko plin, tekočina ali superkritični fluid.

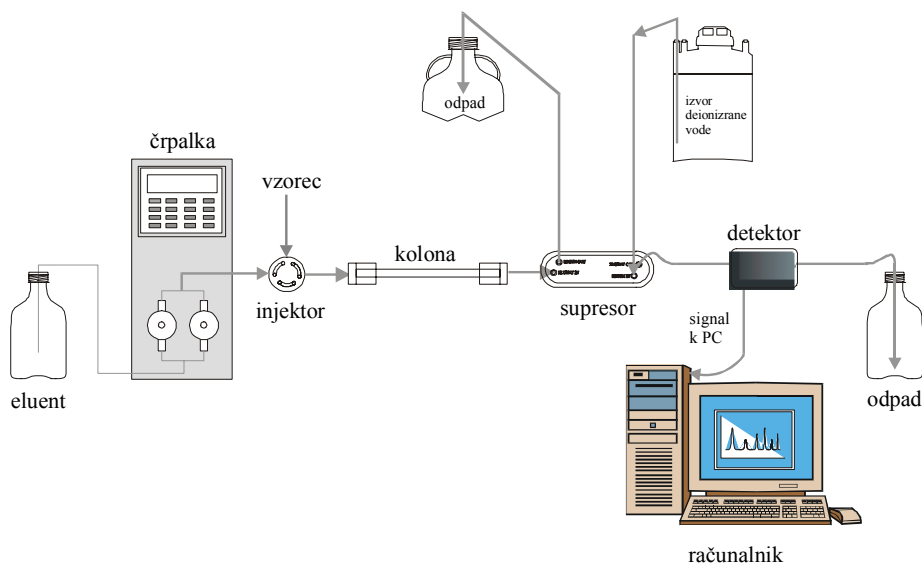
Ionska kromatografija je sodobna analitska tehnika za določevanje ionskih zvrsti in je predstavnica tekočinske kromatografije. Njen glavni element predstavlja kolona, ki je napolnjena z določenim

ionskim izmenjevalcem, ki ga imenujemo nosilec (stacionarna faza). Topilo (mobilno fazo) in raztopljen vzorec potiskamo skozi kolono pod visokim pritiskom s posebnimi črpalkami. Komponente vzorca različno hitro potujejo skozi kolono in se iz nje ločeno eluirajo. Tam jih zaznamo s specifičnimi detektorji (v IC se najpogosteje uporablja detektor električne prevodnosti, saj je prevodnost splošna lastnost ionskih zvrsti). Električni signali, ki jih posreduje detektor se kažejo kot vrhovi, celotno krivuljo imenujemo kromatogram. Čas, ki je potreben, da posamezna komponenta pri idealnih pogojih preteče skozi kolono, imenujemo retenzijski čas. Pri določenih kromatografskih pogojih je retenzijski čas za vsako komponento konstanta. Na osnovi primerjave teh časov z retenzijskimi časi znanih spojin ugotavljamo kvalitativno sestavo vzorca. Površina pod vrhom je sorazmerna koncentraciji in podaja kvantitativno informacijo. V praksi poskušamo doseči čim boljše ločitev v čim krajšem času z optimizacijo vseh parametrov in komponent kromatografskega sistema. Za uspešno kromatografsko ločitev je potrebno poiskati kompromis med ločljivostjo med posameznimi vrhovi, hitrostjo ločitve in kapaciteto kolone.

Aparatura

Osnovni deli ionskega kromatografa so:

- **rezervoar z eluentom,**
- **črpalka,**
- **injektor,**
- **separatorska kolona,**
- **supresor,**
- **detektor in**
- **instrument za zapis signala.**



Shema aparature za ionsko kromatografijo.

Eluent

Eluent oziroma mobilna faza vpliva na prevodnost ozadja in na možnost detekcije posameznih ionov. Tako moramo izbrati ustrezeni eluent, ki ne sme imeti prevelike prevodnosti, kar je odvisno od vrste separacijske kolone in vrste detektorja. Eluent moramo pripraviti z deionizirano in prefiltrirano vodo, ki ima upornost 18,2 M Ω cm in ga pred uporabo preprihati. Paziti moramo, da v eluent ne pride kakršenkoli plin, saj bi motil analizo želenih ionov. Prav tako moramo biti previdni pri skladičenju eluenta, ker je nevarnost razvoja bakterij. Zato ga je potrebno shranjevati v hladilniku in ga zamenjati vsake 2 do 3 dni.

Črpalka

Bistvena naloga črpalke je, da zagotavlja konstanten pretok mobilne faze skozi kromatografski sistem, ne glede na spreminjanje tlaka. Tlaki so v območju od nekaj 100 PSI (6 atm) pa do 6000 PSI (400atm). Dodatna zahteva je, da morajo biti vsi deli, ki so v kontaktu s tekočinami, iz materialov, ki so odporni in inertni na čim večje število kemikalij.

Poznamo več sistemov zagotavljanja konstantnega in enakomerne pretoka:

- **s pomočjo plina pod tlakom,**
- **črpalke z rezervoarjem in batom,**
- **membranske črpalke,**

➤ **recipročne črpalke z eno, dvema ali več črpalnimi glavami.**

S pomočjo črpalke, ki omogoča čim manj nihanj v pretoku, črpamo eluent skozi kromatografski sistem. Vzorec injiciramo skozi injektor z znanim volumnom. Tripotni ventil nam omogoča, da zanko napolnimo z vzorcem pri zračnem tlaku, ko pa ventil preklopimo, eluent izpere vzorec v separatorsko kolono. Ko ioni vzorca in eluenta zapustijo kolono, jih moramo na nek način zaznati. Največkrat v ta namen uporabljamo detektor za merjenje električne prevodnosti. Raztopina nato vstopi v prevodnostno celico, dobljeni signal se izpiše na rekorderju.

Danes so črpalke večinoma računalniško vodene, kjer imamo možnost neposrednega mešanja mobilne faze v sami črpalci s pomočjo posebnih ventilov, kar nam zelo olajša in pospeši delo.

Pomembno je tudi redno vzdrževanje črpalke, pri čemer je potrebno posvetiti posebno pozornost razplinjanju mobilnih faz in njihovemu filtriranju skozi ustrezne filtre. Same črpalke ne potrebujejo posebnega vzdrževanja.

Injektor

Vzorec je potrebno injicirati v sistem pred kolono naenkrat, ne da bi vplival na stacionarno fazo. Najpogosteje uporabljena metoda je injiciranje vzorca v pretoku mobilne faze. Injektor je poseben tripotni ventil, ki nam omogoča, da zanko napolnimo z vzorcem pri zračnem tlaku, ko pa ventil preklopimo, eluent izpere vzorec v separatorsko kolono. Zanka je kapilara, ki ima konstanten notranji premer in točno določeno dolžino. S tem je volumen injiciranja vzorca točno določen. Tovrstni injektorji dajejo odlično ponovljivost pri visokih tlakih in omogočajo avtomatizacijo injiciranja vzorcev pri različnih volumnih.

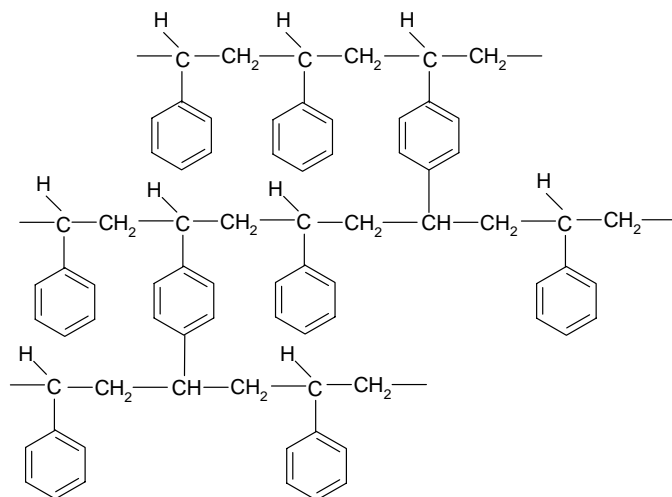
Separatorska kolona

Separatorska kolona je najpomembnejši del kromatografskega sistema in je bistvena za učinkovito ločitev posameznih ionov. Kolone so izdelane iz primerne inertnega materiala in so napolnjene z različnimi ionskimi izmenjevalci. Običajno kolone niso termostatirane in jih uporabljamo pri sobni temperaturi.

