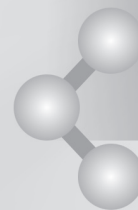


Поглавје 10



Спектроскопски методи на анализа

Сè до почетокот на дваесеттиот век, во квантитативната хемиска анализа како аналитички методи главно биле користени гравиметријата и титриметријата. Со тие методи аналитичарите добивале многу точни резултати, но биле ограничени на анализирање на високи и на умерено ниски концентрации на аналити. Новите аналитички методи, развиени во дваесеттиот век, го прошириле подрачјето на примена, опфаќајќи и концентрации на аналити присутни во траги.

Пример на една од првите колориметриски анализи е методата на Неслер за определување на концентрацијата на амонијак, предложена во 1856 година. Неслер утврдил дека при додавање на алкален раствор на HgI_2 и KI на разреден раствор од амонијак, се создава жолт до црвено-кафеав колоиден раствор, при што обојувањето зависи од концентрацијата на амонијакот. Определувањето на концентрацијата на амонијакот се вршел со споредување на бојата на растворот на анализираниот примерок со обојувањето на серија стандардни раствори. Епрувети со рамно дно биле наполнети со еднакви волумени раствори на примерокот и на стандардите, и поставени на статив со рефлектирачка површина, којашто овозможувала светлината да минува низ растворите. Боите на растворите на примероците и на стандардите биле споредувани со набљудување на секој раствор во насоката од површината кон дното. До скоро, модифицираната форма на оваа метода се цитирала како стандардна метода за определување содржина на амонијак во отпадни води и во води за пиење.¹

Колориметријата, во која аналитот апсорбира видлива светлина, е пример на спектроскопска метода за анализа. До крајот на деветнаесеттиот век, спектроскопијата била ограничена на мерење на апсорпција, емисија и на расејување на видливо, ултравиолетово и инфрацрвено електромагнетно зрачење. Во текот на дваесеттиот век, спектроскопијата вклучила и други форми на електромагнетно зрачење – рендгенско зрачење, микробранови и радиобранови, како и на честички енергија како што се електрони и јони.²

10A Осврт на спектроскопијата

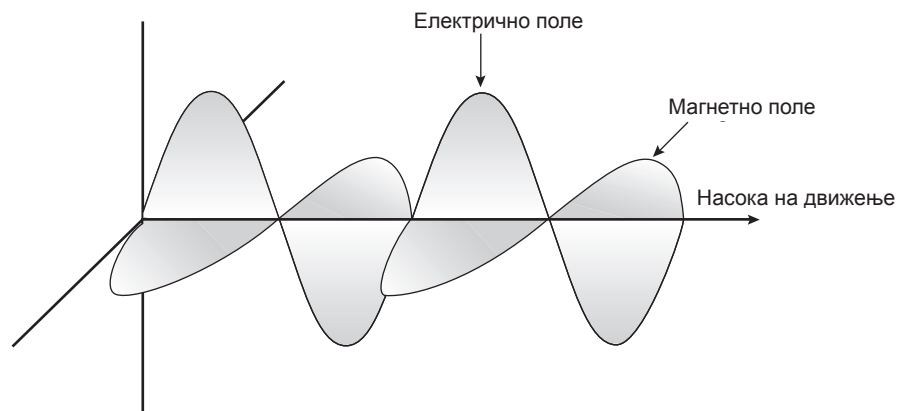
Во фокусот на оваа поглавје е фотонската спектроскопија, каде се користи ултравиолетово, видливо и инфрацрвено зрачење. Бидејќи овие техники користат слични оптички компоненти за диспергирање и за фокусирање на зрачењето, тие често се опфаќаат со терминот оптичка спектроскопија. Од практични причини, најчесто се користи едноставниот термин „спектроскопија“, наместо фотонска спектроскопија или оптичка спектроскопија; меѓутоа, треба да се има на ум дека притоа се разгледува само ограничен дел од многу поширока област на аналитички методи. Пред да ги претставиме специфичните спектроскопски методи, ќе ги прикажеме својствата на електромагнетното зрачење.

10A.1. Што е електромагнетно зрачење

Електромагнетно зрачење, или светлина, е форма на енергија чие однесување се опишува преку брановидни и преку корпускуларни својствата. Оптичките својства на електромагнетното зрачење, како што е дифракцијата, најдобро се објаснуваат ако на светлината ѝ се припише брановидна природа. Меѓутоа, голем број интеракции меѓу електромагнетното зрачење и материјата, како што се апсорпцијата и емисијата, подобро се опишуваат ако светлината се третира како честичка, односно како фотон. Вистинската природа на електромагнетното зрачење останува и понатаму нејасна, како што била и во првата четвртина од дваесеттиот век.³ на почетокот на развојот на квантната механика. Во секој случај, моделите на брановидно и корпускуларно однесување овозможуваат применлив опис на електромагнетното зрачење.

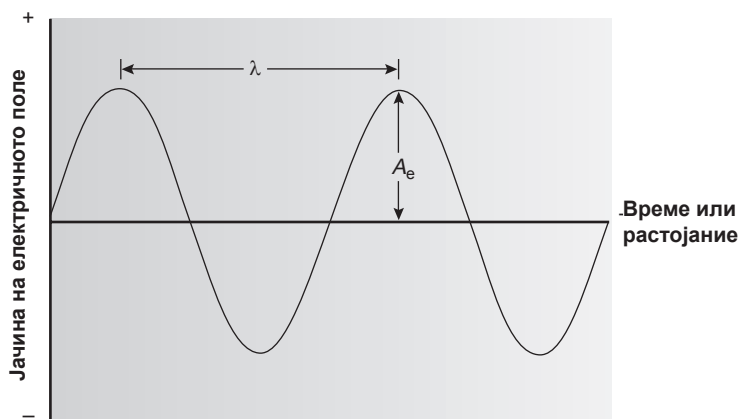
Брановидни својства на електромагнетното зрачење Електромагнетното зрачење претставува комбинација на променливо (осцилаторно) електрично и магнетно поле, коешто се движи низ просторот во линеарна насока и со константна брзина (слика 10.1). Во вакуум, електромагнетното зрачење се движи со брзина на светлината, c , којашто изнесува $2,99792 \times 10^8$ m/s. Низ средина различна од вакуумот, електромагнетното зрачење се движи со брзина, v , помала од брзината на движењето на светлината во вакуум. Разликата меѓу v и c е релативно мала ($<0,1\%$), така што вредноста за брзината на светлината заокружена на три значајни цифри ($3,00 \times 10^8$ m/s) е доволно точна за повеќето примени.

Осцилациите на електричното и на магнетното поле се нормални една на друга, како и на насоката на движењето на електромагнетниот бран. На слика 10.1 е прикажан пример на планарно поларизирано електромагнетно зрачење, коешто се состои од осцилаторно електрично поле и осцилаторно магнетно поле, при што секое од тие полиња е ограничено на една рамнина. Само по себе, електромагнетното зрачење е неполаризирано, со осцилации на електричното и магнетното поле во



Слика 10.1

Електромагнетно зрачење, поларизирано во рамнина, со прикажани електрично и магнетно поле и насока на движење.

**Слика 10.2**

Една од компонентите (на електрично поле) на електромагнетното зрачење, поларизирано во рамнина.

во сите можни рамнини ориентирани нормално во однос на насоката на движењето.

Взаимодејството на електромагнетното зрачење со материјата може да се објасни со помош на електрично или на магнетно поле. На слика 10.2 прикажано е само електричното поле како компонента на електромагнетното зрачење. Осцилаторно електрично поле се опишува како синусен бран, со равенката

$$E = A_e \sin(2\pi\nu t + \Phi)$$

во која E е големина на електричното поле во времето t , A_e е максимална амплитуда на електричното поле, ν е **фреквенција**, или број на осцилации на електричното поле во единица време, а Φ е фазен агол, кој произлегува од фактот дека вредноста на јачината на електричното поле не мора да биде нула за $t = 0$. Идентична равенка може да се напише и за магнетното поле, M :

$$M = A_m \sin(2\pi\nu t + \Phi)$$

во која A_m е максимална амплитуда на магнетното поле.

Значи, електромагнетниот бран се карактеризира со неколку основни својства: брзина, амплитуда, фреквенција, фазен агол, поларизација и насока на движење.⁴ Другите карактеристики, коишто се засноваат на овие основни својства, исто така може да се применат за карактеризирање на брановидното однесување на електромагнетното зрачење. **Бранова должина** на електромагнетен бран, λ , е дефинирана како растојание меѓу два последователни максимуми, или два последователни минути (слика 10.2). Брановата должина на ултравиолетовото и видливото електромагнетно зрачење обично се изразува во нанометри (nm, 10^{-9} m), а брановата должина на инфрацрвеното зрачење се изразува во микрони (μm , 10^{-6} m). За разлика од фреквенцијата, брановата должина зависи од брзината на електромагнетниот бран:

$$\lambda = \frac{\nu}{\bar{\nu}} = \frac{c}{\nu} \quad (\text{во вакуум})$$

Од равенката следува дека брановата должина на електромагнетно зрачење со дадена фреквенција, ν , при негово движење во вакуум, е поголема во споредба со брановата должина при движење во други средини. Друга единица што се користи за опишување на брановите својства на електромагнетното зрачење е **бранов број**, $\bar{\nu}$, кој претставува реципрочна вредност на брановата должина

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$$

фреквенција

Број на осцилации на електромагнетен бран во секунда (ν).

бранова должина

Растојание меѓу два последователни максимуми или минимуми на еден електромагнетен бран (λ).

Бранов број

Реципрочна вредност на брановата должина ($\bar{\nu}$).

Брановиот број, изразен во реципрочни центиметри (cm^{-1}), често се користи за карактеризирање на инфрацрвено зрачење.

Пример

ПРИМЕР 10.1

Во 1817 година, Јозеф Фраунхофер (Josef Fraunhofer), проучувајќи го спектарот на сончевото зрачење, регистрирал континуиран спектар со бројни темни линии. Фраунхофер ги означил најсилните линии со букви. Во 1859 година Густав Киркоф (Gustav Kirchhoff, 1824-1887) покажал дека „D“ линијата во сончевиот спектар се должи на апсорпцијата на сончевото зрачење од страна на атомите на натриумот. Брановата должина на натриумовата D линија е 589 nm. Колкави се вредностите на фреквенцијата и на брановиот број на таа линија?

РЕШЕНИЕ

Фреквенцијата и брановиот број на натриумовата D линија изнесуваат

$$\nu = \frac{c}{\lambda} = \frac{3,00 \times 10^8 \text{ m/s}}{589 \times 10^{-9} \text{ m}} = 5,09 \times 10^{14} \text{ s}^{-1}$$

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{1}{589 \times 10^{-9} \text{ m}} \times \frac{1 \text{ m}}{100 \text{ cm}} = 1,70 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$$

Две други карактеристики на брановите се **моќност**, P , и **интензитет**, I , коишто го определуваат протокот на енергија од изворот на електромагнетното зрачење.

Корпускуларни својства на електромагнетното зрачење Кога некој примерок апсорбира електромагнетно зрачење, тој претрпува енергетска промена. Интеракцијата меѓу примерокот и електромагнетното зрачење најлесно може да се разбере ако се претпостави дека електромагнетното зрачење се состои од електромагнетни честички наречени **фотони**. Кога примерокот апсорбира фотон, фотонот „исчезнува“, а неговата енергија ја преземаат честичките од примерокот.⁵ Енергијата на фотонот, изразена во џули, е поврзана со фреквенцијата, со брановата должина и со брановиот број преку следниве равенки:

$$E = h\nu$$

$$= \frac{hc}{\lambda}$$

$$= hc\bar{\nu}$$

во кои h е Планкова константа, чија вредност изнесува $6,626 \times 10^{-34} \text{ Js}$.

Пример

ПРИМЕР 10.2

Колкава е енергијата на фотоните на натриумовата D линија ($\lambda = 589 \text{ nm}$)?

РЕШЕНИЕ

Енергијата на фотоните на натриумовата D линија изнесува

$$E = \frac{hc}{\lambda} = \frac{(6,626 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}) (3,00 \times 10^8 \text{ m/s})}{589 \times 10^{-9} \text{ m}} = 3,37 \times 10^{-19} \text{ J}$$

моќност

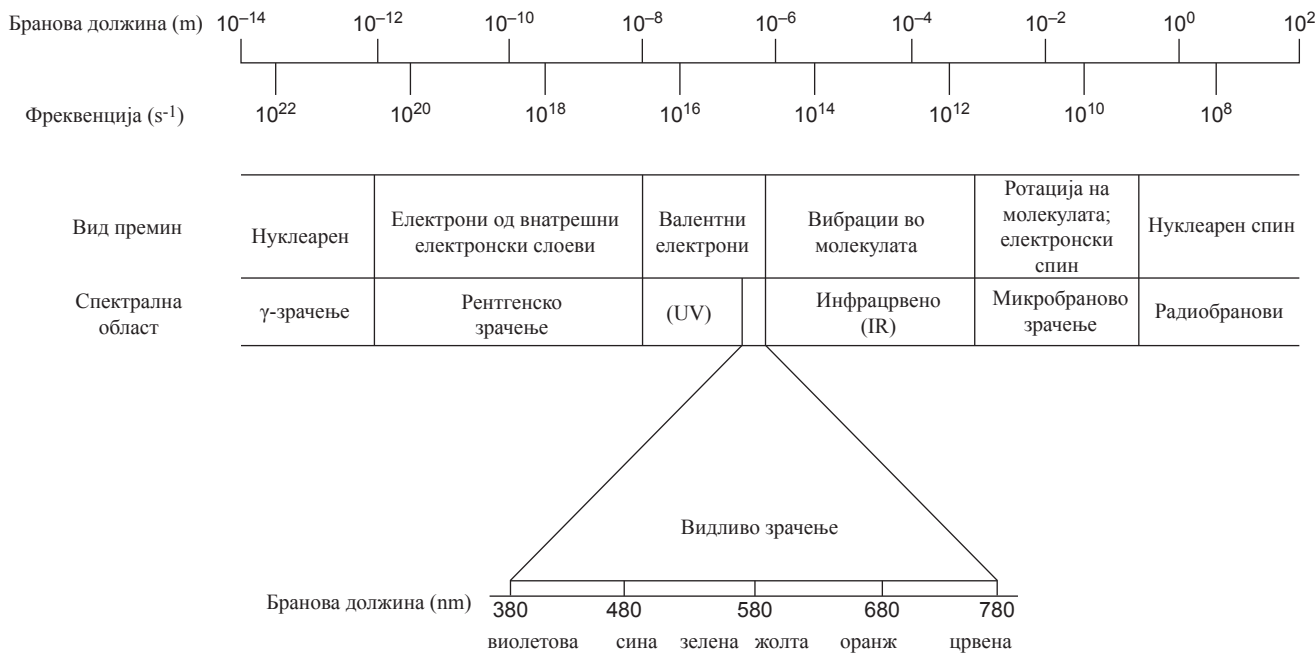
Проток на енергија во единица време (P).

интензитет

Проток на енергија што минува низ одредена површина (I) во единица време.

фотон

Честичка на светлина со енергија еднаква на $h\nu$.



Слика 10.3
Електромагнетен спектар на кој се прикажани боите на видливиот спектар

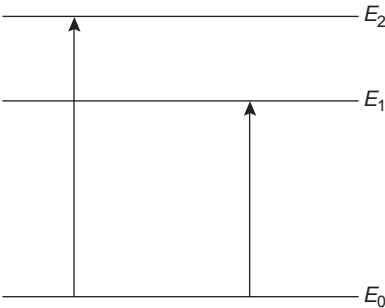
електромагнетен спектар
Поделба на електромагнетно зрачење според енергијата на фотоните.

Електромагнетен спектар Фреквенцијата и брановата должина на електромагнетното зрачење варира во широк интервал на вредности. Од практичен аспект, електромагнетното зрачење е поделено на различни области, според видот на атомскиот или на молекулскиот премин којшто е причина за апсорпција или за емисија на фотони (слика 10.3). Границите опфатени со електромагнетниот спектар не се строги, можни се преклопувања меѓу спектралните области.

10.A.2 Мерење фотони како аналитички сигнал

Во претходната секција дефинирани се неколку карактеристични својства на електромагнетното зрачење, вклучувајќи ги енергијата, брзината, амплитудата, фреквенцијата, фазниот агол, поларизацијата и насоката на движење. Користењето на електромагнетното зрачење за спектроскопски цели е можно само ако интеракцијата на фотоните со примерокот предизвикува промена на едно или повеќе негови карактеристични својства.

Спектроскопијата, од практичен аспект, е поделена на две големи класи. Едната класа опфаќа спектроскопски техники при кои се одвива размена на енергија меѓу фотонот на електромагнетното зрачење и аналитот (Табела 10.1). Во апсорпционата спектроскопија енергијата што ја има фотонот се апсорбира од аналитот, при што тој преминува од состојба со пониска енергија во состојба со повисока енергија, односно преминува во ексцитирана состојба (слика 10.4), при што неговата енергетска состојба ќе зависи од енергијата на фотонот. Електромагнетниот спектар прикажан на слика 10.3, Поради апсорпцијата, се пригушува интензитетот на фотоните што минуваат низ примерокот што го содржи аналитот. Мерењето на тоа пригушување, коешто го нарекуваме **апсорбанца**, се користи како аналитички сигнал. На слика 10.4 енергетските нивоа имаат добро дефинирани вредности (т.е., тие се квантизирани). Електромагнетниот спектар прикажан на слика 10.3, на пр., покажува дека апсорбирањето фотони на видливата светлина предизвикува преминување на валентните електрони на атомите од аналитот на повисоко енергетско ниво. Во друг случај, кога аналитот апсорбира, на пр., инфрацрвено зрачење, некоја од неговите хемиски врски претрпува промена во вибрационата енергија.



Слика 10.4
Едноставен дијаграм на енергетски нивоа, на кој е прикажана апсорпција на фотон.

Табела 10.1 Најважни видови спектроскопија, засновани на промена на енергија

Вид пренос на енергија	Област на електромагнетниот спектар	Спектроскопска техника
Апсорпција	γ-зрачење рентгенско зрачење UV ^a /видлива инфрацрвена микробранова	Мосбауерова спектроскопија апсорпција на рентгенско зрачење UV/видлива спектроскопија ^b атомска апсорпциона спектроскопија ^b инфрацрвена спектроскопија ^b раманска спектроскопија микробранова спектроскопија електронска спин-резонантна спектроскопија
Емисија (термичка екситација) Фотолуминесценција	радибранова UV/видлива рентгенско зрачење UV/видлива	нуклеарна магнетна резонантна спектрометрија атомска емисиона спектроскопија ^b рентгенска флуоресцентна спектрометрија флуоресцентна спектроскопија ^b фосфоресцентна спектроскопија ^b атомска флуоресцентна спектрометрија

^a UV: ултравиолетова.
^b Техники опфатени во овој текст.

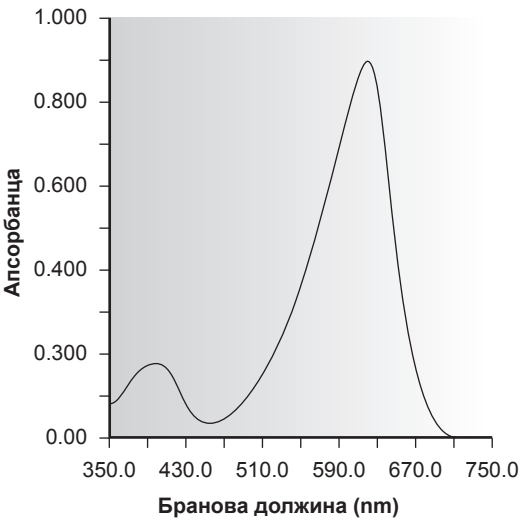
Поради апсорпцијата, се пригушува интензитетот на фотоните што минуваат низ примерокот што го содржи анализот. Мерењето на тоа пригушување, коешто го нарекуваме **апсорбанца**, се користи како аналитички сигнал. На слика 10.4 енергетските нивоа имаат добро дефинирани вредности (т.е., тие се квантизирани). До апсорпција доаѓа единствено кога енергијата на фотонот соодветствува на разликата на енергијата, ΔE , меѓу двете енергетски нивоа. Графичкиот приказ на апсорбанцата како функција на енергијата на фотонот е наречен **апсорпционен спектар** (слика 10.5).

До **емисија** на фотон доаѓа кога анализот од состојба со повисока енергија се враќа во состојба со пониска енергија (слика 10.6). Состојба со повисока енергија може да се постигне на неколку начини: преку примање термичка енергија, преку примање енергија на зрачање емитирано од фотони, или преку хемиска реакција.

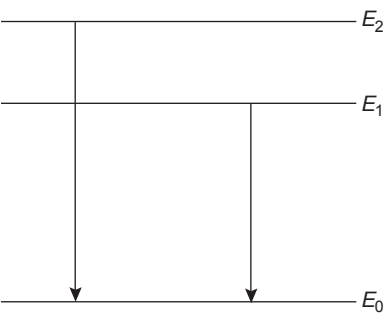
апсорбанца
Пригушување на фотоните при нивно минување низ примерокот (*A*).

апсорпционен спектар
График на кој е претставена апсорпцијата на електромагнетното зрачење од страна на примерокот, во зависност од брановата должина.

емисија
Ослободување фотон при враќање на анализот од повисока во пониска енергетска состојба.



Слика 10.5
Апсорпционен спектар на бромтимол сино во UV/видлива област.



Слика 10.6
Едноставен дијаграм на енергетски нивои, со прикажана емисија на фотони.

Слика 10.7
Фотолуминесцентни спектри на метилтетрахидрофолат и на ензимот метилтрансфераза. Кога ќе се помешаат метилтетрахидрофолат и метилтрансфераза, ензимот веќе не е фотолуминесцентен, но фотолуминесценцијата на метилтетрахидрофолатот е засилена. (Спектрите се објавуваат со дозвола на Dave Roberts, DePauw University).

фотолуминесценција
Емисија што се одвива по апсорпцијата на фотон.

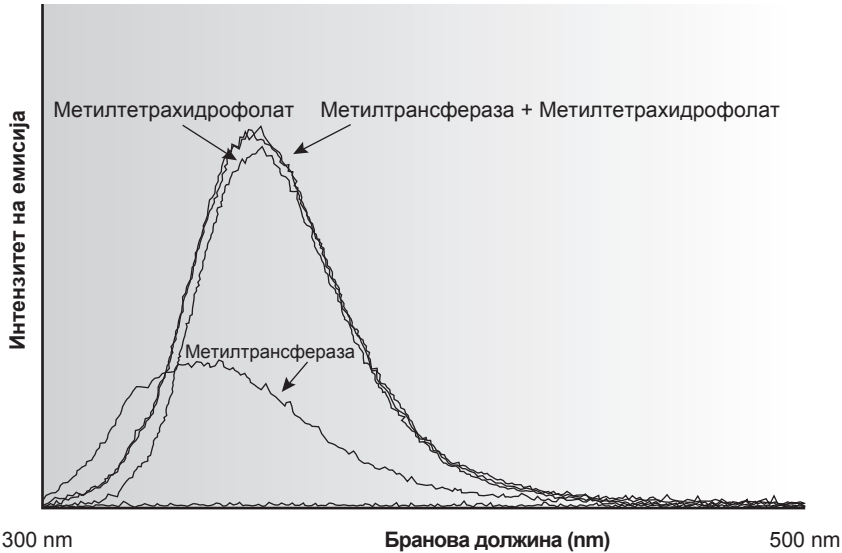
хемилуминесценција
Емисија којашто е резултат на хемиска реакција.

емисионен спектар
Графички приказ на интензитетот на емисијата во зависност од брановата должина (или фреквенцијата или брановиот број).

Табела 10.2 Поважни спектроскопски техники во кои не доаѓа до размена на енергија

Област на електромагнетен спектар	Вид интеракција	Спектроскопска техника
рентгенско зрачење	дифракција	дифракција на рентгенски зраци
UV/видлива	рефракција	рефрактометрија
	ресејување	нефелометрија ^a
	ресејување	турбидиметрија ^a
	дисперзија	оптичка ротациона дисперзија

^a Техники опфатени со овој текст.



Емисијата што следи по апсорпција на фотон е наречена **фотолуминесценција**, а емисијата што следи по хемиска реакција е наречена **хемилуминесценција**. Типичен **емисионен спектар** е прикажан на слика 10.7.

Во втората од споменатите две спектроскопски класи, електромагнетното зрачење претрпува промени на амплитудата, на фазниот агол, на поларизацијата или на насоката на движењето како резултат на рефракција, рефлексија, ресејување, дифракција или дисперзија од страна на примерокот. Неколку поважни спектроскопски техники се наведени во табела 10.2.

10.Б Основни компоненти на спектроскопските инструменти

Инструментите што се користат во спектроскопијата се состојат од неколку заеднички компоненти: извор на енергија што се користи во инструментот, уреди за добивање тесен интервал бранови должини, детектор за мерење на сигналот, и обработувач на сигналот, којшто го преведува сигналот во форма погодна за аналитичарот. Во оваа секција се претставени основните компоненти што се користат при конструкција на спектроскопски инструменти.

Табела 10.3 Вообичаени извори на електромагнетно зрачење што се користат во спектроскопијата

Извор	Област на бранови должини	Примена
H ₂ и D ₂ ламби	континуиран извор од 160-380 nm	UV молекулска спектроскопија
волфрамова ламба	континуиран извор од 320-2400 nm	видлива молекулска апсорпција
Ксенонова лачна ламба	континуиран извор од 200-1000 nm	молекулска флуоресценција
Нернстово стапче	континуиран извор од 0,4-20 μm	инфрацрвена молекулска апсорпција
глобар	континуиран извор од 1-40 μm	инфрацрвена молекулска апсорпција
никел-хром жица	континуиран извор од 160-380 μm	инфрацрвена молекулска апсорпција
ламба со шуплива катода	континуиран извор од 0,75-20 μm	атомска апсорпција
ламба со живини пареи	линиски извор за UV/видлива	молекулска флуоресценција
ласер	линиски извор за UV/видлива	атомска и молекулска апсорпција, флуоресценција и расејување

Подетален опис на овие компоненти може да се најде во литературата посочена на крајот од ова поглавје. Специфични конструкции на инструменти се објаснети во наредните секции.

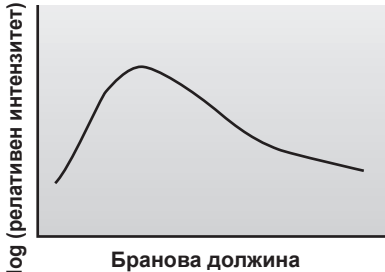
10.Б.1 Извори на енергија

За секој вид спектроскопија е потребен соодветен извор на енергија. Во апсорпционата спектроскопија и во расејувачката спектроскопија, носители на енергијата се фотони. Емисионата и луминесцентната спектроскопија користат термичка или хемиска енергија, како и енергија на зрачење (фотони) за преведување на аналитот во помалку стабилна, високоенергетска состојба.

Извори на електромагнетно зрачење Изворот на електромагнетно зрачење треба да обезбеди доволно интензивно и стабилно зрачење во одреден дел од електромагнетниот спектар. Изворите на електромагнетно зрачење може да бидат континуирани и линиски. **Континуиран извор** емитура зрачење во широк интервал на бранови должини, со релативно мали варијации во интензитетот како функција од брановата должина (слика 10.8). За разлика од него, **линискиот извор** емитура зрачење во неколку избрани, тесни подрачја на бранови должини (слика 10.9). Во табела 10.3 се наведени најчесто користените извори на електромагнетно зрачење.

Извори на термичка енергија Најчести извори на термичка енергија се пламен и плазма. Пламените извори користат согорување на смеша на гориво и оксидационо средство, на пр., ацетилен и воздух, за постигнување температури од 2000 до 3400 K. Плазмата, којашто претставува врел, јонизиран гас, обезбедува температури од 6000 до 10 000 K.

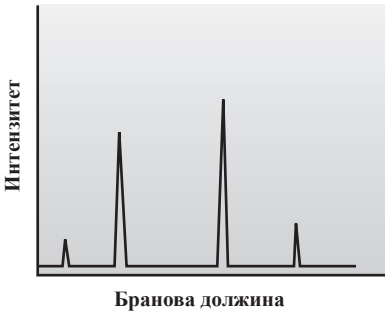
Хемиски извори на енергија Како извор на енергија може да служат и егзотермни реакции. Во хемилуминесценцијата, аналитот се преведува во состојба со повисока енергија со помош на хемиска реакција, по што, при враќањето во основната енергетска состојба, тој емитура карактеристично зрачење. Кога хемиската реакција е биолошка или ензимска по природа, емитираното зрачење се нарекува биолуминесценција. Комерцијално достапните „светлосни стапчиња“ и блесоците светлина кај *Lampiris postilusa* (инсектот „светулка“) се примери на хемилуминесценција, односно биолуминесценција.



Слика 10.8 Изглед на емисионен спектар на континуиран извор на зрачење.

континуиран извор
Извор што емитура зрачење во широк интервал на бранови должини.

линиски извор
Извор што емитура зрачење само со одредени бранови должини.



Слика 10.9 Изглед на емисионен спектар на линиски извор.

номинална бранова должина

Бранова должина пропуштена од селекторот на бранови должини.

ефективна ширина на лента

Ширина на лента на електромагнетно зрачење што минува низ селектор на бранови должини, мерена на половината од висината на лентата.

резолюција

Во спектроскопијата, раздвојување помеѓу две спектрални карактеристики, како што се емисиони или апсорпциони линии.

филтер

Селектор на бранова должина, којшто користи апсорпција, или конструктивна и деструктивна интерференција за контрола на интервалот на избрани бранови должини.

**Слика 10.10**

Лента од зрачење што излегува од селекторот на бранови должини, со означена номинална бранова должина и ефективна ширина на лентата.

монохроматор

Селектор на бранови должини којшто користи дифракциона решетка или призма, и којшто овозможува континуирана промена на брановата должина.

10.Б.2 Избор на бранова должина

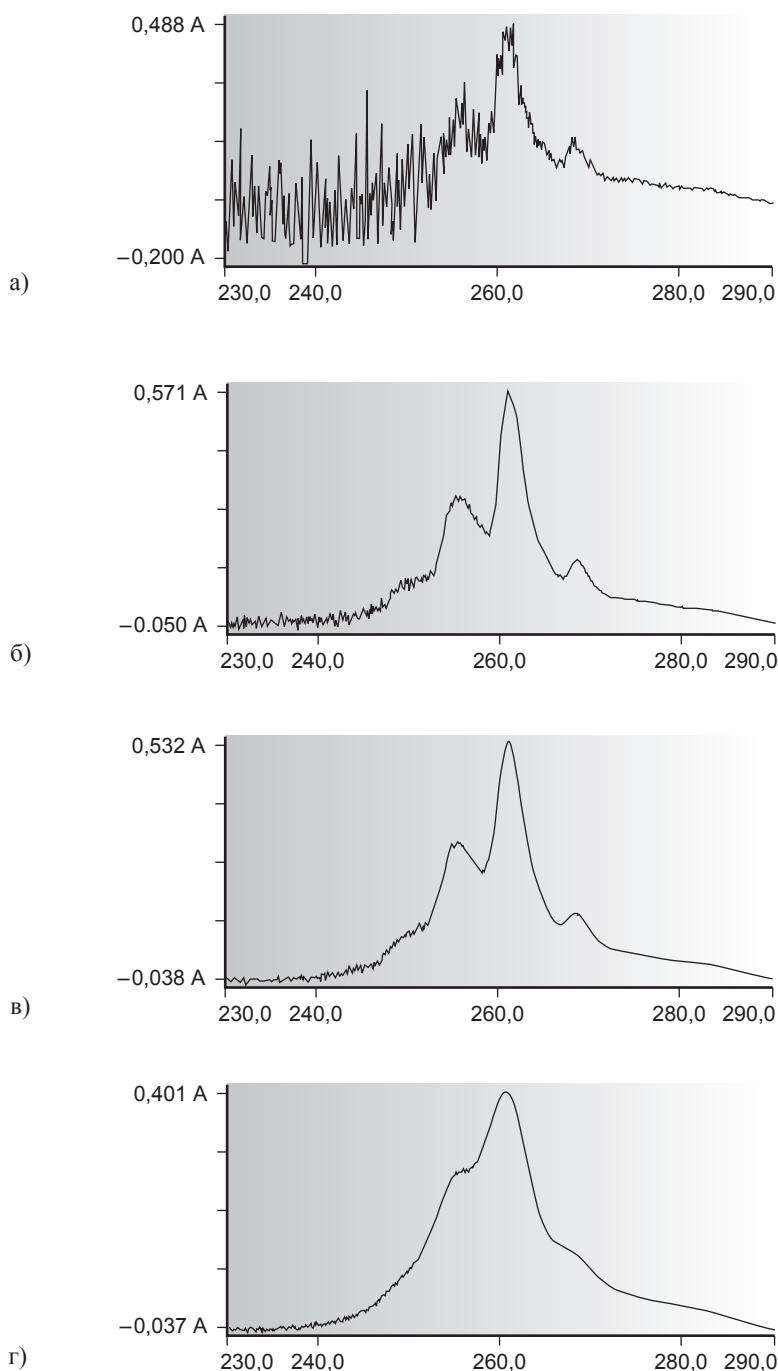
Во оригиналната колориметриска метода на Неслер за определување амонијак, опишана на почетокот од ова поглавје, не се користи тесна област на бранови должини на видливата светлина што минува низ растворот. Но, ако во апсорпцијата на зрачењето учествува повеќе од една компонента на примерокот, квантитативната анализа со оригиналната Неслерова метода станува невозможна. Од таа причина, најчесто се избира зрачење со определена бранова должина, каде аналитот ќе биде единствениот хемиски вид што ќе апсорбира. За жал, од континуиран извор не може да се изолира зрачење со една бранова должина. Затоа се користи селектор на бранови должини кој пропушта тесна лента од зрачење (слика 10.10), којашто се карактеризира со **определена бранова должина**, со **ефективна ширина на лентата**, и со максимална **пропустливост** на зрачењето. Ефективна ширина на лента е дефинирана како интервал на зрачењето на половината од максималната пропустливост.

Идеален селектор на бранови должини се карактеризира со висока пропустливост на електромагнетното зрачење и со мала ефективна ширина на пропуштената спектрална лента. Колку е поголема пропустливоста, поголем број фотони минуваат низ селекторот на бранови должини, со што се добива поголем сигнал и помал шум. Малата ефективна ширина на лентата овозможува повисока **резолюција**, при што спектрални карактеристики се раздвојуваат за повеќе од двапати од ефективната ширина на лентата. Општо земено, овие две карактеристики на селекторот на бранова должина се обратно пропорционални (слика 10.11). Условите коишто овозможуваат поголема пропустливост на зрачењето обично условуваат помала резолуција. Намалувањето на ефективната ширина на лентата ја зголемува резолуцијата, но по цена на зголемување на шумот на сигналот. За квалитативни анализи, резолуцијата, општо земено, е поважна од пропустливоста на зрачењето; соодветно на тоа, пожелна е помала ефективна ширина на лентата.⁶ Кај квантитативните анализи, од друга страна, обично е подобро да се користи поголема пропустливост.

Селекција на бранова должина со филтри Наједноставен начин на изолирање тесна лента на зрачење е со примена на апсорпциони или интерферентни филтри. Апсорпционите филтри работат со селективно апсорбирање на зрачењето во тесна област на електромагнетниот спектар. Интерферентните филтри користат конструктивна и деструктивна интерференција за издвојување тесен интервал бранови должини. Едноставен пример на апсорпционен филтер е плочка од обоено стакло. Виолетов филтер, на пример, ја елиминира комплементарната зелена боја од 500 до 560 nm. Комерцијално достапните апсорпциони филтри овозможуваат ефективна ширина на лента од 30 до 250 nm. Но, максималната пропустливост на филтри со помали ефективни ширини на пропуштена лента може да изнесува само 10 % од интензитетот на емитираното зрачење од изворот, за целиот бранов интервал. Интерферентните филтри се поскапи од апсорпционите, но имаат тесни ефективни ширини на ленти, типично од 10 до 20 nm, со максимална пропустливост од најмалку 40 %.

Селекција на бранова должина со монохроматор Недостаток на апсорпционите и интерферентните филтри е што со нив не може да се врши континуиран избор на бранови должини. Ако мерењата треба да се вршат на две бранови должини, мора да се изврши замена на филтерот. Дополнително ограничување е што не се достапни филтри за сите области на бранови должини. Алтернативно решение за избор на бранова должина, со можност за континуирана промена на брановата должина, е употреба на **монохроматор**.

Конструкција на типичен монохроматор е прикажана на слика 10.12. Зрачењето од изворот влегува во монохроматорот низ влезен процеп. Зрачењето се собира со помош на колиматорско огледало коешто рефлектира паралелен зрак на зрачењето до дифракционата решетка. Дифракциона решетка е оптички рефлексивна површина со голем број паралелно врежани линии (слика 10.12). Со дифракција на решетката,


Слика 10.11

Влијание на ширината на процепот на монохроматорот врз шумот и врз резолуцијата на ултравиолетов апсорпционен спектар на бензен. Ширината на процепот расте од спектарот а) до спектарот г), со ефективна ширина на лента од 0,25 nm, 1,0 nm, 2,0 nm и 4,0 nm.

зрачењето се дисперзира низ просторот, а дел од него, со помош на секундарно огледало, се фокусира на рамна површина на која е поставен излезен процеп. Во некои монохроматори наместо дифракциона решетка се користи призма.

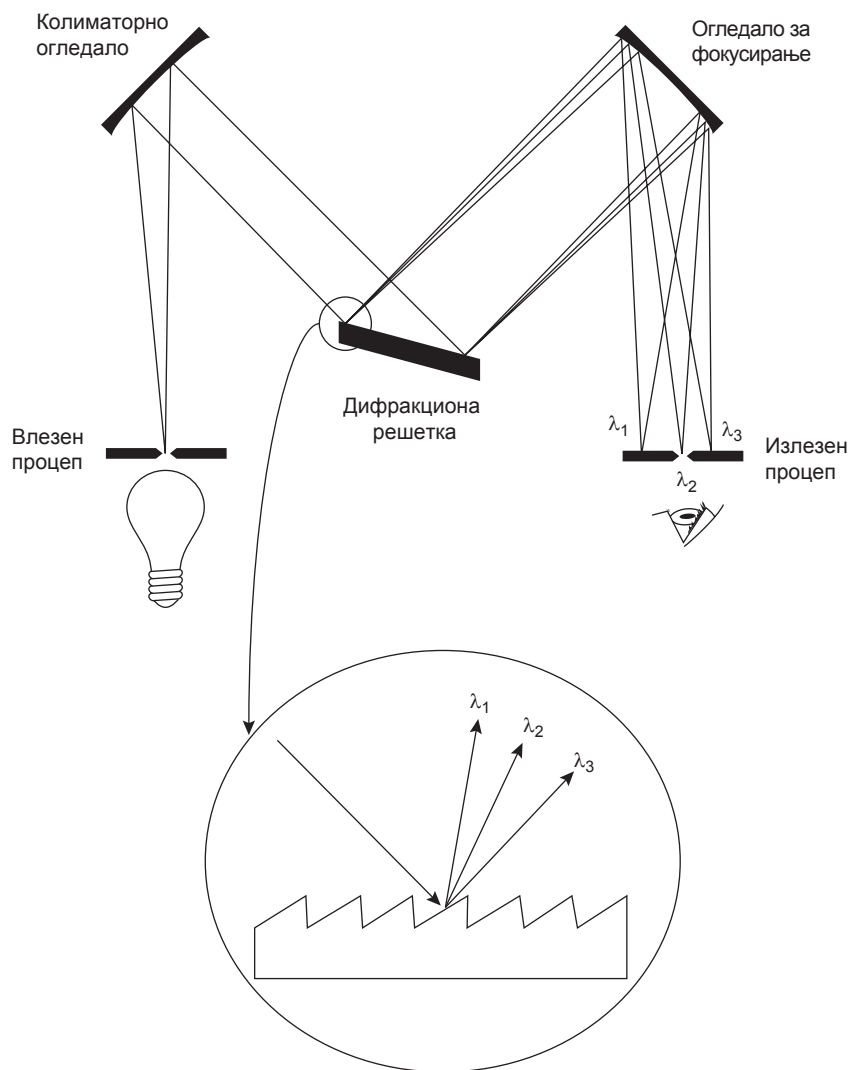
Зрачењето излегува од монохроматорот и влегува во детекторот. Како што е покажано на слика 10.12, **полихроматскиот** извор на зрачење што влегува низ влезниот процеп, на излезниот процеп се претвора во **монохроматски** извор со конечна ефективна ширина на лентата. Изборот на бранова должина којашто ќе излегува од монохроматорот се врши со ротирање на дифракционата решетка. Потесен

полихроматско зрачење

Електромагнетно зрачење со повеќе од една бранова должина.

монохроматско зрачење

Електромагнетно зрачење со една бранова должина.

**Слика 10.12**

Типичен монохроматор со решетка; на издвоениот зголемен дел е прикажана дисперзијата на зрачењето од дифракционата решетка.

интерферометар

Уред кој овозможува симултано мерење на сите бранови должини на светлината, со што се елиминира потребата од селектор на бранови должини.

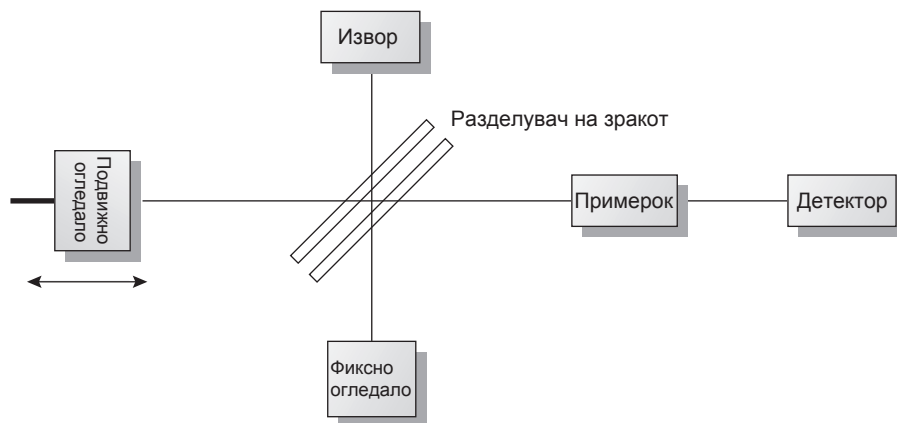
излезен процеп овозможува да се добие помала ефективна ширина на лента и подобра резолуција, но пропустливоста на зрачењето е помала.

Монохроматорите се класифицирани во две групи – со фиксна бранова должина и скенирачки. Брановата должина кај монохроматорите со фиксна бранова должина се избира со рачно вртење на решетката. Тие се употребуваат само за квантитативни анализи при кои се користат само една или две бранови должини. Скенирачки монохроматор користи мотор кој континуирано ја ротира решетката, што овозможува низ излезниот процеп да излегува зрачење со последователни бранови должини. Скенирачки монохроматори се користат за добивање спектри, а кога работат во режим со фиксна бранова должина и - за квантитативни анализи.

Интерферометри Интерферометарот овозможува алтернативен пристап во решавањето на проблемот на изборот на бранова должина. Наместо да го филтрира или дисперзира електромагнетното зрачење од изворот, интерферометарот ги пропушта сите бранови должини до детекторот (слика 10.13). Зрачењето од изворот се фокусира на раздвојувач на зракот, кој половината од зрачењето го пропушта до фиксно огледало, а другата половина ја рефлектира до подвижно огледало. Зрачењето се рекомбинира на раздвојувачот на зракот, каде што конструктивната и деструктивната

интерференција го одредува, за секоја бранова должина, интензитетот на светлината што доаѓа до детекторот. Со промена на позицијата на подвижното огледало се менува и брановата должина на светлината којашто покажува максимална конструктивна интерференција и максимална деструктивна интерференција. Сигналот на детекторот покажува интензитет што зависи од положбата на подвижното огледало, и е изразен во единици на растојание или на време. Резултатот е наречен интерферограм, или спектар во временски домен. Спектарот во временски домен математички се трансформира, преку постапка наречена Фуриеова трансформација, во нормален спектар (исто така наречен и спектар на фреквентен домен) на интензитетот како функција од енергијата на зрачењето. Детали во врска со интерферометри и математичкиот апарат за Фуриеова трансформација можат да се најдат во литературата посочена на крајот од ова поглавје.

Во споредба со монохроматорите, интерферометрите имаат значителни предности. Првата предност, наречена Jacquinot-ова, произлегува од високата пропустливост на зрачењето од изворот. Бидејќи интерферометарот не користи процепи, и има помалку оптички компоненти на кои може да дојде до расејување и ослабнување на зрачењето, до детекторот доаѓа зрачење чиј интензитет е за 80 до 200 пати поголем од интензитетот добиен со примена на монохроматори. Резултат од сето тоа е зголемен **однос сигнал-шум**.



Слика 10.13.
Блок-дијаграм на интерферометар.

Втората предност, наречена Fellget-ова, се однесува на скратувањето на времето потребно за добивање на спектарот. Бидејќи сите фреквенции се следат истовремено, целиот спектар може да се сними за приближно 1 секунда (за споредба, за снимање на спектар со скенирачки монохроматор потребни се 10-15 минути).

10.Б.3 Детектори

Првиот детектор за оптичка спектроскопија бил човечкото око коешто, секако, е ограничено како од аспект на точноста на регистрирањето, така и од аспект на осетливоста на електромагнетното зрачење. Современите детектори користат осетливи конвертори за преведување на сигналот што се состои од фотони, во електричен сигнал којшто лесно се мери. Сигналот на детекторот, S , во идеален случај треба да е линеарно зависен од моќноста на електромагнетното зрачење, P ,

$$S = kP + D$$

каде што k е осетливост на детекторот, а D е **темна струја** на детекторот, или фон на електричната струја кога сето зрачење од изворот е блокирано на патот до детекторот.

Фотонски конвертори Во оптичката спектроскопија се користат две општи класи конвертори, и неколку примери од нив се дадени во табелата 10.4. Фотоелементи и фотомултипликатори имаат фотоосетлива површина којашто апсорбира ултравиолетово, видно и блиско инфрацрвено зрачење создавајќи притоа електрична струја пропорционална со бројот на фотоните што пристигнуваат до конверторот. Други фотонски детектори користат полупроводник како фотоосетлива површина. Кога полупроводникот апсорбира фотон, валентните електрони се поместуваат кон проводната област на полупроводникот, создавајќи мерлива струја. Силициумова фотодиода има предност што лесно може да се произведе во минијатурна форма. Група фотодиоди може да се поврзат линеарно, при што таквата линеарна низа може да содржи од 64 до 4096 индивидуални фотодиоди. Со ширина на една диода од 25 μm , линеарната низа од, на пр., 2048 фотодиоди бара простор од само 51,2 mm. Со поставување на **фотодиодна низа** по должината на фокусната рамнина на монохроматорот, може да се следи истовремено целата област на бранови должини.

