

Аналитичка и инструментална хемија
Предавања

Вовед

Студии по биохемија и физиологија
и молекуларна биологија

Вовед во аналитичка хемија

АНАЛИТИКА

(во хемија, физика, математика, информатика, комерција, бизнис, политика)

Анализа на ситуации или настани. Обезбедува информации за:

- природата и бројот на составни делови на системот
- количества
- просторен распоред и промени со тек на време
- разработка на методологија и постапки за постигнување на овие цели
- проценка и понуда на алтернативни решенија

**СТРУКТУИРАНА ТЕХНИКА
ШТО ДОВЕДУВА ДО КОМПЛЕКСНИ РЕШЕНИЈА**

Аналитичка хемија

Дел од хемијата кој се занимава со изучување на:

- квалитативниот состав на материјалите (од кои компоненти се изградени материјалите)
- квантитативен состав на компонентите (колкава е нивната застапеност во испитуваниот примерок)
- како се однесуваат компонентите во различни услови, како се одделуваат и комбинираат (какви промени настануваат)

Карактеристични реакции на компонентите

Хемиски и физички карактеристики



Определување на
структурата/составот на
материјалот

Аналитичка хемија наспроти Хемиска аналитика

- Разлики меѓу аналитичката хемија и хемиската аналитика,
- Разлики меѓу аналитички хемичар и хемиски аналитичар (аналитичар).

Дефиниција?



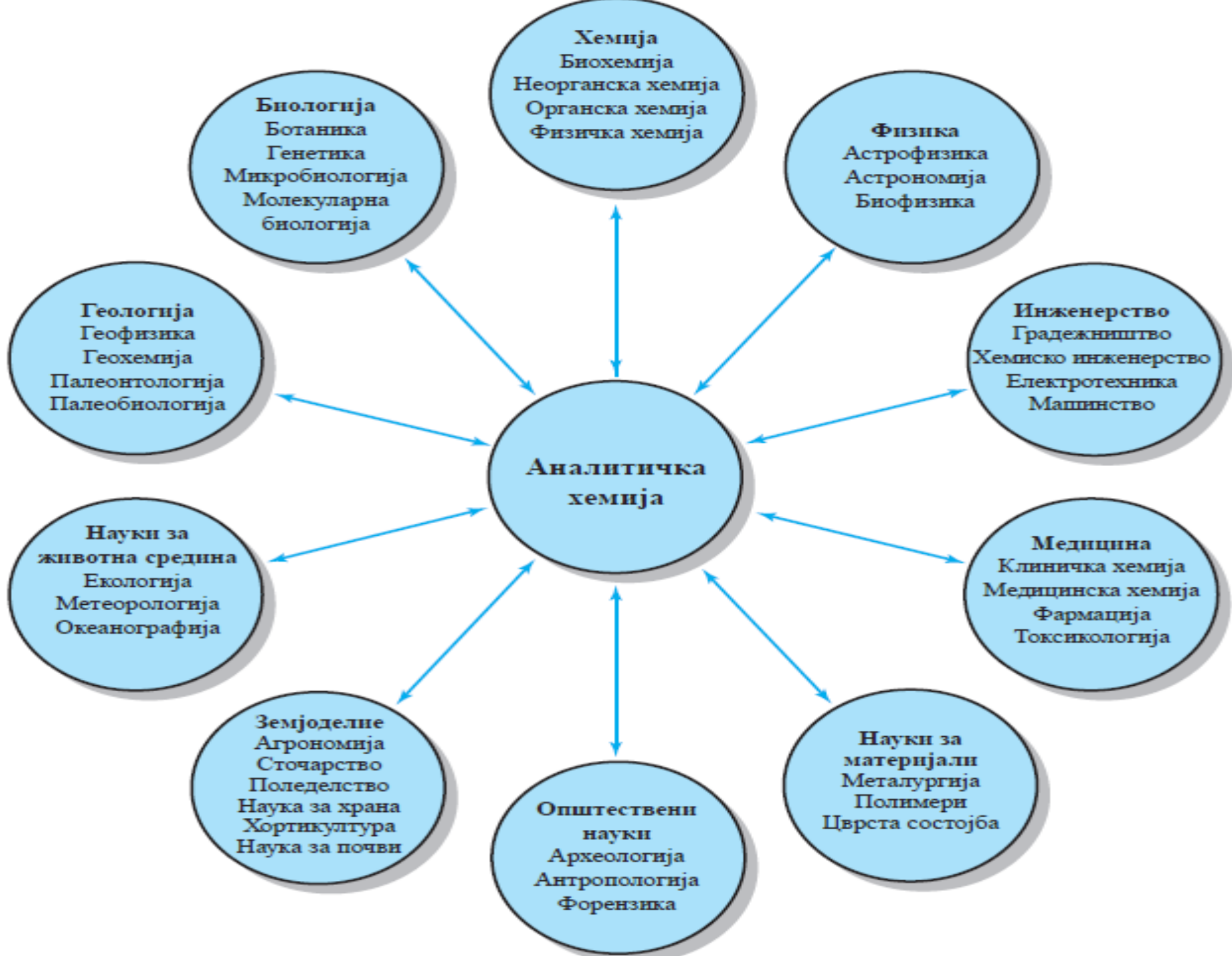
Фридрих Вилхелм Освалд (1853-1932), руско-германски физико-хемичар и нобеловец:

„Аналитичка хемија, или вештина на препознавање различни супстанции и определување на нивните конституенти, зазема важно место меѓу применетите науки. Таа дава одговори на прашањата кои се дел од хемиските процеси и се резултат на научни или технолошки процеси“



Американско хемиско друштво (American Chemical Society - ACS):

„Аналитичката хемија е наука на добивањето, обработката и интерпретацијата на податоците за составот и структурата на материјата. Со други зборови, таа е наука за определување на квалитативниот и квантитативниот состав на материјалите.



Аналитички пристап

Процес во 5 чекори:

- Идентификација и дефинирање на проблемот
- Разработка на експериментална постапка
- Изведување на експериментот и собирање податоци
- Анализа на експериментално добиените податоци
- Предлог решение за проблемот

1. Дефинирање на проблемот

Определување на видот на потребната информација (квалитативна, квантитативна, структурна, фундаментална)
Идентификација на содржината на проблемот

2. Разработка на експериментална постапка

Воспоставување на критериуми (точност, прецизност, осетливост, селективност, цена, брзина)
Идентификација на интерферентите
Избор на метода
Воспоставување критериуми за валидација
Стратегија за земање примерок

Дијаграм на текот на аналитичкиот пристап

3. Спроведување на експериментот

Калибрација на инструменти и прибор
Стандардизација на реагенсите
Собирање на податоците

5. Решение

Надворешно проценување

4. Анализа на податоците

Трансформација
Статистика
Потврда
Интерпретација



Аналитичка хемија / инструментална хемија

Аналитичка хемија: квалитативна и квантитативна анализа

- класични методи за анализа
- погодни за анализа на поголеми количини аналит

Инструментална хемија

(дел од аналитичката хемија која за определување користи инструменти): квалитативна, квантитативна, структурна, динамичка анализа.

- брзо, паралелно определување на повеќе компоненти без разделување, сензитивни методи, мала количина од примерокот, елиминиран субјективен фактор.

Добивање на аналитичката информација

Аналитичка информација – сигнал карактеристичен за испитуваните компоненти:

- За квалитативни цели: зависи од природата на испитуваната компонента.
- За квантитативни цели: величини карактеристични за количеството на компонентата (интензитет на боја, степен за зрачење...).
- Временска зависност (тридимензионална информација). Промена на квантитативниот состав во зависност од времето.

Компонентна аналитика

- Еднодимензионална анализа:
 - квалитативна анализа: има / нема
 - квантитативна анализа: колку има
- Дводимензионална анализа:
 - квантитативен и квалитативен состав: што има и колку има
- Тридимензионална анализа
 - промена на квалитативниот и/или квантитативниот состав на пробата

КЛАСИФИКАЦИЈА НА КВАНТИТАТИВНИ МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗА

- **Класични методи**

1. **Гравиметриска метода:** се мери **МАСАТА**.
2. **Волуметриски методи:** се мери **ВОЛУМЕНОТ** што се потрошил или добил за определување на количеството од анализот.