V anionski izmenjevalni kromatografiji uporabljamo kot osnovo za proizvodnjo ionskih izmenjevalcev večinoma organske polimere, uporabljajo pa se tudi silikatni nosilci, nosilci na osnovi $(Al_2O_3)_x$ in drugi

Za proizvodnjo polimernih anionskih izmenjevalcev najpogosteje uporabljamo stiren-divinilbenzene S/DVB kopolimere, polimetaakrilatne in polivinilne smole. Izmed teh za nosilce najpogosteje uporabljamo S/DVB kopolimere, ki jih dobimo s kopolimerizacijo stirena z divinilbenzenom. Na te

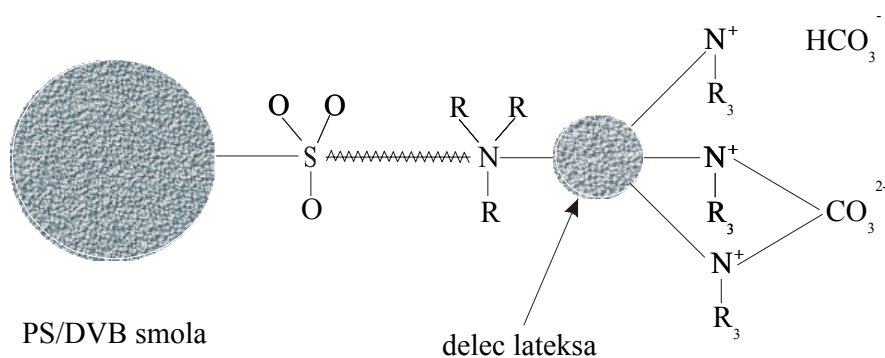
kopolimere lahko z določeno kemijsko reakcijo vežemo različne funkcionalne skupine in na ta način dobimo močno oziroma šibko kisle in močno oziroma šibko bazične izmenjevalce.



Shematski prikaz stiren-divinilbenzenskega skeleta.

Poseben tip ionskih izmenjevalcev, ki jih danes razvija korporacija *Dionex*, so v svojem delu leta 1975 uvedli Small, Stevens in Bauman. Strukturo omenjenih anionskih izmenjevalnih smol, ki jih imenujemo lateksne anionske izmenjevalne smole, shematično prikazuje slika. Poleg visokih kromatografskih učinkovitosti, lateksne anionske izmenjevalce odlikuje tudi nizka anionska izmenjevalna kapaciteta (približno $30 \mu\text{ekv} \cdot \text{g}^{-1}$), kar omogoča uporabo eluentov z nizkimi koncentracijami in s tem bolj občutljivo detekcijo na osnovi električne prevodnosti.

Struktura lateksne anionske izmenjevalne smole.



Vzporedno z organskimi polimeri kot substrati za pripravo anionskih izmenjevalcev so se v zadnjih dveh desetletjih razvijali tudi anionski izmenjevalci s silikatno osnovo. Razvoj anionskih izmenjevalcev s silikatno osnovo je bil usmerjen k materialom z nizko izmenjevalno kapaciteto, ki omogoča uporabo eluentov z nizko električno prevodnostjo.

Anione lahko ločimo tudi s stacionarnimi fazami na osnovi zamreženih organskih polimerov, ki jih modificiramo s cikličnimi polietri. Uporabimo lahko tudi anionske izmenjevalce na osnovi $(Al_2O_3)_x$, ki je poleg silikatov najpogostejša osnova v kromatografiji tekoče-trdno. Kot mnogi kovinski oksidi tudi $(Al_2O_3)_x$ kaže ionsko-izmenjevalne lastnosti.

V procesu sintetiziranja ionskega izmenjevalca, ki je uporaben v ionski kromatografiji visoke ločljivosti, je potrebno posvetiti pozornost predvsem njegovi zamreženosti, poroznosti in kapaciteti:

➤ *Zamreženost*

V zvezi z zamreženostjo je povezana mehanska odpornost ionskega izmenjevalca. Odstotek divinilbenzena v stiren-divinilbenzenski smoli se podaja kot odstotek zamreženosti in določa poroznost smole. Čim večja je zamreženost, tem večja je mehanska odpornost izmenjevalca.

➤ *Poroznost*

Poroznost osnovnega substrata je odvisna od procesa sintetiziranja. Glede na odstotek zamreženosti lahko osnovne substrate delimo v glavnem na mikroporozne in makroporozne, od katerih so za ionsko izmenjevalno kromatografijo bolj pomembne mikroporozne.

➤ *Kapaciteta*

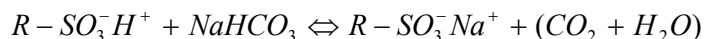
Kapaciteta ionskega izmenjevalca je odvisna od procesa uvajanja aktivne skupine na osnovno kopolimero.

Supresor

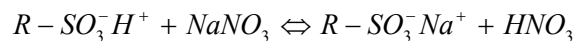
S supresorjem povečamo občutljivost meritev pri IC s prevodnostnim detektorjem, zato ga obravnavamo kot del detektorskega sistema. Vzorec se skupaj z eluentom neposredno iz separatorske kolone izpere v supresor, ki ga v primeru analize anionov sestavlja kolona napolnjena z močno kislim kationskim izmenjevalcem. Supresijo za analizo kationov pa dosežemo s kolono z močno bazičnim anionskim izmenjevalcem [1].

Naloga supresorja je prevesti ione vzorca v popolnoma disociirano obliko, ione eluenta pa v skoraj nedisociirano obliko, saj prevodnostna celica sama ne more razlikovati med ioni vzorca in ioni eluenta. Če imamo v vzorcu na primer nitratne (V) ione in jih eluiramo z natrijevim hidrogenkarbonatom, potečeta v supresorju naslednji reakciji:

V raztopini se natrijevi ioni izmenjajo s protoni in tako prevedejo močno prevoden natrijev hidrogenkarbonat v malo disociirano ogljikovo kislino



Po izmenjavi natrijevega nitrata (V) iz vzorca nastane dušikova (V) kislina

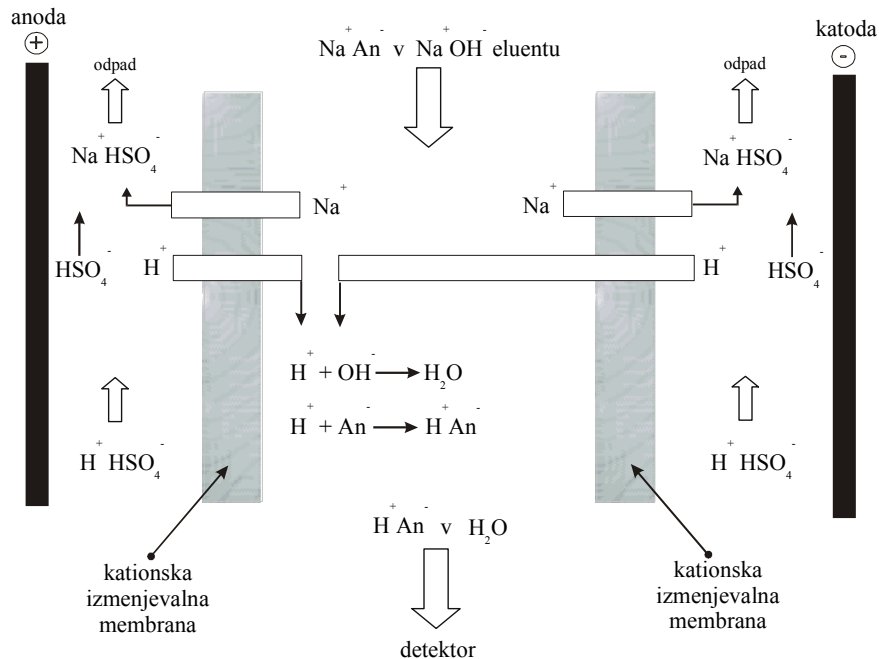


V primeru določanja anionov in uporabe karbonatnega pufra kot eluenta se v supresorski koloni kationi (običajno Na^+) vežejo na ionski izmenjevalec, sprostijo se ekvivalentna količina H_3O^+ ionov, ki pretvorijo HCO_3^- in CO_3^{2-} ione v CO_2 in vodo, kar bistveno zniža električno prevodnost eluenta. Obenem pa se protiioni merjenih anionov zamenjajo s H_3O^+ ioni in na ta način se bistveno poveča prevodnost merjenega ionskega para (H_3O^+ in ustreznega anion).

Klasične supresorske kolone imajo nekaj pomanjkljivosti. Najpomembnejši med njimi sta nujnost regeneracije po določenem času uporabe in zmanjšanje občutljivosti zaradi izčrpanosti ionskega izmenjevalca. Kljub tem pomanjkljivostim so bile supresorske kolone osnova supresirane ionske kromatografije do tedaj, ko so se pojavili prvi membranski supresorji.

Leta 1981 je Stevens s sodelavci predstavil supresor z votlimi vlakni, ki temelji na izmenjavi ionov skozi membrano. Ta supresor sestavlja dolgo votlo vlakno iz polpropustnega ionskega izmenjevalnega materiala. Eluent teče skozi sredino, medtem ko je zunanja površina vlakna omočena z raztopino regenerata. Tako med eluentom in raztopino regeneranta kontinuirno poteka izmenjava ionov. Prednost teh supresorjev sta kontinuirna regeneracija in majhen mrtvi volumen (300 μL), kar omogoča boljšo kromatografsko učinkovitost, se pa ti supresorji ne odlikujejo z visokimi izmenjevalnimi kapacitetami.

Zato so posamezni proizvajalci pričeli z razvojem mikromembranskih supresorjev [30] z majhno prostornino, kontinuirno regeneracijo in visoko izmenjevalno kapaciteto. Shema anionskega mikromembranskega supresorja



Prikaz kemijskega supresorja za analizo anionov.