Термички конвертори Инфрацрвеното зрачење, општо земено, нема доволно енергија за да создаде мерлива струја во фотонскиот конвертор. Затоа, во инфрацрвената спектроскопија се користи термички конвертор. Апсорпцијата на инфрацрвени фотони од страна на термички конвертор ја покачува температурата на конверторот, при што доаѓа до промена на една или на повеќе негови карактеристики.

однос сигнал-шум

Однос на интензитетот на сигналот и средната вредност на интензитетот на околниот шум.

конвертор

Уред којшто едно хемиско или физичко својство, како што е pH или интензитет на фотони, го преведува во лесно мерлив електричен сигнал, како што е напон или струја.

темна струја

Струја што се генерира во фотонскиот детектор при отсуство на електромагнетно зрачење.

фотодиодна низа

Линеарно поставена фотодиодна низа со која може истовремено да се детектира зрачење на повеќе бранови должини.

Табела 10.4 Карактеристики на конвертори за оптичка спектроскопија

Детектор	Класа	Бранов интервал	Излезен сигнал
фотоелемент	фотонски	200-1000 nm	струја
фотомултипликатор	фотонски	110-1000 nm	струја
Si фотодиода	фотонски	250-1100 nm	струја
фотопроводник	фотонски	750-6000 nm	промена на отпор
фотонапонска ќелија	фотонски	400-5000 nm	промена на напон
термодвојка	термички	0,8-40 μ m	напон
термистор	термички	0,8-40 μ m	промена на отпор
пнеуматски	термички	0,8-1000 μ m	поместување на мембрана
пироелектричен	термички	0,3-1000 μ m	струја

Пнеуматски конвертор, на пр., се состои од мала цевка исполнета со ксенон, од едната страна затворена со окно пропустливо за инфрацрвено зрачење, а од другата страна со еластична мембрана. Зацрнетата површина од внатрешниот сид на цевката апсорбира фотони, при што се зголемува температурата на цевката и, соодветно, и притисокот на гасот. Зголемениот притисок предизвикува придвижување на еластичната мембрана, што доведува до создавање електричен сигнал.

10Б.4 Обработувачи на сигналот

Електричниот сигнал, генериран од конверторот, се испраќа до **обработувачот на сигналот**, кој го претвора во форма практична за аналитичарот. Примери на обработувачи на сигналот се аналогни или дигитални мерачи, рекордери, и компјутери опремени со картици за дигитална аквизиција (собирање на податоци). Обработувачот на сигналот може да се користи и за калибрирање на одговорот на детекторот, за засилување на сигналот од детекторот, за отстранување на шумот со филтрирање, или за математичка трансформација на сигналот.

обработувач на сигналот

Уред, како што е мерач или компјутер, кој сигналот од конверторот го прикажува во форма којашто аналитичарот лесно може да ја протолкува.

10В Спектроскопија заснована на апсорпција

Историски, првите спектроскопски студии биле поврзани со карактеризација на видливата светлина од Сонцето, на различни видови пламен и на соли внесени во пламен. Прегледот на спектроскопијата ќе го започнеме со апсорпционата спектроскопија, затоа што е една од поважните техники во современата аналитичка спектроскопија.

10В.1 Апсорпција на електромагнетно зрачење

Во апсорпционата спектроскопија, зракот од електромагнетното зрачење минува низ примерокот. Поголемиот дел од зрачењето минува без намалување на интензитетот. Меѓутоа, на одредени фреквенции интензитетот на зрачењето се пригушува. Тој процес на пригушување е наречен апсорпција. Анализот мора да исполнува два основни услови за да може да апсорбира електромагнетно зрачење. Првиот услов е да постои механизам според кој електричното или магнетното поле на зрачењето заемодејствува со анализот. Во случај на ултравиолетово и видливо зрачење, со заемодејството се опфатени енергиите на валентните електрони. Вибрационата енергија на хемиските врски се менува со апсорпција на инфрацрвено зрачење. Подетално претставување на таа интеракција и нејзината важност во утврдувањето на интензитетот на апсорпцијата, може да се најде во посочената литература на крајот од ова поглавје.

Вториот услов е енергијата на електромагнетното зрачење да биде еднаква на разликата на енергиите, ΔE , меѓу две квантизирани енергетски состојби на аналитот. На слика 10.4 е даден упростен приказ на апсорпција на фотон. Сликата е поучна зашто потенцира дека енергијата на фотонот мора да е еднаква на разликата на енергиите на пониската и на повисоката енергетска состојба. Но, недостасува информацијата за видот на енергетските состојби што се вклучени во апсорпцијата, за тоа кои премини меѓу состојбите се можни, како и за изгледот на добиениот спектар.

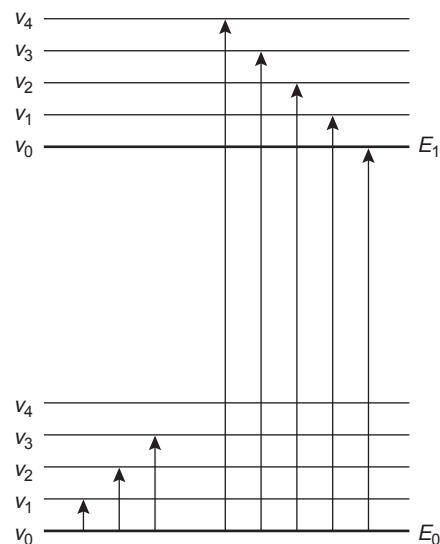
Дијаграмот на енергетските нивоа, прикажан на слика 10.14, може да се користи за објаснување на апсорпционен спектар. Линиите означени со E_0 и E_1 ги претставуваат основната (најниска) електронска состојба и првата електронска ексцитирана состојба на аналитот. На секое од електронските енергетски нивоа се додадени серија линии коишто ги претставуваат соодветните вибрациони енергетски нивоа.

Инфрацрвени спектри на молекули и полиатомски јони Енергијата на инфрацрвеното зрачење доволна да предизвика промена на вибрационата енергија на молекулите или на полиатомските јони (табела 10.1). Како што е покажано на слика 10.14, вибрационите енергетски нивоа се квантизирани, т.е. молекулата може да има само одредени, дискретни вибрациони енергии. Енергијата за дозволени вибрациони модови, E_v , е дадена со изразот

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2} \right) h\nu_0$$

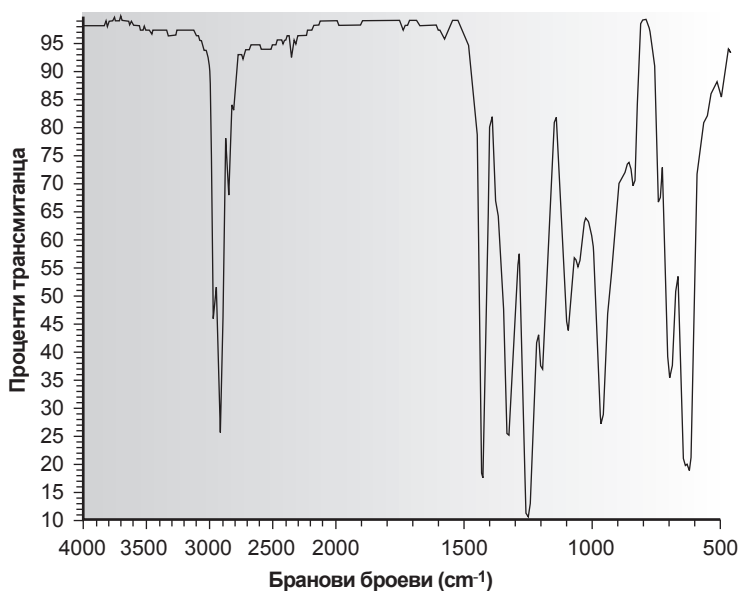
во кој v е вибрационен квантен број, кој може да има вредности 0, 1, 2, ..., а ν_0 е основната вибрациона фреквенција на врската. Вредностите за ν_0 се одредени со јачината на врската и со масите на краевите од врската, и се карактеристични за дадениот вид врска. На пр., проста врска јаглерод-јаглерод (C–C) апсорбира инфрацрвено зрачење на пониски енергии од двојната врска јаглерод-јаглерод (C=C), бидејќи C–C врската е послаба од C=C врската.

Насобна температура, повеќето од молекулите се во нивната основна вибрациона состојба ($v = 0$). За премини од основна вибрациона состојба во прва ексцитирана вибрациона состојба ($v = 1$) потребно е да дојде до апсорпција на фотон со енергија еднаква на $h\nu_0$. Премините во кои Δv е еднакво на ± 1 резултираат со основни апсорпциони линии. Послабите апсорпциони линии, наречени овертонови, потекнуваат од премини за кои Δv е еднакво на ± 2 или ± 3 . Бројот на можните нормални вибрациони модови за линеарни молекули изнесува $3N-5$, а за нелинеарни молекули $3N-6$, каде што N е бројот на атомите во молекулата. Не треба да е изненадување тоа што инфрацрвените спектри често покажуваат значителен број апсорпциони ленти. Дури и релативно простите молекули, каква што е, на пр., бензенот (C_6H_6), имаат 3 можни нормални модови на вибрирање, макар што сите тие модови не учествуваат во апсорпцијата. Типичен изглед на инфрацрвен спектар е прикажан на слика 10.15.



Слика 10.14

Дијаграм на енергетски нивоа, на кој е прикажана разликата меѓу апсорпцијата на инфрацрвено зрачење (лево) и ултравиолетово/видливо зрачење (десно).



Слика 10.15.

Инфрацрвен спектар со Фуријеова трансформација (FT-IR), на поливинилхлорид.

Табела 10.5 Електронски премини во кои се вклучени n , σ и π молекулски орбитали

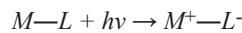
Премин	Бранова област (nm)	Примери
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	<200	C – C, C – H
$n \rightarrow \sigma^*$	160 – 260	H ₂ O, CH ₃ OH, CH ₃ Cl
$\pi \rightarrow \pi^*$	200 – 500	C=C, C=O, C=N, C=C
$n \rightarrow \pi^*$	250 – 600	C=O, C=N, N=N, N=O

UV/Видливи спектри на молекули и јони Кога молекула или јон апсорбираат ултравиолетово или видно зрачење, тие претрпуваат промена во конфигурацијата на валентните електрони. Валентните електрони во органските молекули и неорганските анјони како што е CO_3^{2-} , се наоѓаат во квантизирани сврзувачки σ (сигма), во сврзувачки π (пи), и во несврзувачки n , молекулски орбитали. Празните антисврзувачки сигма (σ^*), и пи, π^* , молекулски орбитали често се енергетски доволно блиску, така што е можен премин на електронот од пополнета во празна орбитала.

Молекулските ултравиолетови/видливи спектри потекнуваат од четири вида премини меѓу квантизираните енергетски нивои. Приближни вредности на брановите должини за овие апсорпции, како и делумна листа на врски, функционални групи или молекули што учествуваат во тие премини, се дадени во табела 10.5. Од сите премини, најважни се $n \rightarrow \pi^*$ и $\pi \rightarrow \pi^*$, затоа што во нив учествуваат функционални групи карактеристични за аналитот, а самите бранови должини лесно се регистрираат. Врските и функционалните групи што учествуваат во апсорпцијата на ултравиолетово и видно зрачење се наречени **хромофори**.

Голем број јони на преодни метали, како што се Cu^{2+} и Co^{2+} , даваат обоени раствори, бидејќи металниот јон апсорбира видлива светлина. Премините што учествуваат во апсорпцијата потекнуваат од валентните електрони во d -орбиталите на металните јони. Кај слободните метални јони, петте d -орбитали имаат иста енергија. Меѓутоа, во присуство на комплексирачки лиганд или на молекули од растворувачот, d -орбиталите се раздвојуваат во две или повеќе групи со различна енергија. На пр., во октаедарскиот комплекс $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$, шестте молекули вода условуваат раздвојување на d -орбиталите во две групи, како што е прикажано на слика 10.16. Лентите од $d-d$ премините за преодните метали се релативно слаби.

Преносот на полнеж е важен извор на UV/видливата апсорпција за неоргански метал–лиганд комплекси, при кој апсорбирањето на фотонот доведува до ексцитирана состојба, којашто може да се опише како пренос на полнеж од металот, M , до лигандот, L .

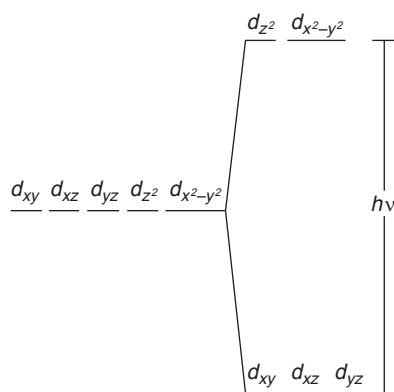


Апсорпцијата со пренос на полнеж е важна поради тоа што дава мошне големи апсорбанци, што ја зголемува осетливоста на аналитичката метода. Еден важен пример на комплекс со пренос на полнеж е комплексот на o -фенантролин со Fe^{2+} , чиј UV/видлив спектар е прикажан на слика 10.17. Можна е и апсорпција со пренос на полнеж при која електронот преминува од лигандот на металот.

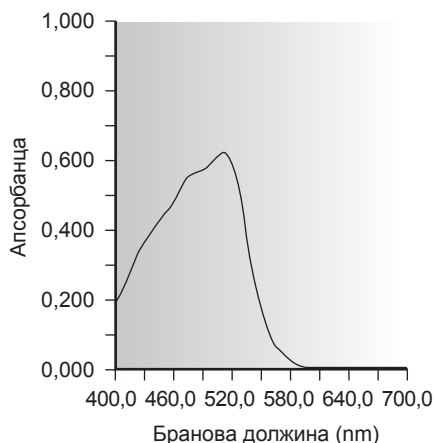
Споредувајќи го инфрацрвениот спектар од слика 10.15 со UV/видливиот спектар од слика 10.17, забележуваме дека UV /видливите апсорпциони ленти се често многу пошироки од оние во инфрацрвените спектри. Причината за тоа може да се изведе од слика 10.14. Кога еден хемиски вид апсорбира UV/видливо зрачење, премините меѓу електронските енергетски нивои може да бидат придружени и со

хромофор

Специфична врска или функционална група во молекулата, одговорна за апсорпција на светлина со определена бранова должина.

**Слика 10.16**

Раздвојување на d -орбитали во октаедарско поле.



Слика 10.17

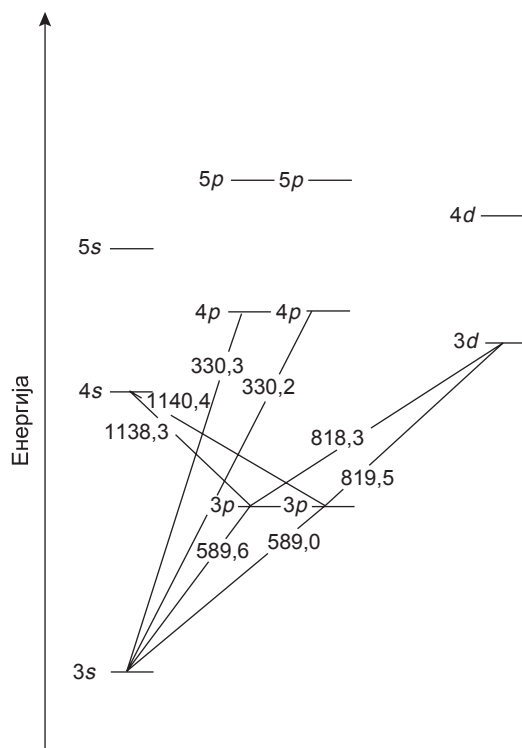
UV/видлив спектар на $\text{Fe}(\text{офенантролин})_3^{2+}$.

премини меѓу вибрационите енергетски нивои. Како резултат на тоа, се добиваат бројни блиски апсорпциони ленти коишто се преклопуваат и формираат една широка апсорпциона лента.

UV/Видливи спектри на атоми Како што беше напоменато во табела 10.1, енергијата на UV/видливото зрачење е доволна да предизвика промена во конфигурацијата на валентните електрони во атомот. Натриумот, на пр., со електронска конфигурација $[\text{Ne}]3s^1$, има еден валентен електрон во $3s$ атомската орбитала. Постојат, исто така, и празни атомски орбитали со повисока енергија. На слика 10.18 е прикажан дел од дијаграмот на електронските енергетски нивои на пополнети и непополнети атомски орбитали од валентниот слој на натриумот. Оваа конфигурација на атомските орбитали, којашто покажува раздвојување на p орбиталите во два нивоа со донекаде различни енергии, веројатно се разликува од конфигурациите прикажани во поранешните курсеви. Причината за раздвојувањето, меѓутоа, излегува од рамките на овој текст, и не е од суштинска важност за разбирање на контекстот.

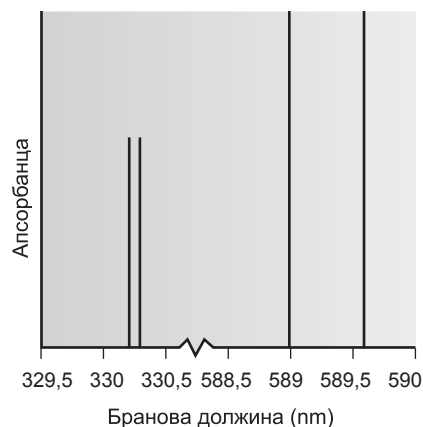
Апсорпцијата на фотонот е проследена со екситација на електрон од атомска орбитала со пониска енергија, во орбитала со повисока енергија. Но, сите можни премини меѓу атомските орбитали не се дозволени. За натриумот, единствено дозволени премини се оние за кои промената на орбиталниот квантен број (l) изнесува ± 1 ; така, премините од $s \rightarrow p$ орбитали се дозволени, но премините од $s \rightarrow d$ орбитали се забранети. Брановите должини на електромагнетно зрачење што мора да биде апсорбирано за да се предизвикаат одредени дозволени премини се прикажани на слика 10.18.

Атомскиот апсорпционен спектар на натриумот е прикажан на слика 10.19. Сличен ваков спектар даваат атомите на повеќето од елементите. Најочигледна карактеристика на овој спектар е дека се состои од неколку дискретни апсорпциони линии што одговараат на премини меѓу основната состојба ($3s$ атомската орбитала) и $3p$ и $4p$ атомските орбитали. Апсорпцијата од ексцитирани нивоа, како што е, на пр., она од $3p$ атомска орбитала во $4s$ или $3d$ атомска орбитала, коишто се вклучени во дијаграмот на енергетските нивоа на



Слика 10.18.

Енергетски дијаграм на валентниот електронски слој на натриум.

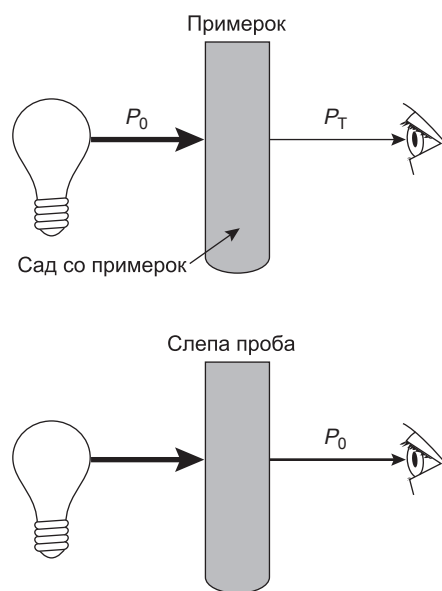


Слика 10.19

Атомски апсорпционен спектар на натриум.

трансмитанца

Однос на моќноста на зрачењето што минува низ примерокот, спрема моќноста на зрачењето од изворот (T).



Слика 10.20

(а) Шематски дијаграм на кој е прикажано пригушување на зрачењето што минува низ примерокот; P_0 е моќност на зрачењето од изворот, а P_T е моќност на зрачењето по минувањето низ примерокот. (б) Шематски дијаграм на кој е прикажано дека P_0 може да се дефинира како моќност на зрачењето што минува низ садот со слепата проба, со што се коригира трансмитанцата (а) за губитоци што произлегуваат од расејувањето, рефлексијата или апсорпцијата од киветата, и апсорпцијата од слепата проба.

слика 10.18, е премногу слаба за да се детектира. Бидејќи времето на постоење на една ексцитирана состојба е кратко (типично изнесува $10^{-7} - 10^{-8}$ s), атомот од ексцитираната состојба веројатно ќе се врати во основна состојба пред да има прилика да апсорбира фотон.

Друга карактеристика на спектарот, прикажан на слика 10.19, е малата ширина на апсорпционите линии, што се должи на определената разлика на енергиите меѓу основната и ексцитираните состојби. Природната ширина на линиите во атомската апсорпција, условена од принципот на неопределеност, изнесува приближно 10^{-5} nm. Други фактори дополнително ја зголемуваат ширината на линиите до приближно 10^{-3} nm.

10В.2 Трансмитанца и апсорбанца

Пригушувањето на електромагнетното зрачење при негово минување низ примерокот квантитативно се опишува со два различни, но поврзани поими: трансмитанца и апсорбанца. **Трансмитанцата** е дефинирана како однос на моќноста на електромагнетното зрачење по минувањето низ примерокот, P_T , спрема моќноста на зрачењето што влегува во примерокот од изворот, P_0 , (слика 10.20).

$$T = \frac{P_T}{P_0} \quad 10.1$$

Тансмитанцата помножена со 100 дава процентна трансмитанца (% T), којашто варира меѓу 100 % (нема апсорпција) и 0 % (целосна апсорпција). Сите методи на детекција, без оглед дали се работи за човечко око или за современ фотоелектричен конвертор, ја мерат трансмитанцата на електромагнетното зрачење.

Пригушувањето на зрачењето при неговото минување низ примерокот е причина трансмитанцата да е помала од 1. Равенката 10.1 не ги разликува разните причини што доведуваат до пригушување. Покрај апсорпцијата од страна на аналитот, неколку други феномени учествуваат во вкупното пригушување на зрачењето, како што се рефлексијата и апсорпцијата од садот во кој се наоѓа примерокот, апсорпцијата од компонентите во матрицата на примерокот различни од аналитот, и расејувањето на зрачењето. За компензирање на овие губитоци на моќноста на електромагнетното зрачење, користиме метода на т.н. слепа проба (слика 10.20 б). Моќноста на зрачењето што излегува од садот со т.н. слепа проба се означува со P_0 .

Поинаков начин на изразување на пригушувањето на електромагнетното зрачење е преку апсорбанцата, A , којашто се дефинира како

$$A = -\log T = -\log \frac{P_T}{P_0} = \log \frac{P_0}{P_T} \quad 10.2$$

Апсорбанцата е попрактична единица за изразување на пригушувањето на зрачењето, затоа што, како што е покажано во наредната секција, е линеарна функција од концентрацијата на аналитот.

Пример

ПРИМЕР 10.3

Примерокот покажува процентна трансмитанца од 50,0 %. Колкава е апсорбанцата?

РЕШЕНИЕ

Со процентна трансмитанца од 50,0 %, трансмитанцата на примерокот е 0,5000. Со замена во равенката 10.2 се добива

$$A = -\log T = -\log(0,500) = 0,301$$

Од равенката 10.1 произлегува дека кај атомската апсорпција, поради малата ширина на линиите, не може да се користи извор на континуирано зрачење. Дури и со висококвалитетен монохроматор, ефективната ширина на лента за континуиран извор е 100 – 1000 пати поголема од ширината на атомската апсорпциона линија. Како резултат на тоа, од извор со континуирано зрачење се апсорбира сосема мал дел ($P_0 = P_T$), и измерената апсорбанца практично има вредност нула. Од овие причини, атомската апсорпција бара линиски извори на зрачење.

10B.3 Апсорбанца и концентрација: Беров закон

Кога монохроматско електромагнетно зрачење минува низ бесконечно тенок слој од примерокот, со дебелина dx , тоа претрпува намалување на енергијата за износ dP (слика 10.21). Фракционото опаѓање на вредноста на моќноста е пропорционално со дебелината на примерокот и концентрацијата на аналитот, C ; така,

$$\frac{-dP}{P} = \alpha C dx \quad 10.3$$

каде P е моќност на зрачењето што паѓа на тенок слој од примерокот, а α е константа на пропорционалност. Интегрирањето на левата страна на равенката 10.3 од $P = P_0$ до $P = P_T$, и на десната страна од $x = 0$ до $x = b$, каде што b е вкупната должина на патот на зрачењето низ примерокот,

$$-\int_{P=P_0}^{P=P_T} \frac{dP}{P} = \alpha C \int_{x=0}^{x=b} dx$$

дава

$$\ln\left(\frac{P_0}{P_T}\right) = \alpha b C$$

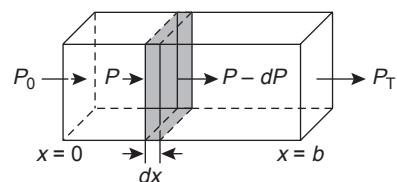
Со замена на природниот логаритам ($\ln$) со декаден ($\log$), и со замена во равенката 10.2, се добива

$$A = abC \quad 10.4$$

каде што a е коефициент на апсорпција на аналитот, со единица $\text{cm}^{-1}(\text{концентрација})^{-1}$. Кога се користи моларна концентрација, коефициентот на апсорпција се заменува со моларен коефициент на апсорпција, ϵ (со единици $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)

$$A = \epsilon b C \quad 10.5$$

Коефициентот на апсорпција и моларниот коефициент на апсорпција ја покажуваат веројатноста за апсорпција на фотон со дадена енергија од аналитот. Како резултат на тоа, вредностите на a и ϵ зависат од брановата должина на електромагнетното зрачење.



Слика 10.21

Елементи користени при изведувањето на Бер-Ламбертовиот закон.

ПРИМЕР 10.4

Раствор на аналит, со концентрација $5,00 \times 10^{-4} \text{ M}$, е пренесен во кивета со дебелина на слој од 1,00 cm. При мерење на апсорбанцата на растворот, на бранова должина од 490 nm, добиена е вредност 0,338. Колкав е моларниот коефициент на апсорпција на аналитот за таа бранова должина?

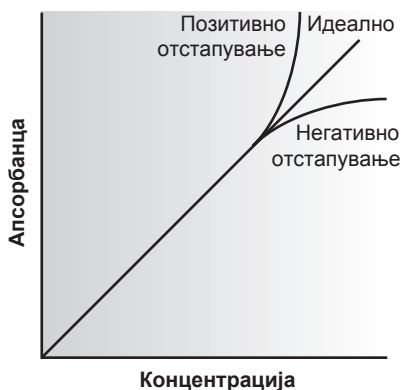
РЕШЕНИЕ

Решавајќи ја равенката 10.5 по ϵ , и извршувајќи соодветни замени, се добива

$$\epsilon = \frac{A}{bC} = \frac{0,338}{(1,00 \text{ cm})(5,00 \times 10^{-4} \text{ M})} = 676 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

Беров закон

Однос меѓу апсорбанцата на примерокот и концентрацијата на хемиските видови што учествуваат во апсорпцијата ($A = \epsilon bC$).

**Слика 10.22**

Калибрациони криви покажуваат позитивно и негативно отстапување од Беровиот закон.

Равенките 10.4 и 10.5, коишто ја даваат линеарната зависност меѓу апсорбанцата и концентрацијата, се познати како Бер-Ламбертов закон, или, повобичаено, како **Беров закон**. Калибрациони дијаграми базирани на Беровиот закон се користат во рутински квантитативни анализи.

10B.4 Беров закон и повеќекомпонентни примероци

Беровиот закон може да се користи и за примероци што содржат неколку компоненти што учествуваат во апсорпцијата, под услов да нема интеракција меѓу компонентите. Индивидуалните апсорбанци, A_i , се адитивни. За двокомпонентна смеша на X и Y, вкупната апсорбанца, A_{tot} , изнесува

$$A_{\text{tot}} = A_X + A_Y = \epsilon_X b C_X + \epsilon_Y b C_Y$$

Генерализирано, апсорбанцата за смеша од n компоненти, A_m , е дадена со изразот

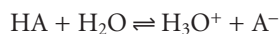
$$A_m = \sum_{i=1}^n A_i = \sum_{i=1}^n \epsilon_i b C_i \quad 10.6$$

10B.5 Ограничувања на Беровиот закон

Согласно Беровиот закон, калибрациона крива на апсорбанца во однос на концентрацијата на аналитот во серија стандардни раствори треба да биде права линија што започнува од координатниот почеток и е со коефициент на правец ab или ϵb . Меѓутоа, во голем број случаи калибрационите криви не се линеарни (слика 10.22). Отстапувањата од линеарноста може да се поделат во три категории: основни, хемиски и инструментални.

Основни ограничувања на Беровиот закон Беровиот закон е ограничен и е применлив само за ниски концентрации на аналитот. Постојат две причини за ова основно ограничување на Беровиот закон. При високи концентрации, поединечните честички на аналитот веќе не се однесуваат независно една од друга. Интеракцијата меѓу честичките на аналитот може да ја промени вредноста на ϵ . Втората причина е зависноста на коефициентот на апсорпција, a , и моларниот коефициент на апсорпција, ϵ , од индексот на рефракција на примерокот. Бидејќи индексот на рефракцијата се менува со промена на концентрацијата на аналитот, вредностите на a и ϵ ќе се менуваат. При доволно ниски концентрации на аналитот, индексот на рефракција останува практично константен, и калибрационата крива е линеарна.

Хемиски ограничувања на Беровиот закон Хемиски отстапувања од Беровиот закон се јавуваат кога апсорпционите хемиски видови се вклучени во рамнотежни реакции. Да разгледаме, на пр., слаба киселина, HA. За конструкција на калибрациона крива според Беровиот закон, се подготвуваат неколку стандарди што содржат позната вкупна концентрација на HA, $C_{\text{вкупно}}$, и апсорбанцата на секој од тие раствори се мери на иста бранова должина. Бидејќи HA е слаба киселина, таа постои во рамнотежа со конјугираната слаба база, A^-



Ако и HA и A^- апсорбираат на одбраната бранова должина, Беровиот закон е даден со изразот

$$A = \epsilon_{\text{HA}} b C_{\text{HA}} + \epsilon_{\text{A}} b C_{\text{A}} \quad 10.7$$

каде C_{HA} и C_{A} се рамнотежни концентрации на HA и на A^- . Бидејќи вкупната концентрација на слабата киселина, $C_{\text{вкупно}}$, изнесува

$$C_{\text{вкупно}} = C_{\text{HA}} + C_{\text{A}}$$

концентрацијата на HA и A^- може да се напише на следниов начин:

$$C_{\text{HA}} = \alpha_{\text{HA}} C_{\text{вкупно}} \quad 10.8$$

$$C_{\text{A}} = (1 - \alpha_{\text{HA}}) C_{\text{вкупно}} \quad 10.9$$

каде α_{HA} е уделот на слабата киселина присутна како HA . Со замена на равенките 10.8 и 10.9 во равенката 10.7, по средувањето, се добива:

$$A = (\epsilon_{\text{HA}} \alpha_{\text{HA}} + \epsilon_{\text{A}} - \epsilon_{\text{A}} \alpha_{\text{HA}}) b C_{\text{вкупно}} \quad 10.10$$

Бидејќи вредностите на α_{HA} ќе зависат од концентрацијата на HA , можно е равенката 10.10 да не биде линеарна. Калибрационата крива на зависноста на A од $C_{\text{вкупно}}$ според Беровиот закон ќе биде линеарна ако е исполнет едниот од двата услови. Ако брановата должина е избрана така што ϵ_{HA} и ϵ_{A} да се еднакви, равенката 10.10 се упростува:

$$A = \epsilon_{\text{A}} b C_{\text{вкупно}}$$

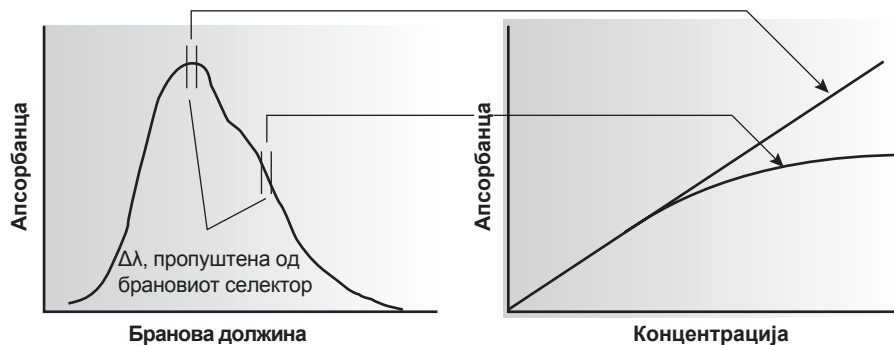
и се добива линеарна калибрациона крива според Беровиот закон. Алтернативно, ако α_{HA} е константно за сите стандарди, тогаш равенката 10.10 ќе биде права линија за сите бранови должини. Бидејќи HA е слаба киселина, вредностите на α_{HA} се менуваат во зависност од pH . За вредноста на α_{HA} да остане константна, потребно е секој стандард да има иста вредност на pH , што се постигнува со додавање соодветно количество пуфер. Доколку стандардите немаат ист pH , калибрационата крива ќе покажува позитивно или негативно отстапување од Беровиот закон, во зависност од релативните вредности на ϵ_{HA} и ϵ_{A} .

Инструментални ограничувања на Беровиот закон Постојат две главни инструментални ограничувања на Беровиот закон. Првото ограничување е поврзано со фактот дека Беровиот закон важи строго само за чисто монохроматско зрачење, т.е., за зрачење што има само една бранова должина. Меѓутоа, како што е покажано во секцијата 10Б.2, дури и најдобриот селектор на бранови должини пропушта зрачење со мала, но конечна ефективна ширина на спектралната лента. Користењето на полихроматско зрачење секогаш доведува до негативно отстапување од Беровиот закон, но тоа отстапување е минимално ако вредноста на ϵ е константна во интервалот на бранови должини пропуштени низ селекторот на бранови должини. Од таа причина, како што е прикажано на слика 10.23, најдобро е мерењето на апсорбанцата да се врши на широк апсорпционен пик. Отстапувањата од Беровиот закон се од помало значење ако ефективната ширина на спектралната лента на зрачењето од изворот е помала од $1/10$ од природната ширина на лентата од апсорбирачките хемиски видови присутни во примерокот.^{7,8} Кога мерењата се вршат на наклонот, линеарноста се зголемува со користење на помала ефективна ширина на лентата пропуштена од селекторот.

Случајното зрачење е вториот фактор за инструментално ограничување на Беровиот закон.

случајно зрачење

Зрачење што доаѓа до детекторот, но коешто не го следи оптичкиот пат од изворот до детекторот.



Слика 10.23

Приказ на влијанието на брановата должина врз линеарноста на калибрациона крива добиена со примена на Беров закон.

Случајното зрачењето потекнува од недостатоците во селекторот на бранови должини, што овозможува случајна светлина да продре во инструментот. Случајното зрачење внесува свој удел, $P_{\text{случ}}$, во моќноста на зрачењето што доаѓа до детекторот:

$$A = \log \frac{P_0 + P_{\text{случ}}}{P_T + P_{\text{случ}}}$$

За мали концентрации на аналитот, $P_{\text{случ}}$ е значително помало од P_0 и P_T , и не влијае врз вредноста на апсорбанцата. Меѓутоа, при повисоки концентрации на аналитот, $P_{\text{случ}}$ веќе не е занемарливо помало од P_T , и апсорбанцата е помала од очекуваната. Резултат од тоа е негативното отстапување од Беровиот закон.

10Г Ултравиолетова/видлива и инфрацрвена спектрофотометрија

Колориметријата, во која примерокот апсорбира видлива светлина, претставува прва рутинска примена на молекулската апсорпциона спектроскопија, во 1830 година. Концентрацијата на аналитот била определувана визуелно, со споредба на боите на примерокот и на серија стандарди, во т.н. Неслерови епрувети (како што е опишано на почетокот од ова поглавје) или со употреба на инструмент наречен колориметар. Развојот на видливата апсорпциона спектрометрија како рутинска аналитичка техника бил ограничен од заморното визуелно споредување на бои. Освен тоа, иако инфрацрвеното зрачење било откриено во 1800, а ултравиолетовото во 1801 година, нивната примена во оптичката молекулска апсорпциона спектроскопија била ограничена поради немање начини за нивна практична детекција. Во текот на 1930-тите и 1940-тите години, напредокот во електрониката овозможил конструкција на фотоелектрични конвертори за ултравиолетовото и видливото зрачење, како и термодвојки за детекција на инфрацрвено зрачење. Како резултат на тоа, „современите“ инструменти за рутинска апсорпциона спектроскопија станале достапни во 1940-тите години. Напредокот на ова поле бил мошне брз.

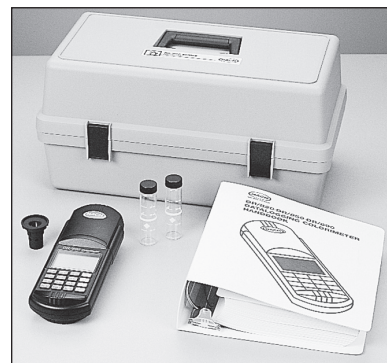
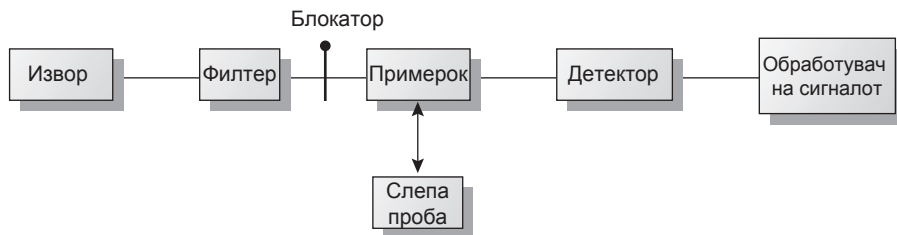
10Г.1 Опрема

Од неколку инструменти со различна конструкција, аналитичарот често треба да избере инструмент кој најдобро одговара за решавање на конкретна аналитичка задача. Во оваа секција, се разгледуваат неколку различни видови инструменти што се користат во молекулската апсорпциона спектроскопија, истакнувајќи ги нивните предности и ограничувања. Во оваа секција, исто така, се опфатени и методите на внесување на примероците.

фотометар со филтер

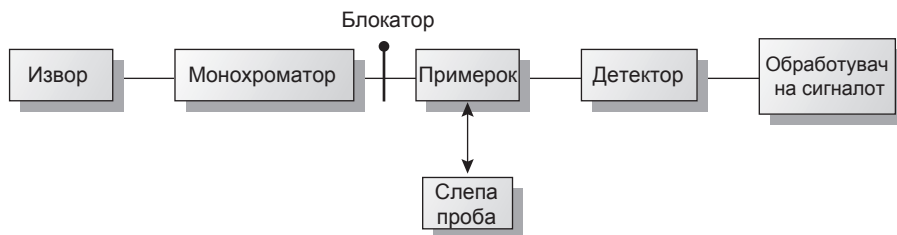
Едноставен инструмент за мерење на апсорбанца, во кој изборот на бранова должина се врши со филтер којшто врши апсорпција или интерференција на светлината.

Инструменти наменети за молекулска UV/видлива апсорпција Наједноставен инструмент што се користи денес во молекулската UV/видлива апсорпција е **фотометар со филтер**, прикажан на слика 10.24, со вграден апсорпционен или интерферентен филтер за селекција на спектрална лента. За да се спречи директното изложување на примерокот на високоенергетско зрачење што може да доведе до разложување, филтерот е поставен меѓу изворот и примерокот. Фотометри со филтер се со единечен оптички пат од изворот до детекторот, и се наречени инструменти со единечен сноп. Инструментот се калибрира на 0 % T со помош на „блокатор“ со кој се спречува зрачењето да стаса до детекторот. По отстранувањето на „блокаторот“, инструментот се калибрира на 100 % T користејќи соодветна слепа проба. Слепата проба потоа се заменува со примерок, и се мери неговата трансмитанца. Бидејќи моќноста на зрачењето од изворот и осетливоста на детекторот зависат од брановата должина, фотометарот мора да се калибрира по секоја промена на филтерот. Во споредба со другите спектроскопски инструменти,



Слика 10.24

Блок-дијаграм на фотометар со филтер, и фотографија на која е прикажан изглед на типичен пренослив инструмент, погоден за примена на терен. Colorimeter™ е производ на Hach Company. (Објавено со дозвола на Hach Company.)



Слика 10.25

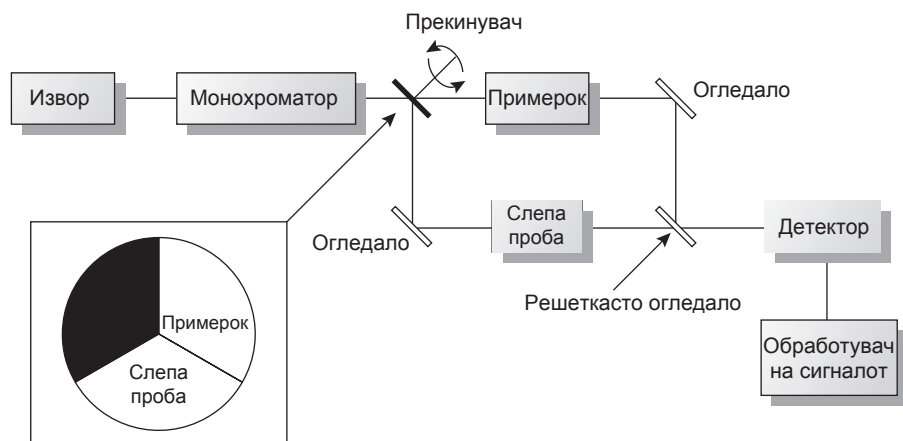
Блок дијаграм на спектрофотометар со еден сноп зраци, со фиксна бранова должина, и фотографија на која е прикажан изгледот на типичен инструмент. (Објавено со дозвола на Fisher Scientific).

спектрофотометар

Инструмент за мерење на апсорбанца, што користи монохроматор за избор на бранова должина.

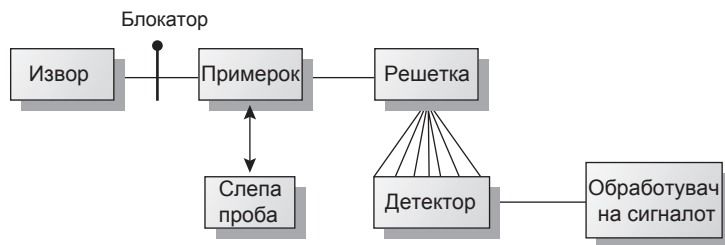
предноста на фотометрите е релативно ниската цена, издржливоста и лесното одржување. Дополнителна погодност на фотометрите е нивната преносливост, што овозможува употреба на терен. Недостаток на фотометрите е што со нив не може да се врши регистрирање на апсорпционите спектри.

Инструменти што користат монохроматори за избор на бранови должини се наречени спектрометри. Во апсорпционата спектроскопија, каде транзитанцата претставува однос на две моќности на зрачењето, инструментот се нарекува спектрофотометар. Наједноставен **спектрофотометар** е инструмент со еден сноп зраци опремен со фиксен монохроматор како селектор на бранови должини. Блок-дијаграмот на ваков вид спектрофотометри е прикажан на слика 10.25. Спектрофотометри со еден сноп зраци се калибрираат и се користат на ист начин како и фотометрите. Пример на спектрофотометар со еден сноп зраци е Spectronic-20, произведен од Milton-Roy. Spectronic-20 може да се користи од 340 до 625 nm (до 950 nm со детектор осетлив на црвена светлина) и има фиксна ширина на спектрална лента од 20 nm. Бидејќи оваа ширина на лентата е прилично голема, инструментот е попогоден за квантитативни анализи одошто за квалитативни. Достапни се и преносливи спектрофотометри со еден сноп зраци, со електрично напојување од батерија, што може да се користат за анализи надвор од лабораторија. Достапни се и спектрофотометри со ефективна ширина на лента од 2 до 8 nm. Спектрофотометри со еден сноп зраци, со фиксна бранова должина не се практични за снимање спектри, бидејќи рачното подесување на брановата должина и рекалибрирањето на спектрофотометарот е неприклично и бара доста време. Освен тоа, точноста на спектрофотометри со еден сноп зраци е условена од стабилноста на изворот на зрачењето и на детекторот.



Слика 10.26

Блок-дијаграм скенирачки спектрофотометар со двоен сноп зраци, и фотографија на која е прикажан изглед на типичен инструмент. (Објавено со дозвола на Varian, inc.)



Слика 10.27

Блок дијаграм на спектрофотометар со диодна низа.

Ограничувањата на спектрофотометрите со еден сноп зраци, со фиксна бранова должина може да се сведат на минимум со примена на спектрофотометар со двоен сноп зраци, прикажан на слика 10.26. Со прекинувач, прикажан на зголемениот дел од сликата, се врши контрола на патот на зрачењето со пренасочување на зракот кон примерокот, кон слепата проба или кон блокаторот. Обработувачот на сигналот ја користи познатата брзина на ротација на прекинувач за да го разложи сигналот што доаѓа до детекторот на дел што е резултат на пропустливоста на матрицата (P_0) и на примерокот (P_T). Со вклучување на непросирна површина, како онаа на блокаторот, можно е постојано подесување на 0% T како одговор на детекторот. Ефективната ширина на лентата на спектрофотометар со двоен сноп зраци се контролира со помош на променлив процеп на влезот и на излезот од монохроматорот. Вообичаена ефективна ширина на лентата изнесува од 0,2 nm до 3,0 nm. Скенирачки монохроматор овозможува автоматско регистрирање на спектри. Инструменти со двоен сноп зраци се поуниверзални од инструменти со еден сноп зраци, и се користат како за квантитативни, така и за квалитативни анализи; меѓутоа, тие се поскапи.