- **Некласични методи**

3. **Инструментални методи:** користење на **ИНСТРУМЕНТИ** за детектирање на сигналот
 - **Електрични** и магнетни (електрон-трансфер, магнетна суцептибилност)
 - **Спектроскопски**, базирани на взаемодејство на електромагнетно зрачење со испитувана супстанца
 - **Сепарациони техники:** GC, HPLC
 - Дополнителни аналитички техники: радиохемиски методи, масена спектрометрија, кинетика, термички својства, **рефрактометрија....**

Користен сигнал за определување на бараната супстанца (**аналит**)

Физички карактеристики

маса

волумен

боја

индекс на рефракција

топлотна спроводливост

Интеракции со електромагнетно зрачење (спектроскопија)

апсорпција

емисија

ресејување

Електричен полнеж

електрохемија

масена спектрометрија

Основни средства во аналитичката хемија

- Единици мерки
- Значајни цифри и заокружување
- Изразување на концентрацијата
- Лабораториски прибор
- Лабораториски дневник

Термини во аналитичката хемија

- **Анализа**: дава информации (хемиски или физички) во врска со примерокот.
- **Аналити**: компоненти од примерокот кои се од интерес.
- **Матрица**: остатокот од примерокот.
- **Определување**: анализа на примерокот за да се утврди идентитетот, квалитативниот и/или квантитативниот состав.
- **Мерење**: споредување на големината на некое својство со некој стандард.

- **Техника:** било кој хемиски или физички принцип кој може да се употреби за изучување на аналит.
(Пр. гравиметрија, волуметрија, ААС, NMR)
- **Метода:** примена на техниката за определувањето на даден аналит во определена матрица.
(Пр. за определување Pb во крв, во отпадна вода, во почва)
- **Постапка:** збир од инструкции за начин на анализа на примерок.
- **Протокол:** збир од строго дефинирани, детални инструкции за спроведување на анализа на примерок.

- **Сигнал (S):** одговор од анализатот предизвикано од мерењето кој е пропорционален со некое негово својство.
(Пр. апсорпција/конц.; боја на талог/квалитативен состав)
- **Техника на вкупна анализа:** збир од техники пропорционални со вкупното количество анализит.
(Пр. класични техники), $S_A = k n_A$
- **Концентрациски техники:** техники кај кои сигналот е пропорционален со концентрацијата на анализитот.
(Пр. инструментални техники), $S_A = k c_A$

При **анализата** се определува идентитетот, концентрацијата или својствата на анализитите. За да се направи ова **определување**, се **мери** едно или повеќе хемиски или физички својства од анализитот.

- **Точност:** мерка за разликата меѓу експерименталниот резултат и неговата очекувана вредност.

Се изразува како релативна грешка:

$$\text{Грешка (\%)} = \frac{\text{добиена вредност} - \text{очекувана вредност}}{\text{очекувана вредност}} \cdot 100$$

- **Прецизност:** дава информации за репродуцибилноста на мерењата или добиените резултати.

- **Осетливост:** мерка за способноста на методата да направи разлика помеѓу два примерока со различна содржина на аналит. Се дефинира како промена на сигнал на единица промена на количество аналит:

$$k = \frac{\Delta S}{\Delta n} , \quad k = \frac{\Delta S}{\Delta c}$$

ΔS – промена на вредноста на сигналот,

Δn – промена на количеството на аналит,

Δc – промена на концентрација на аналит.

- **Граница на детекција:** вредност за најмалото количество аналит кое може да се определи со сигурност (различно од осетливост!).
- **Селективност:** мерка за независноста на методата кон интерференти во однос на онаа кон аналитот.
- **Коефициент на селективност:** мерка за осетливоста на методата кон интерферент (I) во однос на онаа кон аналитот (A):