V tovrstnem supresorju teče eluent na eni strani nabite membrane, donor H_3O^+ ionov pa na drugi strani. Eluent loči od donorja H_3O^+ ionov nabita membrana z vgrajenimi SO_3^- funkcionalnimi skupinami. Zaradi koncentracijskega gradienta H_3O^+ ioni difundirajo skozi membrano v eluent, Na^+ ioni pa prav tako zaradi koncentracijskega gradienta, predvsem pa zaradi pogojev elektronevtralnosti, difundirajo v donor H_3O^+ ionov. Difuzijo anionov skozi membrano preprečujejo SO_3^- skupine, vezane na obeh straneh membrane.

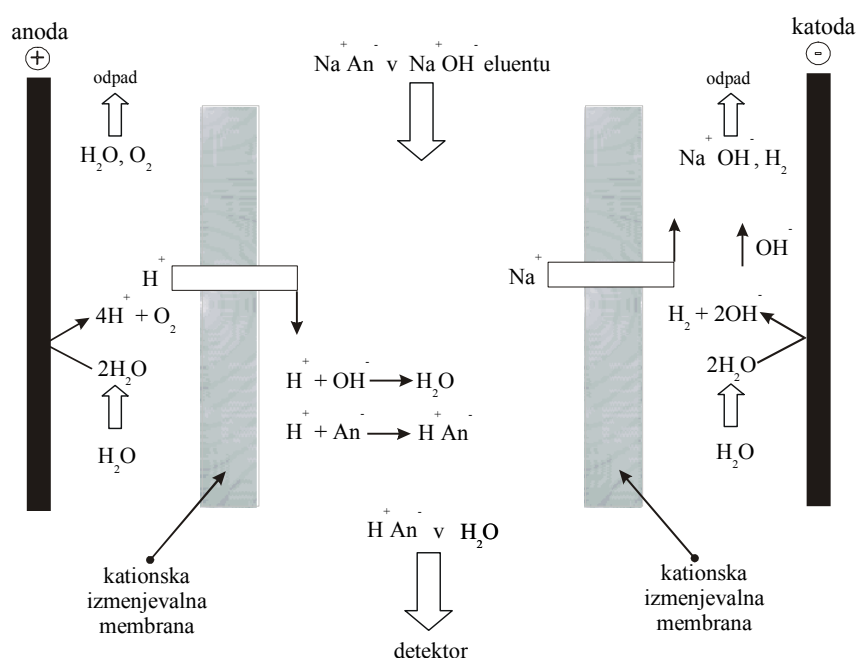
Kljub temu, da je separacijska membrana nabita, difundira v eluent tudi nekaj anionov kisline, ki jo v primeru določanja anionov uporabimo kot donor H_3O^+ ionov (SO_4^{2-}). Difuzija anionov kisline v eluent ni problematična, če je konstantna.

Pri novi generaciji mikromembranskih supresorjev pa lahko poleg klasične kemijske supresije, kjer je regenerant kislina (anionski supresor) ali baza (kationski supresor), dosežemo supresijo z generiranjem hidronijevih oziroma hidroksidnih ionov z elektrolizo vode. Ta način imenujemo avto-supresorski krožni način (*AutoSuppression Recycle Water Mode*) ki uporablja kot vir vode iztok iz nevtralizirane prevodnostne celice. Prednost tega načina je v tem, da je enostaven in lahek za uporabo.

V uporabi je tudi avto-supresorski način z zunanjim dotokom vode (*AutoSuppression External Water Mode*) ki uporablja konstanten izvor deionizirane vode iz steklenice pod pritiskom ali

linijo izvora, ki dostavlja najmanj 5-10 mL deionizirane vode na minuto. S tem še dodatno poenostavimo kromatografski sistem, saj ne potrebujemo posode za regenerant in tlačnega sistema za dovajanje regeneranta. Avto-supresorski način z zunanjim dotokom vode odstrani možnost dovoda ionov, ki bi lahko kontaminirali eluent. Ti ioni bi lahko nastali zaradi oksidacije topil. Ta način zagotavlja visoko občutljivost analize in poveča razmerje signala proti šumu.

Nove supresorje imenujemo samo-regeneracijski supresorji (*angl.* self-regenerating suppressor). Prikaz supresije z elektrolizo H₂O v anionskem samo-regeneracijskem supresorju *Dionex ASRS®-ULTRA*



Shema elektrokemijskega supresorja za analizo anionov.

Želene karakteristike učinkovitega supresorskega sistema so:

- kvantitativna pretvorba v nedisociirano obliko,
- pretvorba analiziranih snovi iz nizkoprevodne oblike v visokoprevodno obliko,
- kontinuirna regeneracija,
- minimalna disperzija v supresorju,
- minimalna kontaminacija v supresorju (nizka bazna linija),
- pH obstojnost,
- odpornost na organska topila in

- mehanska odpornost.

Detektor

Vsaka separacijska metoda je navadno povezana tudi z ustrezno detekcijo posameznih komponent. V ta namen ima kromatograf pretočno celico, ki je vstavljena za kolono. Eluent iz kolone teče skozi detektorsko celico, ki je lahko občutljiva na različne fizikalne in kemijske spremembe. Običajno je volumen te celice majhen, da ne bi prišlo do ponovne združitve že ločenih zvrsti.

V ionski kromatografiji najpogosteje uporabljamo detektor za merjenje električne prevodnosti, saj je električna prevodnost osnovna lastnost vseh ionskih zvrsti. Zelo uporaben je za določevanje različnih ionov, a se ne odziva na molekulske substance kot so voda, etanol in šibke kisline. Detekcija je hitro izvedljiva in relativno poceni.

Elektroprevodnost je lastnost raztopine elektrolitov, da prevajajo električni tok med dvema elektrodama, če je med njima določena električna napetost. Z izmenično napetostjo dosežemo, da na elektrodah ne steče elektrokemijska oksidacija ali redukcija, velikost izmeničnega toka pa je premosorazmerna koncentraciji in mobilnosti ionov v merjeni raztopini.

Poleg prevodnostne celice lahko uporabimo še supresor, lahko pa delamo tudi brez njega. Prevodnostne celice morajo biti termostatirane, saj se pri višji temperaturi viskoznost raztopine zmanjša, istočasno pa se poveča hitrost gibanja ionov in tako pride do sprememb električne prevodnosti raztopine. Zavedati se moramo tudi, da same prevodnosti pozitivnih ali negativnih ionov ne moremo izmeriti, pač pa vedno dobimo vsoto obeh. Velika pomanjkljivost detektorjev za merjenje električne prevodnosti je ta, da so slabo občutljivi za šibko disociirane zvrsti. V teh primerih moramo uporabiti druge načine detekcije.

Izmed ostalih detektorjev se v glavnem uporablja še UV/Vis spektrofotometrija [2,7,8].

Posebej uporabna je v povezavi s pokolonsko derivatizacijo eluiranih komponent, direktna UV/Vis detekcija ionov je namreč redka, saj le malo ionov vsebuje primerne kromofore

Poleg merjenja električne prevodnosti in UV/Vis spektrometrije so v uporabi tudi druge detekcijske tehnike kot so elektrokemijska detekcija, atomska absorpcijska spektrometrija *AAS* in atomska emisijska spektrometrija *AES*, atomska emisijska spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo *ICP-AES*, masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo *ICP-MS* in druge.

Zapis signala

Električni signal, ki ga posreduje detektor sledimo s pomočjo računalnika, ki nam omogoča hranjenje podatkov in kromatogramov. Danes so na razpolago komercialni programi, s katerimi lahko krmilimo več kromatografskih sistemov naenkrat, pri čemer je omogočeno interaktivno delo z vsakim kanalom posebej in naknadna obdelava posameznih podatkov.

Priprava vzorca

Način doziranja v HPLC sistem zahteva, da mora biti vzorec pred doziranjem pripravljen v ustrezni raztopini. Najbolje je, če se vzorec oziroma substanca topi v mobilni fazi. Pri tem je potrebno paziti, da ne doziramo preveč koncentriranih vzorcev, ki bi zaradi preobremenitve kolone poslabšali separacijo ali povzročili deformacijo vrhov.

V primerih, ko se substanca v mobilni fazi ne topi, jo poskusimo raztopiti v kakšnem drugem topilu, nato pa razredčiti z mobilno fazo. Če še to ne pomaga, je potrebno zamenjati sistem. Nekateri vzorci zaradi svoje narave spremenijo lastnosti stacionarne faze. To so zlasti primeri, kjer imamo prisotne nepolarne komponente. V takem slučaju zmanjšamo količino doziranega vzorca na minimum z ustrezno zanko in koncentracijo.

Velike težave lahko povzročajo vzorci s pH, ki se razlikuje od pH mobilne faze. Rešitev je prav tako v zmanjšanju dozirne količine in koncentracije.

V primerih, ko je koncentracija določevane komponente majhna, je potrebno to komponento predhodno separirati iz vzorca. V ta namen se največkrat poslužujemo ekstrakcije tekočetekeče, kjer z uporabo ustreznega topila ekstrahiramo to substanco. Na ta način odstranimo vzorec iz matrične raztopine.