Инструментите, разгледувани до сега, користат само еден детектор и можат да следат само една бранова должина во дадено време. Линеарно поставена низа од фотодиоди се состои од поголем број детектори, или канали, коишто овозможуваат целиот спектар да биде регистриран за време од најмалку 0,1 s. Блок дијаграм на типичен мултиканален спектрофотометар е прикажан на слика 10.27. Зрачењето од изворот што минува низ примерокот се диспергира на решетката. Линеарно подредени фотодиоди се поставени во фокусната рамнина на решетката, при што секоја диода регистрира енергија на зрачење во тесен интервал бранови должини.

Предноста на фотодиодата низа е брзината на собирањето на податоците, којашто овозможува да се регистрираат повеќе спектри за еден примерок. Поединечните спектри се сумираат, а средната вредност го дава финалниот спектар. Процесот на добивањето **средна вредност на сигналот** го подобрува односот на сигналот спрема шумот за даден спектар. Кога се собира серија спектри, сумарната вредност на сигналот во секоја точка расте како nS_x , каде што n е бројот на спектрите, а S_x е вредноста на сигналот во x -та точка од спектарот. Зголемувањето на интензитетот на шумот, којшто претставува случаен настан, се одвива според изразот ($\sqrt{nN_x}$), во кој N_x е интензитетот на шумот во точка x од спектарот. Оттука, односот на сигналот спрема шумот (S/N) во x -та точка од спектарот се зголемува за фактор $\sqrt{n}$

$$\frac{S}{N} = \frac{nS_x}{\sqrt{nN_x}} = \sqrt{n} \frac{S_x}{N_x}$$

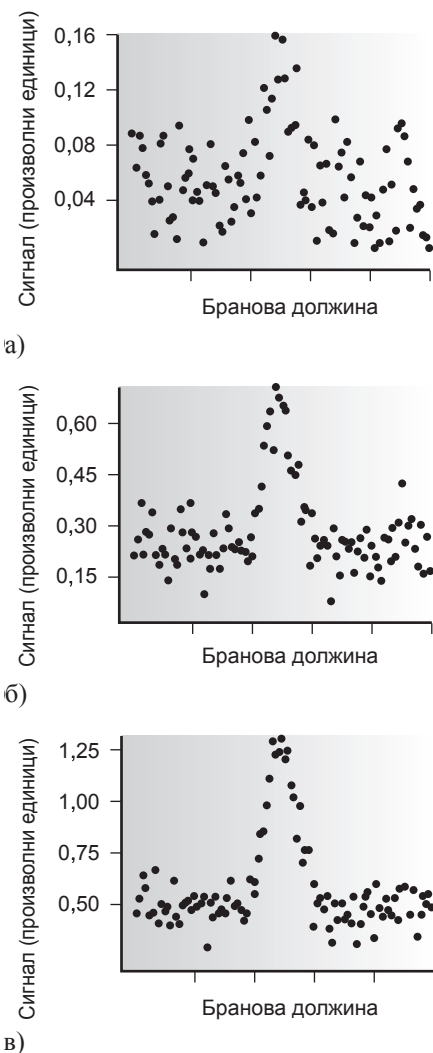
каде (S_x/N_x) е однос на сигналот спрема шумот за еден скен. Ефектот на добивање средна вредност на сигналот е прикажан на слика 10.28. Спектарот на слика 10.28а го покажува вкупниот сигнал на еден скен. Макар што постои воочлив пик во центарот на спектарот, нивото на шумот го прави пикот на сигналот тешко мерлив. На слика 10.28б и 10.28в е прикажано подобрувањето на односот сигнал/шум, постигнато по неколку добивања средна вредност на сигналот. Недостаток на фотодиодни низи е што ефективната ширина на лентата по една диода е за приближно еден ред на големина поголема од онаа добиена со висококвалитетен монохроматор.

Просторот предвиден за внесување на примерокот во инструментите прикажан на слика 10.24 – 10.27 е непропустлив за зрачењето, со што се спречува губиток на зрачењето, како и влегување на случајното зрачење. Примероците, вообичаено, се во течна состојба или во форма на раствор, и се пренесуваат во кивети направени од материјал што пропушта UV/видливо зрачење – кварц, стакло и пластика (слика 10.29). Кивети од кварц или стопен силициум диоксид се користат за работа на бранови должини помали од 300 nm, област во која другите материјали апсорбираат во значителна мера. Најчесто користени кивети се со дебелина од 1 cm, макар што се достапни и кивети со помали (≥ 1 mm) или поголеми (≤ 10 cm) дебелина. Кивети со поголема дебелина се користат за анализа на многу разредени раствори или за гасовити примероци. Кивети со највисок квалитет се прават во правоаголна форма, и се поставуваат така што зрачењето да паѓа на нив под агол од 90° , при што губитоците поради рефлексија се најмали. Такви кивети, со идентични оптички карактеристики, се особено погодни за инструменти со двоен сноп зраци. Цилиндрични кивети често се користат за внесување примероци во едноставните спектрофотометри со еден сноп зраци, макар што разликите во дебелината и оптичките карактеристики на овие цилиндрични кивети внесуваат дополнителни извори на грешки во анализата.

Во некои прилики е важно да се следи системот без физички да се зема примерок за анализирање. Таков е случајот, на пр., при континуирано следење на некој производ или на технолошки отпад, следење на физиолошки процеси или на еколошки системи. Со примена на сонда со оптичко влакно, можно е да се врши анализа на примероци *in situ*. Едноставна сонда со оптичко влакно е прикажана на слика 10.30а, и таа се состои од два кабли со оптички влакна. Едниот кабел го пренесува зрачењето од изворот до киветата низ која слободно циркулира примерокот. Зрачењето од изворот минува низ растворот, по што се рефлектира од огледало. Вториот оптички кабел го пренесува неапсорбираното зрачење до брановиот селектор. Во друга изведба (слика 10.30б), киветата за примерок претставува мембрана што содржи реагенс кој реагира со анализатот. Кога анализатот дифундира низ мембраната, тој реагира со реагенсот давајќи производ што апсорбира UV или видливо зрачење. Неапсорбираното зрачење од изворот се рефлектира или се расејува до детекторот. Сонди со оптички влакна, што покажуваат хемиска селективност, се наречени оптроди.^{9,10}

средна вредност на сигналот

Собирање на последователни спектри за подобрување на односот сигнал/шум.



Слика 10.28

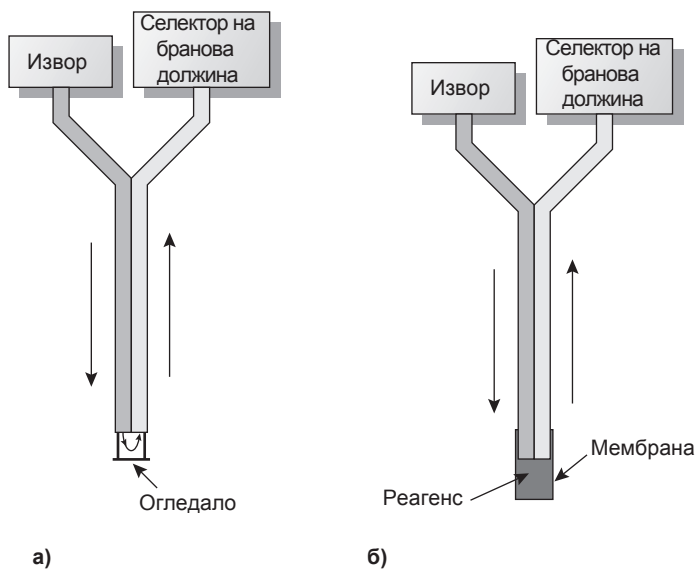
Влијание на добивање средна вредност на односот сигнал/шум на спектарот:

(а) спектар добиен со едно скенирање; (б) спектар добиен со собирање на пет спектри; (в) спектар добиен со собирање на десет спектри.



Слика 10.29

Типичен изглед на кивети што се користат во UV/видлива спектроскопија. Објавено со дозвола на Fisher Scientific.



Слика 10.30

Сонди со оптички влакна

Инструменти за инфрацрвена апсорпција Наједноставен инструмент за инфрацрвена апсорпција е фотометар со филтер, сличен на оној претставен на слика 10.24 за UV/видлива апсорпција. Предноста на овие инструменти е нивната лесна преносливост, и главно се користат како наменски инструменти за анализа на гасови, како што се HCN и CO.

Во инструменти за инфрацрвена апсорпција што користат монохроматори за избор на бранова должина, се вградува оптика со двоен сноп зраци, слична на онаа прикажана на слика 10.26. Оптички со двоен сноп зраци се користат многу почесто, во споредба со оптички со еден сноп зраци, затоа што изворите и детекторите за инфрацрвеното зрачење се помалку стабилни од оние за UV/видливо зрачење. Освен тоа, со примена на оптика со двоен сноп зраци полесно се коригира апсорпцијата на инфрацрвеното зрачење од страна на атмосферски CO₂ и водена пареа. Резолуција од 1 – 3 cm⁻¹ е типична за повеќето инструменти.

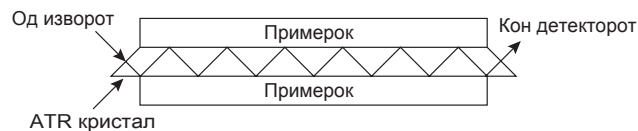
Во инфрацрвените спектрометри со Фуриеова трансформација (FT-IR), монохроматорот е заменет со интерферометар (слика 10.13). Бидејќи FT-IR спектрометар има само еден оптички пат, потребно е да се регистрира посебен спектар за да се компензира апсорпцијата од страна на атмосферски CO₂ и водена пареа. Тоа се прави со регистрирање спектар на фонот без примерок, и чување на резултатот во компјутерската меморија на инструментот. Спектарот на фонот се одзема од спектарот на примерокот со правење однос на двата сигнала. Во споредба со другите видови инфрацрвени спектрометри, FT-IR овозможуваат брзо добивање на податоци и подобрување на односот сигнал/шум во текот на добивањето средна вредност на сигналот.

Инфрацрвената спектроскопија рутински се користи за анализа на примероци во гасовита, течна и цврста состојба. Киветите за примероци се од материјал што пропушта инфрацрвено зрачење, како што се NaCl и KBr. Гасовити примероци се анализираат во кивети со дебелина од приближно 10 cm. Поголеми должини на патот на зракот се постигнуваат со примена на огледала, со кои зракот минува неколку пати низ примерокот.

Течните примероци се анализираат на еден од следниве два начина. За неиспарливи течности, препарат за анализа може да се подготви со ставање капка од течноста меѓу две плочки од NaCl, со што се формира тенок филм со дебелина помала од 0,01 mm. Испарливите течности мора да се ставаат во херметички затворена ќелија, за да се спречи испарувањето.

Анализата на растворените примероци е ограничена, заради апсорпцијата на инфрацрвеното зрачење од страна на најчесто користените растворувачи: CCl₄, CS₂ и CHCl₃. Растворите се ставаат во ќелија со две окна од NaCl, фиксирани на тефлонски држач. Со примена на тефлонски држачи со различни димензии, може да се добие дебелина на слојот од 0,015 до 1 mm. Достапни се херметички затворени ќелии со различни дебелини.

Анализата на водни раствори е сложена поради растворливоста на окната од NaCl во вода. Еден од начините за добивање спектри на водните раствори е користење на т.н. намалена тотална рефлексија, ATR (attenuated total reflectance) наместо трансмисија. На слика 10.31 е прикажан дијаграм на типична ATR ќелија за примероци, којашто се состои од кристал пропуслив за инфрацрвеното зрачење, со висок индекс на рефракција, каков што е, на пр., ZnSe, опкружен со примерок, кој има понизок индекс на рефракција. Зрачењето од изворот влегува во ATR кристалот, во кој претрпува серија тотални рефлексии пред да излезе од кристалот. При секоја рефлексija, зрачењето навлегува во примерокот до длабочина од неколку микрони. Резултатот е селективно пригушување на зрачењето на оние бранови должини на кои примерокот апсорбира. ATR спектрите се слични, но не и идентични, со спектрите добиени со мерење на трансмисијата на зрачењето.



Слика 10.31

Ќелија за пригушена тотална рефлексија (ATR), за инфрацрвена спектроскопија.

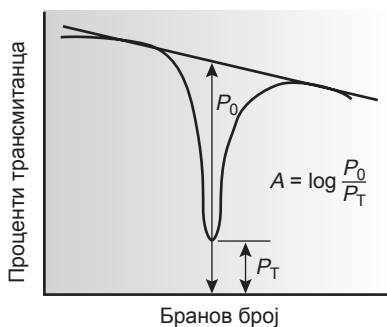
Прозрачните цврсти примероци се анализираат директно, поставувајќи ги на патот на инфрацрвеното зрачење. Меѓутоа, повеќето од цврстите примероци се непрозрачни и мора да се диспергираат во потранспарентна средина, за да може да се сними вообичаен трансмисионен спектар. Ако е достапен соодветен растворувач, може да се подготви раствор на цврстата супстанца и да се изврши анализа на претходно опишаниот начин. Во случај да нема соодветен растворувач, цврстата супстанца, претходно сомелена до фин прав, може да се анализира по нејзино мешање со соодветно масло. Алтернативно, супстанца во прав може да се помеша со КВг и да се пресува во таблетка транспарентна за инфрацрвено зрачење.

Цврсти супстанции може да се анализираат и со мерење на рефлектираното инфрацрвено зрачење. ATR ќелијата (слика 10.31), што се користи за анализа на водни раствори, може да се примени и за анализа на цврсти примероци, под услов да се добие добра контактна површина на примерокот со ATR кристалот. Примери на цврсти супстанции анализирани со ATR се примероци од полимери, влакна, прашкасти материјали, биолошки ткива. Друга рефлексиона метода е дифузионата рефлексија, при која зрачењето се рефлектира од груба површина, каква што е површината на супстанца во прав. Примероците во прав се мешаат со неапсорбирачки материјал, како што е КВг во прав, и рефлектираното зрачење се собира и се анализира. Како и спектарот добиен со ATF, и овој спектар е сличен на спектрите добиени со конвенционални трансмисиони методи. Понатамошни детали во врска со овие и со други методи за подготовка на цврсти примероци за инфрацрвена анализа, може да се најдат во литературата посочената на крајот од ова поглавје.

10Г.2 Квантитативни примени

Една од најчесто среќаваните аналитички методи е определувањето на концентрацијата на некој аналит врз основа на неговата апсорпција на ултравиолетово или видливо зрачење. Една од причините за нејзина популарност е што голем број органски и неоргански соединенија имаат силни апсорпциони ленти во ултравиолетовото и во видливото подрачје на електромагнетниот спектар. Освен тоа, аналитите што не апсорбираат UV/видливо зрачење, или апсорбираат сосема слабо, често можат да се претворат во хемиски видови коишто апсорбираат. На пр., раствор на Pb^{2+} , што не апсорбира, може да реагира со дитизон и да формира Pb-дитизонат комплекс. Дополнителна предност на UV /видливата апсорпција е што, во повеќето случаи, експерименталните и инструменталните услови во кои важи Беровиот закон можат релативно лесно да се подесат.

Квантитативни анализи базирани на апсорпција на инфрацрвено зрачење, макар што се важни, поретко се применуваат во споредба со анализи базирани на UV /видлива апсорпција. Една од причините е големото инструментално отстапување од Беровиот закон кога се работи за инфрацрвената апсорпција. Бидејќи инфрацрвените апсорпциони ленти се релативно тесни, отстапувањата што се резултат на неможности да се добие монохроматско инфрацрвено зрачење, се поизразени. Освен тоа, изворите на инфрацрвено зрачење се помалку интензивни во споредба со изворите за UV /видливо зрачење, што го прави случајното зрачењето мошне проблематично. Проблем е и разликата во дебелината на слојот за примероците и за стандардите, кога се користи течен филм или КВг таблета, макар што може да се употреби интерен стандард за корекција на оваа разликата. Згора на тоа, утврдувањето на базната линија за 100 % T ($A = 0$) често пати е тешко, бидејќи оптичките својства на ќелиите со NaCl можат значително да се менуваат со промената на брановата должина, поради контаминација и разложување. Овој проблем може да се минимизира со определување на апсорбанцата во однос на базната линија утврдена за апсорпциона лента. На слика 10.32 е прикажано како се постигнува тоа.



Слика 10.32

Метода за определување на апсорбанца од инфрацрвен трансмисионен спектар.

Беровиот закон има бројна примена во квантитативни анализи на примероци од областа на хемијата на животната средина, клиничката, индустриската или форензичката хемија. Во понатамошниот текст се дадени примери за секоја од наведените области.

Табела 10.6

Избрани примери на примена на UV /видлива молекулска апсорпција за анализа на води и отпадни води

Аналит	Метода	λ (nm)
<i>Метали присутни во проба</i>		
алуминиум	реакција со Ериохромцијанин R, при pH 6; розово обоен комплекс	535
арсен	редукција до AsH_3 со цинк; при реакција со сребро диетилдитиокарбамат дава црвен комплекс	535
кадмиум	екстракција од примерок, алкализирани со NaOH, со раствор на дитизон во CHCl_3 ; розово-црвен комплекс	518
хром	оксидација до Cr(VI) и реакција со дифенилкарбазид во кисела средина; црвено-виолетов производ	540
бакар	реакција со неocupрин во неутрална до слабо кисела средина; екстрактот во $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ е жолто обоен	457
железо	реакција со o-фенантролин во кисела средина; портокалово-црвен комплекс	510
олово	екстракција со CHCl_3 што содржи дитизон, од примерок алкализирани со амонијачен пуфер; комплекс со вишна-црвена боја	510
манган	оксидација до MnO_4^- со персулфат	525
жива	екстракција со CHCl_3 што содржи дитизон од закиселена проба; портокалов комплекс	492
цинк	реакција со цинкон при pH 9; се формира сино обоен комплекс	620
<i>Неоргански неметали</i>		
амонијак	при реакција со хипохлорит и фенол, се добива син индофенол; за катализа се користи манганова сол	630
цијаниди	преведување во CNCl со реакција со хлорамин-Т, проследено со реакција со пиридин-барбитурна киселина; се добива црвено-сино обојување	578
флуориди	при реакција со црвен Zr-SPANDS лак дава ZrF_6^{2-} и намалување на концентрацијата	570
хлор(резидуален)	оксидација на леуко кристал виолет; се добива производ со модрозина боја	592
фосфати	реакција со амониум молибдат, проследена со редукција со калај хлорид, при што се формира молибденско сино	690
фенол	реакција со 4-аминоантипирин и $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, при што се формира обојување од антипирин	460
површинско-активни супстанции	формирање на син јонски пар меѓу анијонска површински активна супстанца и катјонска боја метиленско сино, којашто се екстрахира во CHCl_3	652

Примена во екологијата Методите за анализа на чиста и на отпадна вода, засновани на апсорпција на UV/видливо зрачење, се едни од најчесто применуваните аналитички методи. Некои од тие методи се посочени во табела 10.6, а некои се подетално опишани подолу.

Иако квантитативната анализа на металите во вода и во отпадна вода се врши главно со примена на атомска апсорпциона или атомска емисиона спектроскопија, голем број метали може да се анализираат и со нивно преведување во обоени, метал-лиганд, комплекси. Една од предностите на овие спектроскопски методи е што лесно се адаптираат за анализа на примероци на теренски услови со примена на фотометри со филтри. Еден од лигандите што се користа за анализа на повеќе метали е дифенилкарбазонот, познат како дитизон. Дитизонот не се раствора во вода, но кога раствор на дитизон во CHCl_3 се клумка со воден раствор кој содржи соодветен метален јон, се формира обоен комплекс метал-дитизонат кој е растворлив во CHCl_3 . Селективноста на дитизонот се контролира со подесување

на рН на водниот раствор на примерокот. На пр., Cd^{2+} се екстрахира од раствор во кој се додава NaOH до силно алкална средина, Pb^{2+} се екстрахира од раствор чија средина е подесена со додавање амонијачен пуфер, а Hg^{2+} се екстрахира од слабо кисел раствор.

Кога во вода ќе се внесе елементарен хлор, делот од хлорот што врши дезинфекција се нарекува резидуален хлор. Се разликуваат две форми на резидуален хлор. Слободен резидуален хлор вклучува Cl_2 , HOCl и OCl^- . Комбиниран резидуален хлор, којшто се формира при реакција на NH_3 со HOCl , се состои од монохлорамин, NH_2Cl , дихлорамин, NHCl_2 , и трихлорамин NCl_3 . Бидејќи слободниот резидуален хлор е поефикасен при дезинфекцијата, разработени се методи за одредување на концентрацијата на двете форми на резидуален хлор. Една од тие методи е и методата со леуко кристал виолет. Слободен резидуален хлор се одредува со додавање на леуко кристал виолет на примерокот, којшто веднаш се оксидира давајќи сино обојување, чиј интензитет се мери на 529 nm. Изведувањето на реакцијата во интервал од 5 минути ја спречува можната интерференција од комбинираниот резидуален хлор. Вкупен резидуален хлор (слободен + комбиниран) се одредува преку реакцијата на примерокот со јодид, кој реагира со двете форми на резидуалниот хлор, ослободувајќи HOI . По завршувањето на реакцијата, се додава леуко кристал виолет, којшто се оксидира од HOI давајќи го истиот обоен производ. Комбинираниот резидуален хлор се одредува од разликата.

Концентрацијата на флуориди во вода за пиење се одредува индиректно користејќи ја способоста на флуоридниот јон да образува комплекс со циркониум. Во присуство на реагенсот SPADNS [натриумова сол на 2-(4-сулфофенилазо)-1,8-дихидрокси-3,6-нафталендисулфонска киселина], циркониумот образува црвеникаво обоено соединение, наречено „лак“, коешто апсорбира на 570 nm. Ако на формираниот „лак“ се додаде раствор што содржи флуориден јон, формирањето на стабилен ZrF_6^{2-} комплекс предизвикува дисоцијација на дел од „лакот“ и соодветно намалување на апсорбанцата. Затоа графикот на зависноста на апсорбанцата од концентрацијата на флуоридни јони има негативен наклон.

Спектроскопски методи се користат и за определување органски конституенти во вода. На пр., комбинираната концентрација на фенол и орто- и мета- супституирани феноли се определува по дестилацијата со водена пареа, со која фенолите се одвојуваат од неиспарливите соединенија. Дестилатот се третира со 4-аминоантипирин при $\text{pH } 7,9 \pm 0,1$ во присуство на $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, при што се формира обоен пигмент на антипиринот. Пигментот се екстрахира во CHCl_3 , а апсорбанцата на екстрактот се мери на 460 nm. Калибрациона крива се конструира само со несупституиран фенол, $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$. Бидејќи моларниот апсорпционен коефициент на супституираните феноли, општо земено, е помал од оној на фенолот, утврдената концентрација ја претставува минималната концентрација на фенолните соединенија.

Молекулската апсорпција може да се користи и за анализа на контаминенти во воздухот. Во голем број случаи, анализата се врши така што образецот се собира во вода, анализите се преведуваат во растворлива форма а потоа тие може да се анализираат со некоја од методите опишани во табела 10.6. На пр., концентрацијата на NO_2 може да се определи по оксидацијата на NO_2 во NO_3^- . Концентрацијата, пак, на NO_3^- се определува по негова редукција до NO_2^- со сулфаниламид и *N*-(1-нафтил)-етилендиамин, при што се формира светло обоена азо-боја. Друга важна примена е определувањето на SO_2 , по собирањето на пробата во воден раствор на HgCl_4^{2-} , при што се добива $\text{Hg}(\text{SO}_3)_2^{2-}$. Додавање на *p*-розанилин и формалдехид доведува до формирање на светловиолетов комплекс чија апсорбанца се мери на 569 nm. Инфрацрвената апсорпција се покажа погодна за анализа на органски пареи, како што се HCN , SO_2 , нитробензен, метилмеркаптан и винилхлорид. Овие анализи често се вршат со мобилни, наменски инфрацрвени фотометри.

Табела 10.7 Примери на примена на UV/видлива молекулска апсорпција за анализирање на клинички примероци

Аналит	Метода	λ (nm)
вкупен серумски протеин	реакција на протеин, NaOH и Cu^{2+} дава сино-виолетов комплекс;	540
серумски холестерол	во реакција со Fe^{3+} во присуство на изопропанол, оцетна киселина и H_2SO_4 , дава сино-виолетов комплекс;	540
мочна киселина	реакција со фосфоволфрамова киселина дава „волфрамово сино“	710
серумски барбитурати	барбитуратите се екстрахираат во CHCl_3 , а потоа во 0,45 M NaOH;	260
глюкоза	при реакција со <i>o</i> -толуидин на 100 °C дава сино-зелен комплекс;	630
протеински сврзан јод	Со разложување на протеинот се ослободува јодот; I^- се определува преку неговиот каталитички ефект врз редокс реакцијата меѓу Ce^{4+} и As^{3+} .	420

Клинички примени UV/видлива молекулска апсорпција е една од најчесто користените техники за анализа на клинички примероци. Неколку примери се дадени во табела 10.7.

Анализата на клиничките примероци е често пати комплицирана поради комплексноста на матрицата на примероците, којашто може да има значителен удел во фонската апсорпција на определената бранова должина. Пример за разрешување на овој проблем претставува определувањето на серум барбитурати. Барбитуратите се екстрахираат од примерок на серум со CHCl_3 , а потоа се преведуваат во воден раствор со екстракција од CHCl_3 со 0,45 M NaOH ($\text{pH} \approx 13$). Апсорбанцата на водниот екстракт се мери на 260 nm, при што во апсорпцијата учествуваат како барбитуратите, така и другите компоненти екстрахирани од примерокот. Потоа pH на растворот се намалува до вредност од приближно 10, со додавање NH_4Cl , и повторно се мери апсорбанцата. Бидејќи барбитуратите не апсорбираат на тој pH, апсорбанцата при pH 10 се користи за корекција на апсорбанцата при pH 13; така,

$$A_{\text{barb}} = A_{\text{pH } 13} - \left(\frac{V_{\text{проба}} + V_{\text{NH}_4\text{Cl}}}{V_{\text{проба}}} \right) A_{\text{pH } 10}$$

Индустриски анализи UV/видливата молекулска апсорпција се користи за анализа на примероци од различни индустриски производи, меѓу кои и фармацевтски производи, храна, бои, стакло, метали итн. Во голем број случаи методите се слични на оние опишани во табелите 10.6 и 10.7. На пр., содржината на железо во храна може да се определи со преведување на железото во раствор и примена на методата со *o*-фенантролин, дадена во табела 10.6.

Голем број фармацевтски производи содржат хромофори и се погодни за анализа со UV /видлива апсорпција. Меѓу производите што може да се анализираат на тој начин спаѓаат антибиотиците, хормоните, витамините и аналгетиците. Еден пример на примена на UV апсорпција е определување на чистота на таблети аспирин, во кои активен ингредиент е ацетилсалицилна киселина. Салицилната киселина, којашто настанува со хидролиза на ацетилсалицилната киселина, е нежелна примеса во таблетите аспирин, и не смее да биде присутна во износ поголем од 0,01 % w/w. Содржината на салицилната киселина може да се следи преку апсорбанцата на бранова должина од 312 nm, и да се утврди дали нејзиното присуство е над

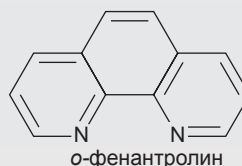
прифатливото ниво. Ацетилсалицилната киселина апсорбира на 280 nm, но апсорбира, иако слабо, и на 312 nm. Условите за подготовка на примерокот се избрани така што апсорбанца поголема од 0,02 укажува на неприфатливо високо ниво на салицилна киселина.

Форензички примени UV /видлива молекуларна апсорпција се користи рутински за анализа на наркотици и за тестирање на лекаства. Една интересна форензичка примена е утврдувањето на присуство на алкохол во крв со т.н. анализатор на здив („Breathalyzer“). Во тој тест, 52,5 mL примерок земен при дишење се пропушта низ закиселен раствор на $K_2Cr_2O_7$. Алкохолот присутен во здивот се оксидира од бихроматот, при што како производи се добиваат оцетна киселина и Cr^{3+} . Концентрацијата на етанол во примерокот од здивот се определува од степенот на намалувањето на апсорбанцата на 440 nm, на која што апсорбира бихроматниот јон. Содржина на алкохол во крвта од 0,1 %, што е законски дозволена граница во повеќето држави, соодветствува на 0,025 mg етанол во примерок од здив.

Развивање на квантитативна метода за една компонента При развивање квантитативна аналитичка процедура, мора да се утврдат условите за кои важи Беровиот закон. Како прво, од апсорпциониот спектар се одредува најсоодветната бранова должина за анализа. Во најголемиот број случаи, најоптималната бранова должина одговара на апсорпциониот максимум, затоа што така се обезбедува поголема осетливост и помало влијание на инструменталните фактори што го ограничуваат Беровиот закон поради примената на зрачење коешто не е апсолутно монохроматско. Како второ, доколку се користи инструмент со процеп чија ширина може да се подесува, треба да се избере најоптималната ширина на процепот. Апсорпциониот спектар помага при изборот на ширината на процепот. Општо земено, процепот треба да биде доволно широк за да пропусти што е можно поголем износ на зрачење од изворот, но и да е доволно тесен за да ги намали инструменталните ограничувања на Беровиот закон. На крајот, како трето, треба да се конструира калибрациона крива за да се утврди концентрациониот интервал за кој важи Беровиот закон. Дополнителни елементи, коишто се важни за секоја квантитативна метода, се влијанијата од потенцијалните интерференции и подготовката на најсоодветна слепа проба.

Метода 10.1 Определување на железо во чиста вода и во отпадна вода¹¹

Опис на методата. Железото, во состојба +2, реагира со *o*-фенантролин и формира портокалово-црвен комплекс $Fe(o\text{-phen})_3^{2+}$ (слика 10.17). Интензитетот на обојувањето на растворот на комплексот зависи од киселоста на растворот, и варира во интервал на pH од 3 до 9. Поради поголемата брзина на формирање на комплексот во кисела средина, реакцијата обично се изведува во средина со pH од 3,0 до 3,5. Доколку е присутно железо во +3 состојба, се редуцира со хидроксиламин пред да се додаде *o*-фенантролин. Најважни супстанции што пречат се: силни оксиданси, полифосфати и метални јони, како што се Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} и Cd^{2+} . Интерференциите од оксидансите се отстрануваат со додавање вишок хидроксиламин, додека, пак, интерференциите од полифосфатите се редуцираат со вриење на примерокот во кисела средина. Апсорбанците на примероците и на стандардите се мерат на бранова должина 510 nm во кивета од 1 cm (макар што може да се користат и кивети со поголема дебелина). Беровиот закон важи за концентрации на железо во интервал од 0,2 до 4,0 ppm.



Постийка. Од примероци што содржат помалку од 2 ppm Fe, директно се зема аликвот од 50 mL и се пренесува во ерленмаер од 125 mL. Примероци што содржат повеќе од 2 ppm Fe претходно се разредуваат, при што од разредениот примерок исто така се зема аликвот од 50 mL. Во ерленмаерот се додаваат 2 mL концентрирана HCl и 1 mL раствор на хидроксиламин. Растворот се загрева до вриење и се остава да врие додека волуменот на растворот не се намали до 15-20 mL. По ладење до собна температура, растворот се пренесува во волуметриски сад од 50 mL, се додава 10 mL амониум ацетатен пуфер, 2 mL раствор на *o*-фенантролин со концентрација 1000 ppm, и се разредува до означениот волумен. Се остава 10-15 минути да се формира комплекс, а потоа се мери апсорбанца, користејќи дестилирана вода за подесување на пропустливоста на 100 %. Стандардите за калибрација, заедно со слепата проба, се подготвуваат на ист начин, користејќи стандарден раствор на Fe²⁺.

Прашања

1. Објаснете зошто силните оксиданси пречат при анализата, и зошто вишокот на хидроксиламин ја елиминира пречката.

За да се добие точен резултат, во растворот мора да биде присутен само комплексот Fe(*o*-phen)₃²⁺. Силните оксиданси оксидираат дел од Fe²⁺ во Fe³⁺, што дава комплекс Fe(*o*-phen)₃³⁺ којшто послабо апсорбира. Вишокот од хидроксиламинот реагира со оксидансите, отстранувајќи ги од растворот.

2. Интензитетот на обојувањето на комплексот е стабилен во pH интервал од 3 до 9. Кои се можните компликации во покисела и побазна средина?

Како и реагенсот EDTA (поглавје 9), и *o*-фенантролинот е лиганд со киселинско-базни својства. Од таа причина, формирањето на Fe(*o*-phen)₃²⁺ комплексот е потешко во средини со пониски вредности на pH, поради протонирањето на *o*-фенантролинот, што доведува до намалување на апсорбанцата. При вредности на pH поголеми од 9, реакцијата на Fe²⁺ со OH⁻ станува поконкурентна од реакцијата со *o*-фенантролинот, што исто така доведува до намалување на апсорбанцата. Освен тоа, при висок pH постои ризик железото да се исталожи во форма на Fe(OH)₃.

3. Кадмиумот пречи при анализата затоа што формира талог со *o*-фенантролинот. Какво влијание има формирањето на талог од Cd-*o*-фенантролинат при определување на железо (во ppm) присутно во примерокот?

Бидејќи *o*-фенантролинот е присутен во растворот во голем вишок (2000 µg *o*-фенантролин за 100 µg Fe²⁺), малку е веројатно причината за интерференцијата да е во недоволното количество *o*-фенантролин достапно за реакција со Fe²⁺. Присутниот талог во киветата предизвикува расејување на зрачењето и привидно зголемување на апсорбанцата. Бидејќи измерената апсорбанца е повисока, и пресметаната концентрација, исто така, е повисока.

4. Дури и амониум ацетат со висока чистота содржи значително количество железо. Зошто овој извор на железо не претставува проблем?

Бидејќи сите примероци и стандарди се подготвуваат користејќи ист волумен на амониум ацетатен пуфер, уделот на овој извор на железо е земен предвид преку реагенсот на слепата проба, користена при добивањето на калибрациона крива.

Квантитативна анализа на еден аналит Концентрацијата на еден аналит се определува преку мерењето апсорбанца на примерокот и примената на Беровиот закон (равенка 10.5), користејќи некоја од методите дадени во поглавје 5. Најчесто се користат методата на нормална калибрациона крива и методата со стандардни додатоци. Исто така, може да се користи и стандардизација во една точка, под услов претходно да е потврдено важењето на Беровиот закон.

Пример

ПРИМЕР 10.5

Определувањето на Fe во индустриска водена пареа е извршено со *o*-фенантролин, како што е опишано во метода 10.1. Користејќи ги податоците дадени во табелата, одредете ја концентрацијата на Fe во пареата.

ppm Fe	Апсорбанца
0,00	0,000
1,00	0,183
2,00	0,364
3,00	0,546
4,00	0,727
непознато	0,269

РЕШЕНИЕ

Линеарната регресија на зависноста на апсорбанцата од концентрацијата на Fe во стандардите дава

$$A = 0,0006 + 0,1817x(\text{ppm Fe})$$

Со замена на апсорбанцата за примерокот во калибрационата равенка, се добива вредноста за содржината на Fe во пареата од 1,48 ppm.

Квантитативна анализа на смеси од аналити Анализа на две или повеќе компоненти во ист примерок може да се врши директно, доколку во спектарот на примерокот постојат области во кои секоја од компонентите е единствениот вид што апсорбира. Во таков случај, секоја компонента може да се анализира како таа да е единствениот хемиски вид во растворот. За жал, апсорпционите ленти во UV/видливи спектри се толку широки што е често невозможно да се најдат соодветни бранови должини на кои одделно ќе апсорбира секоја компонента од смесата. Порано беше покажано дека Беровиот закон е адитивен (равенка 10.6); така, за двокомпонентна смеса на X и Y, измерената апсорбанца на смесата, A_m , е еднаква на

$$(A_m)_{\lambda_1} = (\epsilon_X)_{\lambda_1} b C_X + (\epsilon_Y)_{\lambda_1} b C_Y \quad 10.11$$

каде што λ_1 е бранова должина на која е мерена апсорбанцата. Бидејќи равенката 10.11 вклучува членови како за концентрацијата на X, така и на Y, апсорбанцата само на една бранова должина не дава доволно информации за да се одреди C_X или C_Y . Ако се мери апсорбанца и на друга бранова должина, λ_2 ,

$$(A_m)_{\lambda_2} = (\epsilon_X)_{\lambda_2} b C_X + (\epsilon_Y)_{\lambda_2} b C_Y \quad 10.12$$

тогаш C_X и C_Y може да се одредат со решавање на равенките 10.11 и 10.12. Се разбира, потребно е да се одреди вредноста на ϵ за секоја компонента на двете бранови должини. Општо земено, за смеси од n компоненти, мора да се мери апсорбанцата на n различни бранови должини.

ПРИМЕР 10.6

Концентрациите од Fe^{3+} и Cu^{2+} во смеса може да се одредат со помош на нивните реакции со хексацијанорутенат(II), $\text{Ru}(\text{CN})_6^{4-}$, кој формира виолетов комплекс со Fe^{3+} , ($\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$), и светлозелен комплекс со Cu^{2+} ($\lambda_{\text{max}} = 396 \text{ nm}$).¹² Моларните апсорпциони коефициенти ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) на металните комплекси за двете бранови должини се дадени во следнава табела:

	ϵ_{550}	ϵ_{396}
Fe^{3+}	9970	84
Cu^{2+}	34	856

Кога примерокот што содржи Fe^{3+} и Cu^{2+} се анализира во кивета со дебелина од 1 cm, апсорбанцата на 550 nm изнесува 0,183, а апсорбанцата на 396 nm изнесува 0,109. Кои се моларните концентрации на Fe^{3+} и Cu^{2+} во примерокот?

РЕШЕНИЕ

Со замена на познати вредности во равенките 10.11 и 10.12 се добива

$$A_{550} = 0,183 = 9970C_{\text{Fe}} + 34C_{\text{Cu}}$$

$$A_{396} = 0,109 = 84C_{\text{Fe}} + 856C_{\text{Cu}}$$

За да се определи C_{Fe} и C_{Cu} , се решава првата равенка за C_{Cu}

$$C_{\text{Cu}} = \frac{0,183 - 9970C_{\text{Fe}}}{34}$$

и се заменува резултатот во втората равенка

$$0,109 = 84C_{\text{Fe}} + 856\left(\frac{0,183 - 9970C_{\text{Fe}}}{34}\right) = 4,607 - (2,51 \times 10^5)C_{\text{Fe}}$$

Решавањето за C_{Fe} ја дава вредноста на концентрацијата на Fe^{3+} од $1,80 \times 10^{-5} \text{ M}$. Со замена на оваа вредност во равенката за апсорбанца на смесата на бранова должина од 396 nm, се добива вредноста на концентрацијата на Cu^{2+} од $1,26 \times 10^{-4} \text{ M}$.

За да се добијат задоволителни резултати во поглед на точноста и на прецизноста, треба да се изберат две бранови должини, така што да биде $\epsilon_X > \epsilon_Y$ за едната, односно $\epsilon_Y < \epsilon_X$ за другата бранова должина. Оптимална прецизност се добива при максимална можна разлика на моларните апсорпциони коефициенти. Оттука, метода за одредување оптимална бранова должина се состои во графичко претставување на ϵ_X/ϵ_Y како функција од брановата должина, и наоѓање бранови должини на кои односот ϵ_X/ϵ_Y достигнува максимална и минимална вредност.¹³

Заслужуваат внимание и две други методи за определување состав на смеса. По линеарна регресиона анализа за повеќе бранови должини, апсорбанцата на смеса се споредува со апсорбанците на стандардни раствори на компонентите X и Y на произволна бранова должина, од каде следува

$$A_{SX} = \epsilon_X b C_{SX} \quad 10.13$$

$$A_{SY} = \epsilon_Y b C_{SY} \quad 10.14$$

каде што C_{SX} и C_{SY} се познати концентрации на X и Y во стандардните раствори. Со решавање на равенките 10.13 и 10.14 за ϵ_X и ϵ_Y , нивна замена во 10.11 (ознаката на брановата должина може да се изостави) и средување на изразот, се добива

$$\frac{A_m}{A_{SX}} = \frac{C_X}{C_{SX}} + \left(\frac{C_Y}{C_{SY}} \right) \frac{A_{SY}}{A_{SX}}$$

За да се одреди C_X и C_Y , апсорбанцата на смесата и апсорбанцата на стандардните раствори се мерат на неколку бранови должини. Графикот на A_m/A_{SX} во однос на A_{SY}/A_{SX} претставува права линија со коефициент на правец C_Y/C_{SY} и отсечок на ординатата еднаков на C_X/C_{SX} .

Користењето на општата методата на стандардни додатоци ја проширува примената на овие анализи и на случаи кога матричните ефекти пречат во определувањето на ϵ_X и ϵ_Y со надворешни стандарди.¹⁵ Додавањето на познато количество аналит на раствор на аналит со непозната концентрација, обично не доведува до адитивна концентрација. (прашање 9 во Поглавје 5). Но, секогаш се запазува масата. Равенката 10.11 може да се напише и така што концентрациите ќе се заменат со молови, n , користејќи го односот

$$C = \frac{n}{V} \quad 10.15$$

каде V е вкупен волумен на растворот. Замената на равенката 10.15 во 10.11 и 10.12 дава

$$Q_{\lambda 1} = V(A_m)_{\lambda 1} = (\epsilon_X)_{\lambda 1} b n_X + (\epsilon_Y)_{\lambda 1} b n_Y \quad 10.16$$

$$Q_{\lambda 2} = V(A_m)_{\lambda 2} = (\epsilon_X)_{\lambda 2} b n_X + (\epsilon_Y)_{\lambda 2} b n_Y \quad 10.17$$

каде Q е апсорбанца коригирана заради зголемениот волумен. Ако на примерокот се додаде стандард, бројот на моловите на X и Y ќе се зголеми за Δn_X и за Δn_Y , и новата апсорбанца, коригирана заради промена на волуменот, ќе биде

$$(Q_{\lambda 1})' = (\epsilon_X)_{\lambda 1} b (n_X + \Delta n_X) + (\epsilon_Y)_{\lambda 1} b (n_Y + \Delta n_Y) \quad 10.18$$

$$(Q_{\lambda 2})' = (\epsilon_X)_{\lambda 2} b (n_X + \Delta n_X) + (\epsilon_Y)_{\lambda 2} b (n_Y + \Delta n_Y) \quad 10.19$$

Со одземање на равенките 10.16 од 10.18 и 10.17 од 10.19, се добива

$$\Delta Q_{\lambda 1} = (\epsilon_X)_{\lambda 1} b \Delta n_X + (\epsilon_Y)_{\lambda 1} b \Delta n_Y$$

$$\Delta Q_{\lambda 2} = (\epsilon_X)_{\lambda 2} b \Delta n_X + (\epsilon_Y)_{\lambda 2} b \Delta n_Y$$

Вредностите за $(\epsilon_X)_{\lambda 1}$, $(\epsilon_Y)_{\lambda 1}$, $(\epsilon_X)_{\lambda 2}$ и $(\epsilon_Y)_{\lambda 2}$ може да се добијат нанесувајќи ја на график зависноста на $\Delta Q_{\lambda 1}$ од Δn_X , $\Delta Q_{\lambda 1}$ од Δn_Y , $\Delta Q_{\lambda 2}$ од Δn_X и $\Delta Q_{\lambda 2}$ од Δn_Y и определувајќи го наклонот. Равенките 10.16 и 1.17 потоа може да се решат по n_X и по n_Y .

10Г.3 Квалитативни примени

Како што беше дискутирано порано во секцијата 10В.1, ултравиолетовите, видливите и инфрацрвените ленти се резултат на апсорпцијата на електромагнетното зрачење од страна на одделни валентни електрони или хемиски врски. Енергијата при која доаѓа до апсорпција како и интензитетот на апсорпцијата зависат од хемиската околина на деловите што апсорбираат. На пример, бензенот има неколку ленти во ултравиолетовиот спектар, коишто се резултат на $\pi \rightarrow \pi^*$ премини. Положбата и интензитетот на две од тие ленти, на 203,5 nm ($\epsilon = 7400$) и на 254 nm ($\epsilon = 204$), се мошне осетливи на супституенти. Во спектарот на бензоевата киселина, во која еден од ароматичните водородни атоми е заменет со карбоксилна група, двете ленти се поместени на 230 nm ($\epsilon = 11600$) и на 273 nm ($\epsilon = 970$). Утврдени се неколку правила коишто помагаат при корелирање на положбата на апсорпционите ленти во UV/видливите спектри и хемиската структура. Слични корелации се разработени за

утврдување на структурата преку апсорпционите ленти во инфрацрвените спектри. На пр., карбонилната група, C=O, е мошне осетлива на соседните функционални групи, јавувајќи се на 1650 cm^{-1} кога се во прашање киселини, на 1700 cm^{-1} кога се во прашање кетони, и на 1800 cm^{-1} кога се во прашање хлориди на киселините. Квалитативната интерпретација на UV/видливи и инфрацрвени спектри е широко застапена во хемиските наставни програми, особено во органската хемија, и затоа нема понатаму да се разгледува во овој учебник.

Со развојот на компјутерската обработка и меморирање на податоците, станаа достапни бази на податоци за стандардни референтни спектри. Кога ќе се добие спектар на непознато соединение, неговиот идентитет може често да се утврди со пребарување на датотеката на референтни спектри. Овој процес е познат како **спектрално пребарување**. Споредувањата се вршат со помош на алгоритам со кој се пресметува кумулативната разлика меѓу апсорбанците на примерокот и на референтниот спектар. На пр., еден едноставен алгоритам ја користи следнава равенка

$$D = \sum_{i=1}^n |(A_s)_i - (A_r)_i|$$

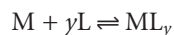
во која D е кумулативната разлика, A_s е апсорбанца на примерокот на иста бранова должина или бранов број i , A_r е апсорбанцата на референтното соединение на иста бранова должина или бранов број, а n е број на точки со кои е дигитализиран спектарот. Кумулативната разлика се пресметува за секој референтен спектар. Референтно соединение со најмала вредност за D најмногу соодветствува на непознатото соединение. Точноста на спектралното пребарување е ограничена од бројот и видовите соединенија вклучени во датотеката и од влијанието на матрицата на примерокот врз спектарот.