$$S = S_A + S_I = k_A \cdot n_A + k_I \cdot n_I$$

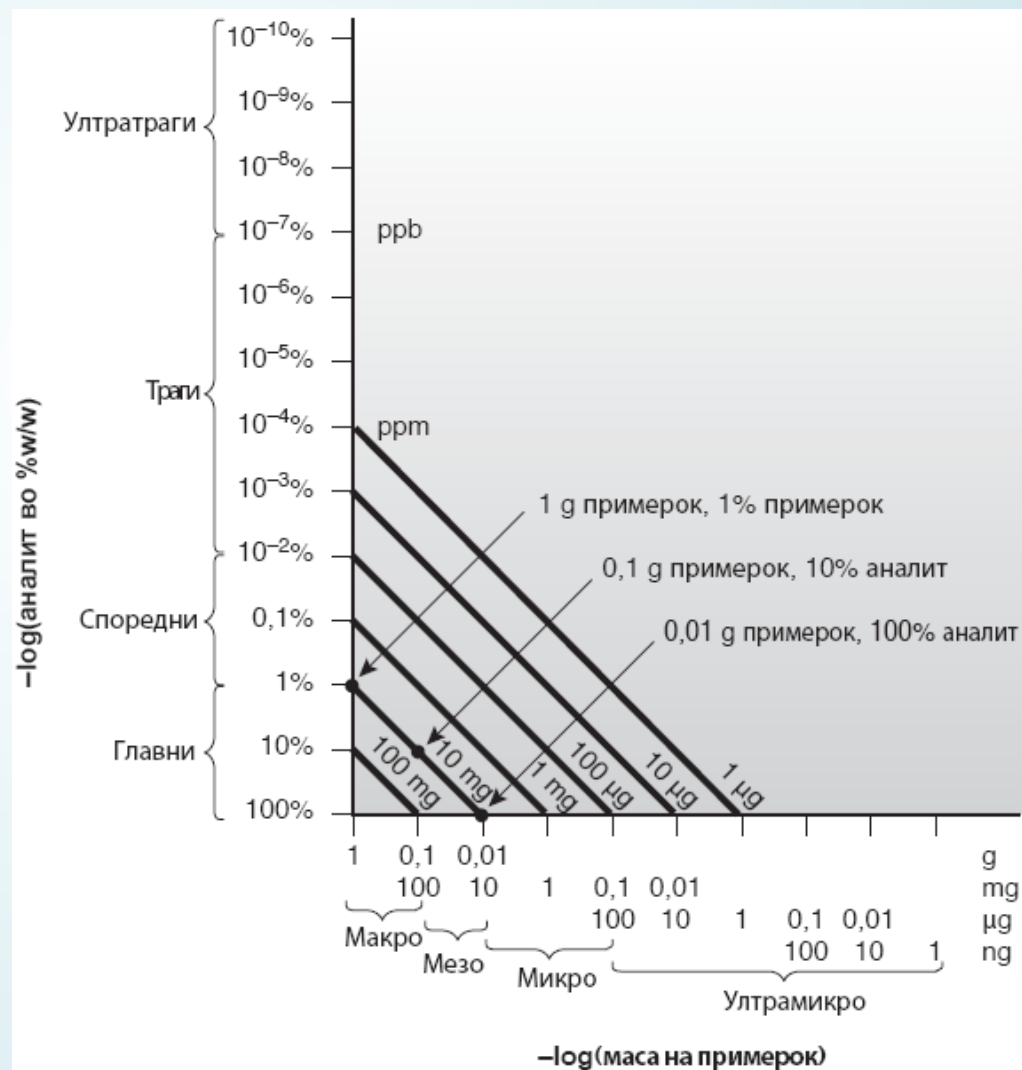
$$K_{A,I} = \frac{k_I}{k_A}$$

- **Робусност:** својство на методата да не зависи од типот на матрицата (интерферентите).
- **Отпорност:** својство на методата да не биде осетлива на промени во експерименталните услови.

- **Интервал на работа:** ја дава врската меѓу содржината на анализот и масата на примерокот што треба да се земе за анализа.

Ограничувања:

- маса од примерок достапна за анализа,
- концентрацијата од анализ во примерокот,
- апсолутната количина од анализ неопходна за добивање на сигнал кој може да се измери.