Priprava vzorca spada dejansko med najpomembnejše elemente vsake analize, pri čemer vsak vzorec zahteva svojevrsten pristop.

Kvantizacija

Ena od osnovnih zahtev vsake analize je tudi kvantitativna določitev. Metoda tekočinske kromatografije visoke ločljivosti spada med relativne tehnike. To pomeni, da je rezultat le toliko zanesljiv, kot je zanesljiv standard, ki smo ga pri analizi uporabili. V HPLC analizi uporabljamo predvsem naslednje metode določevanja koncentracije:

Umeritvena krivulja

Kvantizacijo z umeritvenimi krivuljami uporabljamo vedno, kadar imamo večje število vzorcev, katerih koncentracije so v širšem razponu.

Ponavadi si pripravimo raztopine znanih koncentracij, ki pokrivajo ves interval pričakovanih koncentracij in ga v določeni meri še presegajo na obeh skrajnih točkah. V diagram (x-os je koncentracija, y-os je odziv) nanašamo ustrezne vrednosti, ki jih nato povežemo z neprekinjeno črto. V idealnem primeru bi dobili premico pot kotom 45° z izhodiščem v presečišču koordinatnih osi. V praksi ni nujno, da je dobljena odvisnost linearna, vendar je potrebno v takem primeru pripraviti več koncentracij standardov, da dobimo točke umeritvene krivulje dovolj na gosto. Normalno se zadovoljimo s 5 do 6 točkami v umeritveni krivulji.

V splošnem je enačba katerekoli premice podana z izrazom:

$$y = b_0 + b_1 \cdot x$$

Za vrednotenje linearnosti umeritvene krivulje uporabljamo še metodo najmanjših kvadratov, ki nam tudi da enačbo regresijske premice. Kot dodaten parameter, ki nam vrednoti linearnost umeritvene krivulje, uporabljamo še korelacijski koeficient, ki je tem bliže vrednosti ena, čim bolj je krivulja linearna.

Predvsem moramo paziti, da je interval, na katerem merimo, dobro definiran in po možnosti linearen. Nikoli ne smemo ekstrapolirati naše umeritvene krivulje preko intervala, ki smo ga pokrili s standardi. Zelo pogosta je napaka, ki se lahko pojavi, če vzorec ni v enakem topilu kot standard. Navadno je prisoten določen matriks, ki lahko spremeni odziv preiskovane substance, z njo lahko reagira ali pa povzroči interferenco. Rezultat je lahko odmik od linearnosti, vzporeden premik glede na umeritveno krivuljo ali pa drugačen naklon premice. Zato v takih primerih vedno pripravimo umeritveno krivuljo v slepem vzorcu, kjer so prisotne vse komponente vzorca razen analizirane. Ko se prepričamo, da matriks ne moti, lahko uporabimo umeritveno krivuljo, pripravljeno brez ozadja.

Metoda internega standarda

Gre za metodo, s katero zmanjšujemo eksperimentalno napako. Pri tej metodi uporabimo umeritveno krivuljo. Z uvedbo internega standarda navadno razpolovimo relativni standardni odmik (RSD). Idealni interni standard je zelo težko najti, ker mora ustrezati mnogim zahtevam.

V raztopino standarda in vzorca se doda znana količina ustrezne substance (interni standard), ki se mora v kromatogramu ločiti od preiskovane in ostalih komponent vzorca ter z njimi ne sme reagirati, obenem pa mora imeti podobne detekcijske lastnosti. S tem dodatkom

dobimo v kromatogramu še dodaten vrh, ki bi moral biti teoretično vedno enak, vendar v praksi ni.

Metoda standardnega dodatka

Pogoj za kvantitativno določanje po tej metodi je vsaj približno poznavanje koncentracije določene substance v vzorcu, še zlasti, če ga nimamo dosti.

Princip te metode je naslednji: najprej posnamemo kromatogram samega vzorca in izmerimo odziv ustreznega vrha preiskovane substance v kromatogramu. Nato dodamo v isti vzorec določeno količino preiskovane substance in zopet posnamemo kromatogram. Odziv vrha preiskovane substance je sedaj nekoliko večji zaradi dodatka te substance, obenem pa nekoliko nižji kot bi lahko bil, zaradi dodanega volumna, kar korigiramo s faktorjem razredčitve $((V+dV)/V)$. Postopek dodajanja substance ponovimo večkrat in vsakič izmerimo odziv ustreznega vrha v kromatogramu, korigiranega s faktorjem razredčitve.

Odvisnost odziva od dodane količine preiskovane substance nanašamo na diagram in nato grafično določimo koncentracijo preiskovane substance v vzorcu. Koncentracijo v vzorcu dobimo na ta način, da ekstrapoliramo premico, ki jo dobimo, ko spojimo vse točke korigiranih odzivov, na negativno stran x - osi. Dodatki naj bodo kar se da majhni glede na volumen vzorca, da je faktor razredčitve čim manjši.

EKSTRAKCIJA NA TRDNI FAZI (SPE)

Metodo ekstrakcije na trdni fazi (angl. "solid-phase extraction-SPE") je že leta 1923 omenjal Whitehorn (ekstrakcija adrenalina na silikagelu). Vse do 70-ih let so ekstrahirali na fazah v steklenih, ročno polnjenih kolonah, sredi 70-ih let pa so razvili koncept majhnih polnjenih kolon s polnili za izolacijo analiziranih komponent od ostalih interferenčnih komponent.

Danes je na tržišču veliko ekstrakcijskih kolon polnjenih s silikagelom in s silikagelom vezanim z drugimi fazami ter z drugimi polnili. Predstavitev novih trdnih faz in bolj selektivnih kromatografskih izvedb (metod), razvoj novih eksperimentalnih konfiguracij z željo, da bi se prilagodili specifičnim situacijam in izboljšali avtomatizacijo procesov brez dvoma vodi do uporabe SPE v različnih področjih kemijskih analiz.

Dandanes je SPE že dobro uveljavljena tehnika in zaradi njenih prednosti, pred drugimi postopki za pripravo vzorcev, se uporablja za analize številnih skupin komponent v različnih vrstah matriksov. Zaradi možnosti uporabe velikih volumnov vzorcev se SPE uporablja za določitev organskih onesnaževalcev v vzorcih voda iz okolja. SPE se vedno več uporablja tudi za analize v biomedicini, farmaciji in za analize hrane in pijač.

Glavne prednosti ekstrakcije na trdni fazi so bistveno manjša poraba organskih topil, krajši čas priprave vzorcev, visok izkoristek ekstrakcije za analizirano spojino, možnost avtomatizacije procesa.

OSNOVE IN RAZVOJ EKSTRAKCIJE NA TRDNI FAZI

Razvoj kompletne analitične metode vključuje več stopenj. Od zbiranja vzorcev pa vse do podajanja končnih rezultatov. Vmesne stopnje vključujejo hranjenje vzorcev, njihovo pripravo, izolacijo merjenih komponent, njihovo kvalitativno in končno tudi samo kvantitativno določitev.

<i>1. VZORČENJE</i>	<u><i>zbiranje</i></u> <u><i>hranjenje</i></u>
<i>2. PRIPRAVA VZORCEV</i>	<u><i>ekstrakcija</i></u> <u><i>koncentriranje</i></u> <u><i>odstanitev motenj</i></u>
<i>3. INSTRUMENTALNA ANALIZA</i>	<u><i>izolacija</i></u> <u><i>kvalitativna določitev</i></u> <u><i>kvantitativna določitev</i></u>
<i>4. POROČILO</i>	<u><i>rezultati</i></u>

:

V zadnjih dveh desetletjih so razvili zelo izpopolnjene naprave, namenjene ločitvi in zaznavanju kemijskih spojin. Napredek v pripravi vzorcev pa je bil bolj skromen. Na splošno je pri analizah, priprava vzorcev najdalgotrajnejši korak in hkrati tudi vir mnogih netočnosti in nenatančnosti.

Glavni cilj priprave vzorcev za kromatografske analize je raztapljanje merjenih komponent v primernem topilu ter odstranitev čim več motečih komponent. Poleg tega je pred-koncentriranje in priprava vzorcev, potrebna tudi za ohranjanje lastnosti vzorcev tekom hranjenja in izvajanja analiz samih. Za lažjo ločitev in/ali zaznavanje je včasih potrebno pripraviti derivate merjenih komponent.

Znanih je veliko pripravljalnih tehnik, ki se lahko uporabljajo samostojno ali povezano in se ujemajo s kompleksnostjo vzorca, z naravo matriksa, z analizo in instrumentalno tehniko.

Uporaba ekstrakcijske tehnike je pogosta v pred-tretmanu za veliko tipov vzorcev. Brez dvoma je najbolj pogosto uporabljena ekstrakcija tekoče-tekoče (angl. "liquid-liquid extraction-LLE").