Друга предност на компјутерското собирање податоци е можноста за одземање на еден спектар од друг. Кога оваа постапка ќе се поврзе со спектралното пребарување, станува можно, со повторување на пребарувањето и на одземањето на референтни спектри, да се одредат неколку компоненти во примерокот без потреба од нивно претходно одвојување. На слика 10.33 е покажан пример за идентификација на составот на двокомпонентна смеса, којашто се состои од манитол и кокаин хидрохлорид, со сукцесивно пребарување и одземање на спектри. На слика 10.33а е прикажан спектарот на смесата. Со пребарувањето по датотеката на спектри, избран е манитол (слика 10.33б) како веројатна компонента на смесата. Одземањето на спектарот на манитол од спектарот на смесата дава резултат (слика 10.33в) кој добро соодветствува на спектарот на кокаин хидрохлорид (сл. 10.33г) од датотеката на спектри. Второто одземање дава само еден мал остаточен сигнал (слика 10.33д).

10Г.4 Карактеристични примени

Молекулската апсорпција, особено во UV/видливата област, се користи во најразлични интерпретативни студии, вклучувајќи ги и определувањето на стехиометријата на метал-лиганд комплексите и определувањето на константите на рамнотежа. Во оваа секција ќе бидат разгледани двата примери.

Стехиометрија на метал-лиганд комплекси Стехиометријата на реакцијата на формирање комплекс метал-лиганд со општа форма

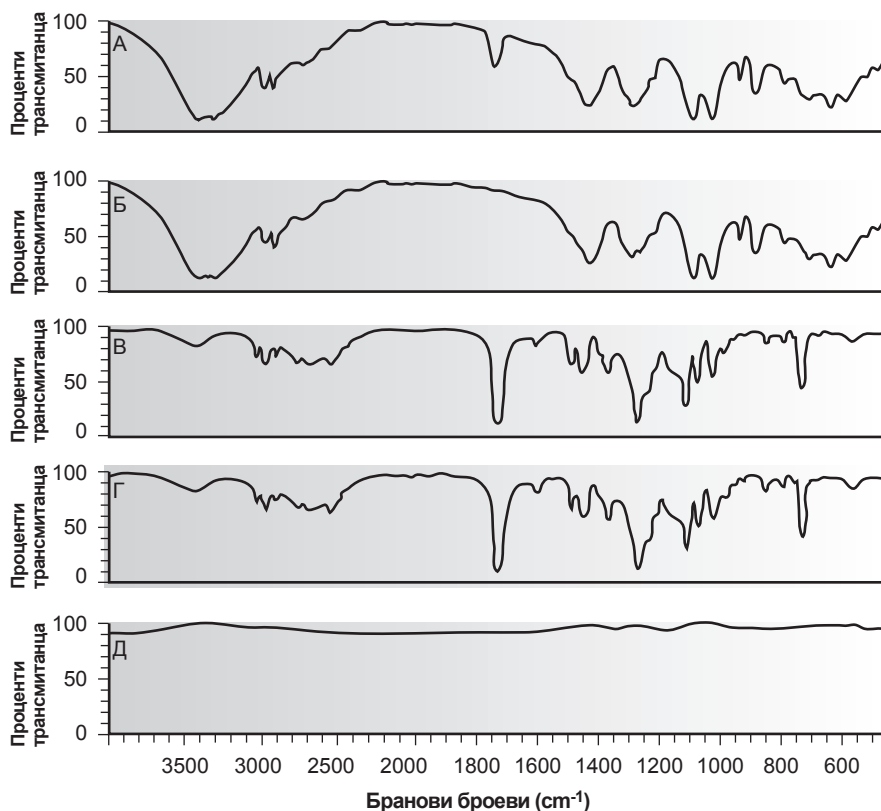


спектрално пребарување

Совпаѓање на изгледот на спектарот на непознато соединение со референтен спектар мемориран во компјутерска база на податоци.

Слика 10.33

Спектрално пребарување и одземање во анализа на смеса од манитол и кокаин хидрохлорид: (а) инфрацрвен спектар на смесата; (б) инфрацрвен спектар на манитол од датотека; (в) спектар добиен со одземање на спектарот на манитол од спектарот на смесата; (г) спектар на кокаин хидрохлорид од датотека; (д) резултантен спектар добиен со одземање на спектарот на кокаин хидрохлорид од спектарот на смесата.



метода на континуирани варијации

Процедура за утврдување на стехиометријата помеѓу два реактанта со приготвување раствори што содржат различни моларни удели на едниот реактант; позната и како метода на Џоб (Job).

може да се определи со една од следниве три методи: метода на континуирани варијации, метода на моларен однос, и метода на однос на наклони.

Од трите методи, **методата на континуирани варијации**, позната и како метода на Џоб (Job), е најпопуларна. За оваа метода се подготвува серија раствори за кои вкупниот број молекули на металот и на лигандот, $n_{\text{вкупно}}$, е ист. Така, ако $(n_M)_i$ и $(n_L)_i$ се, соодветно, број молекули на металот и на лигандот во i -ти раствор, тогаш

$$n_{\text{вкупно}} = (n_M)_i + (n_L)_i$$

Релативното количество лиганд и метал во секој раствор е изразено како моларен удел на лигандот $(X_L)_i$, и моларен удел на металот, $(X_M)_i$

$$(X_L)_i = \frac{(n_L)_i}{n_{\text{вкупно}}}$$

$$(X_M)_i = 1 - (X_L)_i = \frac{(n_M)_i}{n_{\text{вкупно}}}$$

Концентрацијата на метал-лиганд комплексот е одредена со лимитирачкиот реагенс, при што најголема концентрација на комплексот се јавува кога металот и лигандот се смешани во стехиометриски однос. Ако реакцијата се следи на бранова должина на која апсорбира само метал-лиганд комплексот, графикот на зависноста на апсорбанцата од моларниот удел ќе покажува два линеарни правци: едниот кога лимитирачкиот реагенс е лигандот, а вториот кога лимитирачкиот реагенс е металот. Пресекот на овие две линии означува дека е постигнат стехиометриски однос на смесата метал-лиганд. Моларниот удел на лигандот, кој произлегува од тој пресек, се користи за да се одреди вредноста на y за метал-лиганд комплексот, ML_y .

$$y = \frac{n_L}{n_M} = \frac{X_L}{X_M} = \frac{X_L}{1 - X_L}$$

Доколку не може да се најде бранова должина на која апсорбира само метал-лиганд комплексот, измерените апсорбции мора да се коригираат за износ на апсорбанца којашто би се измерила ако металот и лигандот не реагираат и не даваат комплекс

$$A_{\text{кориг}} = A_{\text{вкупно}} - \epsilon_M b C_M - \epsilon_L b C_L$$

Всушност, коригираната апсорбанца ја дава промената на апсорбанцата до којашто доаѓа поради формирањето на метал-лиганд комплексот. Во примерот 10.7 е даден еден случај на примена на методата на континуирана варијација.

Пример

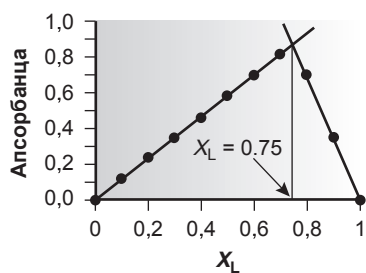
ПРИМЕР 10.7

За определување на формулата на комплексот на Fe^{2+} со *o*-фенантролин, подготвена е серија раствори во кои вкупната концентрација на металот и на лигандот е константна и изнесува $3,15 \times 10^{-4}$ M. Апсорбанците на растворите се мерени на бранова должина од 510 nm. Со податоците дадени подолу, одредете ја формулата на комплексот.

X_L	Апсорбанца	X_L	Апсорбанца
0,0	0,000	0,6	0,693
0,1	0,116	0,7	0,809
0,2	0,231	0,8	0,693
0,3	0,347	0,9	0,347
0,4	0,462	1,0	0,000
0,5	0,578		

РЕШЕНИЕ

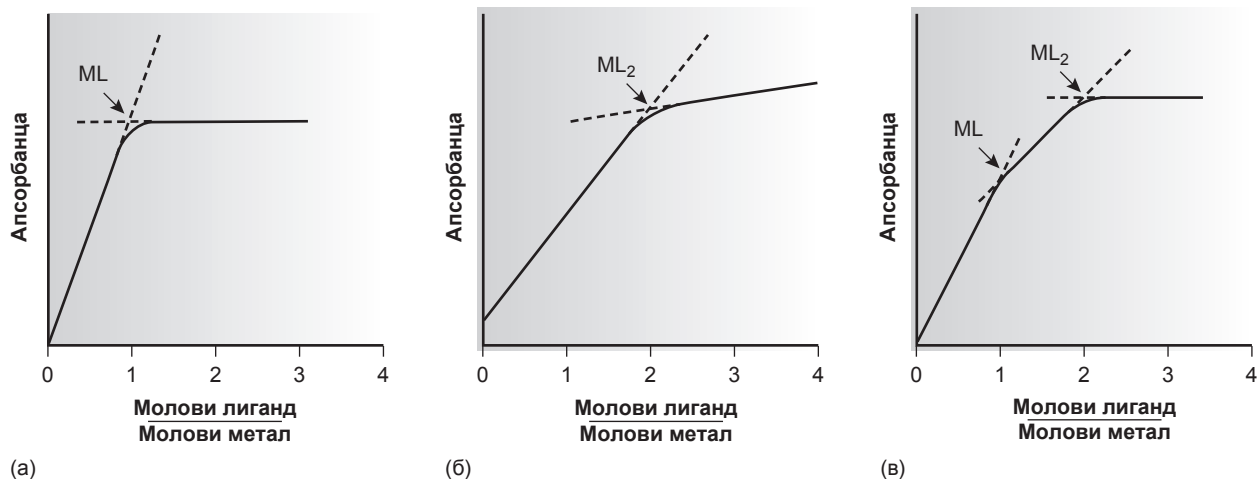
За да се определи формулата на комплексот, треба да се претстави зависноста на апсорбанцата од моларниот удел на лигандот. Резултатот е прикажан на графикот:



Максималната апсорбанца се одредува со екстраполација на двата линеарни дела од графикот. Пресекот на екстраполираните линии соодветствува на моларен удел на лигандот од 0,75. Решавањето на равенката по у дава

$$y = \frac{X_L}{1 - X_L} = \frac{0,75}{1 - 0,75} = 3$$

така што формулата на комплексот е $\text{Fe}(o\text{-фенантролин})_3^{2+}$.

**Слика 10.34**

Графички прикази на моларните удели употребени за определување на стехиометријата на реакцијата при формирање на метал-лиганд комплексот.

Метода на моларен однос

Постапка за утврдување на стехиометрискиот однос меѓу два реактанти со подготовка на раствори што имаат различни молски односи за двата реактанти

Потребни се неколку напомени кога се применува методата на континуирани варијации. Прво, користењето на оваа метода претпоставува дека се формира еден комплекс метал-лиганд. За да се провери дали оваа претпоставка е точна, треба да се конструира график на односот на апсорбанцата спрема X_L за неколку различни вредности на $n_{\text{вкупно}}$. Ако максимумот на апсорбанцата не се јавува на истата вредност за X_L за секоја група услови, тогаш се присутни повеќе од еден метал-лиганд комплекс. Втората претпоставка е дека за метал-лиганд комплексот важи Беровиот закон за интервалот на концентрации употребени за конструкција на графикот на зависноста на апсорбанцата од X_L . Третата напомена се однесува на фактот дека во случај да константата на формирањето на метал-лиганд комплексот е релативно мала, графикот на зависноста на апсорбанцата од X_L може да покаже значително закривување. Во таков случај, често е тешко да се утврди стехиометријата на комплексот со екстраполација. И, на крајот, бидејќи стабилноста на метал-лиганд комплексот може да зависи од условите што владеат во растворот, составот на растворот мора внимателно да се контролира. Кога лигандот е, на пр., слаба база, рН на растворот мора да се одржува на истата вредност со помош на соодветен пуфер.

Во методата на моларен однос, бројот на моловите на едниот реактант, обично на металот, се држи константен, а се менува бројот на моловите на другиот реактант. Апсорбанцата се мери на бранова должина на која апсорбира комплексот метал-лиганд. Графикот на зависноста на апсорбанцата од моларниот однос на лигандот спрема металот (n_L/n_M) има два линеарни правци коишто се сечат на местото на кое моларниот однос одговара на формулата на комплексот. На слика 10.34а е прикажан график на моларниот однос за формирање на метал-лиганд комплекс со однос 1:1, за кој апсорбанцата се мери на бранова должина на која апсорбира само комплексот. На слика 10.34б е прикажан случајот на формирање комплекс со однос 1:2, при што металот, лигандот и комплексот апсорбираат на избраната бранова должина. За разлика од методата на континуирани варијации, методата на моларен однос може да се примени и кај реакции на формирање комплекси коишто се одвиваат во повеќе чекори, при што моларните коефициенти на апсорпција на метал-лиганд комплексите се различни, а доволно различни се и константите на формирање. Типичен изглед на график на моларен однос за формирање комплекси ML и ML_2 е прикажан на слика 10.34в.

И методата на континуирани варијации и методата на моларен однос се базираат на екстраполацијата на податоците за апсорбанцата добиени во услови во кои владее линеарна зависност меѓу апсорбанцата и релативните количества на металот и на лигандот. Кога метал-лиганд комплексот е многу слаб, графикот на зависноста на апсорбанцата од X_L или од n_L/n_M може да биде криволиниски, поради што одредувањето на стехиометријата со екстраполација станува невозможно.

Во такви случаи може да се користи методата на односот на наклони.

За **методата на односот на наклони** се подготвуваат две серии раствори. Во првата серија растворите содржат константно количество метал, а променливо количество лиганд, при што концентрацијата на металот, C_M , е многу поголема од концентрацијата на лигандот, C_L . При такви услови, може да претпоставиме дека целото количество лиганд е сврзано во форма на комплекс. Концентрацијата на метал-лиганд комплексот, со општа формула M_xL_y , изнесува

$$[M_xL_y] = \frac{C_L}{y}$$

Ако апсорбанцата се следи на бранова должина на која апсорбира само M_xL_y , тогаш

$$A = \epsilon b [M_xL_y] = \frac{\epsilon b C_L}{y}$$

а графикот на зависноста на апсорбанцата од C_L ќе биде линеарен, со наклон s_L еднаков на

$$s_L = \frac{\epsilon b}{y}$$

Втората серија раствори се подготвува со фиксна концентрација на лигандот, која што е многу поголема од променливата концентрација на металот; оттука,

$$[M_xL_y] = \frac{C_M}{x}$$

$$A = \epsilon b [M_xL_y] = \frac{\epsilon b C_M}{x}$$

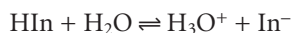
$$s_M = \frac{\epsilon b}{x}$$

Моларниот однос на лигандот спрема металот се одредува од односот на двата наклони.

$$\frac{s_M}{s_L} = \frac{\epsilon b/x}{\epsilon b/y} = \frac{y}{x}$$

Важна претпоставка во методата на односот на наклони е дека реакцијата на комплексирање оди до крај во присуство на доволно голем вишок на метал или на лиганд. Методата на односот на наклони е ограничена на системи за коишто важи Беровиот закон и во кои се формира само еден комплекс.

Определување константи на рамнотежа Друга важна примена на молекулската апсорпција е определувањето константи на рамнотежа. Да разгледаме едноставен пример за киселинско-базна реакција дадена со општ израз



во кој HIn и In^- се конјугирани форми на слаба киселина и слаба база, на киселинско-базен индикатор. Константата на рамнотежа на оваа реакција е

$$K_a = \frac{[H_3O^+][In^-]}{[HIn]}$$

За да се одреди вредноста на константата на рамнотежа, треба да се подготви раствор во кој реакцијата е во состојба на рамнотежа, и да се одредат рамнотежните концентрации на H_3O^+ , HIn и In^- . Концентрацијата на H_3O^+ се одредува лесно, со мерење на pH на растворот, додека, пак, концентрациите на HIn и In^- може да се одредат со мерење на апсорбанцата на растворот.

метода на односот на наклони

Постапка за утврдување на стехиометрискиот однос меѓу два реактанти со мерење на релативната промена на апсорбанцата при услови кога секој од реактантите е лимитирачки реагенс.

Ако и HIn и In^- апсорбираат на избраната бранова должина, тогаш, од равенката 10.6,

$$A = \epsilon_{\text{HIn}}b[\text{HIn}] + \epsilon_{\text{In}}b[\text{In}^-] \quad 10.20$$

каде што ϵ_{HIn} и ϵ_{In} се моларните константи на апсорпција за HIn и In^- . Вкупната концентрација на индикаторот, C , е дадена со равенката за зачувување на масата

$$C = [\text{HIn}] + [\text{In}^-] \quad 10.21$$

Решавањето на равенката 10.21 по $[\text{HIn}]$, и замената во равенката 10.20, дава

$$A = \epsilon_{\text{HIn}}b(C - [\text{In}^-]) + \epsilon_{\text{In}}b[\text{In}^-]$$

Односно, по упростување,

$$A = \epsilon_{\text{HIn}}bC - \epsilon_{\text{HIn}}b[\text{In}^-] + \epsilon_{\text{In}}b[\text{In}^-]$$

$$A = A_{\text{HIn}} + b[\text{In}^-](\epsilon_{\text{In}} - \epsilon_{\text{HIn}}) \quad 10.22$$

каде што A_{HIn} , еднакво на $\epsilon_{\text{HIn}}bC$, е апсорбанца на растворот кога вредноста на pH е доволно ниска за индикаторот речиси целосно да биде во форма на HIn . Решавањето на равенката 10.22 дава вредност за концентрацијата на In^-

$$[\text{In}^-] = \frac{A - A_{\text{HIn}}}{b(\epsilon_{\text{In}} - \epsilon_{\text{HIn}})} \quad 10.23$$

Постапувајќи на ист начин, може да се изведе слична равенка за концентрацијата на HIn ; се добива

$$[\text{HIn}] = \frac{A_{\text{In}} - A}{b(\epsilon_{\text{In}} - \epsilon_{\text{HIn}})} \quad 10.24$$

каде што A_{In} , еднакво на $\epsilon_{\text{In}}bC$, е апсорбанца на растворот кога вредноста на pH е доволно висока за во апсорбанцата да учествува само In^- . Со замена на равенките 10.23 и 10.24 во изразот за константата на рамнотежа за HIn , се добива

$$K_a = [\text{H}_3\text{O}^+] \left(\frac{A - A_{\text{HIn}}}{A_{\text{In}} - A} \right) \quad 10.25$$

Користејќи ја равенката 10.25, вредноста на K_a може да се одреди на еден од следниве два начина. Наједноставен начин е да се подготват три раствори, така што секој од нив да содржи исто количество, C , индикатор. pH на едниот раствор се подесува така што да биде доволно кисел за $[\text{HIn}]$ да биде многу поголема од $[\text{In}^-]$. Апсорбанцата на овој раствор ја дава вредноста на A_{HIn} . Вредноста за A_{In} потоа се одредува со подесување на pH на вториот раствор така што $[\text{In}^-]$ да биде многу поголема од $[\text{HIn}]$. На крајот, pH на третиот раствор се подесува на средна вредност од претходните две, по што се мерат pH и A . Вредноста за K_a може потоа да се пресмета со соодветна замена во равенката 10.25.

Пример

ПРИМЕР 10.8

Константата на дисоцијација на киселинско-базен индикатор е одредена по подготовка на три раствори со концентрација на индикаторот $5,00 \times 10^{-5}$ М. Првиот раствор е силно закиселен со HCl , по што неговата апсорбанца изнесува 0,250. Вториот раствор е силно алкализизиран, по што апсорбанцата е 1,40. Вредноста на pH на третиот раствор изнесува 2,91, а апсорбанцата 0,662. Колкава е вредноста на K_a на индикаторот?

РЕШЕНИЕ

Вредноста на K_a се одредува со соодветна замена во равенката 10.25:

$$K_a = (1,23 \times 10^{-3}) \left(\frac{0,662 - 0,250}{1,40 - 0,662} \right) = 6,87 \times 10^{-4}$$

Вториот пристап е да се подготви серија раствори така што секој од нив да содржи константно количество индикатор. Растворите се користат за одредување на вредностите на A_{HIn} и A_{In} . Равенката 10.25, преведена во логаритамска форма, по средувањето

$$\log \left(\frac{A - A_{\text{HIn}}}{A_{\text{In}} - A} \right) = \text{pH} - \text{p}K_a$$

покажува дека графикот на зависноста на $\log[(A - A_{\text{HIn}})/(A_{\text{In}} - A)]$ од pH е линеарен, со наклон +1 и со отсечок на ординатата еднаква на $-\text{p}K_a$.

Во разработката на ова постапка за одредување на константи на рамнотежа, разгледан е релативно едноставен систем, за кој апсорбанците на HIn и In⁻ се лесно мерливи, и за кој лесно се одредува концентрацијата на H₃O⁺. Освен за киселинско-базни реакции, истиот пристап може да се примени за реакции од општ вид



меѓу кои и реакции на образување метал-лиганд комплекси и редокс реакции, под услов концентрацијата на производот, Z, и на едниот од реактантите да може да се одреди спектрофотометриски, а концентрацијата на другиот реактант со некоја друга метода. Со соодветни модификации, може да се третираат и посложени системи, во кои еден или повеќе од овие параметри не може да се мерат.¹⁶

10Г.5 Проценка

Домен на примена Молекулската UV/видлива апсорпција рутински се користи за анализа на аналити присутни во траги во големи и во средни по обем примероци. Се одредуваат аналити присутни како главни конституенти, или, пак, во помали концентрации, по соодветно разрежување на примерокот, а концентрирањето на примерокот овозможува и анализа на аналити присутни во ултраниски концентрации. Доменот на примената на инфрацрвената апсорпција, општо земено, е помал во споредба со доменот на UV/видливата апсорпција.

Точност При нормални услови, со UV /видлива апсорпциона спектрометрија лесно се постигнува релативна грешка од 1 до 5 %. Точноста е обично ограничена со квалитетот на слепата проба. Примери на видови проблеми коишто може да се сретнат во практиката вклучуваат честички, присутни во примерокот, коишто го расејуваат зрачењето, како и компоненти коишто реагираат со аналитичките реагенси. Во последниот случај, компонентите што предизвикуваат интерференција може да дадат производи коишто апсорбираат, предизвикувајќи позитивна одредена грешка. Компонентите што пречат може да ја попречуваат реакцијата на аналитот, предизвикувајќи така негативна одредена грешка. Со посебна грижа, можно е зголемување на точноста на анализата за најмногу еден ред на големина.

Прецизност Прецизноста во апсорпционата спектрографија е ограничена со неодредени грешки, односно со т.н. инструментален „шум“, што се јавуваат при мерење на апсорбанцата. Прецизноста, генерално, е послаба за многу ниски апсорбанци, поради несигурноста во разликувањето мали разлики меѓу P_0 и P_T , како и за многу високи апсорбанци, за кои P_T достигнува вредност 0. Затоа можеме да очекуваме дека прецизноста ќе зависи од трансмитанцата.

Табела 10.8 Влијание на неопределени инструментални грешки на релативната неопределеност на концентрацијата

Категорија	Извор на неопределена грешка	Равенка на релативна неопределеност на концентрацијата
$s_T = k_1$	резолюција на отчитување на %T, шум во термалните детектори	$\frac{s_C}{C} = \frac{0,434k_1}{T \log T}$
$s_T = k_2 \sqrt{T^2 + T}$	шум во фотонските детектори	$\frac{s_C}{C} = \frac{0,434k_2}{\log T} \sqrt{1 + \frac{1}{T}}$
$s_T = k_3 T$	поставеност на киветата за примероци, флукутации во интензитетот на изворот	$\frac{s_C}{C} = \frac{0,434k_3}{\log T}$

Може да се постави врска меѓу прецизноста и трансмитанцата со помош на проширување на неопределеноста, како што е опишано во поглавје 4. За таков случај, Беровиот закон се пишува во следната форма:

$$C = -\frac{1}{\epsilon b} \log T \tag{10.26}$$

Користејќи ја табелата 4.9, апсолутната неопределеност на концентрацијата, s_C , е дадена како

$$s_C = -\frac{0,434}{\epsilon b} \times \frac{s_T}{T} \tag{10.27}$$

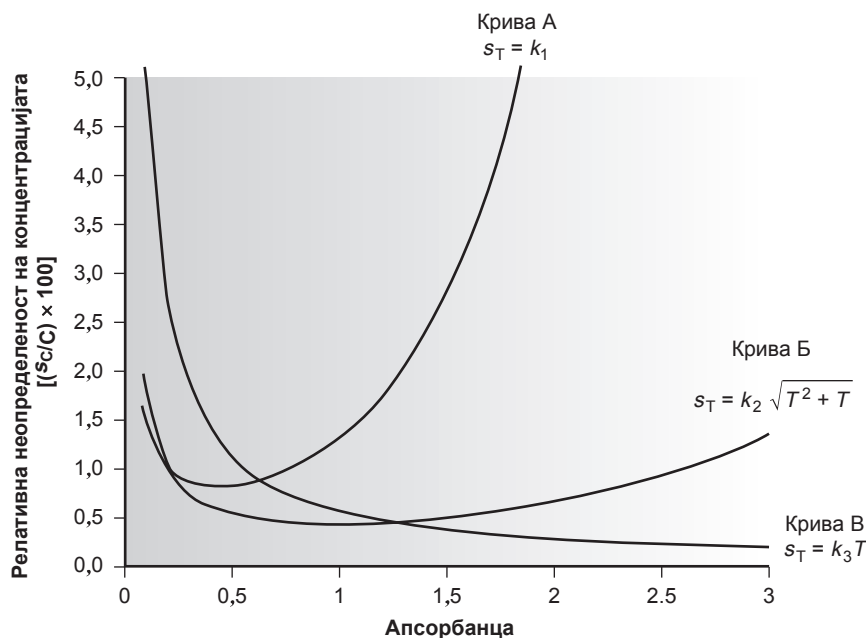
каде што s_T е апсолутната неопределеност на трансмитанцата. Делејќи ја равенката 10.27 со равенката 10.26, се добива релативната неопределеност на концентрацијата, s_C/C :

$$\frac{s_C}{C} = \frac{0,434s_T}{T \log T}$$

Така, доколку е познато s_T , релативната неопределеност на концентрацијата може да се одреди за која било трансмитанца.

Пресметувањето на релативната неопределеност на концентрацијата е сложено, поради фактот дека s_T мора да биде функција од трансмитанцата. Регистрирани се три категории неопределени инструментални грешки.¹⁷ Тие се прикажани во табела 10.8. Константна вредност за s_T е регистрирана за неопределеност поврзана со отчитувањата на %T од инструменти со аналогна или со дигитална скала за отчитување. Типични вредности се $\pm 0,2 - 0,3 \%$ (k_1 од $\pm 0,002 - 0,003$) за аналогна скала, и $\pm 0,001 \%$ (k_1 од $\pm 0,00001$) за дигитална скала. Константна вредност за s_T е регистрирана и при користење термални конвертори што се користат во инфрацрвените спектрофотометри. Ефектот на константната вредност на s_T врз релативната неопределеност на концентрацијата е покажана на слика 10.35 со крива А. Релативната неопределеност е мошне голема како за ниски, така и за високи апсорбанци, достигнувајќи минимална вредност кога апсорбанцата е 0,434. Овој извор на неопределена грешка е важен за инфрацрвени спектрофотометри и за евидните UV /видливи спектрофотометри. За да се добие релативна неопределеност на концентрацијата од $\pm 1 - 2 \%$, вредноста на апсорбанцата мора да се движи меѓу 0,1 и 1.

Кога неопределените грешки се доминантни, поради шумовите предизвикани од фотонските конвертори, вредностите за s_T се сложена функција од трансмитанцата. Кривата Б на слика 10.35 покажува дека релативната неопределеност на концентрацијата е мошне голема за ниски апсорбанци, но е помалку изразена за високи апсорбанци. Макар што релативната неопределеност достигнува максимум кога апсорбанцата изнесува 0,96, забележани се само мали промени на

**Слика 10.35**

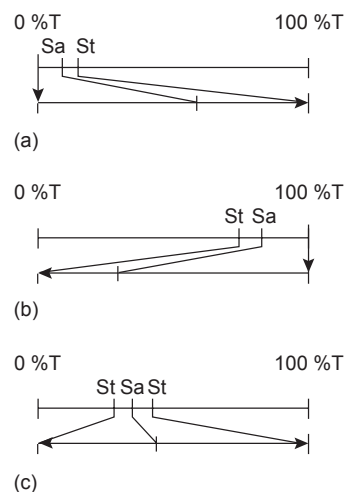
Релативната неопределеност на апсорпционата спектрофотометрија, како функција од апсорбанцата за трите категории на неопределени инструментални грешки (табела 10.8 за равенки).

релативната неопределеност за апсорбанци од 0,5 до 2. Овој извор на неопределена грешка, општо земено, ја ограничува прецизноста на висококвалитетните UV /видливи спектрофотометри за средни и високи апсорбанци.

И, на крајот, вредностите за s_T се директно пропорционални на трансмитанцата, кога се во прашање неопределени грешки што потекнуваат од флукуациите на интензитетот на изворот, како и од разликите во поставувањето на киветата со примерокот во спектрометарот. Последниот фактор е особено важен, зашто оптичките својства на киветите за примероци не се униформни. Како резултат на тоа, повторното поставување на киветата со примерокот може да доведе до промена во интензитетот на пропуштеното зрачење. Како што е прикажано со кривата В на слика 10.35, ефектот на овој извор на неопределени грешки е значаен само за случаи со ниски апсорбанци. Овој извор на неопределени грешки е обично лимитирачки фактор за висококвалитетните UV /видливи спектрофотометри кога се во прашање релативно ниски апсорбанци.

Кога релативната неопределеност на концентрацијата е ограничена со резолуцијата на отчитувањето на $%T$, прецизноста на анализата може да се зголеми со рedefинирање на стандардите што ќе се користат за утврдување на 100 % T и 0 % T . Нормално, 100 % T се подесува со слепа проба, а 0 % T се подесува со примена на блокатор кој спречува зрачењето од изворот да стаса до детекторот. Кога апсорбанцата е многу висока, прецизноста може да се зголеми со повторно подесување на 100 % T , користејќи стандарден раствор на аналитот чија концентрација е помала од концентрацијата во примерокот (слика 10.36 а). За примерок чија апсорбанца е многу ниска, прецизноста може да се зголеми со повторно подесување на 0 % T , со помош на стандарден раствор на аналит чија концентрација е повисока од концентрацијата на примерокот (слика 10.36 б). Во тој случај, потребна е калибрациона крива, бидејќи зависноста на апсорбанцата од концентрацијата веќе не е линеарна. Прецизноста може дополнително да се зголеми со комбинирање на овие две методи (слика 10.36 в). Тука повторно е потребна калибрациона крива, бидејќи односот меѓу апсорбанцата и концентрацијата веќе не е линеарен.

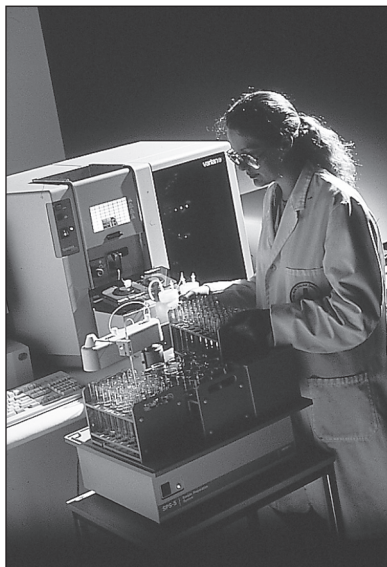
Осетливост Осетливоста на молекулската апсорпциона анализа е еквивалентна со наклонот на калибрационата крива на Беровиот закон, и е одредена со производот на апсорпциониот коефициент на аналитот и должината на патот во киветата за примероци. Осетливоста се зголемува со изборот на бранова должина кога апсорбанцата е максимална, или со зголемување на дебелината на киветата.

**Слика 10.36**

Методи за зголемување на прецизноста на мерењето на апсорпцијата: (а) метода за високи апсорбанци; (б) метода за ниски апсорбанци; (в) метода на максимална прецизност. Кратенки: Sa = примерок; St = стандард.

Селективност Селективноста ретко претставува проблем во молекулската апсорпциона спектрофотометрија. Во голем број случаи може да се најде бранова должина на која апсорбира само аналитот, или да се употреби хемиска реакција преку која аналитот се преведува во единствен хемиски вид што апсорбира на избраната бранова должина. Кога во измерената апсорбанца учествуваат два или повеќе хемиски видови, сè уште е можна мултикомпонентна анализа, како што е прикажано во примерот 10.6.

Време, цена и опрема Анализата на примерок со молекулска апсорпциона спектрометрија е релативно брза, макар што може да е потребно дополнително време ако е потребно да се спроведе хемиска реакција за трансформирање на аналитот од неапсорбирачка форма во форма којашто апсорбира. Цената на UV /видливи инструменти се движи од неколку илјади долари за едноставни инструменти со рачно управување, до 50.000 долари за инструменти со два снопа зраци контролирани преку компјутер, со решетка со висока резолуција, опремени со променлив процеп и коишто работат во широко подрачје на бранови должини. Инфрацрвени спектрофотометри со Фуриеова трансформација може да се набават по цена од 15.000 до 20.000 долари, макар што се достапни и поскапи модели.



Слика 10.37

Фотографија на типичен атомски апсорпционен спектрофотометар (со дозвола на Varian, Inc.)

атомизација

Процес на преведување на аналитот во форма на слободни атоми.

10Д Атомска апсорпциона спектроскопијата

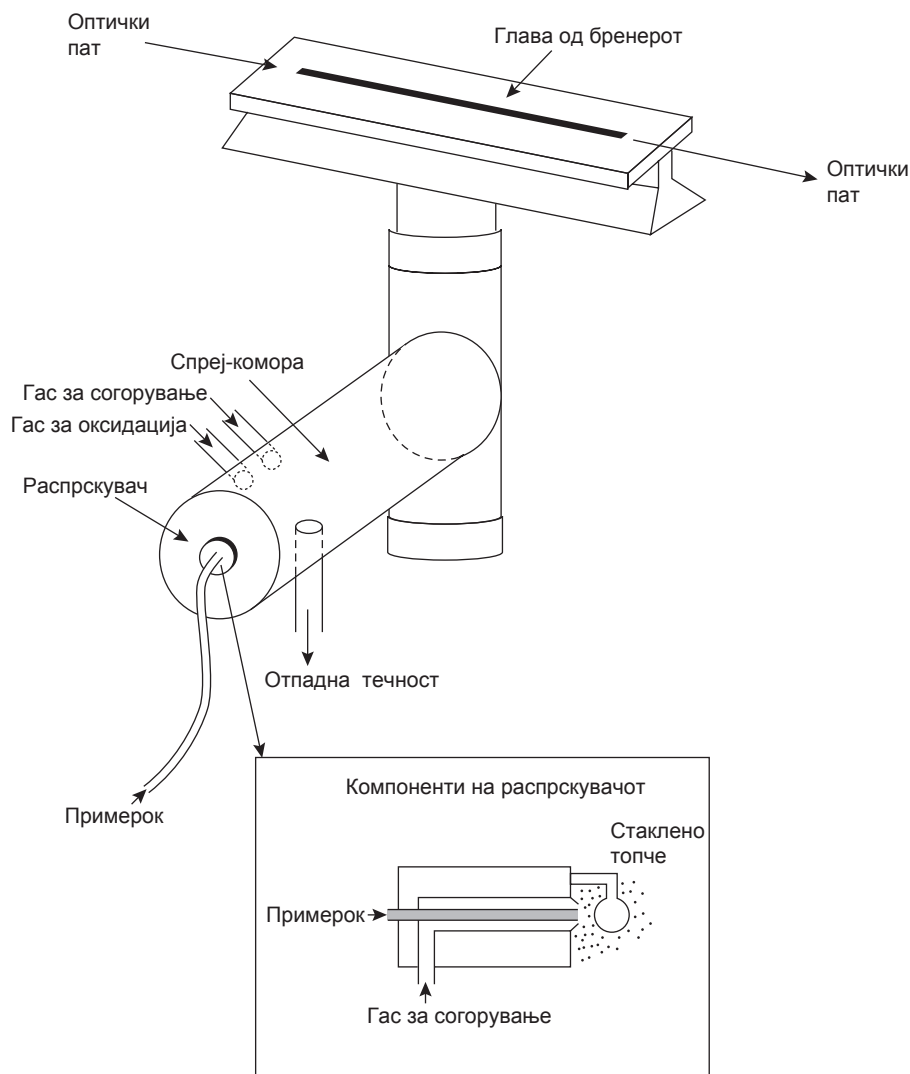
Атомска апсорпција, заедно со атомската емисија, за прв пат биле употребени од Густав Киркоф (Gustav Kirchhoff) и Роберт Бунзен (Robert Bunsen) во 1859, односно 1860 година, за квалитативна идентификација на атомите. Иако атомската емисија продолжила да се развива како аналитичка техника, прогресот во атомската апсорпција стагнирал речиси еден век. Современата атомска апсорпција е воведена во 1955 година како резултат на независни истражувања на Волш (A. Walsh) и Алкемаде (C. T. J. Alkemade).¹⁸ Комерцијални инструменти се појавиле на пазарот во раните 1960-ти, по што важноста на атомската апсорпција како аналитичка техника веднаш станала очигледна.

10Д.1 Инструментација

Атомските апсорпциони спектрометри (слика 10.37) се дизајнирани така што користат или оптика со едноснопно зрачење, или оптика со двоен сноп зраци, како што беше опишано порано и за молекулските апсорпциони спектрометри (слика 10.25 и 10.26). Меѓутоа, има и неколку важни разлики, за кои ќе стане збор во овој дел.

Атомизација Најважната разлика меѓу спектрофотометар за атомска апсорпција и спектрофотометар за молекулска апсорпција е потребата аналитот да се преведе во состојба на слободни атоми. Процесот на преведувањето на аналитот од цврста, течна или од растворена форма во состојба на гас, составен од слободни атоми е наречен **атомизација**. Во повеќето случаи, примерокот содржи аналит којшто претрпел одредени промени при подготовката на примерокот, по што, на пр., е преведен во органски или во воден раствор. Од тие причини, во овој текст се разгледуваат само анализите на растворени примероци. Генерално, се користат две методи за атомизација на растворени примероци: атомизација во пламен и електротермичка атомизација. Мал број елементи се атомизираат користејќи други методи.

Пламени атомизери При атомизација во пламен, примерокот прво се преведува во состојба на фина магла, составена од ситни капки на растворот. Тоа се постигнува со помош на распрскувач, сличен на оној прикажан на слика 10.38. Примерокот се всмукува низ капиларна цевка потопена во растворот и се воведува во спреј-комора низ која струи еден или повеќе согорливи гасови под притисок. При удирањето на капките од примерокот во стаклено топче поставено на излезот од распрскувачот, се формира аеросол во форма на магла. Аеросолот се меша со согорливите гасови во спреј-комората пред да влезе во бренерот, во кој термичката енергија на пламенот


Слика 10.38

Прибор за јонизација во пламен, составен од спреј-комора и бренер со долг тесен отвор. На зголемениот дел од сликата е прикажан распрскувач на растворот на примерокот.

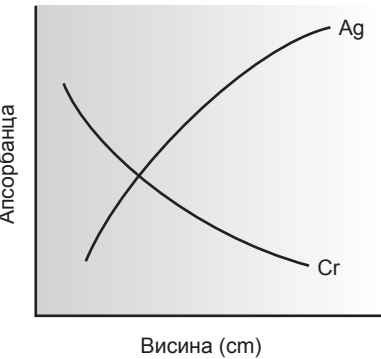
врши десолватација на аеросолот, којшто е во форма на магла, до аеросол составен од суви, мали честички. Потоа, под дејство на термичката енергија, честичките испаруваат формирајќи пареа којашто се состои од молекули, атоми и слободни јони.

Термичката енергија за атомизација во пламен се обезбедува со согорување смеса од согорлив гас – оксидационен гас. Најчесто употребените, согорливи и оксидациони гасови и нивните температурни интервали се наведени во табела 10.9. Од нив, најчесто користени пламени се воздух-ацетилен и азот субоксид-ацетилен. Обично, согорливиот и оксидациониот гас се мешаат во приближно стехиометриски однос; меѓутоа, смеса богата со гориво е подобра за работа со атоми коишто лесно се оксидираат. Најчесто се користи бренер со долг тесен отвор, прикажан на слика 10.38. Ваквиот бренер овозможува долг оптички пат низ пламенот за следење на апсорбанцата, како и стабилен пламен.

Бренерот се монтира на носач кој овозможува поместување на целиот бренер хоризонтално и вертикално. Хоризонталното поместување е потребно за подесување на бренерот така што оптичкиот зрак да минува по целата должина на пламенот. Вертикалното поместување е потребно за подесување на висината на зоната во пламенот, во која ќе се следи апсорбанцата. Ваквото подесување е важно, зашто на концентрацијата на атомите во пламенот влијаат два конкурентни процеси.

Табела 10.9 **Согорливи и оксидациони гасови што се користат во пламено согорување**

Гас за согорување	Оксидационен гас	Температурен интервал (°C)
природен гас	воздух	1700 – 1900
водород	воздух	2000 – 2100
ацетилен	воздух	2100 – 2400
ацетилен	азот субоксид	2600 – 2800
ацетилен	кислород	3050 - 3150



Слика 10.39
Профил на апсорбанца за Ag и Cr во пламена атомска апсорпциона спектрометрија.

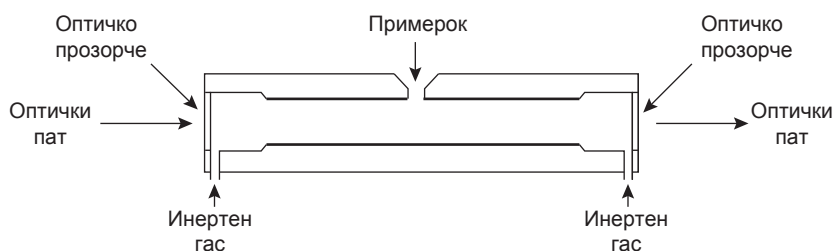
Зголеменото време на престој на анализитот во пламенот резултира со поефикасна атомизација; така, формирањето слободни атоми расте со висината. Од друга страна, подолго задржување во пламенот може да доведе до формирање метални оксиди коишто апсорбираат на бранова должина различна од онаа на која апсорбираат атомите. За метали што лесно се оксидираат, како што е случајот со Cr, концентрацијата на слободните атоми е најголема непосредно над главата на бренерот. За метали коишто потешко се оксидираат, како, на пр., Ag, концентрацијата на атомите расте постепено со висината (слика 10.39). Други атоми покажуваат максимум на концентрационите профили на карактеристична висина.

Вообичаен начин за внесување примероци во пламен атомизер е континуирано всмукување, со кое примерокот континуирано минува низ бренерот додека се следи апсорбанцата. Континуираното всмукување бара доволно количество примерок (2-5 mL). Постојат начини за внесување микроколичества од примерокот во пламен, најчесто со фиксен волумен, кога волуменот на примерокот е ограничен или, пак, кога матрицата на примерокот не е компатибилна со пламениот атомизер. На пр., континуирано всмукување примерок со висока концентрација на растворени цврсти материи, како што е морската вода, може да доведе до издвојување на цврсти депозити на главата од бренерот. Депозитите делумно го попречуваат пламенот, намалувајќи ја на тој начин апсорбанцата. Микроколичество примерок (50-250 µL) се внесува во распрскувачот со микропипета преку тefлонска инка, или со краткотрајно потопување на капиларната цевка од распрскувачот во примерокот. Внесување примерок со потопување обично се врши со автоматски земач на примероци. Сигналот што се добива при внесувањето микроколичество примерок во пламен претставува краткотраен пик чија висина или површина е пропорционална на количеството анализит што е инјектиран.

Главната предност на атомизацијата во пламен е репродукцибилноста со која примерокот се внесува во спектрофотометарот. Значаен недостаток на пламените атомизери е што ефикасноста на атомизацијата може да биде слаба, и тоа поради две причини. Како прво, најголемиот дел од аеросолот создаден во текот на распрскувањето се состои од капки коишто се премногу големи за да бидат пренесени до пламенот со помош на гасовите од гасната смеса. Како резултат на тоа, речиси 95 % од примерокот воопшто не стасува до пламенот. Втората причина за слабата ефикасност на атомизацијата е што големиот волумен на гасовите од смесата за горење значително го разредуваат примерокот. Земени заедно, овие два фактори што влијаат врз ефикасноста на атомизацијата ја намалуваат осетливоста, зашто концентрацијата на анализитот во пламенот може да биде само $2,5 \times 10^{-6}$ дел од неговата концентрација во растворот.¹⁹

графитна печка
Електротермички атомизер во кој атомизацијата се врши со загревање предизвикано од електричен отпор.

Електротермички атомизери Значајно зголемување на осетливоста се постигнува со загревање што се темели на електричен отпор, наместо со пламен. Типичен електротермички атомизер, познат и како **графитна печка**, се состои од цилиндрична графитна цевка со должина од 1 до 3 cm, и пречник од 3 до 8

**Слика 10.40**

Шематски приказ на електротермички атомизер.

mm (слика 10.40). Графитната цевка се става во склоп која ги затвора нејзините краеве со оптички пропустливи окна. Склопот, исто така, овозможува континуиран проток на инертен гас којшто ја штити графитната цевка од оксидација и ги отстранува гасните продукти што се создаваат во текот на атомизацијата. Од извор на електрично напојување се пропушта струја низ графитната цевка која притоа, поради електричниот отпор, се загрева.

Примерокот, во количество од 5 до 50 μL , се инјектира во графитната цевка преку мал отвор на нејзиниот горен дел. Атомизацијата се одвива во три фази. Во првата фаза примерокот се суши со примена на електрична струја која ја загрева цевката до приближно 110 $^{\circ}\text{C}$. По десолватирањето, примерокот останува во форма на цврст остаток. Во втората фаза, наречена жарење, температурата се покачува до 350-1200 $^{\circ}\text{C}$. При овие температури, целиот органски материјал од примерокот се разлага до CO_2 и H_2O , а испарливите неоргански компоненти испаруваат. Гасовите се отстрануваат со струја на инертен гас. Во последната фаза примерокот се атомизира со нагло зголемување на температурата до 2000-3000 $^{\circ}\text{C}$. Резултат на ваквото загревање е краткотраен пик чија висина или плоштина се пропорционални со апсолутното количество аналит инјектиран во графитната цевка. За протекување на споменатите три фази потребни се 45-90 s, при што најголемиот дел од тоа време е резервирано за сушење и за жарење на примерокот.