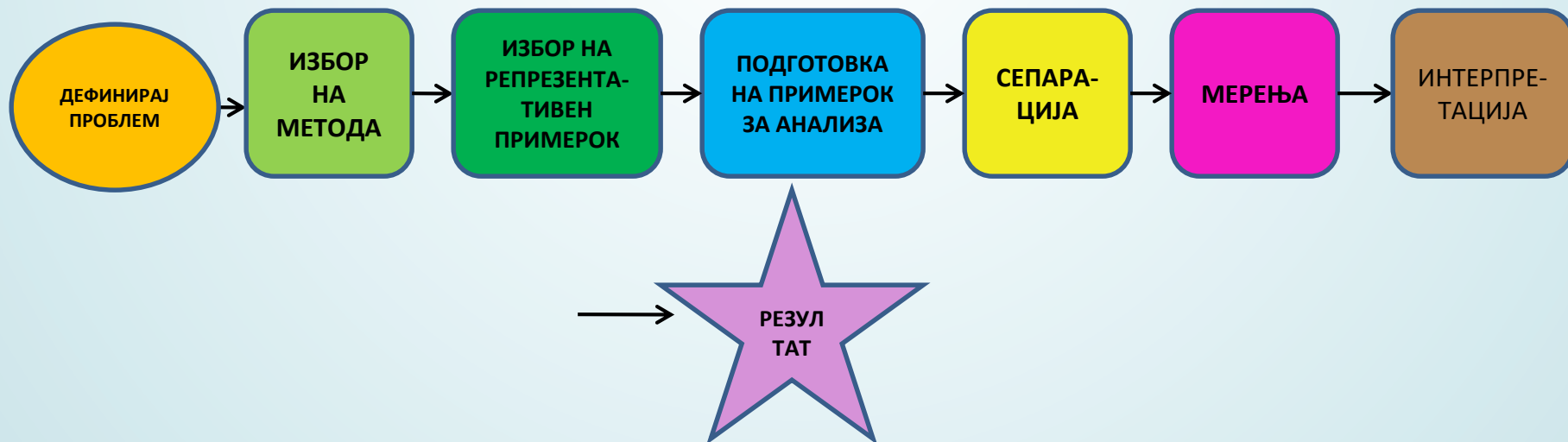
- **Слепа проба:** примерок кој ги содржи сите компоненти од матрицата, освен анализот.
- **Калибрација:** потврда и/или приспособување и подобрување на сигналот измерен со дел од опремата или инструментите.
- **Стандардизација:** поставување врска меѓу количеството аналит и сигналот добиен од методата.
- **Валидација:** процес на потврдување дека методата ги дава очекуваните резултати.
- **Калибрациона крива:** математичка зависност која ја покажува врската меѓу сигналот и количеството аналит.

МЕТОДОЛОГИЈА НА РЕШАВАЊЕ НА АНАЛИТИЧКИ ПРОБЛЕМ (т.н АНАЛИТИЧКИ ПРОЦЕС) или аналитички пристап кон решавање на проблемите

Анализата вклучува неколку постапки и операции, кои ќе зависат од:

1. Дадениот проблем 2. Нашата експертиза 3. Апаратурата и инструментацијата со која располагаме. Накратко:

- Идентификување и дефинирање на проблемот
- Разработка на експериментална постапка (метода, примерок, подготовка)
- Изведба на експеримент и собирање на податоци (сепарација, мерења)
- Анализа на експерименталните податоци
- Предложено решение за проблемот



ДЕФИНИРАЈ
ПРОБЛЕМ

- Што треба да се определува - Квалитативна или квалитативна или структурна анализа или...?
- За што ќе се користи информацијата? Кој ќе ја користи?
- Колку брзо е потребен резултатот?
- Колку точен и прецизен треба да биде?
- Колкав е буџетот?

Аналитичарот ја разработува стратегијата со клиентот, вклучувајќи го и начинот на добивање примероци

ИЗБОР
НА
МЕТОДА

Фактори:

- Тип на примерок
- Величина на примерокот
- Подготовка на проба (да или не)
- Концентрација и интервал (осетливост)
- Селективност (интерференции?)
- Точност (прецизност)
- Инструментација/автоматизација (да или не)
- Експертиза/искуство
- Цена
- Брзина
- Достапност на методи (стандардни) во литературата/поставување нов приод?