Pomankljivosti LLE metode so:

- Postopek je zelo zamuden, posebno pri analizi večjega števila vzorcev;
- potreben je relativno velik volumen vzorca (minimalno 0,5 do 1 ml);
- uporaba velikih količin strupenih organskih topil, ki predstavljajo veliko breme za okolje;
- potrebna so organska topila izedne čistosti (ultra čista topila);
- tvorba emulzij.

Ekstrakcija na trdni fazi (SPE) je bila predstavljena v zgodnjih 70-ih letih in je odpravila ali vsaj zmanjšala zgoraj našete pomankljivosti ekstrakcije tekoče-tekoče (LLE). Skrajšala je potreben čas, še posebno pri avtomatizirani izvedbi. Potreben je manjši volumen vzorcev (50 do 100 μ l), zahteva majhne količine topil, za katere ni potrebna tako visoka čistost kot pri LLE, preprečila je nastanek emulzij.

V zadnjih 10-ih letih je bil dosežen velik napredek v uporabi SPE. Izraz SPE se ni pojavil pred sredino 70-ih in ni bil pogosto v rabi pred 1985. Dve knjigi o SPE je izdalo neko reklamno podjetje, izdanih pa je bilo tudi nekaj preglednih člankov o različnih vidikih SPE.

Pomembnost te tehnike je razvidna iz dejstva, da je bil leta 1992 v ZDA in leta 1994 v Evropi ("SPE Europe", Amsterdam, Holland) simpozij, posvečen samo aplikacijam SPE.

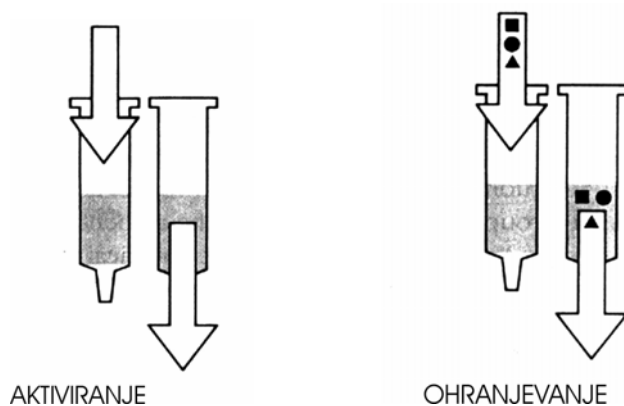
PRINCIP EKSTRAKCIJE NA TRDNI FAZI

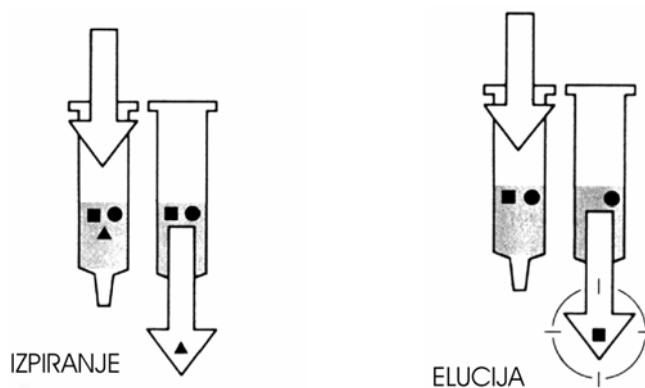
Osnove SPE so podobne kot pri LLE, le da vključuje porazdelitev komponent med dve fazi. Pri SPE je torej komponenta, ki jo želimo ekstrahirati porazdeljena med trdno in tekočo fazo, pri LLE je merjena komponenta porazdeljena med dvema tekočinama, ki se med seboj ne mešata.

Vzorec (mobilna faza), ki vsebuje merjeno komponento, naneseemo na ekstrakcijsko kolono s primernim polnilom (stacionarna faza). Ko je dosežena ravnotežna porazdelitev merjene komponente med obema fazama, fazi ločimo s filtracijo ali odlitjem tekoče faze. Če je polnilo učinkovito, ob merjena komponenta bolj ali manj uspešno ekstrahirana iz tekoče v trdno fazo. Interference, polarne komponente matriksa, spiramo iz kolone z vodo oziroma s primernim pufrom. Polnilo nato osušimo, tako da ga preprihamo z zrakom (plinom), v naslednji fazi pa merjeno komponento speremo (eluiramo) iz kolone z organskim topilom.

Pri moderni izvedbi SPE je adsorbent med dvema kalciniranimi diskoma v polipropilenski ali stekleni koloni imenovani cartridge. Tekoča faza prehaja skozi to kolono bodisi s sesanjem ali s pozitivnim tlakom (gravitacija, tlak iz brizgalke ali s centrifugiranjem).

Za uspešno ekstrakcijo so pomembne naslednje stopnje (prikazane na sliki 1): kondicioniranje kolone, odstranitev aktivacijskega topila, nanos vzorca, spiranje interferenčnih komponent, elucija merjene komponente.





Shema principa ekstrakcije na trdni fazi.

Aktivacija kolone s prehajanjem primerne topila, ki kondicionira površino trdne faze. Največkrat jo izvedemo s acetonitrilom ali s čistim metanolom. V tem koraku aktiviramo površino polnila, da se merjena komponenta bolj veže.

Odstranitev aktivacijskega topila s tekočino, ki ima podobno sestavo kot matriks. Polnilo običajno speremo z vodo ali s pufrom pri pH-ju pri katerem poteka ekstrakcija merjene komponente.

Nanos vzorca; polnilo bo zadržalo merjeno komponento. Volumen vzorca igra pomembno vlogo pri izkoristku ekstrakcije. Na primer pri vzorcih plazme je izkoristek visok pri volumnih od 100 μ l do 1ml, toda nizek pri volumnih od 10 μ l plazme redčene do 1 ml. Vzorec spuščamo skozi kolono običajno z majhnim nadtlakom ali pa pustimo, da prosto pada skozi kolono. Pomembna je tudi hitrost pretoka vzorca, saj je od nje odvisna kvantitativnost vezave analita na polnilo.

Spiranje interferenčnih komponent iz kolone. Interferenčne komponente, ki so ostale v tretji stopnji, odstranimo iz kolone s spiranjem ali z vodo ali s primernim pufrom. Pri tem pazimo, da ne izpiramo tudi iskane komponente.

Sušenje polnila je potrebno, da posušimo fazo pred elucijo s topilom. Običajno sušimo z zrakom (vakuumom) ali prepihavamo s suhim dušikom. Sušenje traja običajno nekaj minut.

Elucija analita iz polnila s primernim organskim topilom. Pomembno je, da elucija poteka počasi, največkrat topilo samo teče skozi kolono. izkoristek ekstrakcije je močno odvisen od hitrosti pretoka.

Uporaba SPE je omejena, vendar je možnih več izvedb, kot na primer uporaba superkritičnih fluidov za elucijo ali uporaba termične desorbcije za zelo hlapno in termično stabilno komponento. Termična desorbpcija se pogosto uporablja v kombinaciji s plinsko kromatografijo (GC), še posebno za poklicne higienske analize.

Najpogostejši cilji SPE so:

- *Spiranje interferenčnih komponent* z uporabo primernih topil.
- *Pred-koncentriranje vzorca*. To je glavni namen sledilne (trace) analize, kot je na primer analiza organskih onesnaževalcev v vzorcih vode, kjer je možno ekstrahirati 1 do 2 litra vzorca s 5 do 10 ml elucijskega topila, da se izognemo 100 ali 400 kratni koncentraciji.
- *Frakcioniranje vzorca* v različne komponente ali skupine komponent kot v klasični kolonski kromatografiji, eluiranje vsake frakcije z drugačno tekočo fazo. Večina SPE izvedb zbira samo eno frakcijo, le v določenih primerih 2,3 ali celo do 7 frakcij.
- *Hranjenje analitov*, ki so nestabilni v tekočem mediju ali imajo relativno visoko hlapnost.
- *Izvršiti reakcijo derivatizacije* med aktivno skupino analita in tistimi na površini polnila. Dobljene derivate lahko takoj eluiramo ali pa jih shranimo in eluiramo kasneje.

Proces SPE lahko izvedemo bodisi on-line ali off-line. Eksperimentalni postopek, opisan zgoraj, je znan kot off-line SPE; tu je priprava vzorcev popolnoma ločena od kromatografske analize. V off-line izvedbi vzorec prenikne skozi polnilo v koloni, pri membranskih ekstrakcijskih diskah pa se vzorec ujame v inertni matriks. Pri on-line izvedbi je ekstrakcijska kolona del kromatografske opreme in je direktno povezana z visoko tlačno paro mobilne faze. On-line SPE procesi so znani tudi kot pred-kolonska koncentracijska tehnika in lahko vsebujejo kolonsko stikalo ali tehniko združenih kolon.

V primerjavi z LLE je off-line SPE dosti hitrejša in prihrani velike količine topila. On-line izvedba povezuje SPE in GC (plinska kromatografija) ali LC (tekočinska kromatografija). Tukaj lahko pričakujemo bolj točne rezultate kot pri off-line izvedbi, saj imamo direktno povezavo pred-koncentriranja in analize. Pri on-line lahko uporabimo manjši volumen vzorca kot pri off-line ker ves volumen vzorca analiziramo.