Електротермичката атомизација овозможува значително подобрување на осетливоста, преку задржувањето на пареите на аналитот во малиот волумен на графитната цевка. Концентрацијата на аналитот по фазата на испарувањето на примерокот може да биде и до 1000 пати поголема од концентрацијата што се добива при атомизација во пламен.²⁰ Зголемувањето на осетливоста и соодветното подобрување на границата на детекција е на сметка на значителното намалување на прецизноста. Ефикасноста на атомизацијата во голема мера зависи од физичкиот контакт на примерокот со графитната цевка, поради што репродуцибилноста тешко може да се контролира.

Други методи на атомизација Неколку елементи може да се атомизираат со хемиски реакции при што се создаваат испарливи производи. Елементи како што се As, Se, Sb, Bi, Ge, Sn, Te и Pb формираат испарливи хидриди кога реагираат со NaBH_4 во кисела средина. Инертен гас ги спроведува испарливите хидриди или во пламен, или во загреана кварцна цевка поставена на оптичкиот пат. Живата се одредува со метода на ладни пареи, по нејзина редукција до елементарна жива со SnCl_2 . Испарената жива се спроведува со инертен гас до цевка поставена на оптичкиот пат на инструментот.

10Д.2 Квантитативни примени

Атомската апсорпција што користи пламена или електротермичка атомизација наоѓа широка примена за анализа на траги од метали во примероци со различни матрици. Разгледувајќи ја атомската апсорпциона анализа на цинк како пример, се сретнуваат низа процедури разработени за негово определување во најразлични примероци, како што се чисти и отпадни води, воздух, крв, урина, месо, коса, млеко, житарици, шампони, легури, бензин, масло, седименти и карпи.

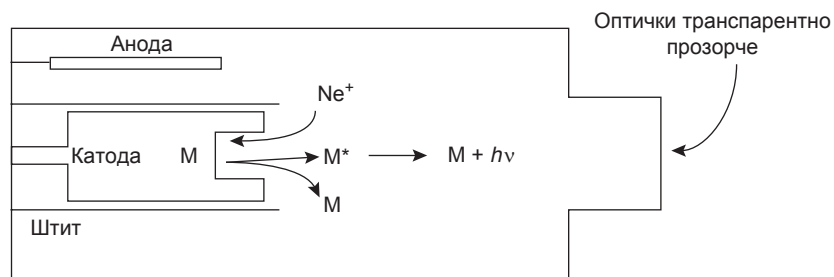
При развивање на квантитативна атомска апсорпциона метода, потребно е да се извршат одредени претходни согледувања, меѓу кои се избор на метода за атомизација, избор на бранова должина и ширина на процепот, начинот на подготовка на примерокот за анализа, намалување на спектралните и на хемиските интерференции, како и избор на метода за стандардизација. Во оваа секција ќе ги анализираме наведените елементи.

Избор помеѓу пламена и електротермичка атомизација Изборот на методата за атомизација е главно условен од концентрацијата на аналитот во примерокот што треба да се анализира. Поради поголемата осетливост, границите на детекција за повеќето елементи се значително пониски кога се користи електротермичката атомизација (табела 10.10). Подобрата прецизност, пак, на атомизацијата во пламен ја фаворизира оваа метода кога концентрацијата на аналитот е значително повисока од границата на детекција на атомизацијата во пламен. Освен тоа, интерференциите при атомизација во пламен се помалубројни, што дозволува поголем проток на примерокот и бара помала стручност од операторот. Електротермичката атомизација е соодветен избор кога концентрацијата на аналитот е пониска од границата на детекција на методата на атомизација во пламен. Оваа метода се одбира и кога располагаме со ограничен волумен на примерокот.

Избор на бранова должина и на ширина на процеп Избор на зрачење за атомска апсорпција е ламба со шуплива катода, којашто се состои од катода и анода поставени во стаклен цилиндер исполнет со Ne или Ag под низок притисок (слика 10.41). По воспоставување на електричен потенцијал меѓу електродите, инертниот гас се јонизира. Позитивните јони се насочуваат кон негативната електрода (катода) и удираат во неа, избивајќи атоми од нејзината површина. Некои од тие атоми се во ексцитирана состојба и емитираат зрачење карактеристично за металот од кој е направена катодата. Доколку металот од кој е направена катодата соодветствува на аналитот, ламбата со шуплива катода обезбедува емисиони линии коишто одговараат на апсорпциониот спектар на аналитот.

Осетливоста на атомската апсорпциона линија често се опишува како **карактеристична концентрација**, која одговара на концентрацијата на аналитот што дава апсорбанца од 0,00436 (што соодветствува на 99 % трансмитанца). На пр., во табела 10.11 е дадена листа на бранови должини и на карактеристични концентрации на бакар.

Обично се избира бранова должина којашто овозможува да се постигне најголема осетливост, макар што за високи концентрации на аналитот може да биде посоодветна помалку осетлива бранова должина. Помалку осетлива бранова должина може да се користи и во случај кога на најосетливата бранова должина се јавуваат значителни интерференции. На пр., атомизирање на примерокот создава атоми не само на аналитот, туку и на другите компоненти присутни во матрицата на примерокот. Присуството на други атоми во пламенот не предизвикува интерференции, освен во случај кога апсорпционите линии на аналитот и на елементот што може да пречи се во границите од приближно 0,01 nm. Во случај на ваков проблем, интерференцијата може да се спречи со избор на друга бранова должина, на која апсорбира аналитот, но не и елементот што пречи.



Слика 10.41

Шематски дијаграм на ламба со шуплива катода, на кој е покажан механизмот по кој се одвива атомска емисија.

карактеристична концентрација

Концентрација на аналитот што дава апсорбанца од 0,00436.

Табела 10.10 Граници на детекција на некои елементи со атомска апсорпција

Елемент	Граници на детекција (ppb)	
	Атомизација во пламен	Електротермичка атомизација
Ag	0,9	0,001
Al	20	0,01
As ^a	20	0,08
Au	6	0,01
B	700	15
Ba	8	0,04
Be	1	0,003
Bi ^a	20	0,1
Ca	0,5	0,01
Cd	0,5	0,0002
Co	2	0,008
Cr	2	0,004
Cs	8	0,04
Fe	3	0,01
Ga	50	0,01
Ge	50	0,1
Hg ^b	200	0,2
K	1	0,004
Li	0,3	0,01
Mg	0,1	0,0002
Mn	0,8	0,0006
Mo	10	0,02
Na	0,2	0,004
Ni	2	0,05
Pb	10	0,007
Pd	10	0,05
Pt	40	0,2
Sb ^a	30	0,08
Se ^b	100	0,05
Si	20	0,005
Sn	10	0,03
Sr	2	0,01
Ti	10	0,3
V	20	0,1
Zn	0,8	0,0006

Извор: Преземено од Parson, M. L.; Major, S.; Forster, A. R., *Appl. Spectrosc.* **1983**, 37, 411-418; Weltz, B. *Atomic Absorption Spectrometry*, VCH: Deerfield Beach, FL, 1985.

^aГраница на детекција на методата со хидридни пареи:

As 0,02 ppb
Bi 0,02 ppb
Sb 0,1 ppb
Se 0,02 ppb

^bГраница на детекција со методата на ладни пареи

Hg 0,001 ppb

Табела 10.11 **Апсорпциони линии и карактеристични концентрации за бакар**

Бранова должина (nm)	Карактеристична концентрација (ppm)
324,8	0,04
327,4	0,1
217,9	0,6
222,6	2,0
249,2	10
244,2	40

Емисиониот спектар на ламба со шуплива катода вклучува, освен емисионата линија на анализот, и дополнителни линии од нечистотите присутни во металната катода и во гасот со кој е исполнета ламбата. Овие линии претставуваат дополнителен извор за зрачењето на фонот, што може да доведе до инструментално отстапување од Беровиот закон. Вообичаено е да се избере што е можно поширок монохроматорски процеп, за да се зголеми интензитетот на зрачењето, но потесниот процеп ја елиминира споменатата компонента на зрачењето на фонот.

Подготовка на примерокот За пламена и за електротермичка атомизација примерокот мора да е во течна форма или во форма на раствор. Примероците во цврста форма се подготвуваат за анализа со растворање во соодветен растворувач. Ако примерокот не се раствара, тој може да се разложи со загревање со HNO_3 , H_2SO_4 или со HClO_4 , на грејна плоча или во микробранова печка. Постои можност анализот да се екстрахира во Сокслетов екстрактор. Течните примероци може да се анализираат директно, или, пак, да се разредат или да се екстрахираат, доколку нивната матрица не е компатибилна со методата на атомизација. На пр., примероци од серум тешко се аспирираат во пламени атомизери, а при електротермичка атомизација може да предизвикаат неприфатливо висок фон. Течно-течна екстракција со органски растворувач што содржи комплексобразувачки реагенси често се користи за концентрирање на аналити. Разредени раствори на Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} и Zn^{2+} , на пр., може да се концентрираат со екстракција со раствор на пиролдиндитиокарбамат во метилизобутил кетон.

Сведување на спектрални интерференции на минимум Спектралните интерференции се јавуваат кога апсорпционата линија на анализот се преклопува со апсорпционата линија или лента на елементот што пречи. Како што беше напоменато претходно, ретко се случува преклопување на две атомски апсорпциони линии. Од друга страна, широка молекулска апсорпциона лента или расеано зрачење од изворот се потенцијална причина за сериозни спектрални интерференции.

Важно прашање, коешто треба да се анализира кога се користи пламен како извор за атомизација, е како да се изврши корекција поради апсорпцијата на зрачењето од страна на пламенот. Производите на согорувањето содржат молекули кои може да имаат широки апсорпциони ленти, како и честички коишто учествуваат во расејувањето на зрачењето од изворот. Ако не се изврши соодветна корекција на спектралната интерференција, интензитетот на пропуштеното зрачење е помал. Како резултат на тоа, доаѓа до зголемување на апсорбанцата на примерокот. Апсорбанцата и расејувањето на зрачењето предизвикани од пламенот можат да се коригираат со анализа на слепа проба.

Спектрални интерференции се јавуваат и кога компонентите од матрицата на примерокот реагираат во пламенот и формираат молекулски форми, како што се оксиди или хидроксиди. Апсорпцијата и расејувањето што потекнуваат од компоненти на матрицата на примерокот различни од аналитот, учествуваат во создавањето на фонот на примерокот, кој може да претставува сериозен проблем, особено во областа на бранови должини под 300 nm, во која расејувањето на зрачењето станува поизразито. Ако е познат составот на матрицата на примерокот, може да се подготват стандарди со иста таква матрица. Во тој случај, апсорпцијата на фонот е иста и за примероците и за стандардите. Ако се знае од која компонента на матрицата потекува фонот, тогаш таа компонента може да се внесе во вишок во сите примероци и стандарди, со што фонот кој потекнува од нејзиното природно присуство во примероците станува занемарливо мал. Интерференцијата што потекнува од матрицата на примерокот може да се елиминира и со промена на составот на пламент. На пр., со користење пламен со повисоки температури, може да се спречи создавањето оксиди и хидроксиди коишто пречат при анализата.

Кога составот на матрицата на примерокот е непознат, или кога не е можно да се подеси пламенот за да се елиминираат интерференциите, мора да се применат други начини за компензирање на интерференциите на фонот. За компензирање на интерференциите на матрицата, развиени се неколку методи, и повеќето атомски апсорпциони спектрометри користат една или неколку такви методи.

Една од нејчесто користените методи за **корекција на фонот** е примената на континуиран извор на зрачење, каков што е деутериумова (D_2) ламба. Бидејќи емисиониот спектар од оваа ламба е континуиран, апсорпцијата на нејзиното зрачење од страна на аналитот, чија апсорпциона линија е многу тенка, е занемарливо. Од таа причина, практично сета апсорпција на зрачењето од D_2 ламбата се должи на фонот. Од друга страна, апсорпцијата на зрачењето од ламба со шуплива катода се должи и на аналитот, и на фонот. Со одземањето на апсорпцијата на D_2 ламбата од апсорпцијата на ламбата со шуплива катода, се добива вредност којашто служи за корекција на интерференцијата на фонот. Оваа метода на корекција на фонот може да биде доволно ефикасна, под услов апсорпцијата на фонот да биде константна за целиот интервал бранови должини што минуваат низ монохроматорот. Во спротивно, одземањето на вредностите на двете апсорпции може да резултира со пониска или со повисока корекција на фонот.

Развиени се и други методи за корекција на фонот, меѓу кои се и корекцијата со примената на Земановиот (Zeeman) ефект, и Шмит-Хеефтје-овата (Smith-Hieftje) корекција, вклучени во некои комерцијално достапни атомски апсорпциони спектрофотометри. Повеќе детали за овие методи на корекција може да се најдат во литературата наведена на крајот од ова поглавје.

Намалување на хемиската интерференција Квантитативната анализа на некои елементи се усложнува поради хемиски интерференции што се јавуваат при атомизацијата. Две најчести хемиски интерференции се формирањето на неиспарливи соединенија на аналитот, и јонизација на аналитот. Пример на хемиска интерференција предизвикана од формирање неиспарливи соединенија е случајот со раствор на Ca^{2+} во кој се внесени PO_4^{3-} или Al^{3+} јони. Според едно проучување, додавањето на 100 ppm Al^{3+} на раствор со 5 ppm Ca^{2+} ја намалува апсорбанцата на калциумот од 0,50 на 0,14, додека, пак, додавањето 500 ppm PO_4^{3-} на сличен раствор на Ca^{2+} ја намалува апсорбанцата од 0,50 на 0,38.²¹ Овие интерференции се припишани на формирањето честички на $Ca_3(PO_4)_2$ и $Al-Ca-O$ оксид со висока точка на топење.

корекција на фонот

Во атомската апсорпциона спектроскопија, корекција на нето апсорбанцата за вредност на апсорбанцата што потекнува од матрицата на примерокот.

ослободувачки реагенс

Реагенс кој, во споредба со аналитот, полесно реагира со елементот што пречи при анализата.

заштитен реагенс

Реагенс кој реагира со аналитот, спречувајќи го да се трансформира во форма непогодна за анализа.

спречувач на јонизација

Реагенс кој се јонизира полесно од аналитот.

Трансформацијата во неиспарливи соединенија често може значително да се намали со зголемување на температурата на пламенот, било со промена на односот на смесата согорлив гас – гас за оксидација, било со примена на друга смеса на согорлив гас и гас за оксидација. Друг пристап е на растворот на аналитот да се додаде ослободувачки реагенс или заштитен реагенс. **Ослободувачки реагенс** е реагенс кој, во споредба со аналитот, полесно реагира со елементот што пречи при анализата. Додавање на Sr^{2+} или на La^{3+} на раствор на Ca^{2+} , на пр., го минимизира влијанието на PO_4^{3-} и Al^{3+} јоните така што реагира со нив. Така, со додавање 2000 ppm SrCl_2 на смеса $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-}$ или $\text{Ca}^{2+}/\text{Al}^{3+}$, за кои е дискутирано во претходниот параграф, за секоја смеса се добива апсорбанца од 0,48, додека раствор само на 2000 ppm SrCl_2 и на Ca^{2+} дава апсорбанца од 0,49. **Заштитен реагенс** реагира со аналитот, формирајќи стабилен испарлив комплекс. По додавање на 1 % w/w EDTA на $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-}$ раствор, за кој е дискутирано во претходниот параграф, се добива апсорбанца од 0,52, додека, пак, за смеса само од Ca^{2+} и EDTA се добива апсорбанца 0,55. Од друга страна, EDTA не може да се користи како заштитен реагенс за раствори на Ca^{2+} и Al^{3+} .

Интерференциите поради јонизација се јавуваат кога термичката енергија на пламенот или на електротермичкиот атомизер е доволно висока за да изврши јонизација на аналитот



каде M е аналит во атомска форма, а M^+ е катјон на аналитот, формиран со јонизација. Бидејќи апсорпционите спектри на M и M^+ се различни, положбата на рамнотежата во реакцијата 10.28 влијае на апсорбанцата на брановата должина на која апсорбира M . Ако се присутни други хемиски видови, кои се јонизираат полесно од M , тогаш рамнотежата на реакцијата 10.28 се поместува во лево. Затоа промените на концентрацијата на хемиските видови што лесно се оксидираат може да имаат значително влијание врз апсорбанцата на аналитот, што резултира со одредена грешка. Влијанието на јонизацијата може да се намали со додавање на **спречувачи на јонизација**, коишто претставуваат хемиски видови што се јонизираат полесно од аналитот. Ако концентрацијата на спречувачот на јонизација е доволно висока, зголемената концентрација на електрони во пламенот ја поместува рамнотежата на реакцијата 10.28 во лево, спречувајќи ја така јонизацијата на аналитот. Како спречувачи на јонизација најчесто се користат калиумот и цезиумот, поради нивната ниска енергија на јонизација.

Стандардизирање на метода Бидејќи Беровиот закон е применлив и за атомската апсорпција, се очекува калибрационите криви за атомската апсорпција да бидат линеарни. Меѓутоа, во практиката, повеќето калибрациони криви во атомската апсорпција не се линеарни, или се линеарни за ограничен концентрационен интервал. Нелинеарноста во атомската апсорпција е последица на инструменталните ограничувања, меѓу кои спаѓа и фонот од зрачењето од ламбата со шуплива катода, и променливиот моларен апсорпционен коефициент, како резултат на малата ширина на апсорпционата линија. Затоа, за точна квантитативна анализа, често се бараат погодни начини за конструкција на калибрациона крива со помош на серија стандарди. Нелинеарните калибрациони криви можат да се конструираат како криви од втор или од трет степен, макар што и тие не може да се применат за широк интервал на концентрации. Поточни резултати може да се добијат со примена на методите споменати во секција 5B.5, поглавје 5.

Во одредени случаи, квантитативната анализа најдобро се извршува со примена на надворешен стандард. За жал, чест проблем се интерференциите предизвикани од матрицата, особено ако се користи електротермичката атомизација. Од таа причина, често се користи методата на стандарден додаток. Едно од ограничувањата на оваа метода на стандардизација е потребата од линеарна зависност меѓу апсорбанцата и концентрацијата.

Метода 10.2 Определување на Cu и Zn во примероци од ткива²²

Опис на методот. Бакарот и цинкот се одвојуваат со разложување на примероците од ткиво, по извршената претходна екстракција на масното ткиво. Концентрацијата на бакарот и на цинкот во добиениот раствор се одредува со атомска апсорпција со пламен од воздух-ацетилен.

Поступок. Примерок од мускулно ткиво се зема со биопсија, по што се суши 24-30 часа на 105 °C за да се отстрани секоја трага од влага. Масното ткиво во исушениот примерок се отстранува со екстракција со безводен етер, во тек на 24 часа. По отстранувањето на етерот, примерокот се суши за да може да се измери масата на обезмастен и сув примерок. Примерокот се разложува на 68 °C во тек на 20-24 часа со 3 mL 0,75 M HNO₃. По центрифугирање со 2500 вртежи во минута, во тек на 10 минути, течноста над талогот се пренесува во волуметриски сад од 5 mL. Разложувањето се повторува уште неколку пати, во траење по 2-4 часа, со аликвоти од 0,9 mL 0,75 M HNO₃. Добиените раствори се пренесуваат во волуметрискиот сад од 5 mL, кој потоа се дополнува до ознаката со 0,75 M HNO₃. Концентрацијата на Cu и Zn во добиениот раствор се одредува со атомска апсорпција, со примена на пламен воздух-ацетилен и со надворешен стандард. Бакарот се анализира на бранова должина од 324,8 nm и со ширина на процеп од 0,5 nm, а цинкот се анализира на 213,9 nm и со ширина на процеп од 1,0 nm. При анализа на цинкот, потребна е корекција на фонот. Резултатите се прикажуваат како микрограми Cu или Zn во грам сув и обезмастен примерок.

Прашања**1. Која е најсоодветна матрица за надворешни стандарди и за слепа проба?**

Матрицата за стандардите и за слепата проба треба да одговара на матрицата на примероците; така, приближната матрица е 0,75 M HNO₃. Интерференциите од другите компоненти на матрицата на примероците се редуцираат со корекција на фонот.

2. Зошто е потребна корекција на фонот при анализа на Zn, но не и при анализа на Cu?

Корекција на фонот се користи за компензација на апсорпцијата и на расејувањето од страна на фонот, поради интерференциите во примерокот. Таквите интерференции се многу посериозни за аналити каков што е Zn, кој апсорбира на бранова должина под 300 nm.

3. За серија калибрациони стандарди за Cu, добиени се следниве апсорбанци

ppm Cu	Апсорбанца
0,000	0,000
0,100	0,006
0,200	0,013
0,300	0,020
0,400	0,026
0,500	0,033
0,600	0,039
0,700	0,046
1,000	0,066

Која е концентрацијата на Cu, во микрограми по грам обезмастен и сув примерок, ако 11,23 обезмастен и сув примерок ткиво покажува апсорбанца 0,023?

Линеарната регресија за калибрационите стандарди ја дава следнава врска меѓу апсорбанцата и концентрацијата

$$A = -0,0002 + 0,0661(\text{ppm Cu})$$

Со замена на вредноста за апсорбанцата во горната равенка, се добива вредност за концентрацијата на Cu во растворот од 0,351 ppm. Концентрацијата во примерокот од ткивото е

$$\frac{(0,351 \mu\text{g/mL})(5 \text{ mL})}{0,01123 \text{ g}} = 156 \mu\text{g Cu/g}$$

10Д.3 Оценка

Подрачје на примена Атомската апсорпциона спектроскопија е идеална метода за анализа на аналити присутни во микро и ултрамикро концентрации, особено кога се користи електротермичка атомизација. Со разредување на примероците, атомската апсорпција може да се користи и за умерени и за високи концентрации на аналити. Во повеќето анализи се користат примероци достапни во умерени и во поголеми количества. Мали волумени примероци може да се анализираат со електротермичка атомизација или со уред за внесување микроколичества примерок во пламен, со што се овозможува анализа на микро и ултрамикро количества примероци.

Точност Кога спектралните и хемиските интерференции ќе се сведат на минимум, може да се постигне точност од 0,5 - 5 % при рутинска работа. Во случај на нелинеарни калибрациони криви, повисока точност се постигнува со примена на двојка стандарди избрани така што апсорбанцата на примерокот да лежи меѓу вредностите на апсорбанците на стандардите, под претпоставка дека промената на апсорбанцата е линеарна во опфатениот интервал. Одредените грешки при електротермичката атомизација се често поголеми од грешките добиени со пламена атомизација, поради поголемите интерференции од матрицата.

Прецизност За апсорбанци поголеми од 0,1 – 0,2, релативната стандардна девијација за атомската апсорпција изнесува 0,3 до 1 % за атомизација во пламен и 1 до 5 % за електротермичка атомизација. Главното ограничување е флукуацијата на концентрацијата на слободните атоми на аналитот, којашто е резултат на променливата брзина на всмукување, на распрскувањето и на самата атомизација во пламените атомизери, односно неуедначеноста на загревањето на примерокот во текот на електротермичката атомизација.

Осетливост Осетливоста во атомската апсорпциона анализа со атомизација во пламен многу зависи од составот на пламенот и од зоната од пламенот во која се врши регистрирањето на апсорпцијата. Вообичаено, осетливоста на анализата може да се оптимизира со всмукување на стандард и подесување на условите на анализата, како што се односот на согорливиот гас спрема гасот за оксидација, брзината на внесувањето на растворот во распрскувачот, како и висината на зоната на пламенот во која се регистрира највисока апсорбанца. При анализа со електротермичка атомизација, осетливоста зависи од фазите на сушење и на жарење, коишто и претходат на атомизацијата. Температурата и времето на секоја фаза мора да се утврдат за секој вид примерок. Осетливоста зависи и од матрицата на примерокот. Веќе напоменавме дека осетливоста може да се намали поради хемиски интерференции. Зголемувањето на осетливоста може да се постигне со додавање на алкохоли со ниска молекулска маса, естери или кетони, или со примена на органски растворувачи.

Селективност Поради малата ширина на апсорпционите линии, атомската апсорпција овозможува извонредна селективност. Атомската апсорпција може да се користи за анализа на преку 60 елементи присутни во концентрации до ниво на ppm.

Време, цена и опрема Времето потребно за анализа со пламена атомизација е кратко, и можно е да се извршат 250-350 одредувања за еден час, ако се користи целосно автоматизиран систем. Електротермичката атомизација бара многу подолго време за една анализа, со најмногу 20 до 30 примероци анализирани за еден час. Вредноста на новите инструменти изнесува 10.000 до 50.000 \$ за спектрофотометри со пламени атомизери, и 18.000 до 70.000 \$ за спектрофотометри со електротермичка атомизација. Повисоките вредности во секој од наведените интервали се резервирани за инструменти со оптика со двоен сноп зраци, со автоматски земач на примероци и со компјутерско управување. Поскапите инструменти вклучуваат и опции за автоматска промена на ламби со шуплива катода и автоматски избор на бранова должина.

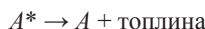
10Г Спектроскопија базирана на емисија

Аналит во ексцитирана состојба има енергија, E_2 , која е поголема од енергијата што ја има кога се наоѓа во пониска енергетска состојба, E_1 . Кога аналитот се враќа во пониска енергетска состојба (процес наречен *релаксација*), тој се ослободува од вишокот енергија, ΔE ,

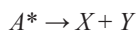
$$\Delta E = E_2 - E_1$$

Упростена шема на овој процес е прикажана на слика 10.5

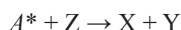
Времето на постоење на аналитот во ексцитирана состојба, A^* , е кратко, и изнесува $10^{-5} - 10^{-9}$ s за електронски ексцитирани состојби, и 10^{-15} s за вибрациони ексцитирани состојби. Процесот на **релаксација** се одвива преку судири меѓу A^* и други хемиски видови од примерокот, преку фотохемиски реакции и со емисија на фотони.



Релаксацијата преку фотоемисиона реакција може да се одвива и преку реакција на разложување на A^*

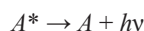


или преку реакција на A^* со некој друг хемиски вид



Во секој случај, вишокот на енергија се користи за одвивање на хемиска реакција или се ослободува како топлина.

Во третиот механизам, вишокот енергија се ослободува како фотон на електромагнетно зрачење



Ослободување фотон по термичката ексцитација е наречено емисија, а ослободувањето по апсорпција на фотон е наречено фотолуминесценција. Во хемилуминесценцијата и во биолуминесценцијата, ексцитацијата настанува како резултат на хемиски, односно биохемиски реакции. Спектроскопските методи базирани на фотолуминесценцијата се дадени во секцијата 10Е, а на атомската емисија во секцијата 10Ж.

10Е Молекулска фотолуминесцентна спектроскопија

Фотолуминесценцијата е поделена во две категории: флуоресценција и фосфоресценција. Апсорпција на фотон од ултравиолетова или видлива светлина доведува до премин на валентен електрон од негова основна состојба во ексцитирана состојба, при што спинот на електронот не се менува. На пример, електроните од електронска двојка во некоја основна електронска состојба се со спротивни спинови (слика 10.42а) и за нив се вели дека се во сингулетна спинска состојба. При апсорпција на фотон доаѓа до премин на еден електрон на електронскиот пар во т.н **сингулетна ексцитирана состојба** (слика 10.42б). Емисијата на фотон, при враќање на електронот од сингулетната ексцитирана состојба во сингулетна основна состојба, или во некое друго електронско ниво со ист спин, е наречена **флуоресценција**. Веројатноста за флуоресцентен премин е мошне висока, а средното време на задржување на електронот во ексцитирана состојба изнесува само $10^{-5} - 10^{-8}$ s. Затоа флуоресценцијата се гасне веднаш по отстранување на изворот на екситација. Во некои случаи, електронот од сингулетната ексцитирана состојба се трансформира во **триплетна ексцитирана состојба** (слика 10.42в) во која неговиот спин веќе не е спарен со оној во основната состојба. Емисијата меѓу триплетна ексцитирана состојба и сингулетна основна состојба, или меѓу кои било две други енергетски нивоа што се разликуваат во своите соодветни спински

време на постоење

Време за кое аналитот останува во ексцитирана состојба, пред да се врати во состојба со пониска енергија.

релаксација

Процес преку кој аналитот од состојба со повисока енергија се враќа во состојба со пониска енергија.

сингулетна ексцитирана состојба

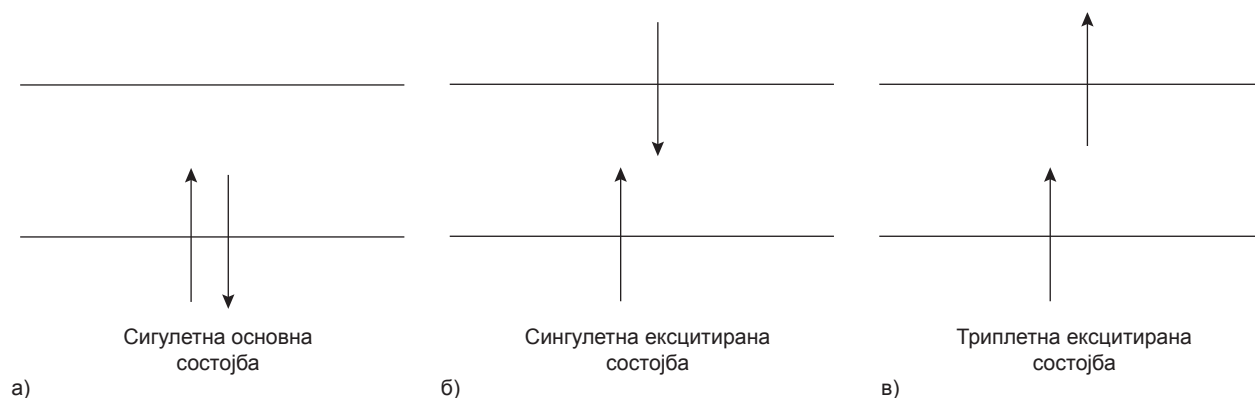
Ексцитирана состојба во која електронските спинови се спарени.

флуоресценција

Емисија на фотон при враќање на аналитот во состојба со пониска енергија со ист спин каков што го имал и во состојбата со повисока енергија.

триплетна ексцитирана состојба

Ексцитирана состојба во која се јавува неспарен електронски спин.

**Слика 10.42**

Разлика меѓу синглетна и триплетна состојба.

фосфоресценција

Емисија на фотон кога анализот се враќа во состојба со пониска енергија со спротивен спин од оној што го имал во состојба со повисока енергија.

состојби, е наречена **фосфоресценција**. Бидејќи средното време на постоење на фосфоресценцијата изнесува од 10^{-4} до 10^4 s, фосфоресценцијата може да се одвива и извесно време по отстранувањето на изворот на екситација.

Користењето на молекулската фосфоресценција за квалитативни и за семи-квантитативни анализи може да се следи наназад сè до раните до средни 1800-те години, но, поточни квантитативни методи се јавуваат во 1920-те години. Инструментите за фосфоресцентна спектроскопија што користат филтри и монохроматори за избор на бранова должина се појавиле во 1930-те и 1950-те години, соодветно. Макар што откривањето на фосфоресценцијата претходело речиси 200 години пред откривањето на флуоресценцијата, квалитативната и квантитативната примена на молекулската фосфоресценција не привлела многу внимание сè до појавата на флуоресцентните инструменти.

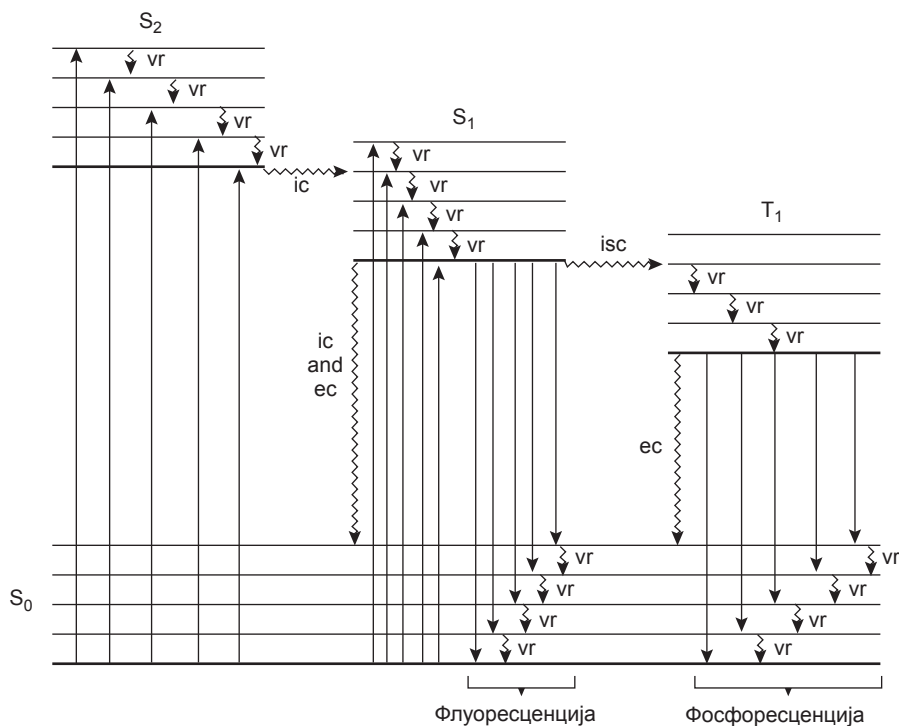
10Е.1 Молекулски флуоресцентни и фосфоресцентни спектри

За да стане јасно како настанува молекулската флуоресценција и фосфоресценција, ќе разгледаме што се случува со молекулата, следејќи ја апсорпцијата на фотон. Да претпоставиме дека некоја молекула се наоѓа во основна електронска состојба и, истовремено, во најниска вибрациона енергетска состојба. Основната состојба, прикажана на слика 10.43, е синглетна состојба, означена со S_0 . Апсорпцијата на фотон со соодветен износ на енергија ја ексцитира молекулата до едно од неколкуте вибрациони енергетски нивоа во првата електронска ексцитирана состојба, S_1 , или во втората електронска ексцитирана состојба, S_2 , при што и двете состојби се синглетни. Релаксацијата од овие ексцитирани состојби до основна состојба се одвива преку бројни механизми, коишто се или без емисија на зрачење, односно без емисија на фотони, или вклучуваат емисија на фотони. Овие релаксациони механизми се прикажани на слика 10.43. Најверојатниот начин по кој ќе се одвива релаксацијата на молекулата до нејзината основна состојба е оној, за којшто е потребно најкратко време.

вибрациона релаксација

Форма на релаксација при која не доаѓа до емисија на зрачење, во која анализот преминува од повисоко вибрационо енергетско ниво во пониско вибрационо енергетско ниво, во рамките на исто електронско ниво.

Релаксација без емитирање зрачење Една од релаксациите при која не доаѓа до емисија на зрачење е **вибрациона релаксација**, каде молекулата што се наоѓа во ексцитирано вибрационо енергетско ниво губи енергија при премин во пониско вибрационо енергетско ниво, останувајќи притоа во истата електронска состојба. Вибрационата релаксација е мошне брза, се средно време на задржување на молекулата во ексцитираното вибрационо енергетско ниво од 10^{-12} s или пократко. Како резултат на тоа, молекули што се ексцитираат до различни вибрациони енергетски нивоа од истата електронска ексцитирана состојба брзо се враќаат во пониско вибрационо енергетско ниво на истата ексцитирана состојба.


Слика 10.43

Дијаграм на молекулски енергетски нивои, на кој е прикажан патот на релаксација од ексцитирана состојба: *vr* е вибрациона релаксација; *ic* е внатрешна конверзија; *ec* е надворешна конверзија; *isc* е меѓусистемски премин. Најниското вибрационо енергетско ниво за секоја електронска состојба е прикажано со подебела линија.

Друга форма на релаксација при која не се емитира зрачење е **внатрешната конверзија**, при која молекулата во основно вибрационо ниво, на ексцитирана електронска состојба, преминува директно во повисоко вибрационо енергетско ниво од пониска енергетска електронска состојба со иста состојба на спинот. Со комбинација на внатрешни конверзии и вибрациони релаксации, молекулата може да се врати од ексцитирана електронска енергетска состојба во основна електронска состојба без да емитира фотон. Слична форма на релаксација без емисија на зрачење е **надворешна конверзија**, при која вишокот енергија се пренесува на растворувачот или на друга компонента на матрицата на примерокот.

Последна форма на релаксација без емисија на зрачење е **меѓусистемски премин**, при кој молекулата во основно вибрационо енергетско ниво на ексцитирана електронска состојба преминува во повисоко вибрационо енергетско ниво на пониска електронска енергетска состојба со различна состојба на спинот. На пр., меѓусистемски премин е прикажан на слика 10.43, меѓу синглетна ексцитирана состојба S_1 и триплетна ексцитирана состојба T_1 .

Флуоресценција Флуоресценцијата се јавува кога молекулата во пониско вибрационо енергетско ниво на една ексцитирана електронска состојба се враќа во пониска електронска енергетска состојба со емитирање на фотон. Бидејќи молекулата се враќа во својата основна состојба преку најбрзиот механизам, флуоресценцијата се јавува доколку таа е поефикасен начин на релаксација од комбинацијата на внатрешна конверзија и вибрациона релаксација. Квантитативен израз за ефикасноста на флуоресценцијата е **квантен принос**, Φ_F , кој е еднаков на делот од ексцитираните молекули коишто се враќаат во основна состојба со флуоресценција. Вредноста на квантниот принос се движи од 1, кога секоја молекула од ексцитирана состојба се релаксира преку флуоресценција, до 0, кога флуоресценцијата воопшто не учествува во релаксацијата.

Интензитетот на флуоресценцијата, I_F , е пропорционален на количеството зрачење од изворот на ексцитација, што е апсорбирано, и квантниот принос на флуоресценцијата

$$I_F = k\Phi_F(P_0 - P_T) \quad 10.29$$

внатрешна конверзија

Форма на релаксација при која не доаѓа до емисија на зрачење, во која аналитот преминува од повисоко електронско енергетско ниво во пониско електронско енергетско ниво.

надворешна конверзија

Форма на релаксација при која не доаѓа до емисија на зрачење, во која енергијата се пренесува на растворувачот или на матрицата на примерокот.

меѓусистемски премин

Форма на релаксација, при која не доаѓа до емисија на зрачење и во која аналитот преминува од повисоко електронско енергетско ниво во пониско електронско енергетско ниво со различна состојба на спинот.

квантен принос

Дел од апсорбираните фотони коишто создаваат посакуван ефект, каков што е флуоресценција или фосфоресценција.

каде што k е константа поврзана со ефикасноста на собирањето и на детекцијата на флуоресцентната емисија. Од Беровиот закон е познато дека

$$\frac{P_T}{P_0} = 10^{-\varepsilon b C} \quad 10.30$$

каде што C е концентрација на флуоресцентните хемиски видови. Решавањето на равенката 10.30 за P_T и замената во равенката 10.29 дава, по упростувањето,

$$I_f = k\Phi_f P_0 (1 - 10^{-\varepsilon b C}) \quad 10.31$$

За ниски концентрации на флуоресцентни видови, кога $\varepsilon b C$ е помало од 0,01, равенката може понатаму да се упрости до

$$I_f = 2,303 k\Phi_f P_0 \varepsilon b C \quad 10.32$$

Така, интензитетот на флуоресценцијата е пропорционален со квантната ефикасност, со енергијата на изворот на екситацијата, со моларниот апсорпционен коефициент и концентрацијата на флуоресцентните хемиски видови.

Флуоресценцијата, општо земено, се забележува кај молекули за кои најниската енергетска апсорпција е $\pi \rightarrow \pi^*$ преминот, макар што и некои $n \rightarrow \pi^*$ премини покажуваат слаба флуоресценција. Повеќето несупституирани, нехетероциклични ароматични соединенија покажуваат значителни флуоресцентни квантни приноси, макар што супституцијата во ароматичниот прстен може да има значителен ефект врз Φ_f . На пр., присуството на електрон-акцепторни групи, каква што е $-\text{NO}_2$, ја намалува вредноста на Φ_f , додека, пак, внесувањето на електрон-донорни групи, каква што е $-\text{OH}$, ја зголемува вредноста на Φ_f . Флуоресценцијата расте за ароматични прстенести системи и за ароматични молекули со планарна структура.

Врз молекулскиот флуоресцентен квантен принос влијаат и надворешни фактори, како што се температурата и растворувачот. Зголемувањето на температурата, општо земено, го намалува Φ_f , бидејќи честите судири помеѓу молекулата и растворувачот ја зголемува надворешната конверзија. Намалувањето на вискозноста на растворувачот го намалува Φ_f поради слични причини. За анализи со кисели или базни функционални групи, промената на pH може да ја промени структурата на анализот и, соодветно, неговите флуоресцентни својства. Промените може да се одразат како на брановата должина, така и на интензитетот на флуоресценцијата.

Како што е прикажано на слика 10.43, флуоресценцијата може да ја врати молекулата од кое било вибрационо енергетско ниво во основна електронска состојба. Затоа, флуоресценцијата се јавува во широк дијапазон бранови должини. Бидејќи промената на енергијата за флуоресцентна емисија е, општо земено, помала од онаа за апсорпција, молекулскиот флуоресцентен спектар е поместен кон повисоки бранови должини, во споредба со апсорпциониот спектар.

Фосфоресценција Молекулата во најниско вибрационо енергетско ниво на ексци-тирана триплетна електронска состојба, нормално се релаксира до основна состојба преку меѓусистемски премин до сингулентна состојба или со надворешна конверзија. Фосфоресценцијата се забележува кога релаксацијата е проследена со емисија на фотон. Како што е покажано на слика 10.43, фосфоресценцијата се јавува во широк интервал бранови должини, при што сите тие имаат пониска енергија во однос на молекулската апсорпциона лента. Интензитетот на фосфоресценцијата, I_p , е даден со равенка слична на равенката 10.32 за флуоресценција

$$I_p = 2,303 k\Phi_p P_0 \varepsilon b C \quad 10.33$$

каде што Φ_p е квантен принос за фосфоресценција.

Фосфоресценцијата е најчеста кај молекули со $n \rightarrow \pi^*$ премини, коишто имаат повисока веројатност за меѓусистемски премин во споредба со $\pi \rightarrow \pi^*$ премините. На пр., фосфоресценцијата се набљудува кај ароматични молекули што содржат карбонилни групи или хетероатоми. Ароматичните соединенија што содржат халогени атоми имаат, исто така, повисок коефициент за фосфоресценција. Општо земено, порастот на фосфоресценцијата соодветствува на намалувањето на флуоресценцијата.

Бидејќи средното време на задржување за фосфоресценцијата е мошне долго, од 10^{-4} до 10^4 s, квантниот принос за фосфоресценцијата е обично сосема мал. Зголемувањето на Φ_r се постигнува со намалување на ефикасноста на надворешната конверзија. Тоа може да се постигне на неколку начини, како на пр., со намалување на температурата, со примена на повискозни растворувачи, со депозиција на примерокот на цврст супстрат, или со преведување на молекулите во раствор.

Споредба на експитационите со емисиони спектри Фотолуминесцентни спектри се регистрираат со мерење на интензитетот на емитираното зрачење како функција или на брановата должина на експитацијата или на брановата должина на емисијата. **Експитационен спектар** се добива со следење на емисијата на фиксна бранова должина, при променлива бранова должина на експитација. На слика 10.44 е прикажан експитационен спектар на хипотетичен систем опишан со дијаграм на енергетски нивои на слика 10.43. Ако се изврши корекција заради променливоста на интензитетот на изворот и одговорот на детекторот, експитациониот спектар на примерокот е речиси ист со неговиот апсорпционен спектар. Експитациониот спектар овозможува да се изврши избор на најдобра експитациона бранова должина за квалитативни и за квантитативни анализи.

За добивање емисионен спектар, за експитација на молекули се користи фиксна бранова должина, а интензитетот на емитираното зрачење се следи како функција од брановата должина. Иако молекулата има само еден експитационен спектар, таа има два емисиони спектри, еден за флуоресценција и еден за фосфоресценција. Соодветниот експитационен спектар за хипотетичкиот систем прикажан на слика 10.43 е даден на слика 10.44,

експитационен спектар

Флуоресцентен или фосфоресцентен спектар, во кој интензитетот на емисијата, на фиксна бранова должина, се мери како функција на брановата должина употребена за експитација.



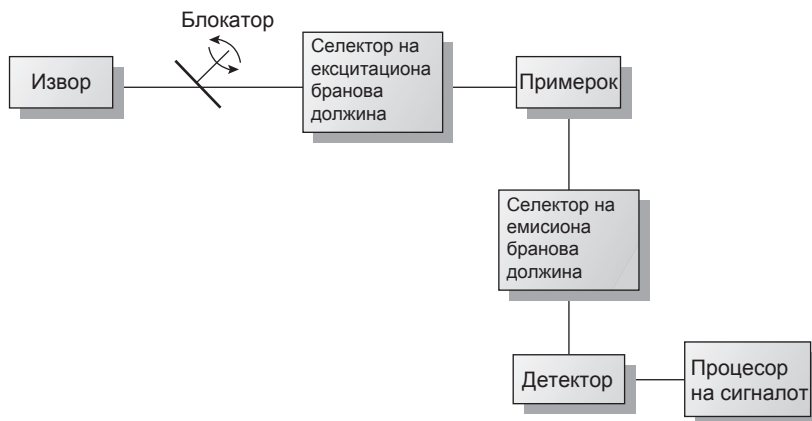
Слика 10.44

Пример на молекулски експитационен и емисионен спектар.

10Е.2 Инструментација

Основната конструкција на инструментите за следење на молекулската флуоресценција и на молекулската фосфоресценција е слична на конструкцијата на другите спектроскопски инструменти. Најбитните разлики се дадени во наредните секции.

Молекулска флуоресценција Блок дијаграм на типичен инструмент за молекулска флуоресценција е прикажан на слика 10.45. За разлика од инструментите за апсорпциона спектроскопија, оптичкиот пат од изворот до детекторот обично е поставен под агол од 90° .



Слика 10.45

Блок дијаграм на молекулски флуоресцентен спектрометар.

флуорометар

Инструмент за мерење на флуоресценцијата, со филтер за избор на ексцитациона и емисиона бранова должина.

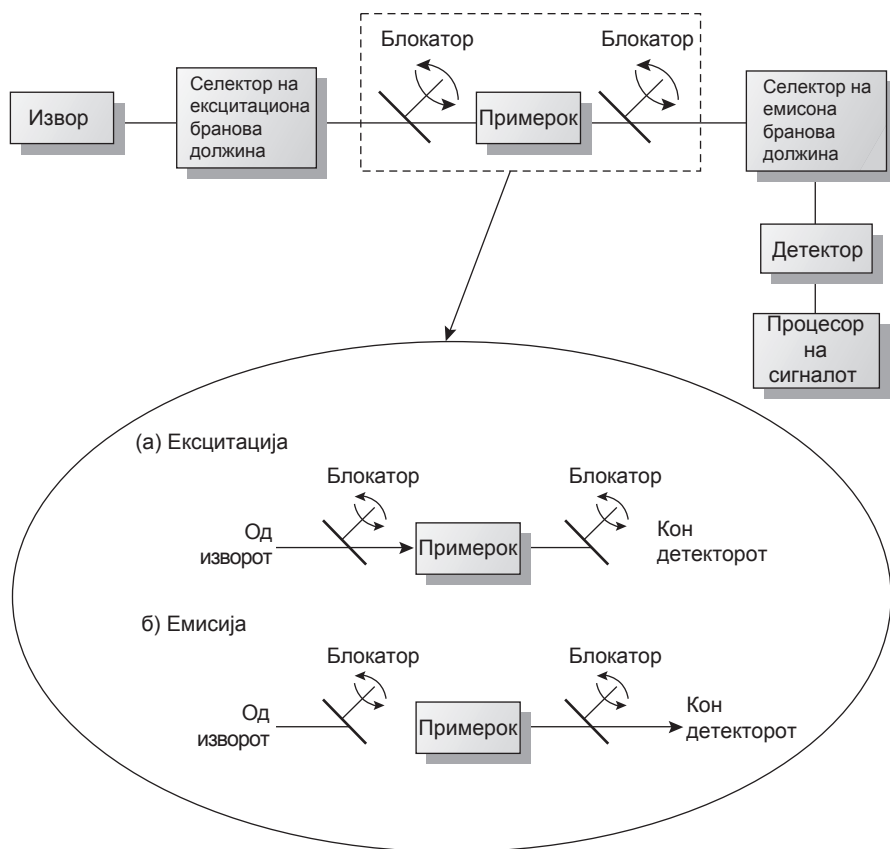
спектрофлуорометар

Инструмент за мерење на флуоресценцијата, со монохроматор за избор на ексцитациона и емисиона бранова должина.

За мерење на молекулската флуоресценција се користат два типа конструкции на инструменти. Во флуорометар, ексцитационата и емисионата бранова должина се избира со апсорпционен или интерферентен филтер. Како ексцитационен извор за **флуорометарот** обично служи ламба со живини пареи под низок притисок, којашто дава интензивни емисиони линии во ултравиолетов и видлив дел од спектарот (254, 312, 365, 404, 436, 546, 577, 691 и 773 nm). Кога за избор на ексцитациони и емисиони бранови должини се користи монохроматор, таквиот инструмент се нарекува **спектрофлуорометар**. За инструменти со монохроматор, ексцитационен извор обично е лачна ламба со ксенон под висок притисок, со континуиран емисионен спектар. И двата типа инструменти може да се користат за квантитативни мерења, но само спектрофлуорометарот може да се користи за снимање на ексцитациони или емисиони спектри.

Киветите за молекулска флуоресценција се слични на киветите за оптичка молекулска апсорпција. Може да се користи и далечински регистратор со сонди со оптичко влакно (слика 10.30), приклучен на флуорометар или спектрофлуорометар. Аналит којшто е флуоресцентен може да се следи директно. За аналити што не се флуоресцентни, на врвот од флуоресцентната сонда може да се внесе флуоресцентна молекула. Реакцијата на аналитот со молекулата од сондата доведува до зголемување или до намалување на флуоресценцијата.

Молекулска фосфоресценција Инструментите за молекулска фосфоресценција мора да овозможат разликување на фосфоресценцијата од флуоресценцијата. Бидејќи времето на егзистенција за флуоресценцијата е многу пократко од соодветното време за фосфоресценцијата, разликувањето лесно се постигнува со поставување на блокатор меѓу ексцитираната и мерената фосфоресцентна емисија. Типична конструкција на



Слика 10.46

Блок дијаграм на молекуларен фосфоресцентен спектрометар. На зголемениот дел од сликата е прикажано како се користи блокаторот за раздвојување на ексцитацијата и емисијата.

инструмент за молекуларна фосфоресценција е прикажана на слика 10.46. Како што е прикажано на зголемениот дел од сликата, двата блокатори ротираат со различни фази, така што флуоресцентната емисија се блокира пред детекторот кога ексцитациониот извор е фокусиран на примерокот, а ексцитациониот извор се блокира пред примерокот кога се мери фосфоресцентната емисија.

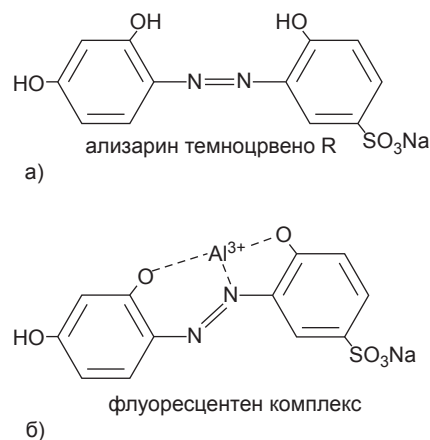
Бидејќи фосфоресценцијата е бавен процес, мора да се преземат мерки за спречување на релаксацијата на ексцитираната состојба преку надворешна конверзија. Традиционално, тоа се постигнува со растворање на примерокот во соодветен органски растворувач, обично смеса на етанол, изопентанол и диетил етер. Добениот раствор се замрзнува со ладење со течен азот, при што се добива оптички проѕирен цврст препарат. Цврстата матрица ја минимизира надворешната конверзија предизвикана од судирите меѓу аналитот и растворувачот. Надворешната конверзија се минимизира и со имобилизирање на примерокот на цврст супстрат, што овозможува мерење на фосфоресценцијата на собна температура. Едно од можностите е да се нанесе капка раствор на аналит на мала кружна филтер хартија. По сушењето на примерокот, хартијата со примерокот се става во спектрофлуорометар за анализа. Други цврсти површини, што се користат за оваа намена, се силикагел, алуминиум оксид, натриум ацетат и сахароза. Ваквата техника е особено погодна за анализа на плочи од тенкослојна хроматографија.

10Е.3 Квантитативни примени на молекуларната флуоресценција

Молекуларната флуоресценција и, во помала мера, фосфоресценцијата, се користат за директни или за индиректни анализи на аналити во различни видови матрици. Директна квантитативна анализа е можна кога квантниот принос за флуоресценција или за фосфоресценција на аналитот е доволно висок. Кога аналитот не покажува флуоресценција или фосфоресценција, или кога квантниот принос за флуоресценција или за фосфоресценција е мал, може да се користи индиректната анализа. Еден од начините за индиректна анализа е третманот на аналитот со реагенс кој дава производ со флуоресцентни карактеристики. Друг начин е мерење на намалувањето на флуоресценцијата кога аналитот ќе се додаде на раствор што содржи флуоресцентни молекули. Намалувањето на флуоресценцијата се забележува кога реакцијата меѓу молекулите на аналитот и флуоресцентите молекули ја зголемува релаксацијата без емитување на зрачење, или дава нефлуоресцентен производ. Примената на флуоресценцијата и фосфоресценцијата за анализа на неоргански и органски аналити е дадена во наредната секција.

Неоргански аналити Освен мал број метални јони, меѓу кои треба да се спомене UO_2^{2+} , повеќето неоргански јони не се доволно флуоресцентни за директна анализа. Голем број метални јони може да се определат индиректно, преку реакција со органски лиганд и формирање флуоресцентен или, поретко, фосфоресцентен метал-лиганд комплекс. Пример за таков хелатен лиганд е натриумовата сол на 2,4,3'-трихидроксиазобенбензен-5'-сулфонска киселина, позната и како ализарин темноцрвено R, којшто формира флуоресцентен метал-лиганд комплекс со Al^{3+} (слика 10.47). Анализата се изведува користејќи ексцитациона бранова должина од 470 nm, со следење на флуоресценцијата на 500 nm. Други примери на хелатни реагенси коишто формираат флуоресцентни метал-лиганд комплекси со метални јони се дадени во табела 10.12. Неколку неоргански неметали се определуваат преку нивната способност да ја намалуваат, односно да ја гаснат флуоресценцијата на други хемиски видови. Еден таков пример е анализата на F^- , која се темели на неговата способност да ја гасне флуоресценцијата на комплексот Al^{3+} -ализарин темноцрвено R.

Органски аналити Како што веќе беше напоменато, органски соединенија што содржат ароматични прстени се флуоресцентни, но ароматичните хетероциклични соединенија се често и фосфоресцентни. Голем број биохемиски и



Слика 10.47

Структура на ализарин темноцрвено R (а) и неговиот комплекс метал-лиганд со Al^{3+} (б).

Табела 10.12 Некои хелатни реагенси за флуорометриска анализа на неоргански метални јони

Хелатен реагенс	Метални јони
8-хидроксихинолин	Al^{3+} , Be^{2+} , Zn^{2+} , Li^+ , Mg^{2+} (и други)
флавонал	Zr^{2+} , Sn^{4+}
бензоин	$\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$, Zn^{2+} ,
2',3,4',5,7-пентахидроксифлавоин	Be^{2+} ,
2-(<i>o</i> -хидроксифенил)бензоксазол	Cd^{2+} ,

Табела 10.13 Некои хелатни реагенси за флуорометриска анализа на неоргански метални јони

Класа	Соединенија
ароматични аминокиселини	фенилаланин (F) тирозин (F) триптофан (F, P)
витамини	витамин А (F) витамин B ₂ (F) витамин B ₆ (F) витамин B ₁₂ (F) витамин Е (F) фолна киселина (F)
катехоламини	допамин норепинефрин (F)
фармацевтски препарати и лекови	хинин (F) салицилна киселина (F, P) морфиум (F) барбитурати LSD (F) кодеин (P) кофеин (P) сулфаниламид (P)
загадувачи на животната средина	полициклични ароматични јаглеводороди: пирен (F) бензо[<i>a</i>]пирен (F) органофосфорни пестициди (F) карбаматни инсектициди (F) ДДТ (P)

Кратенки: F = флуоресценција, P = фосфоресценција, LSD = диетиламид на лисергинска киселина, ДДТ = дихлордифенилтрихлоретан

фармацевтски соединенија, како и соединенија од животната средина се ароматични и, според тоа, може да се анализираат квантитативно со флуориметрија или фосфориметрија. Неколку примери се наведени во табела 10.13. Кога органски аналит не е природно флуоресцентен или фосфоресцентен, може, преку соодветна хемиска реакција, да се преведе во флуоресцентен или во фосфоресцентен производ. На пр., ензимот креатин фосфокиназа се определува преку продуктот на негова катализа, креатин образуван од фосфокреатинот. Добиениот креатин реагира со нинхидрин, давајќи флуоресцентен производ со непозната структура.

Стандардизирање на метода Равенките 10.32 и 10.33 покажуваат дека интензитетот на флуоресцентната или фосфоресцентната емисија е пропорционален на концентрацијата на фотолуминесцентниот хемиски вид, под услов апсорбанцата на зрачењето од екситациониот извор ($A = \epsilon bC$) да е помала од 0,01. Квантитативните методи обично се стандардизираат со серија надворешни стандарди. Калибрационите криви се линеарни најмногу до 4–6 реда на големина за флуоресценција и 2–4 реда на големина за фосфоресценција. Калибрационите криви стануваат нелинеарни за високи концентрации на фотолуминесцентните хемиски видови, за кои интензитетот на емисијата е даден со равенката 10.31. Но, нелинеарност може да се појави и при ниски концентрации, доколку се присутни флуоресцентни или фосфоресцентни контаминанти. Како што е дискутирано претходно, квантната ефикасност за емисијата зависи од температурата и од матрицата на примерокот, коишто може да се контролираат со примена на надворешни стандарди. Освен тоа, интензитетот на емисијата зависи од моларниот апсорпционен коефициент на фотолуминесцентните хемиски видови, што, од своја страна, зависи од матрицата на примерокот.

Метода 10.3 Определување на хинин во урина²³

Ојис на методот. Хинин е алкалоид што се користи при лечење на маларија (тој се додава и во тоник-пијалоците). Тој покажува силна флуоресценција во разредени раствори на H_2SO_4 ($\Phi_f = 0.55$). Екситациониот спектар на хининот покажува две апсорпциони ленти на 250 nm и 350 nm, а емисиониот спектар покажува една емисиона лента на 450 nm. Хининот брзо се исфрла од организмот преку урината и може лесно да се определи со флуоресцентна метода по негова екстракција од урината.

Поступка. 2,00 mL примерок од урина се пренесуваат во епрувета од 15 mL, се подесува вредноста на pH меѓу 9 и 10 со 3,7 M NaOH. Се додава 4 mL смеса од хлороформ и изопропанол во волуменски однос 3:1, и се клумка содржината на епруветата 1 минута. Се остава епруветата за да се раздвојат органскиот и водниот слој (урина); органската фаза се пренесува во чиста епрувета. Во органската фаза се додава 2,00 mL 0,05 M H_2SO_4 , и содржината на епруветата се клумка 1 минута. Епруветата се остава за да се одвојат органскиот и водниот слој, по што водната фаза се пренесува во кивета. Се мери флуоресцентната емисија на 450 nm, користејќи екситациона бранова должина 350 nm. Концентрацијата на хининот во урината се одредува од калибрациона крива конструирана со серија надворешни стандарди во 0,05 M H_2SO_4 , и дестилирана вода како слепа проба. Надворешните стандарди се подготвуваат од раствор на хинин (100,0 ppm) во 0,05 M H_2SO_4 .

Прашања

1. Познато е дека хлоридниот јон го намалува интензитетот на флуоресцентната емисија на хининот. На пр., во присуство на 100 ppm NaCl (61 ppm Cl⁻) се добива интензитет којшто изнесува само 83 % од интензитетот без присуство на хлориди, додека, пак, во присуство на 1000 ppm NaCl (610 ppm Cl⁻) се добива интензитет којшто изнесува само 29 % од интензитетот без присуство на хлориди. Концентрацијата на хлориди во урина изнесува од 4600 до 6700 ppm Cl⁻. Како е елиминирана интерференцијата на хлоридите во дадената постапка?

Со екстракција на примерокот од урина со смеса од хлороформ и изопропанол, хининот се издвојува во органската фаза, а хлоридите остануваат во водната фаза.

2. Примероци од урина што не содржат хинин, содржат мало количество флуоресцентен материјал по извршените екстракции. Како може да се

модифицира квантитативната постапка опишана погоре, за да се земе предвид овој факт?

Еден од начините е да се подготви слепа проба користејќи урина за која се знае дека не содржи хинин. Флуоресцентниот сигнал за слепата проба треба да се одземе од измерената флуоресценција на примерокот од урина.

- 3. Флуоресцентната емисија за хинин на 450 nm може да се индуцира со екситациона фреквенција од 250 nm или од 350 nm. Се знае дека флуоресцентната квантна ефикасност е иста за секоја екситациона бранова должина, а UV/видлив апсорпционен спектар покажува дека ϵ_{250} е поголемо од ϵ_{350} . Сепак, интензитетот на флуоресцентната емисија е поголем кога се користи екситациона бранова должина од 350 nm. Размислете зошто е така.**

Од равенката 10.32 следува дека I_f е функција од k , Φ_f , P_0 , ϵ , b и C . Бидејќи Φ_f , b и C се исти за која било екситациона бранова должина, а ϵ е поголемо за бранова должина од 250 nm, поголемата вредност за I_f за екситациона бранова должина од 350 nm мора да се должи на поголема вредност за P_0 или за k на бранова должина од 350 nm. И навистина, P_0 на 350 nm за ксенонова лачна ламба со Хе под висок притисок изнесува 170 % од P_0 на 250 nm. Освен тоа, осетливоста на просечен фотомултипликаторски конвертор (од кој зависи вредноста на k) на 350 nm е околу 140 % од онаа на 250 nm.

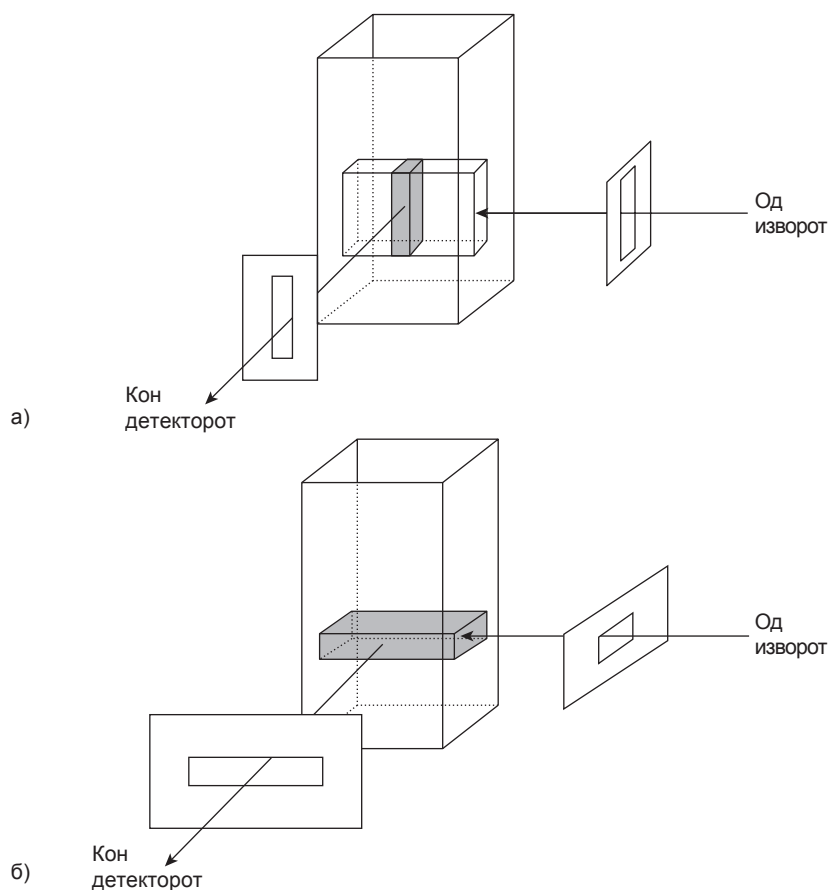
10E.4 Оценка

Интервал на примена Молекулската фотолуминесценција може да се користи за рутински анализи на микро и ултрамикро количества аналити во големи и средни по обем примероци. Врз границите на детекција на флуоресцентната спектроскопија силно влијае квантниот принос на аналитот. За аналити со $\Phi_f > 0,5$, границите на детекција се од редот на пикомолови, доколку се користат висококвалитетни спектрофлуорометри. На пр., граница на детекција за хинин сулфат, за кој Φ_f е 0,55, се движи од 1 ppb до 1 ppTg (делови на трилион). Границите на детекција за фосфоресценција се нешто послаби во споредба со оние на флуоресценција, со типични вредности од редот на наномолови за нискотемпературна фосфориметрија, односно микромолови за фосфориметрија на собна температура со примена на цврст супстрат.

Точност Точноста на флуоресцентна метода е, општо земено, 1-5 % при занемарливи спектрални и хемиски интерференции. Точноста е ограничена со истите фактори што ги засегаат и другите спектроскопски методи. Освен тоа, точноста е поврзана и со интерференции коишто влијаат на квантниот принос. Точноста на фосфоресценцијата е донекаде поголема во споредба со точноста на флуоресценцијата.

Прецизност Кога концентрацијата на аналитот е знатно над границата на детекција, релативната стандардна девијација за флуоресценцијата е обично 0,5 до 2 %. Ограничувачки инструментален фактор, којшто влијае на прецизности, е изворот на екситација. Прецизности за фосфоресценција е често ограничена со репродуцибилноста на подготовката на примероците за анализа, и релативната стандардна девијација најчесто изнесува 5-10 %.

Осетливост Од равенките 10.32 и 10.33 може да се види дека осетливоста на флуоресцентната или фосфоресцентната метода зависи од бројни параметри. Влијанието на квантниот принос, на температурата и на составот на растворот

**Слика 10.48**

Користење на ориентацијата на процепите за промена на волуменот од кој се мери флуоресценцијата: (а) нормална ориентација; (б) ротирана за 90°.

врз Φ_f и Φ_r веќе беше споменато. Освен преку квантниот принос, осетливоста на анализата може да се зголеми со примена на извор за екситација којшто има поголем интензитет на емисија (P_0) на работната бранова должина, и со избор на екситациона бранова должина којашто соодветствува на апсорпциониот максимум (ϵ). Друг начин за зголемување на осетливоста е зголемувањето на волуменот на примерокот од кој се мери емисијата. На слика 10.48 е прикажано како ротирањето за 90° на процепите за фокусирање на зрачењето од изворот за екситација на примерокот и за следењето на емисијата од примерокот може да доведе до 5–30-кратно зголемување на сигналот.

Селективност Селективноста на молекулската флуоресценција и фосфоресценција е многу поголема од селективноста на апсорпционата спектрофотометрија, и тоа од две причини: 1) секое соединение што апсорбира зрачење не е истовремено и флуоресцентно или фосфоресцентно и 2) ако постои разлика во екситациони или емисиони спектри меѓу анализитот и хемискиот вид што пречи, можна е селективна анализа. Во молекулската луминесценција, вкупниот интензитет на емисијата претставува збир на емисиони интензитети на секој од флуоресцентните или од фосфоресцентните видови. Оттука, анализа на примерок што содржи n компоненти може да се врши со мерење на интензитетот на вкупната емисија на n бранови должини.

Време, цена и опрема Како и другите оптички спектроскопски методи, и флуоресцентните и фосфоресцентните методи нудат брза анализа и лесно се автоматизираат. Флуорометрите се релативно евтини, со цена од неколку стотици до неколку илјади долари, и често се сосема задоволителни за квантитативни цели.

Спектрофлуорометрите се поскапи, при што некои модели достигнуваат цена и до 50.000 \$.

10Ж Атомска емисиона спектроскопија

Емисионата спектроскопија, во принцип, може да се примени како на атоми, така и на молекули. Молекулската инфрацрвена емисија, или зрачењето на црно тело, одиграла важна улога во раниот развој на квантната механика и била користена за анализа на компонентите во пламени и во врелите гасови од ракетните мотори. Иако инфрацрвените спектрометри со Фуриеова трансформација ја прошириле примената на инфрацрвената емисиона спектроскопија на широк спектар примероци, сепак, нејзината примена останува ограничена. Од овие причини, инфрацрвената емисија нема да биде разгледувана во понатамошниот текст. Молекулската UV/видлива спектроскопија е од мало значење, бидејќи термичките енергии потребни за екситација главно предизвикуваат разложување на примероците.

Во оваа секција, акцент е ставен на емисијата на UV/видливо зрачење коешто ја следи термичката или електричната екситација на атомите. Атомската емисиона спектроскопија има долга историја. Квалитативната примена базирана на бојата на пламените се користела при топењето руди уште во раните 1550-ти години, и била разработена околу 1830-те години при набљудувањето на атомските спектри добиени при емисија од пламен или од искра.²⁴ Квантитативните примени, што се темелат на атомската емисија од електрични искри биле разработени од страна на Norman Lockyer (1836-1920) во раните 1870-ти години, а основите на квантитативните примени базирани на емисија на пламен, биле поставени од Н. G. Lundegardh во 1930. Атомската емисија базирана на емисија од плазма е воведена во 1964 година.

10Ж.1 Атомски емисиони спектри

Атомската емисија се јавува кога валентен електрон од енергетски повисока атомска орбитала се враќа во атомска орбитала со пониска енергија. На слика 10.23 е прикажан дел од дијаграмот на енергетски нивои на натриум, што веќе беше прикажан при објаснувањето на атомските апсорпциони спектри. Значи, атомскиот емисионен спектар се состои од серија дискретни линии со бранови должини што соодветствуваат на разликата на енергиите меѓу две атомски орбитали.

Интензитетот, I , на некоја емисиона линија е пропорционален на бројот на атомите, N^* , што се наоѓаат во екситирана состојба

$$I = kN^* \quad 10.34$$

каде k е константа што е поврзана со ефикасноста на преминот. За систем што е во термичка рамнотежа, популацијата на екситираната состојба е поврзана со вкупната концентрација на атоми, N , преку Болцмановата распределба. За голем број елементи на температури пониски од 500 K, Болцмановата дистрибуција за екситирана состојба изнесува приближно

$$N^* = N \left(\frac{g_i}{g_0} \right) e^{-E_i/kT} \quad 10.35$$

каде што g_i и g_0 се статистички фактори поврзани со бројот на еквивалентни енергетски нивои за екситирана состојба и за основна состојба, E_i е енергија на екситираната состојба, во релативен однос спрема енергијата на основната состојба ($E_0 = 0$), k е Болцманова константа ($1,3807 \cdot 10^{-23}$ J/K), а T е температура во Келвинови степени. Од равенката 10.35 може да се види дека екситираните состојби со пониска енергија имаат поголема популација и, соодветно на тоа, најинтензивни емисиони линии. Освен тоа, интензитетите на емисијата растат со зголемување на температурата.

10Ж.2 Опрема

Инструментите за атомска емисиона спектроскопија се слични по конструкција со инструментите што се користат за атомска апсорпција. Всушност, повеќето пламени атомски апсорпциони спектрометри лесно може да се адаптираат да работат и како атомски емисиони спектрометри со исклучување на ламбата со шуплива катода и со мерење на разликата меѓу интензитетот на зрачењето емитирано при всмукување на примерокот и зрачењето емитирано при всмукување на слепата проба. Сепак, повеќето атомски емисиони спектрометри се наменски инструменти конструирани така што да ги искористат специфичните карактеристики на атомската емисија, вклучувајќи ги и примената на плазма, лак, искра и ласер како извори за атомизација и за екситација, и имаат извонредни можности за мултиелементна анализа.

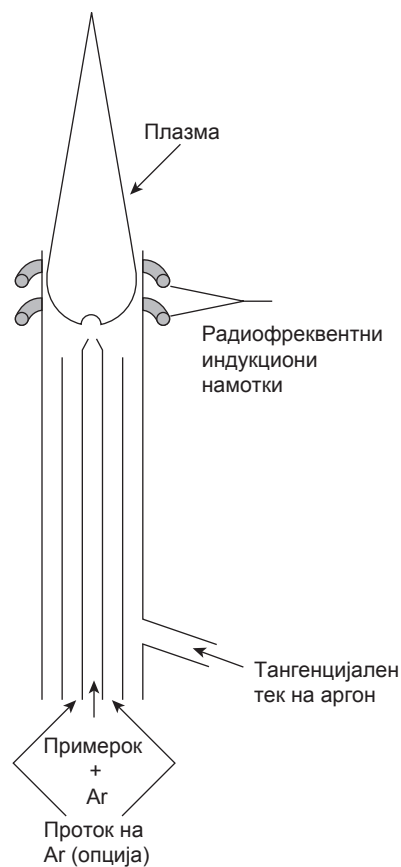
Атомизација и екситација За примена на атомската емисија, потребни се соодветни начини за преведување на аналитот од цврста или течна (растворена) форма во форма на слободни гасни атоми. Истите извори на термичка енергија обично служат и како извори за екситација. Најчесто се користат пламен и плазма, при што и двата извори се користат за течни примероци или за раствори. Цврсти примероци може да се анализираат по растворање во соодветен растворувач и со последователна примена на пламен или плазма за атомизација.

Извори на пламен Атомизацијата и екситацијата во пламена атомска емисија се реализира со примена на распрскувач и спреј-комора какви што се користат и во атомската апсорпција (слика 10.38). Главата на брениерот се состои од еден или повеќе тесни отвори, или, пак, се користи Мекеров тип на брениер. Постарите атомски емисиони инструменти често користат брениери во кои примеркот се внесува преку капиларна цевка директно во пламен.

Извори на плазма Плазмата се состои од врел, делумно јонизиран гас којшто содржи катјони и електрони во релативно високи концентрации, коишто плазмата ја прават проводник. Плазми што се користат во атомската емисија се формираат со јонизирање на струја од аргон, при што настануваат јони на аргон и електрони. Високата температура на плазмата е резултат на загревањето предизвикано од отпорот при движењето на електроните и на јоните на аргон. Бидејќи температурата на плазмата е многу повисока од температурата на обичен пламен, таа овозможува подобра атомизација и повисока популација на екситираните состојби. Покрај неутрални атоми, поради повисоките температури, плазмата создава и јони на аналитот. Шематски дијаграм на пламеник за индуктивно спрегната плазма (inductively coupled plasma, ICP) е прикажан на слика 10.49. Пламеникот се состои од три концентрично поставени кварцни цевки, обвиткани при врвот со радиофреквентни намотки. Примерокот се меша со струја на аргон со помош на распрснувач и спреј-комора слични на оние што се користат во пламената емисија, и се спроведува до плазмата преку централната цевка на пламеникот. Плазмата започнува да се образува користејќи искра од Теслината намотка. Променива радиофреквентна струја во индукционите намотки создава пулсирачко магнетно поле коешто предизвикува создавање јони на аргон и на електрони, коишто се движат по кружни патеки. Отпорот што се јавува поради судирите меѓу овие честички и нејонизирани атоми доведуваат до загревање на гасот до температури до 10.000 K при основата на плазмата, и меѓу 6.000 и 8.000 K на височина од 15-20 mm над намотките, каде што, инаку, најчесто се мери емисијата. Поради вака високите температури, надворешната кварцна цевка мора да биде термички изолирана од плазмата. Тоа се постигнува со тангенцијален проток на аргон, како што е прикажано на шематскиот дијаграм.

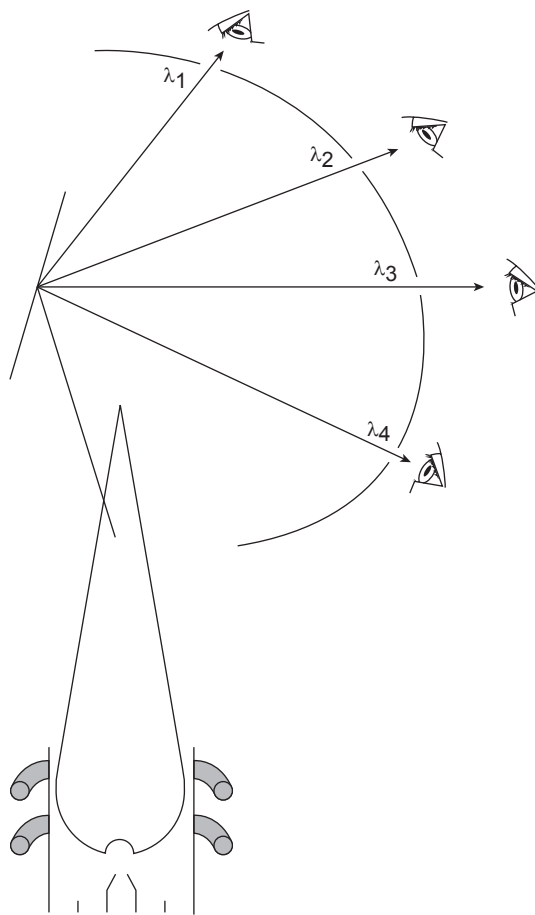
плазма

Врел, јонизиран гас што избилува со јони и електрони.



Слика 10.49

Дијаграм на пламеник за индуктивно спрегната плазма.

**Слика 10.50**

Шематски дијаграм на мултиканалски атомски емисионен спектрометар, на кој е прикажана поставеноста на излезните процепи и детекторите за симултана анализа на неколку елементи.

Мултиелементна анализа Атомската емисиона спектроскопија е идеална метода за мултиелементна анализа, бидејќи сите аналити во примерокот се ексцитираат истовремено. Скенирачкиот монохроматор може да се програмира така што да се движи брзо до избраната бранова должина на определен аналит, да се задржи извесно време додека се изврши мерењето на интензитетот на емисијата пред да се придвижи до брановата должина на следниот аналит. На ваков начин може да се анализираат три до четири аналити во минута.

Друг приод кон мултиелементна анализа е користење мултиканални инструменти, коишто овозможуваат истовремено мерење на голем број аналити. Едноставен мултиканален спектрометар се состои од стандардна дифракциона решетка и 48-60 одвоени процепи и детектори поставени полукружно околу дифракционата решетка на положби соодветни на избраните бранови должини (слика 10.50).

10Ж.3 Примена во квантитативни анализи

Атомската емисија се користи за анализи на ист вид примероци какви што се анализираат и со атомската апсорпција. При развојот на квантитативна атомска емисиона метода треба да се земат предвид неколку фактори, вклучувајќи избор на извор на атомизација и екситација, избор на бранова должина и ширина на процеп, подготовка на примероците за анализа, сведување на минимум на спектралните и на хемиските интерференции и избор на метода за стандардизација.

Избор на извор за атомизација и за екситација Освен за алкалните метали, границите на детекција при користење индуктивно спрегната плазма, се значително подобри од оние што се добиваат со пламена емисија (табела 1.14). Плазмата, исто така, е помалку подложна на спектрални и на хемиски интерференции. Од наведените причини, емисионите извори со плазма се добро решение.

Избор на бранова должина и на ширина на процеп

Изборот на бранова должина е поврзан со потребната осетливост и ослободувањето од интерференции што потекнуваат од неразделени емисиони линии од другите конституенти во примерокот. Бидејќи атомските емисиони спектри обично имаат множество емисиони линии, особено кога се користи високотемпературна плазма како извор, неизбежно доаѓа до препокривање на спектралните линии. На пр., анализата на Ni на атомска емисиона линија на 349,30 nm е усложнета поради атомската емисиона линија на Fe на 349,06 nm. Потесен процеп овозможува подобра резолуција. Најлесен приод при изборот на погодна бранова должина е да се добие емисионен спектар за примерокот, а потоа да се бара емисиона линија за аналитот којашто дава интензивен сигнал и е одвоена од другите емисиони линии.

Подготовка на примероците Пламенот и плазмата како извори се најдобри за анализа на примероци во растворена или во течна форма. Макар што цврсти материјали може да се анализираат директно со внесување во пламен или во плазма, тие обично прво се преведуваат во раствор преку разложување или екстракција.

Минимизирање на спектралните интерференции

Најважна спектрална интерференција е континуирираниот извор на емисија на фонот од пламенот или од плазмата и емисионите ленти на молекулските хемиски видови. Оваа емисија на фонот е особено сериозна за пламени на кои температурата е недоволно висока за да ги разложи тешко топливите соединенија, како, на пр., оксидите и хидроксидите. Корекција на фонот за пламената емисија се врши со скенирање на емисионата линија и цртање на базната линија (слика10.51). Бидејќи температурата на плазмата е многу повисока, интерференциите на фонот поради молекулската

Табела 10.14

Границии на детекција за атомска емисија за избрани елементи

Границии на детекција (ppb)		
Извор на атомизација и екситација		
Елемент	Пламен	Индуктивно сврзана плазма
Ag	2	0,2
Al	3	0,2
As	2000	2
Au	500	0,9
B	50	0,1
Ba	1	0,01
Be	100	0,003
Bi	1000	10
Ca	0,1	0,0001
Cd	300	0,07
Co	5	0,1
Cr	1	0,08
Cs	0,02	-
Fe	10	0,09
Ga	5	0,6
Ge	400	0,5
Hg	150	1
K	0,01	30
Li	0,001	0,02
Mg	1	0,003
Mn	1	0,01
Mo	10	0,2
Na	0,01	0,1
Ni	10	0,2
Pb	0,2	1
Pd	40	2
Pt	2000	0,9
Sb	100	10
Se	-	1
Si	-	2
Sn	100	3
Sr	0,1	0,002
Ti	30	0,03
V	7	0,06
Zn	1000	0,1

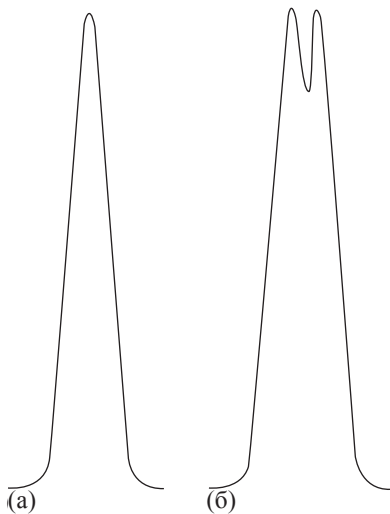
Извор: Parsons, M.L., Major, S., Forster, A.R., *App. Spectrosc.* **1983**, 37, 411-418.

самоапсорпција

Во атомската емисија, намалување на интензитетот на емисијата кога светлината емитирана од атоми во ексцитирана состојба во центарот на пламенот или на плазмата се апсорбира од страна на атомите во надворешните делови од пламенот, односно плазмата.

**Слика 10.51**

Метода за корекција на фонот во пламена атомска емисија.

**Слика 10.52**

Атомска емисиона линија при (а) ниска концентрација на аналитот, и (б) при висока концентрација на аналитот, на која се забележува влијанието на самоапсорпцијата.

емисија се помалку проблематични. Емисијата од јадрото на плазмата е силна но е занемарлива на висина од 10-30 mm над јадрото, каде што вообичаено се вршат мерењата.

Минимизирање на хемиските интерференции Емисијата од пламен е подложна на истите видови хемиски интерференции како и атомската апсорпција. Тие интерференции се минимизираат со подесување на составот на пламенот и со додавање заштитни реагенси, реагенси за ослободување, како и придушувачи на јонизацијата. Една специфична хемиска интерференција е **самоапсорпцијата**. Бидејќи температурата на пламенот е поголема во неговиот центар, концентрацијата на атомите на аналитот во ексцитирана состојба е поголема во централната зона одошто во надворешната. Ако еден атом во ексцитирана состојба во центарот на пламенот емитира зрачење при враќањето во основна состојба, атомите од надворешните, постудени зони на пламенот, што се наоѓаат во основна состојба, може да го апсорбираат тоа зрачење, ослабувајќи го така неговиот интензитет. При високи концентрации на аналитот, самоапсорпцијата може да се регистрира преку спуштање на центарот на емисионата лента (слика 10.52).

Хемиските интерференции со плазма како извор, општо земено, се занемарливи. Високата температура на плазмата го ограничува формирањето на неиспарливи хемиски видови. На пр., при пламена емисија, присуството на PO_4^{3-} во раствор во кој се анализира Ca^{2+} пројавува изразита интерференција, но при примена на плазма, неговото влијание е занемарливо. Освен тоа, високи концентрации на електрони од јонизацијата на аргонот го минимизира влијанието на јонизационата интерференција.

Стандардизирање на метода Равенката 10.34 покажува дека интензитетот на емисијата е пропорционален со популацијата на ексцитираната состојба, N^* , од која потекнува емисионата линија. Ако изворот на емисија е во термичка рамнотежа, популацијата во ексцитираната состојба е пропорционална на вкупната популација на атомите на аналитот, N , преку Болцмановата распределба (равенка 10.35).

Калибрационите криви за пламена емисиона спектрометрија се, општо земено, линеарни во интервал од два до три реда на големина, при што хемиските интерференции што потекнуваат од јонизацијата ја ограничуваат линеарноста за ниските концентрации на аналитот, а самоапсорпцијата ја ограничува линеарноста за повисоките концентрации на аналитот. Пламени извори, кај коишто хемиските интерференции се помалку изразени, често даваат калибрациони криви коишто се линеарни во четири до пет реда големини, и главно не претрпува промени под влијание на матрицата на стандардите.

Квантитативните анализи најдобро се изведуваат со примена на надворешни стандарди. Емисионите интензитети, меѓутоа зависат од голем број параметри, вклучувајќи ја температурата на изворот за ексцитација и ефикасноста на атомизацијата. Зголемувањето на температурата за 10 K, на пр., резултира со 4 % промена во уделот на атомите на Na во $3p$ ексцитираната состојба. Методата со внатрешни стандарди може да се користи кога варијациите на параметрите на изворот тешко може да се контролираат. Во таков случај, се избира внатрешен стандард што има линии блиски на линиите на аналитот, за компензирање на влијанијата предизвикани од промените на температурата на изворот за ексцитација. Освен тоа, внатрешниот стандард треба да биде подложен на истите хемиски интерференции, за да се компензираат промените во ефикасноста на атомизацијата. За поточно компензирање на овие грешки, емисионите линии на аналитот и на внатрешниот стандард мора да се следат истовремено. Исто така, може да се користи и методата на стандардни додатоци.

Метода 10.4 Определување на хинин во урина²³

Опис на методиката. Средства за замена на готварската сол, што се користат во диети со ниска содржина на натриум, содржат KCl. Во зависност од производителот, препаратот може да содржи фумарна киселина, калциум хидроген фосфат или калиум тартрат. Концентрацијата на натриумот во препарат за замена на сол изнесува, просечно, околу 100 ppm. Концентрацијата на натриумот се одредува лесно со пламена атомска емисија. Бидејќи е тешко да се усогласи матрицата на стандардот со матрицата на примерокот, анализата се изведува со метода на стандардни додатоци.

Посийајка. Примерокот се подготвува со растворање на приближно 10 g препарат во 10 mL 3M HCl и 100 mL дестилирана вода. По растворањето на примерокот, растворот се пренесува во волуметриска колба од 250 mL и се разредува до ознаката со дестилирана вода. Серијата стандардни додатоци се подготвува со пренесување на порции од 25 mL од разредениот примерок во одделни волуметриски колби од 50 mL, по што во секоја колба се додава познато количество од стандарден раствор на Na⁺ со приближно 10 ppm, и дополнување на колби со дестилирана вода. По подесувањето на отчитувањето на инструментот на вредност нула со соодветна слепа проба, инструментот се оптимизира на бранова должина 589,0 nm со стандарден раствор на Na⁺. Емисионите интензитети се мерат за секој примерок со стандардниот додаток, а концентрацијата на Na⁺ во препаратот се прикажува во ppm.

Прашања

1. Кој вид хемиска интерференција ја условува примената на методата на стандардни додатоци?

Калиумот полесно се јонизира од натриумот. Високи концентрации на калиум во примерокот ја попречуваат јонизацијата на натриумот. Се зголемува неговата емисија во однос на стандардот со еднаква концентрација на натриум, но којшто не содржи калиум.

2. Зошто не се препрачува прилагодување на матрицата на стандардот кон матрицата на примерокот, со додавање на KCl на секој стандард?

Натриумот е општ контаминент во голем број хемикалии. KCl, со чистота на реагенс, може да содржи и до 40-50 ppm натриум. Тоа е значаен извор на натриум, имајќи предвид дека неговата концентрација во препаратите за замена на сол изнесува околу 100 ppm.

3. Еден од проблемите при анализа на примероци сол е што имаат склоност да го блокираат аспираторот на брениерскиот систем. Какво влијание ќе има тоа врз анализата?

Блокирањето на аспираторот во брениерскиот систем ја намалува брзината на всмукувањето, намалувајќи ја со тоа концентрацијата на анализитот во пламенот. Како резултат на тоа, доаѓа до намалување на сигналот и внесување на определена грешка.

4. При анализа на 1,0077 g примерок на препарат за замена на сол, со примена на опишаната метода, се добиени следниве резултати:

Концентрација на додаден натриум (ppm)	Емисија
0,000	1,79
0,420	2,63
1,051	3,54
2,102	4,94
3,153	6,18

Која е концентрацијата на натриумот, во ppm, во препаратот?

Калибрационата крива за стандардни додатоци, со емисија во однос на концентрацијата на додадениот натриум, дава равенка на линеарна регресија,

$$I = 1,97 + 1,37 \cdot (\text{ppm Na})$$

Концентрацијата на натриумот во примероците со стандардни додатоци зависи од *ајсолутијата* вредност на x-отсечката (в. слика 5.76); така, со замена на *I* (интензитетот на емисијата) со вредност нула, се добива концентрација на натриум од 1,44 ppm. Концентрацијата на натриумот во препаратот изнесува

$$\frac{(1,44 \mu\text{g Na}^+ / \text{mL solution}) \times (50,00 \text{ mL} / 25,00 \text{ mL}) \times 250,0 \text{ mL}}{10,0077 \text{ g}} = 71,9 \text{ ppm Na}^+$$

10Ж.4 Оценка

Опсег на примена Атомската емисија е идеална метода за директна анализа на аналити присутни во траги и во ултратраги во примероци со голема и со средна маса. Со соодветно разредување, атомската емисија може да се примени и за аналити присутни во макро и семимикро количества.

Точност Во случај спектралните и хемиските интерференции да се занемарливи, атомската емисија дава квантитативни резултати со точност од 1-5 %. Точноста на пламената емисија е често ограничена со хемиски интерференции. Бидејќи повисоките температури на изворите со плазма даваат побројни емисиони линии, точноста при примената на плазмена емисија е често ограничена со фонско зрачење предизвикано со препокривање на емисионите линии.

Прецизност За примероци и стандарди во кои концентрацијата на аналитот ја надминува границата на детекција за фактор од најмалку 50, релативната стандардна девијација за пламена и плазмена емисија изнесува околу 1-5%. Веројатно најважниот фактор што влијае врз прецизноста е стабилноста на температурата на пламенот или на плазмата. На пр., при температура на пламенот од 2500 K, флукуациите од $\pm 2,5$ K даваат релативна стандардна девијација за интензитетот на емисијата од 1 %. Значително подобрување на прецизноста може да се постигне со примена на внатрешни стандарди.

Осетливост Осетливоста на пламената атомска емисија во голема мера зависи од температурата на изворот за екситација и од составот на матрицата на примерокот. Обично, осетливоста може да се оптимизира со всмукување на стандарден раствор и подесување на составот и висината на пламенот сè додека не се добие максимален интензитет на емисијата. Хемиските интерференции, доколку се присутни, ја намалуваат осетливоста на анализата. Кај плазмена емисија, осетливоста во помала мера зависи од матрицата на примерокот. Во некои случаи, на пр., калибрационите криви за плазмена емисија, конструирани со примена на стандарди со матрица од дестилирана вода, може да се користат за анализа на примероци со многу посложена матрица.

Селективност Селективноста во атомската емисија е слична со селективноста во атомската апсорпција. Атомската емисија има дополнителни предности од аспект на брзи, поедини или истовремени анализи.

Време, цена и опрема Бројот на примероци што може да се анализираат за единица време во атомската емисија е мошне голем, кога се користат автоматизирани системи за мултиелементна анализа. На пример, со примена на симултан спектрометар со индуктивно сврзана плазма, постигнати се 3000 определувања на час, односно 300 определувања со секвенцијален спектрометар. Пламена емисија често се изведува и со атомски апсорпционен спектрометар, чија типична цена изнесува 10.000 – 50.000 \$. Секвенцијални спектрометри со индуктивно спрегната плазма чинат 55.000 до 150.000 \$, додека цената на симултаните спектрометри достигнува вредност од 80.000 до 200.000 \$. Комбинирани спектрометри со плазма што можат да работат во двата режима – симултан и секвенцијален – чинат 150.000 до 300.000 \$. Цената на аргонот, што знатно се троши при анализата, не може да се занемари кога се проценува чинењето на анализата со спектрометар со индуктивно спрегната плазма.