Modifikacije in razvoji off-line SPE, ki so se pojavili iz začetnih in preprostih eksperimentalnih zapiskov lahko razvrstimo v tri kategorije:

- Predstavitev novih, bolj selektivnih trdnih faz in novih izvedb kromatografije.
- Razvoj novih eksperimentalnih konfiguracij.
- Načrtovanje avtomatiziranih sistemov.

Polnila, kemizem in princip so enaki pri on-line in off-line izvedbi. Edina razlika je višina polnila v kolonah; ta je večja pri off-line (40 do 60 μm) kot pri on-line kolonah (5 do 10 μm).

Pomemben parameter za kontrolo in razvoj SPE metode je **prebojni (breakthrough) volumen**. To je volumen vzorca, kjer se merjena komponenta pričinja eluirati iz kolone. Preboj dosežemo kadar polnilo ne zadržuje več topila ali ko je polnilo popolnoma zasedeno, vendar preboj večinoma povzroči nezadostno zadrževanje. Ta parameter določa maksimalen volumen vzorca, ki se lahko uporablja v SPE in s tem tudi mejo maksimalnega pred-koncentracijskega faktorja. Kadar je razpoložljivi volumen vzorca majhen, kot pri bioloških analizah, potem prebojni volumen običajno ne predstavlja večje težave. Zelo pomemben pa je pri velikih volumnih vzorca, kot npr. pri analizah vode, kjer se prebojni volumen zlahka doseže. Vrednost prebojnega volumna je funkcija kromatografske retenzije (zadrževanja) vzorca na posameznem polnilu (sorbent) v SPE koloni in ga lahko spremenimo samo s spremembo polnila (članek 4).

Prebojni volumen lahko izmerimo z merjenjem UV signala vzorcev (spiked) s topilom, ki ima začetno absorbanco (A_0). Vzorec spustimo skozi pred kolono in če polnilo zadrži komponento, je eluent ne bo vseboval in UV absorbanca bo nič. Prebojna krivulja se prične snemati pri volumnu V_b (običajno definiran kot 1% A_0) do volumna V_m (definiran kot 99% A_0), kjer ima eluent enako sestavo kot vzorec (spiked) s topilom.

Snemanje prebojne krivulje je zelo dolgotrajno, odčitavanje V_b pri 1% A_0 pa je težko in nenatančno. Hitra metoda, ki je lahko izvedljiva, meri površine ali višine pikov različnih volumnov vzorcev, ki vsebujejo enako količino merjene komponente. Z naraščanjem volumna vzorca koncentracija merjene komponente pada. Ko dosežemo preboj, ekstrahirana količina pada, prav tako pada tudi površina elucijskega pika. Odgovarjajoči izkoristki (razmerje med ekstrahirano in naneseo količino vzorca) se lahko izračunajo z ločitvijo površin pikov doseženih pred in po preboju. Izkoristek pri SPE je odvisen od volumna vzorca in prebojnega volumna, ki je povezan s količino in naravo polnila. Med seboj lahko primerjamo samo izkoristke meritev kjer smo uporabili enako količino polnila in volumen vzorca.

IZBIRA PRIMERNEGA EKSTRAKCIJSKEGA MEHANIZMA IN

POLNILA

SPE se največ uporabljajo naslednji trije ekstrakcijski mehanizmi: **nepolarni, polarni in ionsko izmenjevalni**. Izbira mehanizma polnila je odvisna od polarnosti merjene komponente (vezanih funkcionalnih skupin), ter od sestave vzorčnega matriksa. Vsako polnilo znotraj danega ekstrakcijskega mehanizma predstavlja edinstvene lastnosti retenzije in selektivnosti, ki so specifične za dano komponento. Torej, tudi če je za ekstrakcijo najprimernejši nepolarni mehanizem, je potrebno preizkusiti nekaj polnil, da se določi optimalno ravnotežje med visoko obnovljivostjo (high recovery) in dobro ločitvijo (good clean up).

Na primer, tako C8 kot C18 dajeta sprejemljivo visoke obnovljivosti za nepolarne komponente v vodnih matriksih. Toda zaradi rahlo večje polarnosti, C8 prepušča skozi kolono mnoge sestavine matriksa, ki bi se zadržale na bolj nepolarnem polnilu C18. Končni rezultat je čistejši končni ekstrakt s polnilom C8.

Ekstrakcijske kolone lahko izberemo tako:

- da ima polnilo visoko afiniteto do komponente, ki jo želimo analizirati, in jo zadrži na koloni; neželene komponente vzorca pa prepušča
- da ima polnilo slabo afiniteto do merjene komponente in jo prepušča; na koloni pa zadrži interferenčne komponente.

Komponento, ki ostane na trdni fazi se kasneje lahko odstrani z eluiranjem s topilom, ki ima večjo afiniteto do analita.

Polnilo v ekstrakcijskih kolonah se mora ujemati z vzorčnim matriksom iz katerega bo separacija izvršena; z njim ne sme reagirati ali se v njem raztapljati. Polnilo je v plastični (propilenski) ali stekleni koloni v količini od 100 do 500 mg, velikost delcev polnila je okrog 40 µm.

Polnila, ki se uporabljajo v SPE, so v glavnem podobne tistim v kolonski tekočinski kromatografiji. To so: aktivno oglje, silikagel, magnezijev silikat (florisil), skupine vezane na silikagel (glej tabelo 1) in polimeri.

NEPOLARNA	
C 18	oktadecilsilan
C 8	oktilsilan
C 2	etilsilan
PH	fenilsilan
CH	cikloheksilsilan

POLARNA	
SI	silikagel
CN	cianopropilsilan
2OH	diolsilan
NH ₂	aminopropilsilan
PSA	N-propiletildiaminosilan

IONSKO IZMENJEVALNA	
SCX	benzensulfonpropilsilan
PRS	sulfonpropilsilan
CBA	karboksimetilsilan
DEA	dietilaminopropilsilan
SAX	trimetilaminopropilsilan

Nepolarna, polarna in ionsko izmenjevalna polnila, ki se najpogosteje uporabljajo v SPE.

Posamezne skupine vezane na silikagel se uporabljajo kot:

- *normalne faze*: silikagel ((SiOH)_n), florisil (MgO·SiO₂ = 15:85), aluminijev oksid (Al₂O₃);
- *reverzne faze*: metilna (C1), etilna (C2), heksilna (C6), oktilna (C8), cianopropilna (CN), cikloheksilna (C₆H₁₁) in fenilna (C₆H₅).

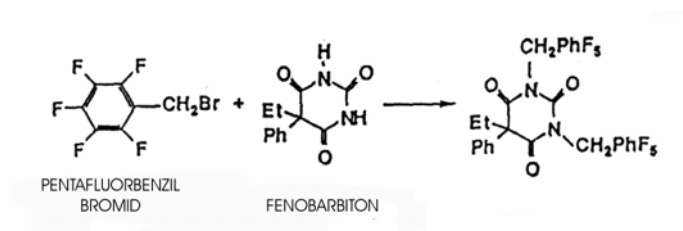
Za merjene komponente z ionsko izmenjevalnimi lastnostmi so bolj primerna ionsko izmenjevalna polnila. Skupine anionskih in kationskih izmenjevalcev so običajno vezane v stirendivinilbenzenu:

- *anionski izmenjevalci*: kvarterni amini (N⁺), amini (NH₂), diamini (NH₂-NH);
- *kationski izmenjevalci*: aromatski sulfoni (C₆H₅SO₃H), karboksilne kisline (COOH);

Nedavno razvite polimerne kolone na osnovi stirendivinilbenzena imajo lipofilne ter ionsko izmenjevalne lastnosti. Njihova prednost je, da so uporabne v celotnem pH območju, njihova slabost pa so daljši časi potrebni za kondicioniranje kolone.

Trdna faza v SPE je lahko kemijsko modificirana z aktivno skupino ali je lahko napolnjena z raztopino, ki vsebuje aktivno sestavino, da bi derivatizirali merjeno komponento (reagent-labelled phases). Slika 4 prikazuje reakcijo phenobarbitone s penta-fluorobenzil bromidom predhodno impregniranim na adsorbent. Krull je objavil nekaj člankov o

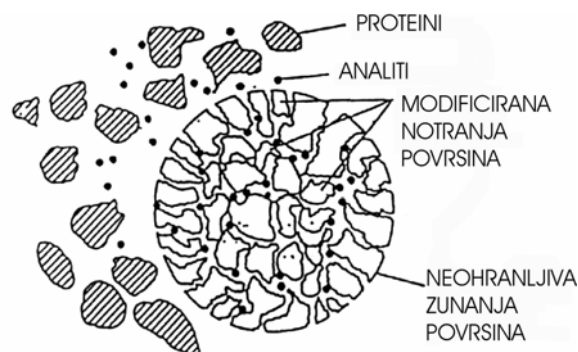
derivatizaciji aminov, aminokislin in peptidov na trdno fazo z različnimi reagenti (9-fluoreneacetylchloride, 3,5-dinitrobenzoat, 3,5-dinitrophenylcarbomate) za fluorescentno detekcijo z uporabo on-line ali off-line izvedbe.