10.3 Спектроскопија заснована на расејување

Сината боја на небото во текот на денот и црвената боја на Сонцето при залез се резултат на расејување на светлината низ мали честички прав, молекули вода и другите гасови во атмосферата. Ефикасноста на расејувањето на светлината зависи од нејзината бранова должина. Небото е сино затоа што виолетовата и сината боја се расејуваат во поголем степен во споредба со другите, подолги бранови должини на светлината. Од иста причина, Сонцето изгледа црвено кога се набљудува на залез, бидејќи црвената светлина послабо се расејува и, затоа, минува низ атмосферата во поголем степен во споредба со другите бранови должини на светлината. Проучувањето на расејувањето на зрачењето започнало при крајот на 19 век, а наскоро започнале и првите примени од овие проучувања. Првите квантитативни примени на расејувањето, коишто датираат од почетокот на 20 век, користеле еластично расејување на светлината за определување на концентрацијата на колоидни честички во суспензиите.

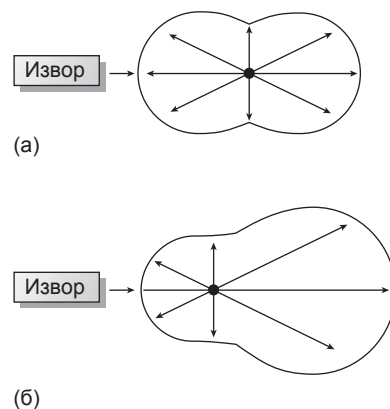
10.3.1 Извори на расејување

Фокусиран, монохроматски сноп на зраци со бранова должина λ , при минување низ средина што содржи честички чии најголеми димензии се помали од $3/2 \lambda$, се расејува во сите насоки. На пример, видлива светлина од 500 nm се расејува на честички со големина до 750 nm. На поголеми честички, зрачењето може да претрпи и рефлексија или рефракција. Општо земено, се разликуваат две категории расејување. При еластичното расејување, зрачењето се апсорбира од страна на аналитот и се реемитира без промена на неговата енергија. Кога зрачењето се реемитира со променета енергија, за расејувањето се вели дека е нееластично. Во овој текст се разгледува само еластичното расејување.

Еластичното расејување се дели на два вида: Рејлиево, или расејување на мали честички, и расејување на големи честички. Рејлиево расејување се јавува кога најголемата димензија на честичките е помала од 5 % од брановата должина на зрачењето. Интензитетот на расеаното зрачење е рамномерно распределен (слика 10.53a) и е пропорционален со четвртиот степен од неговата фреквенција (ν^4), така што најголемо расејување покажува сината светлина, а најмало црвената. За поголеми честички, распределбата на расеаната светлина расте во насоката на движењето на светлината, а опаѓа во спротивната насока, како резултат на конструктивна и деструктивна интерференција (слика 10.53b).

10.3.2 Турбидиметрија и нефелометрија

Турбидиметријата и нефелометријата се две сродни техники во кои упадното зрачење еластично се расејува низ суспензија на колоидни честички. Во **турбидиметријата**, детекторот е поставен во иста линија со изворот на зрачењето и

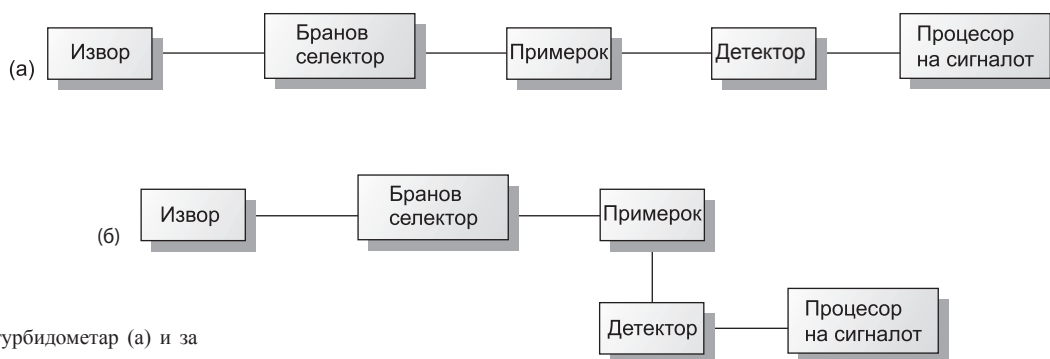


Слика 10.53

Распределба на зрачењето при Рејлиево расејување (a) и при расејување на големи честички (b).

турбидиметрија

Метода со која се мери намалувањето на интензитетот на пропуштено зрачење како резултат на расејување.

**Слика 10.54**

Блок-дијаграм за турбидометар (а) и за нефелометар (б).

нефелометрија

Метода со која интензитетот на расеаното зрачење се мери под агол од 90° во однос на изворот

го мери намалувањето на моќноста на пропуштеното зрачење. Во **нефелометријата**, расеаното зрачење се мери под агол од 90° во однос на изворот на зрачењето. Сличноста во мерењето на апсорбанцата во турбидиметријата со мерењето на флуоресценцијата во нефелометријата е евидентна од блок-дијаграмот прикажан на слика 10.54. Всушност, турбидиметријата може да се мери користејќи UV/видлив спектрофотометар, додека, пак, за нефелометрија е погоден спектрофлуорометар.

Споредба меѓу турбидиметрија и нефелометрија Два главни фактора одлучуваат во изборот на турбидиметрија или нефелометрија. Најважниот елемент што треба да се земе предвид е интензитетот на пропуштеното или на расеаното зрачење во споредба со интензитетот на зрачењето од изворот. Кога растворот содржи мали концентрации на честички коишто се причина за расејувањето, интензитетот на пропуштеното зрачење, I_T , ќе има слична вредност со интензитетот на изворот на зрачењето, I_0 . Како што беше покажано во секцијата за молекулската апсорпција, определувањето на мали разлики меѓу два интензивни сигнали е мошне несигурно. Така, нефелометријата е поприфатлива за примероци што содржат мало количество честички. Од друга страна, турбидиметријата е подобар избор за примероци со висока концентрација на честички.

Вториот елемент што треба да се земе предвид при избор меѓу турбидиметрија и нефелометрија е големината на честичките коишто се причина за расејување. За нефелометриски мерења, интензитетот на расеаното зрачење на 90° ќе биде поголем ако честичките се доволно мали за да превладува Рејлиево расејување. За поголеми честички, како што е покажано на слика 10.53, интензитетот на расеаното зрачење е помал за насоката од 90° . Кога се користи извор на ултравиолетово или на видливо зрачење, оптимална големина на честичките изнесува 0,1 до 1 μm . Големината на честичките што учествуваат во расејувањето е од помала важност за турбидиметријата, во која сигналот претставува релативно намалување на пропуштеното зрачење. Всушност, турбидиметриските мерења се можни дури и во случај кога големината на честичките е причина за зголемување на рефраксијата и на рефракцијата (макар што притоа може да дојде до нарушување на линеарниот однос меѓу сигналот и концентрацијата на честичките).

Определување концентрација со турбидиметрија Во турбидиметријата, измерената трансмитанца, T , претставува однос помеѓу интензитетот на пропуштеното зрачење од изворот, I_T , и интензитетот на изворот на зрачењето пропуштено низ слепа проба, I_0 .

$$T = \frac{I_T}{I_0}$$

Односот на трансмитанцата и концентрацијата на честичките коишто учествуваат во расејувањето е сличен на односот даден со Беровиот закон

$$-\log T = kbC \quad 10.36$$

каде C е концентрација на честичките што учествуваат во расејувањето, изразена во единица маса на единица волумен, (w/v) , b е должината на оптичкиот пат, а k е константа којашто зависи од неколку фактори, меѓу кои се и големината и формата на честичките и брановата должина на зрачењето од изворот. Како и Беровиот закон, и равенката 10.36 може да покаже значителни отстапувања од линеарноста. Точниот однос се утврдува од калибрациона крива конструирана со серија стандарди со позната концентрација.

Определување на концентрација со нефелометрија Во нефелометријата, односот меѓу интензитетот на расеаното зрачење, I_S , и концентрацијата на честичките коишто учествуваат во расејувањето, (w/v) , е даден со изразот

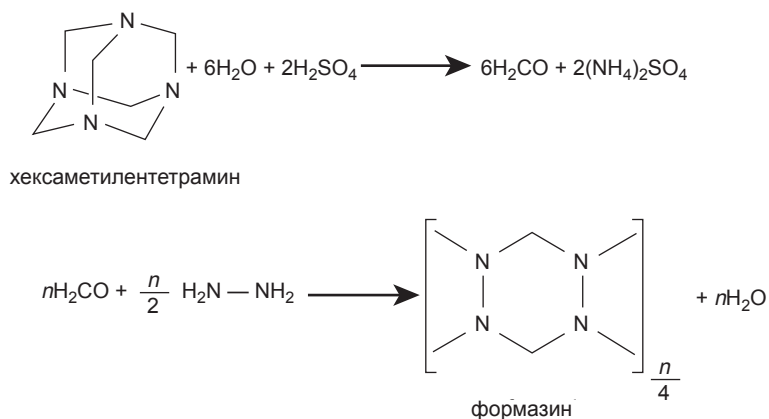
$$I_S = k_S I_0 C \quad 10.37$$

каде k_S е емпириска константа за даден систем, а I_0 е интензитетот на упадното зрачење од изворот. Вредноста на k_S се утврдува од калибрациона крива конструирана со серија стандарди со позната концентрација.

Избор на бранова должина на упадното зрачење Изборот на брановата должина на упадното зрачење се темели главно на потребата од намалување на потенцијалните интерференции. Во турбидиметријата, во која упадното зрачење се пропушта низ примерокот, треба да се спречи апсорпцијата на зрачењето од страна на примерокот. Бидејќи апсорпцијата претставува чест проблем, на изборот на бранова должина мора да му се посвети соодветна грижа, користејќи филтер или монохроматор за селекција на бранова должина. Апсорпцијата на упадното зрачење не претставува проблем во нефелометријата, освен во случај кога таа предизвикува флуоресценција на примерокот. За нефлуоресцентни примероци нема потреба од избор на бранова должина, па за упадно зрачење може да се користи и белата светлина. Ако се користи филтер или монохроматор, потребно е да се провери зависноста на интензитетот на расејувањето, осетливоста на конверторот, како и интензитетот на изворот од брановата должина. На пр., голем број вообичаени конвертори на фотони се поосетливи на зрачење со $\lambda = 400 \text{ nm}$, одошто на зрачење со $\lambda = 600 \text{ nm}$.

Подготовка на примерок Макар што равенките 10.36 и 10.37 ги поврзуваат расејувањето и концентрацијата на честичките, интензитетот на расеаното зрачење во голема мера зависи и од големината и од формата на честичките коишто учествуваат во расејувањето. На пр., примероци со ист број честички можат да покажат значителна разлика на вредностите за $-\log T$ или I_S во зависност од средниот дијаметар на честичките. За квантитативни анализи е потребно да се одржува рамномерна распределба на големината на зрната како во рамките на примерокот, така и помеѓу примерокот и стандардите.

Повеќето турбидиметриски и нефелометриски методи се применуваат на честички што се формирани со таложение. Како што е покажано во дискусијата за таложната гравиметрија (поглавје 8), својствата на талогот се определени со условите избрани за таложение. За да се задржи репродуцибилна распределбата на големината на честичките на примерокот и на стандардите, потребна е контрола на сите параметри, како што се концентрацијата на реагенсот, редоследот на додавањето на реагенсите, рН, температурата, брзината на мешањето, јонската сила и времето меѓу почетното формирање на честичките и мерењето на трансмитанцата или на расејувањето. Во голем број случаи се додаваат површинско-активни реагенси, како што се глицерин, желатин или декстрин, за стабилизирање на талозите во колоидна состојба и за спречување на коагулација на честичките.

**Слика 10.55**

Шема на синтезата на формазин

Примена Турбидиметријата и нефелометријата наоѓаат широка примена за определување на бистрината на вода, на напитки и на прехранбени производи. На пр., турбидитетот на водата се определува со примена на нефелометрија, со споредување на расејувањата на примерокот и на стандардите. Примарен стандард за мерење турбидитет е формазин (слика 10.55), којшто лесно се подготвува и формира стабилна полимерна суспензија.²⁶ Формазинот се подготвува со мешање на 100 mL раствор што содржи 1 g хидразин сулфат, N₂H₄·H₂SO₄, со 100 mL раствор што содржи 10 g хексаметиленetetрамин, при што се добива суспензија што има 4000 нефелометриски единици турбидитет (НЕТ). За конструкција на калибрационен дијаграм се користи серија стандарди со НЕТ од 0 до 40. Оваа метода лесно се прилагодува за анализа на бистрина на сок од портокал, на пиво и јаворов сируп.

Голем број неоргански катјони и ањони може да се определат, по нивното таложување при добро дефинирани услови и мерење на трансмитанцата или рефлексијата на исталожените честички. Трансмитанцата, односно расејувањето, како што се гледа од равенките 10.36 или 10.37, се пропорционални со концентрацијата на честичките коишто, од своја страна, се поврзани стехиометриски, преку таложната реакција, со концентрацијата на аналитот. Примери на аналити што се определуваат на овој начин, се дадени во табела 10.15. Турбидиметриското определување на SO₄²⁻, по нивно таложување како BaSO₄, е опишано во методата 10.5.

Табела 10.15**Примери на талози што се користат во турбидиметриски и нефелометриски методи**

Аналит	Таложен реагенс	Талог
Ag ⁺	NaCl	AgCl
Ca ²⁺	Na ₂ C ₂ O ₄	Ca ₂ C ₂ O ₄
Cl ⁻	AgNO ₃	AgCl
CN ⁻	AgNO ₃	AgCN
CO ₃ ²⁻	BaCl ₂	BaCO ₃
F ⁻	CaCl ₂	CaF ₂
SO ₄ ²⁻	BaCl ₂	BaSO ₄

Метода 10.5 Турбидиметриско определување на сулфати во вода²⁷

Опис на методот Со додавање на BaCl_2 на закиселен раствор на примерок, SO_4^{2-} се таложува како BaSO_4 . Концентрацијата на SO_4^{2-} може да се определи турбидиметриски или нефелометриски, користејќи извор на зрачење со бранова должина од 420 nm. За стандардизација на методата, се користи стандарден раствор со позната концентрација на SO_4^{2-} .

Поступок 100 mL примерок се пренесува во ерленмаерка и се додава 5,00 mL реагенс за подесување. Составот на реагенсот за подесување е: 50 mL глицерол, 30 mL конц. HCl, 300 mL дестилирана вода, 100 mL 95 % етанол или изопропил алкохол, и 75 g NaCl. Примерокот со реагенсот за подесување се става на магнетна мешалка, којашто треба да е со иста брзина на вртежи како за примероците, така и за стандардите. Се додава порција BaCl_2 со мерно лажиче, чиј капацитет е 0,2 – 0,3 mL, со кој се таложува SO_4^{2-} како BaSO_4 . По додавањето на BaCl_2 , растворот се меша точно 1 минута. По истекот на предвиденото време за мешање, дел од суспензијата се префрла во кивета, во турбидиметар или нефелометар. Интензитетот на трансмитанцата или на расејувањето се мери во интервали од 30 s во тек на 4 минути. Минималната трансмитанца или максималното расејување регистрирано во тој период претставува аналитички сигнал. Калибрациона крива за интервал од 0 до 40 ppm SO_4^{2-} се конструира со раствори добиени со разредување на стандарден раствор со 100 ppm SO_4^{2-} . Стандардите и слепата проба мора да се третираат на ист начин како и примероците.

Прашања**1. Која е улогата на реагенсот за подесување?**

Реагенсот за подесување се користи за стабилизирање на талогот на BaSO_4 . Високата јонска сила и киселоста, како резултат на присутните NaCl и HCl, спречуваат формирање микрочестички од BaSO_4 , а глицеролот и алкохолот помагаат да се стабилизира суспензијата на талогот.

2. Зошто е важно да се користат иста брзина и време на мешање за примероците и за стандардите?

Брзината и времето на мешање влијаат на големината на исталожените честички, како и на нивната суспензија во растворот.

3. Со турбидиметриска анализа, за серија стандардни раствори на SO_4^{2-} , користејќи ја погоре опишаната постапка, се добиени следниве резултати:

ppm SO_4^{2-}	Трансмитанца (T)
0,00	1,00
10,00	0,646
20,00	0,417
30,00	0,269
40,00	0,174

При анализа на примерок површинска вода, според опишаната постапка, добиена е трансмитанца 0,538. Колкава е концентрацијата на сулфати во примерокот?

Калибрациона крива на $-\log(T)$ во однос на концентрацијата ја дава равенката за стандардизација

$$-\log(T) = -1,04 \cdot 10^{-5} + 0,0190 \text{ (ppm } \text{SO}_4^{2-}\text{)}$$

Со замена на вредноста за трансмитанцата на примерокот во равенката за стандардизација, се добива вредност 14,2 ppm за концентрацијата на сулфатите во примерокот.



10S КЛУЧНИ ТЕРМИНИ

апсорбанца (с. 373)	конвертор (с. 379)	самоапсорпција (с. 438)
апсорпционен спектар (с. 373)	континуиран спектар (с. 375)	сингулетна ексцитирана состојба (с. 423)
атомизација (с. 412)	корекција на фонот (с. 419)	спектрофлуорометар (с. 428)
Беров закон (с. 386)	линиски извор (с. 375)	спектрофотометар (с. 389)
бранов број (с. 370)	метода на континуирани варијации (с. 404)	супресор на јонизација (с. 420)
бранова должина (с. 370)	метода на молски односи (с. 406)	темна струја (с. 379)
вибрациона релаксација (с. 424)	метода на однос на коефициенти на правец (с. 407)	трансмитанца (с. 384)
внатрешен премин (с. 425)	моќност (с. 371)	триплетна ексцитирана состојба (с. 423)
внатрешна конверзија (с. 425)	монокроматор (с. 376)	турбидиметрија (с. 441)
време на егзистирање (с. 423)	монокроматско (с. 377)	усреднување на сигналот (с. 391)
графитна печка (с. 414)	неконтролирано зрачење (с. 387)	филтер (с. 376)
надворешна конверзија (с. 425)	нефелометрија (с. 442)	филтер-фотометар (с. 388)
екситационен спектар (с. 427)	номинална бранова должина (с. 376)	флуоресценција (с. 423)
електромагнетен спектар (с. 372)	однос сигнал-шум (с. 379)	флуорометар (с. 428)
емисија (с. 373)	ослободувачки реагенс (с. 420)	фосфоресценција (с. 424)
емисионен спектар (с. 374)	плазма (с. 435)	фотодиодна низа (с. 379)
ефективна ширина на лента (с. 376)	полихроматско (с. 377)	фотолуминесценција (с. 374)
заштитен реагенс (с. 420)	пребарување на спектри (с. 403)	фотон (с. 371)
интензитет (с. 371)	процесор на сигналот (с. 380)	фреквенција (с. 370)
интерферометар (с. 378)	резолюција (с. 376)	хемилуминесценција (с. 374)
карактеристична концентрација (с. 416)	релаксација (с. 423)	хромофор (с. 382)
квантен принос (с. 425)		



10И ПРЕГЛЕД

Спектроскопските методи на анализа, опфатени во оваа поглавје, се темелат на апсорпција, на емисија или на расејување на електромагнетното зрачење. Кога молекула апсорбира UV/видливо зрачење, претрпува промени во конфигурацијата на валентниот слој, додека, пак, апсорпцијата на инфрацрвено зрачење доведува до промени на вибрационата енергија. Експериментално, се мери делот на зрачењето (T) пропуштено низ примерокот. За инструменти за молекулска апсорпција е потребен извор на електромагнетно зрачење, уред за селекција на бранова должина на која се мери трансмитанцата, како и детектор за мерење на трансмитанцата. Беровиот закон ја поврзува апсорбанцата како со трансмитанцата, така и со концентрацијата на хемискиот вид што учествува во апсорпцијата ($A = -\log T = \epsilon bC$).

Во атомската апсорпција се мери апсорпцијата на зрачењето на атоми на аналити во гасна состојба. Примерокот се атомизира со помош на термичка енергија, во пламен или во графитна печка. Бидејќи ширината на атомските апсорпциони ленти е мала, не може да се користат извори на континуирано зрачење што се користат во молекулската апсорпција. Затоа се користат ламби со шуплива катода, коишто претставуваат линиски извори на зрачење. Атомската апсорпција е подложна на бројни спектрални и хемиски интерференции. Апсорпцијата или расејувањето од страна на матрицата на примерокот е сериозна интерференција, којашто може да се минимизира со корекција на фонот. Хемиските интерференции вклучуваат формирање неиспарливи форми на аналитот во пламенот и јонизација на

аналитот. Првата интерференција се минимизира со примена на реагенси за ослободување или со заштитни реагенси, а спречувачи на јонизацијата помагаат за намалување на јонизацијата како причина за интерференција.

Кога молекула апсорбира зрачење, таа поминува од состојба со пониска енергија во состојба со повисока енергија. При враќањето во состојба со пониска енергија, молекулата може да емитира зрачење. Процесот е наречен фотолуминесценција. Една форма на фотолуминесценцијата е флуоресценцијата, при која аналитот емитира фотон без да претрпи промена на спинската состојба. Во фосфоресценцијата, при емисија доаѓа до промена на спинската состојба на аналитот. За ниски концентрации на аналитот, интензитетите на флуоресцентната и на фосфоресцентната емисија се линеарно зависни од концентрацијата на аналитот. Термички ексцитираните атоми исто така емитираат зрачење, создавајќи ја, со тоа, основата на атомската емисиона спектроскопија. Термичката ексцитација се постигнува со примена на пламен или на плазма.

Спектроскопските мерења може, исто така, да опфатат и расејување на светлината од аналити во форма на честички. Во турбидиметријата се мери намалувањето на трансмитанцата на зрачењето при негово минување низ примерок, коешто е поврзано со концентрацијата на аналитот преку Беровиот закон. Во нефелометријата, се мери интензитетот на расеаното зрачење, којшто се менува линеарно со промената на концентрацијата на аналитот.

10J Предложени ЕКСПЕРИМЕНТИ

Експерименти



Експериментите што се наведени подолу може да се користат како примери за примената на спектроскопијата за квантитативни цели или за карактеризација. Експериментите се поделени во четири групи: експерименти со примена на UV/видлива апсорпција, експерименти со примена на инфрацрвена апсорпција, експерименти во кои се користат атомска апсорпција или атомска емисија, и експерименти со примена на флуоресценција. Други експерименти се опишани во соодветните секциски методи. За секој експеримент е даден крајок опис, во кој се дадени деталите како што се видот на примерокот за анализа и методот за стандардизација.

Првата група експерименти се оние со анализа на примероци со UV/видлива апсорпција.

Allen, H. C.; Brauers, T.; Finlayson-Pitts, B. J. "Illustrating Deviations in the Beer-Lambert Law in an Instrumental Analysis Laboratory: Measuring Atmospheric Pollutants by Differential Optical Absorption Spectrometry," *J. Chem. Educ.* **1997**, 74, 1459-1462.

Овој експеримент ги демонстрира хемиските ограничувања на Беровиот закон, користејќи како пример NO_2 - N_2O_4 рамнотежа.

Blanco, M.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; et al. "A Simple Method for Spectrophotometric Determination of Two-Components with Overlapped Spectra," *J. Chem. Educ.* **1989**, 66, 178-180.

Овој експеримент опишува примена на линеарна регресија за повеќе бранови должини, за анализа на двокомпонентни смеси. Дадени се упатства за анализа на смеса перманганат-бихромат, смеса Ti(IV) - V(V) и смеса Cu(II) - Zn(II) .

Bruneau, E.; Lavabre, D.; Levy, G.; et al. "Quantitative Analysis of Continuous-Variation Plots with a Comparison of Several Methods," *J. Chem. Educ.* **1992**, 69, 833-837.

Во овој експеримент се користи методата на континуирани варијации за определување стехиометриска и рамнотежна константа за органски комплекс на 3-аминопиридин со пикринска киселина во CHCl_3 , и за неоргански комплекс на Fe^{3+} со салицилна киселина.

Crisp, P. T.; Eckert, J. M.; Gibson, N. A. "The Determination of Anionic Surfactants in Natural and Waste Waters," *J. Chem. Educ.* **1983**, 60, 236-238.

Спектрофотометриски се определува концентрацијата на анјонски површински активни супстанции (сурфактанти) на ниво пониско од ppm во природни и во индустриски води. Анјонските сурфактанти се екстрахираат со неводни растворувачи, по формирањето јонски асоцијати со соодветен катјон.

Domínguez, A.; Fernández, A.; González, N.; et al. "Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques," *J. Chem. Educ.* **1997**, 74, 1227-1231.

Сурфактанти се соединенија со долга низа, чиј еден крај

е хидрофобен, а друг јонски. Во поларни растворувачи, сурфактантите формираат „сферна“ структура позната како мицела, во која хидрофобниот крај излегува од сферата. Концентрацијата на сурфактантот, потребна за формирање мицела, е наречена критична мицелна концентрација (КМК). Овој експеримент опишува UV апсорпциона и флуоресцентна метода за определување на КМК. Дадени се и упатства како да се определи КМК со мерење електрична спроводливост.

Hill, Z. D.; MacCarthy, P. "Novel Approach to Job's Method," *J. Chem. Educ.* **1986**, 63, 162-167.

Податоци од спектрофотометриски титрации на Fe^{3+} со SCN^- , и Cu^{2+} со EDTA се употребени за определување на стехиометријата на добиените комплекси, со примена на методата на континуирани варијации.

Long, J. R.; Drago, R. S. "The Rigorous Evaluation of Spectrophotometric Data to Obtain an Equilibrium Constant," *J. Chem. Educ.* **1982**, 59, 1037-1039.

Макар што е опишан како теориски, овој експеримент може да се адаптира и за лабораториски услови. Дадени се детали за определување константа на рамнотежа за сврзување на луисовска база 1-метилимидазол со луисовска киселина кобалт(II)-4-трисфлуорометил-о-фенилен-4,6-метоксисалицилидеминат во толуен. Рамнотежната константа се определува со линеарна регресиона анализа на податоци за апсорбанца, според теорискиот модел на рамнотежа.

McDevitt, V. L.; Rodriguez, A.; Williams, K. R. "Analysis of Soft Drinks: UV Spectrophotometry, Liquid Chromatography, and Capillary Electrophoresis," **1998**, 75, 625-629.

Дадени се постапки за определување на кофеин, бензоева киселина и аспартам во сода-вода со трите наведени методи. Во примерот даден во статијата, концентрациите на кофеин и на бензоева киселина во Mello Yellow се определени спектрофотометриски.

Mehra, M. C.; Rioux, J. "An Analytical Chemistry Experiment in Simultaneous Spectrophotometric Determination of Fe(III) and Cu(II) with Hexacyanoruthenate(II) Reagent," *J. Chem. Educ.* **1982**, 59, 688-689.

Овој експеримент опишува стандардна мултикомпо

нентна анализа на два аналити, базирана на мерење на апсорбанца на две бранови должини. Како реагенс за комплексирање се користи хексацијанорутенат(II), кој формира виолетово-син комплекс со Fe(III) и светло зелен комплекс со Cu(II).

Örstan, A.; Wojcik, J. F. "Spectroscopic Determination of Protein-Ligand Binding Constants," *J. Chem. Educ.* **1987**, 64, 814–816.

Овој експеримент претставува добар пример за примена на спектроскопијата во биохемијата. По прикажувањето на основната теорија за спектроскопско следење на интеракции протеин-лиганд, опишана е постапка за карактеризација на сврзувањето на метил оранж со говедски серум албумин.

Pandey, S.; Powell, J. R.; McHale, M. E. R.; et al. "Quantitative Determination of Cr(III) and Co(II) Using a Spectroscopic H-Point Standard Addition," *J. Chem. Educ.* **1997**, 74, 848–850.

Овој експеримент е уште еден добар пример за мултикомпонентна анализа базирана на нови истражувања. Макар што стандарден додаток во X точка не е дискутиран во овој текст, статијата дава соодветна теорија и цитира изворна литература.

Raymond, M.; Jochum, C.; Kowalski, B. R. "Optimal Multicomponent Analysis Using the Generalized Standard Addition Method," *J. Chem. Educ.* **1983**, 60, 1072–1073.

Овој експеримент ја демонстрира примената на општата метода на стандардни додатоци за анализа на смеса од K₂Cr₂O₇ и KMnO₄.

Tucker, S.; Robinson, R.; Keane, C.; et al. "Colorimetric Determination of pH," *J. Chem. Educ.* **1989**, 66, 769–771.

Во овој експеримент се користи смеса од бои за спектрофотометриско определување на pH на даден примерок.

Walmsley, F. "Aggregation in Dyes: A Spectrophotometric Study," *J. Chem. Educ.* **1992**, 69, 583.

Боја што се користи за бојење на материјали, како што се влакна, мора да биде присутна во форма на мономер за да може да се апсорбира на површината на материјалот. Во овој експеримент е опишано како спектрофотометријата може да се користи за определување на рамнотежна константа меѓу мономер и димер за бојата пинацијанол јодид во вода.

Williams, K. R.; Cole, S. R.; Boyette, S. E.; et al. "The Use of Dristan Nasal Spray as the Unknown for Simultaneous Spectrophotometric Analysis of a Mixture," *J. Chem. Educ.* **1990**, 67, 535.

Во овој експеримент е опишана анализа на фармацевтски препарати фенирамин малеат и

фенилефрин хидрохлорид.

Yarnelle, M. K.; West, K. J. "Modification of an Ultraviolet Spectrophotometric Determination of the Active Ingredients in APC Tablets," *J. Chem. Educ.* **1989**, 66, 601–602.

Анализата на APC таблети (смеса од аспирин, фенацетин и кофеин) претставува вообичаен студентски лабораториски експеримент. Во овој експеримент се опишани модификации на стандардната анализа на APC таблети со парацетамол (познат и како ацетаминофен), кој претставува замена за фенацетин.

Второот блок експериментите дава примери за примена на инфрацрвена спектроскопија.

Frohlich, H. "Using Infrared Spectroscopy Measurements to Study Intermolecular Hydrogen Bonding," *J. Chem. Educ.* **1993**, 70, A3–A6.

Во овој експеримент се опишува анализа на степенот на асоцијација, константата на рамнотежа и енергијата на водородната врска за бензил алкохол и фенол во CCl₄.

Mathias, L. J.; Hankins, M. G.; Bertolucci, C. M.; et al. "Quantitative Analysis by FT-IR: Thin Films of Copolymers of Ethylene and Vinyl Acetate," *J. Chem. Educ.* **1992**, 69, A217–A219.

Масен удел (во проценти) на винил ацетат во кополимер е определен преку односот на пикот на 1020 cm⁻¹ од C—O вибрацијата и пикот на 720 cm⁻¹ од C—H вибрацијата во полиетилен.

Seasholtz, M. B.; Pence, L. E.; Moe Jr., O. A. "Determination of Carbon Monoxide in Automobile Exhaust by FT-IR Spectroscopy," *J. Chem. Educ.* **1988**, 65, 820–823.

Примероци од автомобилски издувни гасови се земени во стаклени садови од 4 L, евакуирани претходно до притисок < 2 тора. Користена е нормална калибрациона крива конструирана со надворешни стандарди со познат P_{CO} за определување на P_{CO} во примероци од издувни гасови.

Во следниве експериментите се опишани соодветни примери на атомска апсорпциона спектрометрија.

Gilles de Pelichy, L. D.; Adams, C.; Smith, E. T. "Analysis of the Essential Nutrient Strontium in Marine Aquariums by Atomic Absorption Spectroscopy," *J. Chem. Educ.* **1997**, 74, 1192–1194.

Концентрацијата на стронциум во аквариумска морска вода е определена со атомска апсорпција со методата на стандардни додатоци. Испитано е и влијанието на додавањето на La³⁺ како ослободувачки реагенс.

Hoskins, L. C.; Reichardt, P. B.; Stolzberg, R. J. "Determination

of the Extraction Constant for Zinc Pyrrolidinecarbodithioate,” *J. Chem. Educ.* **1981**, 58, 580–581.

Подготвен е воден раствор со pH 5,2 и со позната концентрација на вкупен Zn^{2+} . На овој раствор е додаден раствор на амониум пириролидинкарбодитиоат и метилизобутил кетон. Смесата се клумка кратко време, а потоа е оставена на автоматска ротациона мешалка 30 минути. По овој период, водната и органската фаза се одвојуваат, а концентрацијата на цинкот во водниот слој се определува со атомска апсорпција. Концентрацијата на цинкот во органската фаза се определува од разликата; се определува и рамнотежната константа на екстракција.

Lehman, T. A.; Everett, W. W. “Solubility of Lead Sulfate in Water and in Sodium Sulfate Solutions,” *J. Chem. Educ.* **1982**, 59, 797.

Подготвени се заситени раствори со додавање на $PbSO_4$ на раствори со $0 - 2 \times 10^{-3} M Na_2SO_4$. По истекот на определено време за воспоставување рамнотежа, водниот слој е одвоен со декантација и анализиран со атомска апсорпција за содржина на Pb^{2+} . Пресметана е константа K_{sp} за $PbSO_4$, којашто го покажува влијанието на јонската јачина врз производот на растворливоста.

Markow, P. G. “Determining the Lead Content of Paint Chips,” *J. Chem. Educ.* **1996**, 73, 178–179.

Масениот удел на олово (во %) во стандарден референтен материјал на оловна боја е определен со атомска апсорпција со примена на надворешни стандарди.

Masina, M. R.; Nkosi, P. A.; Rasmussen, P. W.; et al. “Determination of Metal Ions in Pineapple Juice and Effluent of a Fruit Canning Industry,” *J. Chem. Educ.* **1989**, 66, 342–343.

Концентрациите на железо, олово, калај и алуминиум се определени со методата на стандардни додатоци.

Quigley, M. N. “Determination of Calcium in Analgesic Tablets Using Atomic Absorption Spectrophotometry,” *J. Chem. Educ.* **1994**, 71, 800.

Таблети на аналгетик се спрашени со мелење, растворени во HCl и анализирани за содржина на калциум со атомска апсорпција. За спречување на интерференции коишто се јавуваат поради формирање калциум фосфат, употребен е La^{3+} како реагенс за ослободување.

Quigley, M. N.; Vernon, F. “Determination of Trace Metal Ion Concentrations in Seawater,” *J. Chem. Educ.* **1996**, 73, 671–675.

Трагите од метали во морска вода се концентрираат или со таложење со $Fe(OH)_3$ и повторно преведување

во раствор со растварање на талогот, или со јонска измена. Концентрациите на неколку елементи присутни во траги се определени со атомска апсорпциона спектрометрија со графитна печка, со метода на стандардни додатоци.

Rheingold, A. L.; Hues, S.; Cohen, M. N. “Strontium and Zinc Content in Bones as an Indication of Diet,” *J. Chem. Educ.*, **1983**, 60, 233–234.

Примероци животински коски со маса од приближно 3 g се жарат на 600 °C додека не станат бели по боја. Примероците потоа се ситнат во аванче. Дел од примерок е растворен во HCl и растворот е разреден до познат волумен. Концентрациите на цинк и на стронциум се определени со атомска апсорпција. Анализата на стронциум ја илустрира примената на заштитен реагенс каков што е $La(NO_3)_3$, што се додава за спречување на интерференција што потекнува од формираниот стронциум фосфат.

Rocha, F. R. P.; Nóbrega, J. A. “Effects of Solution Physical Properties on Copper and Chromium Signals in Flame Atomic Absorption Spectrometry,” *J. Chem. Educ.* **1996**, 73, 982–984.

Добар експеримент, кој ја илустрира важноста на матрицата на примерокот. Испитувано е влијанието на содржината на етанол врз апсорпцијата на бакар, и влијанието на површински активните супстанции врз апсорпцијата на хром.

Последната група експерименти ја илустрира примената на флуоресценцијата со етроскопија.

Buccigross, J. M.; Bedell, C. M.; Suding-Moster, H. L. “Fluorescent Measurement of TNS Binding to Calmodulin,” *J. Chem. Educ.* **1996**, 73, 275–278.

Макар што е наменет за биохемиски лаборатории, овој експеримент е добар пример за студентите по аналитичка хемија за анализи на карактеризација. Од посебен интерес е примената на методата на Цоб за определување на бројот на THC (2-*p*-толудинилнафтален-6-сулфонат) сврзувачки места на калмодулин. Флуоресценцијата е мерена на 475 nm со екситациона бранова должина од 330 nm.

Henderleiter, J. A.; Hyslop, R. M. “The Analysis of Riboflavin in Urine by Fluorescence,” *J. Chem. Educ.* **1996**, 73, 563–564.

Примероци урина се анализирани и содржина на рибофлавин пред и по земањето витаминска таблета којашто содржи рибофлавин. Концентрациите се определени со надворешни стандарди или со метода на стандардни додатоци. Флуоресценцијата е следена на 525 nm, со примена на екситациона бранова должина од 280 nm.



10К ПРОБЛЕМИ

1. Внесете ги податоците што недостасуваат во табелата.

Бранова должина (m)	Фреквенција (s ⁻¹)	Бранов број (cm ⁻¹)	Енергија (J/молекула)
4,50 x 10 ⁻⁹	1,33 x 10 ¹⁵	3215	7,20 x 10 ⁻¹⁹

2. Внесете ги податоците што недостасуваат во табелата.

Аналит (M)	Апсор- банца	% Трансми- танца	Моларен апсорпционен коэффициент (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Должина на оптички пат (cm)
4,50 x 10 ⁻⁹			1120	1,00
	0,563		750	1,00
4,50 x 10 ⁻⁹	0,225		440	
4,50 x 10 ⁻⁹	0,167			5,00
		33,3	565	1,00
4,50 x 10 ⁻⁹		21,2	1550	
4,50 x 10 ⁻⁹		81,3		10,0

3. Трансмитанцата на некој раствор изнесува 35,0 %.
Колкава ќе биде трансмитанцата ако растворот се разреди во однос 1:1?
4. Трансмитанцата на некој раствор изнесува 85,0 % кога се мери во кивета со оптички пат од 1,00 cm. Колкава ќе биде трансмитанцата ако оптичкиот пат се зголеми на 10,00 cm?
5. Точноста на некој спектрофотометар може да се утврди со приготвување раствор со 60,06 ppm K₂Cr₂O₇ во 0,0050 M H₂SO₄ и мерење на апсорбанцата на бранова должина од 350 nm користејќи кивета со оптички пат 1,00 cm. Апсорбанцата треба да изнесува 0,640. Колкав е моларниот апсорпционен коэффициент на K₂Cr₂O₇ на оваа бранова должина?
6. До хемиско отстапување од Беровиот закон може да дојде ако концентрацијата на хемискиот вид што апсорбира зависи од положбата на рамнотежната реакција. Да разгледаме случај со слаба киселина, HA, за која K_a е 2 x 10⁻⁵. Конструирајте калибрациона крива за апсорбаца во однос на вкупната концентрација на слабата киселина, согласно Беровиот закон (C_{tot} = [HA] + [A⁻]), користејќи вредности за C_{tot} од 1,0 x 10⁻⁵, 3,0 x 10⁻⁵, 5,0 x 10⁻⁵, 9,0 x 10⁻⁵, 11 x 10⁻⁵ и 13 x 10⁻⁵ M за следниве групи услови: (a) ε_{HA} = ε_{A⁻} = 2000, растворот не е пуфериран; (b) ε_{HA} = 2000 а ε_{A⁻} = 500, растворот не е пуфериран; (c) ε_{HA} = 2000 а ε_{A⁻} = 500, растворот е пуфериран до pH = 4,50. За сите примероци е користена кивета со оптички пат од 1,00 cm. Сите вредности за ε имаат единици M⁻¹cm⁻¹.
7. Едно од инструменталните ограничувања на Беровиот закон се јавува при употреба на полихроматско зрачење наместо монохроматско. Да разгледаме извор на зрачење што емитира зрачење со две бранови должини, λ' и λ''.

Кога се користат одделно, апсорбанците на овие бранови должини, A' и A'', се

$$A' = \log \frac{P_0'}{P_T'} = \epsilon' b C$$

$$A'' = \log \frac{P_0''}{P_T''} = \epsilon'' b C$$

Кога двете бранови должини се мерат симултано, апсорбанцата е дадена како

$$A = \log \frac{(P_0' + P_0'')}{(P_T' + P_T'')}$$

- (a) Покажете дека, кога моларните апсорпциони коефициенти на λ' и λ'' се исти (ε' = ε'' = ε), апсорбанцата е еднаква на

$$A = \epsilon b C$$

- (б) Конструирајте калибрациона крива на основа Беровиот закон, за концентрационен интервал од нула до 1 x 10⁻⁴ M, земајќи вредности ε' = 1900 и ε'' = 100. Претпоставете дека должината на оптичкиот пат е иста, 1,00 cm, и P' = P''. Објаснете ја разликата меѓу двете криви.

8. Друго инструментално ограничување на Беровиот закон е случајното зрачење. Следниве податоци се добиени со примена на кивета со должина на оптички пат од 1,00 cm, кога случајното зрачење е незначително (P_{случајно} = 0)

[Аналит] (M)	Апсорбанца
0,000	0,00
0,002	0,40
0,004	0,80
0,006	1,20
0,008	1,60
0,010	2,0

Пресметајте ја апсорбанцата за секој раствор кога P_{случајно} е 5 % од P₀, и нацртајте калибрациони криви, согласно Беровиот закон, за двете групи податоци. Објаснете ги разликите меѓу двете криви. (Совет: Претпоставете дека P₀ е 100).

9. Во процесот на спектрофотометриско определување на Fe, аналитичарот подготвил калибрациона крива користејќи спектрометар со еден сноп зраци. По конструкцијата на калибрационата крива, на аналитичарот му се скршила киветата користена за методската слепа проба и за стандардите. Аналитичарот зел нова кивета, ја измерил апсорбанцата на примерокот и ја определил содржината на Fe во примерокот. Дали промената на киветата ќе доведе до определена грешка во анализата? Објаснете.
10. Една од методите за анализа на Fe³⁺, којашто може да се користи за примероци со различни матрици, е со формирање

интензивно обоен комплекс на Fe^{3+} со тиогликолна киселина. Комплексот силно апсорбира на 535 nm. Стандардизирање на методата се врши со примена на надворешни стандарди. Работен стандард со 10 ppm Fe^{3+} се подготвува со пренесување 10 mL аликвот од стандарден раствор на Fe^{3+} со 100,0 ppm, во волуметриска тиквица од 100 mL и разредување до ознаката. Потоа се подготвуваат калибрациони стандарди со 1,00, 2,00, 3,00, 4,00 и 5,00 ppm Fe^{3+} со пренесување соодветни количества од работниот раствор со 100 ppm Fe^{3+} во волуметриски тиквици од 50 mL, во кои претходно се внесени по 5 mL тиогликолна киселина, 2 mL 20 % раствор амониум цитрат и 5 mL 0,22 M NH_4OH . По разредувањето до ознаката, се мерат апсорбанците на надворешните стандарди со соодветна слепа проба. Примероците се подготвуваат за анализа со земање порција за која се знае дека содржи приближно 0,1 g Fe^{3+} , растворување на порцијата во минимално количество HNO_3 , и разредување на растворот во колба од 1 L. 1 mL аликвот од раствор на примерок се пренесува во колба од 50 mL, се додава 5 mL тиогликолна киселина, 2 mL 20 % w/v амониум цитрат, и 5 mL 0,22 M NH_4OH и се разредува до ознаката. Апсорбанцата на овој раствор се користи за определување на концентрацијата на Fe^{3+} во примерокот.

(а) Која е најсоодветна слепа проба за оваа метода? (б) Амониум цитрат се додава за да се спречи таложење на Al^{3+} . Каков ефект би имало присуството на траги од Fe^{3+} во амониум цитратот врз добиените вредности за концентрацијата на железо во примероците? (в) Зошто во постапката се бара да се земе количество примерок што содржи приближно 0,1 g Fe^{3+} ? (д) Без да знае, аналитичарот користел волуметриска колба од 100 mL за подготовка на работен стандард со 10,00 ppm Fe^{3+} , којашто имала волумен значително помал од 100,0 mL. Како ќе се одраз ова врз добиените резултати за содржина на железо во примероците.

11. Спектрофотометриска метода за анализа на железо има линеарна калибрациона крива за стандарди од 0,00, 5,00, 10,00, 15,00 и 20,00 ppm. Примерок железна руда со очекувана содржина на железо од 40 до 60 % w/w, треба да се анализира со дадената метода. Земено е приближно 0,5 g примерок, растворен е во минимално количество концентрирана HCl, и растворот е разреден со дестилирана вода до 1 L. Земен е аликвот од 5 mL. До кој волумен (10, 25, 50, 100, 250, 500 или 1000 mL) треба да се разреди аликвотот за да се сведе на минимум неопределеноста на анализата? Објаснете.

12. Во една статија, Lozano-Calero со соработниците опишува нова метода за кватитативна анализа на фосфор во кола-напитоци.²⁸ Методата се заснова на формирање интензивно обоен син фосфолибдатен комплекс, $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}]$. Комплексот се формира со додавање $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ на примерокот во присуство на редуктор, на пр., аскорбинска киселина. Концентрацијата на комплексот е определена спектрофотометриски на бранова должина 830 nm, користејќи нормална калибрациона крива како метода за стандардизација.

При рутинска анализа, се подготвува серија стандардни раствори, што содржат познато количество фосфор,

пренесувајќи соодветен волумен од раствор со 4 ppm P_2O_5 во волуметриска колба од 5 mL. Во колбата се додава 2 mL редукционен раствор на аскорбинска киселина и се разредува со вода до ознаката. Примероци од кола-напитоци се подготвувани за анализа со оставање на напитокот во чаша во тек на 24 часа за отстранување на растворени гасови (CO_2). 2,5 mL дегазиран примерок се пренесува во колба од 50 mL и се разредува до ознаката со вода. Аликвот од 250 μL од разредениот примерок се пренесува во колба од 5 mL, се додава 2 mL аскорбинска киселина за редукција, и се разредува до ознаката со дестилирана вода.

(а) Авторите нагласуваат дека методата може да се користи само за безбојни кола-напитоци, како што е Crystal Pepsi. Објаснете јасно зошто е така. (б) Како би ја модифицирале методата за да може да се примени за секој вид кола-напитоци? (в) Зошто е потребно да се отстранат растворените гасови? (г) Како би подготвиле слепа проба за оваа метода? (д) Калибрационата крива, дадена од авторите, конструирана со регресиона анализа, е линеарна:

$$\text{Abs} = -0,02 + 0,72(\text{ppm } \text{P}_2\text{O}_5)$$

Примерок од Crystal Pepsi, анализиран со опишаната метода, покажал апсорбанца од 0,565. Колкава е концентрацијата на фосфор (изразена во ppm P) во оригиналниот примерок Crystal Pepsi?

13. EDTA формира обоени комплекси со повеќе метални јони, коишто може да послужат како основа за кватитативна спектрофотометриска метода за анализа. Моларните апсорпциони коефициенти на комплексите на EDTA со Cu^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} на три бранови должини се сумирани во табелата (сите вредности на ϵ се во $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

Метал	$\epsilon_{462,9}$	$\epsilon_{732,0}$	$\epsilon_{378,7}$
Co^{2+}	15,8	2,11	3,11
Cu^{2+}	2,32	95,2	7,73
Ni^{2+}	1,79	3,03	13,5

Врз основа на оваа информација, определете ја (а) концентрацијата на Cu^{2+} во раствор којшто покажува апсорбанца 0,338 на 732,0 nm; (б) концентрацијата на Cu^{2+} и Co^{2+} во раствор којшто покажува апсорбанца 0,453 на 732,0 nm и 0,107 на 462,9 nm, и (в) концентрацијата на Cu^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} во раствор којшто покажува апсорбанца 0,423 на 732,0 nm, 0,184 на 462,9 nm, и 0,291 на бранова должина 378,7 nm. Должината на оптичкиот пат, b , за сите мерења е 1,00 cm.

14. Концентрацијата на фенол во вода е определена по одвојувањето на фенолот од неиспарливите примеси со дестилација со водена пареа, по што фенолот, со реакција со аминокантипинин и $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ при pH 7,9, формира обоено соединение – антипининска боја. Стандарден раствор на фенол со концентрација 4 ppm покажува апсорбанца од 0,424 на бранова должина 460 nm, со примена на кивета од 1 cm. Примерок од вода се дестилира со водена пареа, 50 mL аликвот од дестилатот се пренесува во волуметриска колба од 100 mL и се разредува со дестилирана вода до

ознаката. Со мерење на апсорбанца на тој раствор се добива вредност 0,394. Колкава е концентрацијата на фенолот (во ppm) во примерокот вода?

15,0	1,52
20,0	1,62
25,0	1,74
30,0	1,84

15. Saito опишува квантитативна спектрофотометриска постапка базирана на цврстофазна екстракција со батифенантролин на мембрана од поливинил хлорид.²⁹ Во отсуство на железо, мембраната е безбојна, но кога ќе се потопи во раствор со Fe^{2+} и I^- , мембраната се обојува црвено, како резултат на формирање комплекс Fe^{2+} -батифенантролин. За конструкција на калибрациона крива е користена серија надворешни стандарди со позната моларна концентрација на Fe^{2+} , при што е добиена равенката

$$A = (8.60 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1})[\text{Fe}^{2+}]$$

Колкава е концентрацијата на железо (во ppm) за примерок со апсорбанца 0,100?

16. Во DPD колориметриска метода за резидуален хлор (дефиниран како ppm Cl_2), слободниот хлор го оксидира безбојниот амин *N,N*-диетил-*p*-фенилендиамин во обоено соединение коешто апсорбира во интервал од 440–580 nm. Со анализа на серија калибрациони стандарди добиени се следниве вредности:

ppm Cl_2	апсорбанца
0	0,000
0,50	0,270
1,00	0,543
1,50	0,813
2,00	1,084

Примерок од градска водоводна вода, анализиран за содржина на резидуален хлор, покажува апсорбанца од 0,113. Колкава е содржината на резидуален хлор во примерокот, во ppm?

17. Brown и Lin објавиле квантитативна метода за определување метанол, применувајќи го неговото влијание врз видливиот спектар на метиленско сино.³⁰ Во отсуство на метанол, видливиот спектар на метиленско сино покажува две интензивни апсорпциони ленти со максимуми на приближно 610 nm и 660 nm, коишто соодветствуваат на мономерна и на димерна форма. Во присуство на метанол, интензитетот на лентата од димерната форма се намалува, а на лентата на мономерната форма се зголемува. За концентрации на метанол меѓу 0 и 30 % v/v, односот на апсорбанците на 663 nm, A_{663} , и на 610 nm, A_{610} , е линеарна функција од количеството метанол. Користејќи ги следниве податоци од стандардизацијата, определете ја содржината на метанол (v/v), во %, за примерок за кој A_{610} изнесува 0,75, а A_{663} изнесува 1,07.

% Метанол (v/v)	A_{663}/A_{610}
0	1,21
5,0	1,29
10,0	1,42

18. Концентрација на барбитуратот Барбитал во примерок од крв, е определена по екстракција на 3,0 mL крв со 15 mL CHCl_3 . Хлороформот, кој по екстракцијата содржи Барбитал, е третиран со 10 mL 0,045 M NaOH (pH $\approx$ 13). 3 mL примерок од водниот екстракт е пренесен во кивета од 1,00 cm, и измерена е апсорбанца од 0,115. Вредноста на pH на растворот во киветата потоа е подесена на приближно 10, со додавање на 5 mL 16 % w/v NH_4Cl , по што е измерена апсорбанца од 0,023. Кога 3 mL стандарден раствор на Барбитал, со концентрација 3,0 mg/100 mL, е анализиран според истата постапка, добиени се вредности за апсорбанца 0,295 при pH 13, и 0,002 при pH 10. Пресметајте ја концентрацијата на Барбиталот (mg/100 mL) во примерокот.

19. Jones и Thatcher разработиле спектрофотометриска метода за анализа на аналгетски таблети што содржат аспирин, фенацетин и кофеин.³¹ Примерокот е растворен во CHCl_3 и екстрахиран со воден раствор на NaHCO_3 за отстранување на аспиринот. По завршената екстракција, хлороформот е пренесен во волуметриска колба од 250 mL и е разреден до ознаката со CHCl_3 . 2 mL од разредениот раствор се разредуваат во волуметриска колба од 200 mL со CHCl_3 . Апсорбанцата на крајниот раствор е мерена на бранови должини 250 nm и на 275 nm, на кои апсорпционите коефициенти, во $\text{ppm}^{-1}\text{cm}^{-1}$, за кофеинот и фенацетинот, се

$$\begin{aligned} \text{кофеин: } a_{250} &= 0,0131 \text{ и } a_{275} = 0,0485 \\ \text{фенацетин: } a_{250} &= 0,0702 \text{ и } a_{275} = 0,0159 \end{aligned}$$

Аспиринот е определен со неутрализација на NaHCO_3 во водниот раствор и екстракција на аспиринот во CHCl_3 . Комбинираниите екстракти се разредуваат до 500 mL во волуметриска колба. 20 mL од растворот се пренесува во волуметриска колба од 100 mL и се разредува со CHCl_3 до ознаката. Апсорбанцата на овој раствор е мерена на бранова должина од 277 nm, на која апсорпциониот коефициент на аспиринот изнесува $0,00682 \text{ ppm}^{-1}\text{cm}^{-1}$. За аналгетската таблета, третирана според опишаната постапка, се добиени апсорбанци од 0,466 на 250 nm, 0,164 на 275 nm, и 0,600 на 277 nm, користејќи кивета со оптички пат од 1,00 cm. Пресметајте ја содржината на аспиринот, кофеинот и фенацетинот (во mg) во аналгетската таблета.

20. Концентрацијата на SO_2 во примерок воздух е определена со метода со *p*-розанилин. SO_2 е собран во 10,00 mL раствор на HgCl_4^{2-} , со кој формира $\text{Hg}(\text{SO}_3)_2^{2-}$, со пропуштање на воздух низ растворот во тек на 75 минути со брзина од 1,6 L/min. По додавањето на *p*-розанилин и формалдехид, обоениот раствор е разреден во колба од 25 mL. Апсорбанцата е мерена на 569 nm во кивета од 1,00 cm, при што е добиена вредност од 0,485. Стандарден

примерок е подготвен со замена на 1 mL примерок со стандарден раствор еквивалентен на 15,00 ppm SO₂ во примерок од воздух. За апсорбанца на стандардот добиена е вредност 0,181. Изразете ја концентрацијата на SO₂ во воздухот во ppm. За густината на воздухот може да се земе вредноста 1,18 g/L.

21. Seacholtz со соработниците разработиле метода за квантитативна анализа на CO во издувни гасови од автомобили, базирана на мерењето на инфрацрвеното зрачење на 2170 cm⁻¹.³² Калибрациона крива се конструира со полнење на инфрацрвени гасни кивети од 10 cm со CO под познат притисок и со мерење на апсорбанца користејќи инфрацрвена спектрометрија со Фуриеова трансформација. Со стандардизација се добива равенката

$$A = -1,1 \times 10^{-4} + 9,9 \times 10^{-4}(P_{CO} \text{ во тори})$$

Гасната кивета се полни со примерок со помош на вакуум. По мерењето на вкупниот притисок, се мери апсорбанцата на примерокот на 2170 cm⁻¹. Резултатите се изразуваат во % CO (P_{CO}/P_{tot}). Анализирани се пет примероци од издувни гасови, при што се добиени следниве резултати:

P _{tot} (тор)	Апсорбанца
595	0,1146
345	0,0642
332	0,0591
233	0,0412
143	0,0254

Определете го % CO за секој примерок, и изразете ја средната вредност со интервал на доверба од 95 %.

22. Најново подобрување во подготовката на примероци за инфрацрвена апсорпција е со ленти за примероци за еднократна употреба, направени од тенки листови полиетилен (ПЕ) или политетрафлуороетилен (ПТФЕ). Примероци на аналит се раствораат во соодветен растворувач и се ставаат на лентата. По испарувањето на растворувачот, се добива инфрацрвен спектар. Бидејќи дебелината на ПЕ или на ПТФЕ не е униформна, инфрацрвените ленти главно се користат за квалитативни анализи. Zhao и Malinowski покажале како може да се врши квантитативна анализа со полистирен, со додавање на KSCN на примерокот.³³ Полистиренот е следен на 1494 cm⁻¹ а KSCN на 2064 cm⁻¹. Стандардни раствори се подготвени со ставање измерени порции полистирен во волуметриска колба од 10 mL и разредување до ознаката со раствор на KSCN во метилизобутил кетон. Резултатите добиени со ПЕ ленти се дадени подолу:

g полистирен	0,1609	0,3290	0,4842	0,6402	0,8006
A _{1494 cm⁻¹}	0,0452	0,1138	0,1820	0,3275	0,3195
A _{2064 cm⁻¹}	0,1948	0,2274	0,2525	0,3580	0,2703

Кога 0,8006 g примерок од поли(стирен/малеин анхидрид) кополимер е подготвен на ист начин, добиени се следниве резултати:

Анализа No.	A _{1494 cm⁻¹}	A _{2064 cm⁻¹}
1	0,2729	0,3582
2	0,2074	0,2820
3	0,2785	0,3642

Колкава е содржината (во %) на полистирен во кополимерот? Со оглед дека декларирана содржина на полистирен (%w/w) изнесува 67 %, можно ли е да постои определена грешка од α = 0,05?

23. Во следнава табела се дадени моларни апсорпциони коефициенти на комплекси на Арсеназо со бакар и бариум, на избрани бранови должини.³⁴ Определете ги оптималните бранови должини за анализа на смеса од бакар и бариум.

Бранова должина (nm)	ε _{Cu}	ε _{Ba}
595	11900	7100
600	15500	7200
607	18300	7400
611	19300	6900
614	19300	7000
620	17800	7100
626	16300	8400
635	10900	9900
641	7500	10500
645	5300	10000
650	3500	8600
655	2200	6600
658	1900	6500
665	1500	3900
670	1500	2800
680	1800	1500

24. Blanco со соработниците¹⁴ наведуваат неколку примери на примена на линеарна регресиона анализа за повеќе бранови должини, за симултано определување на смеса од две компоненти со спектри што се преклопуваат. За секоја од следниве смеси определете ја моларната концентрација на секој аналит од смесата.

(а) Смеса од MnO₄⁻ и Cr₂O₇²⁻ и стандарди од 1,0 x 10⁻⁴ M KMnO₄ и 1,0 x 10⁻⁴ M K₂Cr₂O₇ даваат следни резултати:

Бранова должина (nm)	Апсорбанци		смеса
	MnO ₄ ⁻ стандард	Cr ₂ O ₇ ²⁻ стандард	
266	0,042	0,410	0,766
288	0,082	0,283	0,571
320	0,168	0,158	0,422
350	0,125	0,318	0,672
360	0,056	0,181	0,366

(б) Титан и ванадиум се определени преку нивните комплекси со H₂O₂. Резултатите за смеса Ti(IV) и V(V) и за стандардите од 63,1 ppm Ti(IV) и 96,4 ppm V(V) се дадени во табелава:

Бранова должина (nm)	Апсорбанци		
	Ti (IV) стандард	V(V) стандард	Смеса
390	0,895	0,326	0,651
430	0,884	0,497	0,743
450	0,694	0,528	0,665
470	0,481	0,512	0,547
510	0,173	0,374	0,314

(в) Бакар и цинк се определени со формирање обоени комплекси со 2-пиридил-азо-резорцинол (ПАР). Апсорбанцата за ПАР, за смеса од Cu^{2+} и Zn^{2+} и за стандарди од 1,0 ppm Cu^{2+} и 1,0 ppm Zn^{2+} се дадени во наредната табела. Имајте на ум дека мора да извршите корекција на вредностите на апсорбанците на металите, за вредност на апсорбанцата на ПАР.

Бранова должина (nm)	Апсорбанци			
	ПАР	Cu^{2+} стандард	Zn^{2+} стандард	смеса
480	0,211	0,698	0,971	0,656
496	0,137	0,732	1,018	0,668
510	0,100	0,732	0,891	0,627
526	0,072	0,602	0,672	0,498
540	0,056	0,387	0,306	0,290

25. Jochun со соработниците^{15b} известува за следниве резултати од анализа на Ni^{2+} и Cu^{2+} со општата метода на стандардни додатоци:

$\Delta n_{\text{Ni}} (\text{mol})$	$\Delta n_{\text{Cu}} (\text{mol})$	$\Delta Q_{\lambda 1}$	$\Delta Q_{\lambda 2}$
$1,00 \times 10^{-5}$	0	0,174	0,058
$2,00 \times 10^{-5}$	0	0,345	0,093
$3,00 \times 10^{-5}$	0	0,532	0,198
$4,00 \times 10^{-5}$	0	0,732	0,266
$4,00 \times 10^{-5}$	$2,00 \times 10^{-5}$	1,11	1,81
$4,00 \times 10^{-5}$	$4,00 \times 10^{-5}$	1,49	3,28
$4,00 \times 10^{-5}$	$6,00 \times 10^{-5}$	1,89	4,88
$4,00 \times 10^{-5}$	$8,00 \times 10^{-5}$	2,31	6,44

Определете ги моловите на Ni^{2+} и Cu^{2+} во примерокот ако коригираните вредности на апсорбанците (корекции за волумен) на λ_1 и λ_2 се, соодветно, 0,442 и 0,869, пред додавањето стандардни додатоци.

26. Стехиометријата на метал-лиганд комплексот е определена со метода на континуирани варијации. Подготвена е серија раствори во кои комбинираниите концентрации на метал и на лиганд се одржуваат константни ($5,15 \times 10^{-4}$ M). Апсорбанците на овие раствори се мерени на бранова должина на која апсорбира само метал-лиганд комплексот. Користејќи ги прикажаните податоци, определете ја формулата на комплексот.

Молски удел на М	Молски удел на L	Апсорбанца
1,0	0,0	0,001
0,9	0,1	0,126
0,8	0,2	0,260
0,7	0,3	0,389
0,6	0,4	0,515
0,5	0,5	0,642
0,4	0,6	0,775
0,3	0,7	0,771
0,2	0,8	0,513
0,1	0,9	0,253
0,0	1,0	0,000

27. Стехиометријата на метал-лиганд комплексот е определена со метода на молски однос. Подготвена е серија раствори со константна концентрација на металот, $3,65 \times 10^{-4}$ M, а концентрацијата на лигандот е менувана од 1×10^{-4} M до 1×10^{-3} M. Користејќи ги податоците дадени подолу, определете ја стехиометријата на комплексот метал-лиганд.

[Лиганд] (M)	Апсорбанца
$1,0 \times 10^{-4}$	0,122
$2,0 \times 10^{-4}$	0,251
$3,0 \times 10^{-4}$	0,376
$4,0 \times 10^{-4}$	0,496
$5,0 \times 10^{-4}$	0,625
$6,0 \times 10^{-4}$	0,752
$7,0 \times 10^{-4}$	0,873
$8,0 \times 10^{-4}$	0,937
$9,0 \times 10^{-4}$	0,962
$1,0 \times 10^{-3}$	1,001

28. Стехиометријата на метал-лиганд комплексот е определена со метода на однос на коефициенти на правец. Подготвени се две серии раствори. Растворите од првата серија се со константна концентрација на металот (0,010 M), а со променлива концентрација на лигандот. При мерење на апсорбанцата на растворите на бранова должина на која апсорбира само комплексот метал-лиганд, добиени се следниве вредности:

[Лиганд] (M)	Апсорбанца
$1,0 \times 10^{-5}$	0,012
$2,0 \times 10^{-5}$	0,029
$3,0 \times 10^{-5}$	0,042
$4,0 \times 10^{-5}$	0,055
$5,0 \times 10^{-5}$	0,069

Растворите од втората серија се со константна концентрација на лигандот (0,010 M), а со променлива концентрација на металот. Добиени се следниве апсорбанци:

[Метал] (М)	Апсорбанца
$1,0 \times 10^{-5}$	0,040
$2,0 \times 10^{-5}$	0,085
$3,0 \times 10^{-5}$	0,125
$4,0 \times 10^{-5}$	0,162
$5,0 \times 10^{-5}$	0,206

Од овие податоци определете ја стехиометријата на метал-лиганд комплексот.

29. Kawakami и Igarshi³⁵ разработиле нова спектрофотометриска метода за нитрити, базирана на нивна реакција со 5,10,15,20-тетракис (4-аминофенил) порфирин (ТАФП). Како дел од нивната студија, тие ја испитувале стехиометријата на реакцијата меѓу ТАФП и NO_2^- ; следниве податоци се преземени од нивната статија:

[ТАФП] (М)	[NO_2^-] (М)	Апсорбанца
$8,0 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-7}$	0,227
$8,0 \times 10^{-7}$	$3,2 \times 10^{-7}$	0,192
$8,0 \times 10^{-7}$	$4,8 \times 10^{-7}$	0,158
$8,0 \times 10^{-7}$	$8,0 \times 10^{-7}$	0,126
$8,0 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-6}$	0,065
$8,0 \times 10^{-7}$	$2,4 \times 10^{-6}$	0,047
$8,0 \times 10^{-7}$	$3,2 \times 10^{-6}$	0,042
$8,0 \times 10^{-7}$	$4,0 \times 10^{-6}$	0,042

Определете ја стехиометријата на реакцијата.

30. Рамнотежната константа за киселинско-базен индикатор е определена со помош на три раствори со иста концентрација на индикаторот $1,35 \times 10^{-5}$ М. рН на првиот раствор е подесен до киселост со којашто се гарантира дека е присутна само киселинска форма на индикаторот, и измерена е апсорбанца 0,673. Вториот раствор, чиј рН е подесен така што да е присутна само базна форма на индикаторот, покажа апсорбанца од 0,118. Третиот раствор, чиј рН е подесен на 4,7 покажа апсорбанца од 0,439. Која е константата на дисоцијација за киселинско-базниот индикатор.
31. Константата на дисоцијација на некоја слаба органска киселина е определена со мерење на апсорбанцата како функција на рН, при константна вкупна концентрација на киселината. Користејќи ги податоците од нареднава табела, определете ја константата на дисоцијација на слабата органска киселина.

рН	Апсорбанца
1,53	0,010
2,20	0,010
3,66	0,035
4,11	0,072
4,35	0,103
4,75	0,169
4,88	0,193
5,09	0,227

5,69	0,288
7,20	0,317
7,78	0,317

32. При користење спектрофотометар чија прецизност на мерење на апсорбанцата е ограничена со неопределеност на отчитувањето на % T , анализата на раствори со висока апсорбанца може да има неприфатливо високо ниво на неопределена грешка. Да ја земеме како пример анализата на примерок за кој моларниот апсорпционен коефициент изнесува $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, и должина на оптичкиот пат 1,00 cm. (а) Колкава е релативната неопределеност на концентрацијата за аналит чија концентрација изнесува $2,0 \times 10^{-4}$ М, ако $s_T = \pm 0,002$? (б) Колкава е релативната неопределеност на концентрацијата ако е спектрофотометарот калибриран со слепа проба којашто содржи $1,0 \times 10^{-4}$ М раствор на аналит?

33. При калибрација на метода за пламена апсорпциона анализа на фосфор, Hobbins ги добил следниве резултати:³⁶

ppm P	Апсорбанца
2130	0,048
4260	0,110
6400	0,173
8530	0,230

За определување на чистота на примерок од Na_2HPO_4 , 2,469 g примерок биле растворени и разредени во колба до 100 mL. Растворот покажал апсорбанца од 0,135. Колкава е чистотата на Na_2HPO_4 ?

34. Bonert и Pohl објавиле резултати од атомска апсорпциона анализа на неколку метали во базни суспензии добиени во текот на производството на сода со амонијачна постапка.³⁷ (а) Концентрацијата на Си е определена од 200 mL примерок од базен раствор, закиселен со 20 mL концентрирана HNO_3 . На растворот е додаден 1 mL 27 % (w/v) H_2O_2 , растворот е загреан до вриење и оставен да врие 30 мин. Добиениот раствор е разреден до 500 mL, филтриран и анализиран со атомска апсорпциона спектрометрија со стандарди со сличен матрикс. Резултатите од анализата се прикажани во следнава табела:

Раствор	ppm Cu	Апсорбанца
слепа проба	0	0,007
стандарден 1	0,200	0,014
стандарден 2	0,500	0,036
стандарден 3	1,000	0,072
стандарден 4	2,000	0,146
примерок		0,027

Определете ја концентрацијата на Си во суспензијата. (б) Определувањето на Сг е извршено од 200 mL примерок од базен раствор, закиселен со 20 mL концентрирана HNO_3 . На растворот се додадени 0,2 g Na_2SO_3 , растворот е загреан до вриење и оставен да врие 30 мин. Хромот е издвоен од

растворот со таложење како хидроксид, со додавање 20 mL NH_4OH . Талогот е издвоен со филтрирање, испран и префрлен со вода за испирање во чаша. По закиселување со 10 mL HNO_3 , растворот е испарен до суво. Остатокот е растворен во смеса од HNO_3 и HCl и повторно испарен до суво. На крајот, остатокот е растворен во 5 mL HCl , филтриран, разреден до волумен од 50 mL во волуметриска колба и анализиран со атомска апсорпција со метода на стандардни додатоци.

Резултатите од атомската апсорпција се сумирани во следнава табела:

Примерок	ppm додаден Cr	Апсорбанца
слепа проба		0,001
Примерок		0,045
стандарден додаток 1	0,200	0,083
стандарден додаток 2	0,500	0,118
стандарден додаток 3	1,000	0,192

Пресметајте ја концентрацијата на хромот во алкална суспензија.

35. Quigley и Vernon објавиле резултати за определување траги од метали во морска вода користејќи атомски апсорпционен спектрометар со графитна печка.³⁸ Калибрацијата е извршена со метода на стандардни додатоци. Метали присутни во траги прво се одвоени од сложената матрица со големо количество соли, со копреципитација со Fe^{3+} . Во опишаната анализа, порција од 5 mL раствор со 2000 ppm Fe^{3+} е додаден на 1 L примерок морска вода. pH е подесен со NH_4OH , а талогот од $\text{Fe}(\text{OH})_3$ е оставен да стои преку ноќ. По изолирањето и испирањето на талогот, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ и копреципитираните метали се растворени во 2 mL концентрирана HNO_3 и разредени до 50 mL во волуметриска колба. За анализа на Mn^{2+} , 1 mL аликвот од тој раствор е разреден до 100 mL во волуметриска колба. Следниве примероци се инјектирани во графитна печка и анализирани

	Апсорбанца
2,5- μL примерок + 2,5 μL стандард 0-ppb Mn^{2+}	0,223
2,5- μL примерок + 2,5 μL стандард 2,5-ppb Mn^{2+}	0,294
2,5- μL примерок + 2,5 μL стандард 5,0-ppb Mn^{2+}	0,361

Пресметајте ја содржината на Mn^{2+} во ppb во примерокот морска вода.

36. Концентрацијата на Na во растителен материјал може да се определи со пламена атомска емисија. Материјалот за анализа се подготвува со уситнување, хомогенизирање и сушење на 103 °C. Примерок од приближно 4 g е пренесен во кварцно лонче и загреван на електрична плоча за да се разложи органскиот материјал. Потоа пробата е загревана во муфолна печка на 550 °C неколку часа. По ладењето до собна температура, остатокот е растворен со додавање 2 mL 1:1 HNO_3 и испарен до суво. Остатокот е растворен во 10 mL 1:9 HNO_3 , филтриран и разреден до 50 mL во волуметриска колба. Следниве резултати се добиени со

анализа на Na во примерок од овесни снегулки со маса 4,0264 g:

Примерок	ppm Na	Емисија (арбитрарни единици)
слепа проба	0	0
стандард 1	2,00	90,3
стандард 2	4,00	181
стандард 3	6,00	272
стандард 4	8,00	363
стандард 5	10,00	448
Примерок		238

Определете ја содржината (во ppm) на Na во овесните снегулки.

37. Goudenis опишал примена на индуктивно спрегната плазма за анализа на Pb и Ni во примероци месинг.³⁹ При анализа на Pb користени се надворешни стандарди подготвени од примероци месинг со позната содржина на Pb. Резултатите се дадени во табелава:

% w/w Pb	Интензитет на емисија
0,000	$4,29 \times 10^4$
0,0100	$1,87 \times 10^5$
0,0200	$3,20 \times 10^5$
0,0650	$1,28 \times 10^6$
0,350	$6,22 \times 10^6$
0,700	$1,26 \times 10^7$
1,04	$1,77 \times 10^7$
2,24	$3,88 \times 10^7$
3,15	$5,61 \times 10^7$
9,25	$1,64 \times 10^8$

Колкава е содржината на оловото (во % w/w) во примерок месинг, којшто дава емисионен интензитет $9,25 \times 10^4$?

При анализа на Ni користен е внатрешен стандард. Резултатите од калибрацијата се дадени во табелава:

% w/w Ni	Однос на емисиони интензитети
0,000	0,00267
0,0140	0,00154
0,0330	0,00312
0,130	0,120
0,280	0,246
0,280	0,247
0,560	0,533
1,30	1,20
4,82	4,44

Колкава е содржината на Ni (во % w/w) во примерок за кој односот на емисионите интензитети изнесува $1,10 \times 10^{-3}$?

38. Yan со соработниците разработиле метода за анализа на железо, базирана на формирање флуоресцентен метал-лиганд комплекс со лигандот 5-(4-метилфенилазо)-8-аминохинолин.⁴⁰ Во присуство на површински активен реагенс цетилтриметил амониев бромид, анализата се врши на екситациона бранова должина од 316 nm со

следење на емисијата на 528 nm. Стандардизацијата со надворешни стандарди дава

$$I = -0,03 + 1,594(\text{ppm Fe}^{3+})$$

Примерок од исушена храна за кучиња со маса 0,5113 g е жарен за да се отстранат органските материи, а остатокот е рстворен во мало количество HCl и разреден до 50 mL во волуметриска колба. Анализата на добиениот раствор дава интензитет на флуоресцентна емисија од 5,72. Определете ја содржината на Fe (во ppm) во примерокот од храната.

39. Раствор со $5,00 \times 10^{-5}$ M 1,3-дихидроксинафтален во 2 M NaOH има интензитет на флуоресценција 4,85 на бранова должина 459 nm. Колкава е концентрацијата на 1,3-дихидроксинафтален во раствор со интензитет на флуоресценција 3,74 при исти услови?

40. Следниве податоци се регистрирани при мерење интензитет на фосфоресценција за неколку стандардни раствори на бензо[a]пирен:

Молярна концентрација на бензо[a]пирен	Интензитет на фосфоресцентна емисија
0	0
$1,00 \times 10^{-5}$	0,98
$3,00 \times 10^{-5}$	3,22
$6,00 \times 10^{-5}$	6,25
$1,00 \times 10^{-4}$	10,21

Колкава е концентрацијата на бензо[a]пирен во примерок којшто дава интензитет на фосфоресцентна емисија од 4,97?

41. Концентрацијата на ацетилсалицилна киселина, $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$, во таблети аспирин може да се определи со хидролиза на салицилатен јон, $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2^-$ и спектрофлуорометриско определување на концентрацијата на салицилатен јон. Основен стандарден раствор се подготвува со пренесување 0,0774 g салицилна киселина, $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$, во волуметриска колба од 1 L и разредување до ознаката со дестилирана вода. Серија калибрациони стандарди се подготвуваат со пипетирање на 0, 2,00, 4,00, 6,00, 8,00 и 10,00 mL од матичниот раствор во волуметриски тиквици од 100 mL, во кои претходно се пренесени по 2,00 mL 4 M NaOH, и разредување на растворот до ознаката со дестилирана вода. Флуоресценцијата на калибрационите стандарди е мерена на емисиона бранова дложина 400 nm со ексцитациона бранова должина 310 nm; резултатите се дадени во наредната табела.

Волумен (mL) на основен стандарден раствор	Интензитет на флуоресцентна емисија
0	0
2,00	3,02
4,00	5,98
6,00	9,18
8,00	12,13
10,00	14,96

Неколку таблети аспирин се спрашени во аванче. Порција од 0,1013 g прав е пренесена во колба од 1 L и колбата е дополнета со дестилирана вода. Порција од овој раствор е филтрирана за да се отстранат нерастворливите врзивни честички, и 10,00 mL аликвот е пренесен во колба од 100 mL, во која претходно се пренесени 2,00 mL 4 M NaOH. По разредувањето до ознаката, за добиениот раствор е измерена флуоресценција од 8,69. Колкава е содржината (масен удел, w/w, во проценти) на ацетилсалицилната киселина во таблетите аспирин?

42. Селен(IV) во природни води може да се определи со комплексирање со амониум пиридин дитиокарбамат и екстракција во CHCl_3 . Овој чекор служи за концентрирање на Se(IV) и одвојување од Se(VI). Se(IV) потоа повторно се екстрахира во водна средина со помош на HNO_3 . По комплексирање со 2,3-диаминонафтален, комплексот е екстрахиран во циклохексан. Флуоресценцијата е мерена на 520 nm, со ексцитација на 380 nm. Калибрацијата е извршена со додавање на познато количество Se(IV) во примерокот вода пред отпочнувањето со анализата. Земајќи ги предвид следниве резултати, колкава е концентрацијата на Se(IV) во примерокот?

Концентрација на додаден Se (IV) (nM)	Интензитет на флуоресценција
0	323
2,00	597
4,00	862
6,00	1123

43. Фибриноген е протеин откриен во човечка плазма, што се синтетизира во црниот дроб. Неговата концентрација во плазмата е клинички важен показател за згрутчување на крвта. Голем број аналитички методи што се користат за определување на концентрацијата на фибриногенот во плазмата се базираат на расејување на светлината по негово таложење. Da Silva и соработниците опишале метода во која фибриногенот се таложи во присуство на амониум сулфат во пуфер со гуанидин хидрохлорид.⁴¹ Расејувањето на светлината е мерено нефелометриски на бранова должина 340 nm. Со анализа на серија надворешни калибрациони стандарди е добиена следнава калибрациона равенка:

$$I = -4,66 + 9907,63C_A$$

каде I е интензитетот на расеаната светлина C_A е концентрацијата на фибриногенот во g/L. Примерок плазма, со волумен 9,00 mL, е земен од пациент и помешан со 1,00 mL антикоагулантен реагенс. 1,00 mL аликвот е разреден до 250 mL во волуметриска колба. Со анализа на добиениот раствор добиен е интензитет на расејување 44,70. Колкава е концентрацијата на фибриногенот (во g/L) во примерокот од плазма.



10Л ПРЕПОРАЧАНА ЛИТЕРАТУРА

Историјата на спектроскопијата се разгледува во:

Laitinen, H. A.; Ewing, G. W., eds. *A History of Analytical Chemistry*; The Division of Analytical Chemistry of the American Chemical Society: Washington, D.C., 1977, pp. 103–243.

Thomas, N. C. “The Early History of Spectroscopy,” *J. Chem. Educ.* **1991**, *68*, 631–633.

Објаснувањето за голем број единици што се користат за опишување на енергијата на електромагнетното зрачење е дадено во статијата:

Ball, D. W. “Units! Units! Units!” *Spectroscopy* **1995**, *10*(8), 44–47.

Теориската обработка на интеракцијата на електромагнетното зрачење со материјата се разгледува во:

Ingle, J. D.; Crouch, S. R. *Spectrochemical Analysis*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1988.

Macomber, R. S. “A Unifying Approach to Absorption Spectroscopy at the Undergraduate Level,” *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 65–67.

Orchin, M.; Jaffe, H. H. *Symmetry, Orbitals and Spectra*. Wiley-Interscience: New York, 1971.

Два приода во поставувањето на Бер-Ламбертовиот закон, без примена на математички апарат, се дадени во следниве статии:

Lykos, P. “The Beer–Lambert Law Revisited: A Development without Calculus,” *J. Chem. Educ.* **1992**, *69*, 730–732.

Ricci, R. W.; Ditzler, M. A.; Nestor, L. P. “Discovering the Beer–Lambert Law,” *J. Chem. Educ.* **1994**, *71*, 983–985.

Дополнителни информации за оптичките карактеристики на решетките и за начините на нивна изработка се дадени во:

Grossman, W. E. L. “The Optical Characteristics and Production of Diffraction Gratings,” *J. Chem. Educ.* **1993**, *70*, 741–748.

Palmer, C. “Diffraction Gratings,” *Spectroscopy* **1995**, *10*(2), 14–15.

Оценка на инструментите за молекулска UV/видлива спектроскопија е дадена во следниве две статии:

Altermose, I. R. “Evolution of Instrumentation for UV–Visible Spectrophotometry: Part I,” *J. Chem. Educ.* **1986**, *63*, A216–A223.

Altermose, I. R. “Evolution of Instrumentation for UV–Visible Spectrophotometry: Part II,” *J. Chem. Educ.* **1986**, *63*, A262–A266.

Статија во два дела за примена на фотодиодна низа во UV/видлива спектроскопија:

Jones, D. G. “Photodiode Array Detectors in UV–Vis Spectroscopy: Part I,” *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1057A–1073A.

Jones, D. G. “Photodiode Array Detectors in UV–Vis Spectroscopy: Part II,” *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1207A–1214A.

Постои опширна литература за Фуриеова трансформација и за нејзина примена во спектроскопијата. Дадени се неколку примери.

Bracewell, R. N. “The Fourier Transform,” *Sci. American* **1989**, *260*(6), 85–95.

Glasser, L. “Fourier Transforms for Chemists: Part I. Introduction to the Fourier Transform,” *J. Chem. Educ.* **1987**, *64*, A228–A233.

Glasser, L. “Fourier Transforms for Chemists: Part II. Fourier Transforms in Chemistry and Spectroscopy,” *J. Chem. Educ.* **1987**, *64*, A260–A266.

Glasser, L. “Fourier Transforms for Chemists: Part III. Fourier Transforms in Data Treatment,” *J. Chem. Educ.* **1987**, *64*, A306–A313.

Graff, D. K. “Fourier and Hadamard: Transforms in Spectroscopy,” *J. Chem. Educ.* **1995**, *72*, 304–309.

Griffiths, P. R. *Chemical Fourier Transform Spectroscopy*. Wiley-Interscience: New York, 1975.

Griffiths, P. R. ed. *Transform Techniques in Chemistry*. Plenum Press: New York, 1978.

Perkins, W. E. “Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Part I. Instrumentation,” *J. Chem. Educ.* **1986**, *63*, A5–A10.

Perkins, W. E. “Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Part II. Advantages of FT–IR,” *J. Chem. Educ.* **1987**, *64*, A269–A271.

Perkins, W. E. “Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Part III. Applications,” *J. Chem. Educ.* **1987**, *64*, A296–A305.

Strong III, F. C. “How the Fourier Transform Infrared Spectrophotometer Works,” *J. Chem. Educ.* **1979**, *56*, 681–684.

Погледнете во следниве извори за повеќе податоци за рефлективна техника во инфрацрвената спектроскопија:

Leyden, D. E.; Shreedhara Murthy, R. S. “Surface-Selective Sampling Techniques in Fourier Transform Infrared Spectroscopy,” *Spectroscopy* **1987**, *2*(2), 28–36.

Optical Spectroscopy: Sampling Techniques Manual. Harrick Scientific Corporation: Ossining, N.Y., 1987.

Porro, T. J.; Pattacini, S. C. “Sample Handling for Mid-Infrared Spectroscopy, Part I: Solid and Liquid Sampling,” *Spectroscopy* **1993**, *8*(7), 40–47.

Porro, T. J.; Pattacini, S. C. “Sample Handling for Mid-Infrared Spectroscopy, Part II: Specialized Techniques,” *Spectroscopy* **1993**, *8*(8), 39–44.

Темелна обработка на мултикомпонентната квантитативна анализа на примероци, базирана на Беров закон, и анализа на примероци за кои не е дефинирана должината на оптичкиот пат, може да се најде во следната ревијална статија.

Brown, C. W.; Obremski, R. J. “Multicomponent Quantitative Analysis,” *Appl. Spectrosc. Rev.* **1984**, *20*, 373–418.

За повеќе информации за оптичката луминесцентна спектроскопија, погледнете ги:

Guilbault, G. G. *Practical Fluorescence*. Decker: New York, 1990.

Schenk, G. “Historical Overview of Fluorescence Analysis to 1980,” *Spectroscopy* **1997**, *12*, 47–56.

Vo-Dinh, T. *Room-Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*. Wiley-Interscience: New York, 1984.

Winefordner, J. D.; Schulman, S. G.; O’Haver, T. C. *Luminescence Spectroscopy in Analytical Chemistry*. Wiley-Interscience: New York, 1969.

Дополнителни информации за атомската апсорпција и за атомската емисија се дадени во:

Blades, M. W.; Weir, D. G. "Fundamental Studies of the Inductively Coupled Plasma," *Spectroscopy* **1994**, 9, 14–21.

Hieftje, G. M. "Atomic Absorption Spectrometry—Has It Gone or Where Is It Going?" *J. Anal. At. Spectrom.* **1989**, 4, 117–122.

Koirtiyohann, S. R. "A History of Atomic Absorption Spectrometry from an Academic Perspective," *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1024A–1031A.

L'Vov, B. V. "Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry," *Anal. Chem.* **1991**, 63, 924A–931A.

Slavin, W. "A Comparison of Atomic Spectroscopic Analytical Techniques," *Spectroscopy* **1991**, 6, 16–21.

Van Loon, J. C. *Analytical Atomic Absorption Spectroscopy*. Academic Press: New York, 1980.

Walsh, A. "The Development of Atomic Absorption Methods of

Elemental Analysis 1952–1962," *Anal. Chem.* **1991**, 63, 933A–941A.

Welz, B. *Atomic Absorption Spectroscopy*. VCH: Deerfield Beach, FL, 1985.

Наредниве текстови може да се разгледаат за понатамошно објаснување на спектроскопските методи на анализа:

Christian, G. D.; Callis, J. B. eds. *Trace Analysis and Spectroscopic Methods for Molecules*. Wiley-Interscience: New York, 1986.

Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Principles of Instrumental Analysis*. Saunders College Publishing: Philadelphia, 1998.

Vandecasteele, C.; Block, C. B. *Modern Methods for Trace Element Determination*. Wiley: Chichester, England, 1994.

Van Loon, J. C. *Selected Methods of Trace Metal Analysis: Biological and Environmental Samples*. Wiley-Interscience: New York, 1985.



101 РЕФЕРЕНЦИ

1. Method 417B in *Standard Methods for the Analysis of Water and Wastewater*; American Public Health Association: Washington, D.C.; 15 ed., 1981, pp. 356–360.

2. (a) Sheppard, N. In Andrews, D. L. Ed. *Perspectives in Modern Chemical Spectroscopy*. Springer-Verlag: Berlin, 1990, pp. 1–41; (b) Tyson, J. *Analysis: What Analytical Chemists Do*. Royal Society of Chemistry: Letchworth, England, 1988, pp. 49–52.

3. Home, D.; Gribbin, J. *New Scientist* **1991**, 2 November, 30–33.

4. Ball, D. W. *Spectroscopy* **1994**, 9(5), 24–25.

5. Ball, D. W. *Spectroscopy* **1994**, 9(6), 20–21.

6. Jiang, S.; Parker, G. A. *Am. Lab.* **1981**, October, 38–43.

7. Strong, F. C., III *Anal. Chem.* **1976**, 48, 2155–2161.

8. Gilbert, D. D. *J. Chem. Educ.* **1991**, 68, A278–A281.

9. Seitz, W. R. *Anal. Chem.* **1984**, 56, 16A–34A.

10. Angel, S. M. *Spectroscopy* **1987**, 2(2), 38–48.

11. Method 3500-Fe-B as published in *Standard Methods for the Analysis of Water and Wastewater*. American Public Health Association: Washington, D.C., 19th ed., 1998, pp. 3–76 to 3–78.

12. DiTusa, M. R.; Schilt, A. A. *J. Chem. Educ.* **1985**, 62, 541–542.

13. Mehra, M. C.; Rioux, J. J. *J. Chem. Educ.* **1982**, 59, 688–689.

14. Blanco, M.; Iturriaga, H.; Maspocho, S.; et al. *Chem. Educ.* **1989**, 66, 178–180.

15. (a) Saxberg, B. E. H.; Kowalski, B. R. *Anal. Chem.* **1979**, 51, 1031–1038; (b) Jochum, C.; Jochum, P.; Kowalski, B. R. *Anal. Chem.* **1981**, 53, 85–92; (c) Gerlach, R. W.; Kowalski, B. R. *Anal. Chim. Acta.* **1982**, 134, 119; (d) Kalivas, J. H.; Kowalski, B. R. *Anal. Chem.* **1981**, 53, 2207–2212; Raymond, M.; Jochum, C.; Kowalski, B. R. *J. Chem. Educ.* **1983**, 60, 1072–1073.

16. Ramette, R. W. *Chemical Equilibrium and Analysis*. Addison-Wesley: Reading, MA, 1981, Chapter 13.

17. Rothman, L. D.; Crouch, S. R.; Ingle, J. D. Jr. *Anal. Chem.* **1975**, 47, 1226–1233.

18. (a) Walsh, A. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 933A–941A; (b) Koirtiyohann,

S. R. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1024A–1031A; (c) Slavin, W. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1033A–1038A.

19. Ingle, J. D.; Crouch, S. R. *Spectrochemical Analysis*. Prentice-Hall: Englewood Cliffs, N.J., 1988; p. 275.

20. Parsons, M. L.; Major, S.; Forster, A. R. *Appl. Spectrosc.* **1983**, 37, 411–418.

21. Hosking, J. W.; Snell, N. B.; Sturman, B. T. *J. Chem. Educ.* **1977**, 54, 128–130.

22. (a) Bhattacharya, S. K.; Goodwin, T. G.; Crawford, A. J. *Anal. Lett.* **1984**, 17, 1567–1593; (b) Crawford, A. J.; Bhattacharya, S. K. "Microanalysis of Copper and Zinc in Biopsy-Sized Tissue Specimens by Atomic Absorption Spectroscopy Using a Stoichiometric Air–Acetylene Flame"; Varian Instruments at Work, Number AA-46, April 1985.

23. (a) Mule, S. J.; Hushin, P. L. *Anal. Chem.* **1971**, 43, 708–711; (b) O'Reilly, J. E. *J. Chem. Educ.* **1975**, 52, 610–612.

24. Dawson, J. B. *J. Anal. At. Spectrosc.* **1991**, 6, 93–98.

25. Goodney, D. E. *J. Chem. Educ.* **1982**, 59, 875–876.

26. Hach, C. C.; Bryant, M. "Turbidity Standards"; Technical Information Series-Booklet No. 12, Hach Company: Loveland, CO, 1995.

27. Method 4500-SO₄²⁻-E in *Standard Methods for the Analysis of Water and Wastewater*; American Public Health Association: Washington, D.C.; 20th ed., 1998, pp. 4–178 to 4–179.

28. Lozano-Calero, D.; Martín-Palomeque, P.; Madueño-Loriguillo, S. *J. Chem. Educ.* **1996**, 73, 1173–1174.

29. Saito, T. *Anal. Chim. Acta.* **1992**, 268, 351–355.

30. Lin, J.; Brown, C. W. *Spectroscopy* **1995**, 10(5), 48–51.

31. Jones, M.; Thatcher, R. L. *Anal. Chem.* **1951**, 23, 957–960.

32. Seaholtz, M. B.; Pence, L. E.; Moe, O. A. Jr. *J. Chem. Educ.* **1988**, 65, 820–823.

33. Zhao, Z.; Malinowski, E. R. *Spectroscopy* **1996**, 11(7), 44–49.

34. Grossman, O.; Turanov, A. N. *Anal. Chim. Acta.* **1992**, 257, 195–202.

35. Kawakami, T.; Igarashi, S. *Anal. Chim. Acta.* **1996**, 333, 175–180.

36. Hobbins, W. B. "Direct Determination of Phosphorus in Aqueous Matrices by Atomic Absorption"; Varian Instruments at Work, Number AA-19, February 1982.
37. Bonert, K.; Pohl, B. "The Determination of Cd, Cr, Cu, Ni, and Pb in Concentrated CaCl₂/NaCl Solutions by AAS"; AA Instruments at Work (Varian), Number 98, November 1990.
38. Quigley, M. N.; Vernon, F. *J. Chem. Educ.* **1996**, 73, 671–673.
39. Gluodenis, Jr., T. J. *Am. Lab.* November **1998**, 245–275.
40. Yan, G.; Shi, G; Liu, Y. *Anal. Chim. Acta.* **1992**, 264, 121–124.
41. da Silva, M. P.; Fernández-Romero, J. M.; Luque de Castro, M. D. *Anal. Chim. Acta.* **1996**, 327, 101–106.