Trdne faze z aktivnimi skupinami.

Pri fazah polnjenih s kovino je primeren kovinski kation naložen na reagent-labelled-phase. Te modificirane faze so sposobne zadržati številne organske molekule s pomočjo tvorbe kompleksa med kovino in merjeno komponento. Na ta način, je bil z uporabo Fe(III) vezanega na 8-hidroxyquinoline silikagel, ekstrahiran doxorubicin iz plazme. Na kationskem izmenjevalcu je lahko zadržan tudi kovinski ion ali organski ligandi. To izvedbo SPE imenujemo ligand izmenjevalska kromatografija in se je prej uporabljala v HPLC.

Drugi materiali s kemijskimi modifikacijami so bili uporabljeni, za direktno obdelavo plazemskih in serumskih vzorcev brez predhodnje sedimentacije proteinov, samo v notranji površini por in ne na zunanji površini polnila. Velike molekule kot so npr. proteini niso sposobne prodreti skozi pore in eluirati, medtem ko majhne molekule vstopajo v pore in se tam zadržijo (slika 4).



Notranja površina reverzne faze

Različni adsorbcijski materiali so bili kombinirani na številne načine:

- znotraj ekstrakcijske kolone z uporabo tako imenovanih mešanih faz z različnimi funkcionalnimi skupinami, različnih lastnosti, vezanih na isti adsorbcijski delec;
- zaporedne ekstrakcije s kolonami z različnimi adsorbcijskimi materiali, kjer eluent iz prve kolone vodimo v drugo kolono bodisi off-line ali on-line.
- Packing različnih adsorbentov v plasti znotraj same kolone nam da »sendvič tip« ekstrakcijsko kolono.

DRUGE IZVEDBE EKSTRAKCIJE NA TRDNI FAZI

V opisu SPE ekstrakcije je že bila predstavljena ekstrakcija v plastičnih ali steklenih kolonah. Polnilo za ekstrakcijo je lahko vgrajeno tudi v ekstrakcijske diske ali pa naneseo na ekstrakcijsko iglo.

DISKI ZA EKSTRAKCIJO NA TRDNI FAZI

V membrane ali diske za SPE je adsorbent vgrajen v mrežo mikrovlaknen. Rezultat je 0,5 mm debela membrana (običajno iz politetrafluoroetilena) v mrežo katerega so zajeti delci polnila premera 8 µm. Diski dovoljujejo večje pretoke, hkrati pa ne prihaja do kanaliziranja kot pri običajnih SPE kolonah. Ker imajo veliko specifično površino in zelo enakomerno porazdelitev delcev, nudijo visoko učinkovitost ekstrakcije in so zelo primerni za zelo umazane vzorce. Diski za SPE se uporabljajo kadar je volumen vzorca zelo velik, koncentracija analita pa majhna, kot pri analizah sledi organskih onesnaževalcev v vodi. Ekstrakcijski proces z diski je lahko izveden na tri različne načine:

- Najpogostejši način je uporaba standardnih filtracijskih aparatov, kjer omogočimo prehod vzorca skozi disk s pomočjo vakuumu. Merjene komponente se zadržijo in nato odstranijo z majhnim volumnom primerne eluenta.
- Membrana je potopljena v tekočem vzorcu določen čas, nato jo hitro osušimo na zraku in končno merjene komponente zaznamo direktno s spektroskopsko tehniko.
- Zadnja možnost je podobna drugi, vendar merjene komponente desorbiramo s potopitvijo diska v topilo, in jih nato zaznavamo v ekstraktu.

Primerjava med diski in ekstrakcijskimi kolonami pri analizi enake učinkovine kaže prva bistveno višji izkoristek. Pri uporabi posebnih nosilcev za diske se lahko ekstrakcijski diski uporabljajo on-line skupaj s tekočinsko kromatografijo. Prav tako se lahko on-line združeno uporabljajo s plinsko kromatografijo za določanje pesticidov v vodi.

MIKROEKSTRAKCIJA NA TRDNI FAZI (SPME)

Druga eksperimentalna izvedba ekstrakcije na trdni fazi je mikroekstrakcija na trdni fazi (angl. "solid phase microextraction – SPME"). Zelo primerna je za ekstrakcijo zelo hlapnih vzorcev. Trdna faza je vlakno iz različnih materialov (fused silikagel prevlečen ali neprevlečen s polidimetilsiloksanom, poliimidi, poliakrilati, grafitom). Za zaščito je vlakno pritrjeno v iglo na posebni mikro injekcijski brizgalki. Vlakno namočimo v vzorec, za določen čas, da se vzpostavi ravnotežje. Adsorbcija je končana v 2-h do 15-ih minutah, vsakič ko se vlakno dvigne v iglo. Merjene komponente se termično desorbirajo če vstavimo iglo v vroč injektor plinskega kromatografa.

SPME se veliko uporablja za separacijo hlapnih spojin, vendar predvsem iz vode. Uporaba SPME za izolacijo zdravilnih učinkovin iz biološkega medija pa je razmeroma slabo opisana. Nekaj prispevkov je opisanih za separacijo učinkovin iz plazme in urina. Separacija učinkovin iz urina je hitrejša in učinkovitejša, kot iz plazme, saj ni potrebno obarjati proteinov in zato adsorbcija na vlakna poteče neovirano.

AVTOMATIZACIJA EKSTRAKCIJE NA TRDNI FAZI

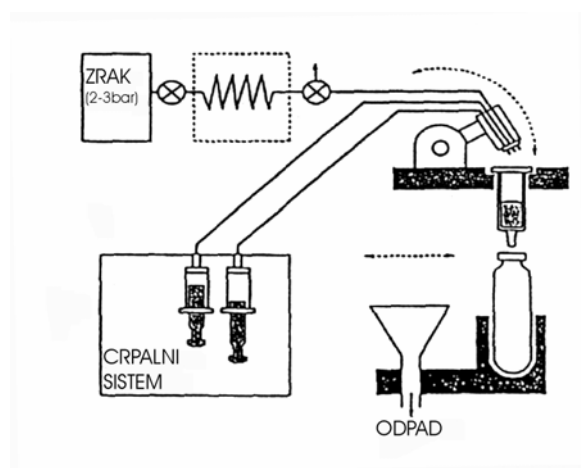
Uvodoma predstavljen eksperimentalni postopek za off-line analize ja navadno izveden ročno. Za simultano izvršitev ekstrakcije na več zaporednih kolonah (ponavadi med 10 in 24) so vpeljali zapleten ekstrakcijski mehanizem. Popolna avtomatizacija off-line SPE je dobrodošla predvsem za analizo velikega števila vzorcev. Avtomatiziran SPE on-line mehanizem s HPLC opremo je bil razvit z uporabo iste kolone kot za mnogokratno ekstrakcijo ali za izvrševanje avtomatizirane kolonske izmenjave. Prva komercialna sistema, ki sta avtomatizirala nekatere SPE korake sta bila Varian Advanced Automated Sample Processor (AASP) in DuPont Prep System; sedaj so oba umaknili iz prodaje.

AVTOMATIZIRANA OFF-LINE SPE

Danes je na razpolago mnogo off-line SPE instrumentov. Nekateri izvajajo vse SPE procese avtomatično, le prenos eluatov iz SPE v HPLC je ročen (pol-avtomatizirani sistemi). Drugi so sposobni avtomatično prenesti eluate v HPLC injektor in izvesti kromatografske analize, torej lahko sami izvršijo pripravo in analizo (popolnoma avtomatizirani sistemi).

Ti avtomatizirani off-line sistemi pogosto uporabljajo enake ekstrakcijske kolone kot pri običajnih ročnih sistemih, ki so nameščene v stojala.

Vrh kolone mora biti hermetično zaprt, da lahko črpalni sistem s pozitivnim tlakom potiska tekočino skozi kolono. Drugi deli mehanizma so sistem za disperzijo topila (batna ali injekcijska črpalka), zbiralnik za eluat in odvodni kanal za odpadno tekočino (slika 6).



Shema off-line avtomatizirane SPE enote.

ASPEC Gilson-ov sistem je sestavljen iz različnih stojal za vzorce, kolon, ekstrakcijskih tekočin, cevi za odpadke in cevi za zbiranje eluata, vzorčnega procesorja in batne črpalke. Ta črpalka je sistem za delitev topila. Najprej dvigne tekočino iz določene steklenice ali cevi in jo doda v ustrezno kolono. Nato potisne tekočino, s črpanjem zraka, skozi kolono. Na koncu igla batne črpalke odpipetira eluat in ga vodi v odprtino za injektor.

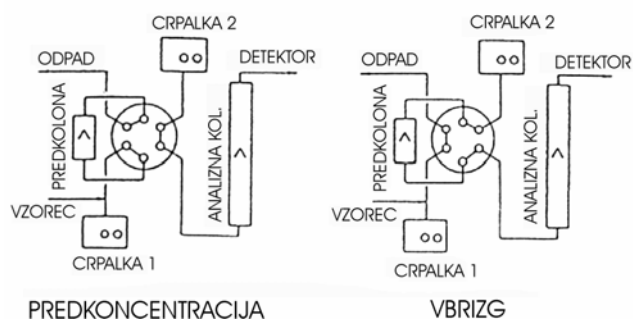
AVTOMATIZIRANA ON-LINE SPE

Avtomatiziran on-line SPE mehanizem so na začetku uporabljali za pred-koncentriranje velikih volumnov vzorcev v koloni. On-line SPE naprave so sestavljene iz tako imenovanega

“kolonskega stikala“ ali “združene “ tehnike, ki vključuje vse metode pri katerih se smer toka mobilne faze spreminja s preklapanjem visokotlačnih ventilov, tako da se tisti, ki teče iz ene kolone v določenem časovnem intervalu preklopi na drugo kolono. Prva kolona ima navadno nizko učinkovitost in se v njej izvaja pred-koncentriranje vzorca. Za tem se frakcija, ki vsebuje merjeno komponento, prenese v drugo, visoko učinkovito kolono. Tako se vzorec on-line očisti pred glavno kromatografsko separacijo.

V teh sistemih so trdne faze navadno v nerjavečih kolonah, saj poteka proces pod visokim tlakom.

Ko je injektor v “load” poziciji se vzorec s črpalko 1 prečrpa skozi kolono, kjer se zadržuje merjena komponenta. S pomočjo črpalke 2 mobilna faza spontano preide skozi kolono za analize. Ko je ta pred-koncentracijski korak končan se injektorski ventil vrne v “inject” položaj in mobilna faza gre skozi pred-kolono in prenese merjeno komponento v glavno kolono.



Tokovni diagram preklapanja kolon.

Zaradi visokega tlaka v pred-koloni je težko spreminjati vzorce, tako da je ista pred-kolona pogosto uporabljena za niz vzorcev, ki imajo pralne cikle drug pred drugim. Na razpolago sta dve opremljeni za avtomatizirano pred-kolonsko izmenjavo. In sicer Prospect iz Spark-Holland in OSP-2 iz Merck-a.

SPE navadno združi on-line s HPLC sistemi z UV detektorji (SPE-LC-UV), vendar se uporabljajo tudi fluorescentni detektorji, elektrokamijski detektorji, diodni detektorji (SPE-LC-DAD) in masni spektrometri (SPE-LC-MS). Uspešno se uporablja tudi on-line združen s plinskim kromatografskim sistemom (SPE-GC).

Prej omenjeni ekstrakcijski diski se uporabljajo za on-line čiščenje vzorcev s LC in s GC ter s serijo pred-kolon.

PRIPRAVA VZORCEV

Način doziranja v HPLC sistem zahteva, da mora biti vzorec pred doziranjem pripravljen v ustrezni raztopini. Najbolje je če se vzorec oziroma merjena komponenta raztopi v mobilni fazi. Pri tem je potrebno paziti, da ne doziramo preveč koncentriranih vzorcev, ki bi zaradi preobremenitve kolone poslabšali ločitev ali povzročili deformacijo vrhov. Značilnost takšnih vrhov je počasno začetno eluiranje, nato pa sledi strm padec.

Kadar se merjena komponenta ne topi v mobilni fazi, jo poskusimo raztopiti v kakšnem drugem topilu in nato razredčiti z mobilno fazo. Če tudi to ni mogoče, moramo zamenjati sistem. Nekateri vzorci zaradi svoje narave spremenijo lastnosti stacionarne faze. To so predvsem primeri, kjer imamo prisotne nepolarne komponente. V takem primeru zmanjšamo količino doziranega vzorca na minimum z ustrezno zanko in z zmanjšanjem koncentracije. Velike težave lahko povzročijo vzorci katerih pH se razlikuje od pH mobilne faze. Tudi v tem primeru je rešitev v zmanjšani količini doziranega vzorca in koncentraciji.

Optimizacija analitske metode je sestavljena iz izbire topil, mobilne faze, izbire kolone, temperature kolone, pritiska, itd. Po pravilno izvedeni optimizaciji sledi kompletna validacija, ki zajema pripravo vzorcev, standardnih raztopin za umeritveno krivuljo, vzorčnih raztopin ter primerjavo rezultatov, dobljenih z umeritveno krivuljo merjene komponente same ter umeritvene krivulje vzorčnih raztopin z dodano merjeno komponento. Primerjava je potrebna za ugotavljanje vpliva matriksa na pravilnost rezultatov.

Praktično vsak vzorec zahteva svojevrsten pristop, priprava vzorcev pa spada med najpomembnejše elemente vsake analize.

KVANTIZACIJA

Ena od osnovnih zahtev vsake analize je tudi kvantitativna določitev merjene komponente. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti spada med relativne tehnike, kar pomeni, da je rezultat zanesljiv le toliko, kot je zanesljiv pri analizi uporabljen standard. Pri tem ne upošteva ostalih analitskih napak. Vendar to dejstvo ne zmanjšuje uporabnosti in točnosti rezultatov, pridobljenih s HPLC analizo.

V HPLC analizi uporabljamo predvsem naslednje metode določevanja koncentracij:

- Umeritvena krivulja (metoda eksternega standarda) se uporablja kadar imamo večje število vzorcev, katerih koncentracije so v širšem območju. V ta namen si ponavadi pripravimo raztopine znanih koncentracij, ki pokrivajo ves interval pričakovanih koncentracij in ga v določeni meri še presegajo na obeh skrajnostih. V diagram nanašamo ustrezne vrednosti. Na x-os nanašamo koncentracije in na y-os merjeni signal. V praksi ni nujno, da je dobljena odvisnost linearna, vendar je potrebno v takem primeru pripraviti več koncentracij standardov, da dobimo točke umeritvene krivulje dovolj na gosto. Normalno se zadovoljimo s petimi ali šestimi točkami umeritvene krivulje. V splošnem je enačba katerekoli premice podana z izrazom:

$$y = b_0 + b_1 x,$$

kjer je: b_0 – odsek na y-osi in merilo za absolutno sistematično napako,

b_1 – naklon premice in je merilo občutljivosti.

- Za vrednotenje linearnosti umeritvene krivulje uporabljamo metodo najmanjših kvadratov, ki nam da enačbo regresijske premice. Kot dodaten parameter, ki nam vrednoti linearnost umeritvene krivulje, uporabljamo še korelacijski koeficient, ki naj bi bil tem bližji vrednosti ena, čim bolj je krivulja linearna. Pri odvisnostih, ki niso linearne, uporabimo polinomno regresijo višjih stopenj. Iz navedenega sledi, da pravzaprav ni pomembna oblika krivulje, če jo le lahko dovolj natančno določimo. Paziti moramo, da je interval, na katerem merimo, dobro definiran in po možnosti linearen. Nikoli ne smemo ekstrapolirati naše umeritvene krivulje preko intervala, ki smo ga pokrili s standardi. Pogosta napaka se pojavi tudi takrat, ko vzorec ni v enakem topilu kot standard. Navadno je prisoten določen matriks, ki lahko spremeni odziv merjene komponente, z njo lahko reagira ali povzroči interference. Rezultat je lahko odmik od linearnosti, vzporeden

premik glede na umeritveno krivuljo ali drugačen naklon premice. V takih primerih vedno pripravimo umeritveno krivuljo v slepem vzorcu, torej takem, kjer so prisotne vse komponente vzorca, razen analizirane. Šele takrat, ko se prepričamo, da matriks ne moti, lahko pripravimo standardne raztopine v primernem topilu za umeritveno krivuljo.

- Metoda internega standarda zmanjšuje napake, ki jih naredimo s pripravljanjem raztopin. V raztopino standarda in vzorca se doda znana količina ustrezne substance, ki se mora v kromatogramu ločiti od ostalih komponent vzorca ter z njimi ne sme reagirati, obenem mora imeti podobne detekcijske lastnosti. Tako substanco najlažje najdemo med homologi merjene komponente. S tem dodatkom dobimo v kromatogramu dodaten vrh, ki bi teoretično moral biti vedno enak, vendar v praksi seveda ni. Ta metoda omogoča boljšo ponovljivost med posameznimi doziranjmi.
- Metoda standardnega dodatka temelji na tem, da vsaj približno poznamo koncentracijo določene substance v vzorcu. Najprej posnamemo kromatogram samega vzorca in izmerimo odziv ustreznega vrha merjene komponente v kromatogramu. Nato dodamo v isti vzorec določeno količino merjene komponente v določenem volumnu in posnamemo kromatogram. Odziv vrha merjene komponente je sedaj nekoliko večji zaradi dodatka te substance, obenem je tudi nekoliko nižji, zaradi dodatnega volumna, kar korigiramo s faktorjem razredčitve. Odvisnost odziva dodane količine merjene komponente nanašamo v diagram in nato grafično določimo koncentracijo merjene komponente. Dodatki morajo biti kar se da majhni, glede na volumen vzorca tako, da je faktor razredčitve $((V + \Delta V)/V)$ čim manjši. Če imamo na razpolago dovolj vzorca, izvedemo metodo standardnega dodatka tako, da enakemu volumnu vzorca dodajamo različne standardne raztopine ter nato razredčimo na enak volumen.