**ИЗБОР НА
РЕПРЕЗЕНТА-
ТИВЕН
ПРИМЕРОК**

Фактори:

- тип на примерок/хомогеност/димензии
- земање примерок/грешки

**ПОДГОТОВ-
КА НА
ПРИМЕРОК
ЗА АНАЛИЗА**

Фактори:

- цврсто, течно, гас
- се раствора ли?
- да се согори или да се загрева?
- хемиско сепарирање или маскирање на интерферентите
- потреба за концентрирање/разредување?
- потреба за трансформација на аналитот за детекција?
- потреба за подесување на условите (pH, реагенси)

СЕПАРА- ЦИЈА

- Дестилација
- Таложeње
- Екстракција со растворувачи
- Цврсто-фазна екстракција
- Хроматографија (и како дел од мерењето)
- Електрофореза (и како дел од мерењето)

МЕРЕЊА

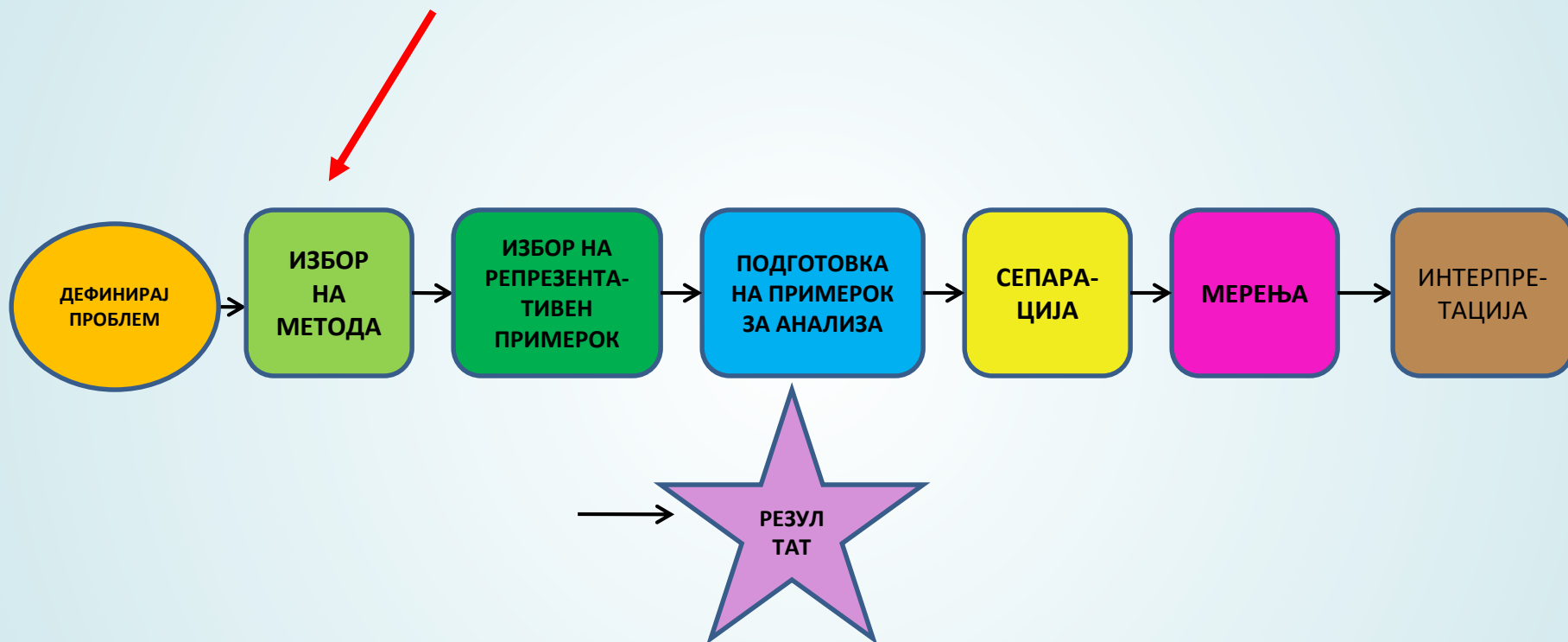
Фактори:

- Калибрација
- Валидација/контроли/слепи проби
- паралелни проби/повторување

ИНТЕРПРЕ- ТАЦИЈА

- Статистичка анализа
- Извештај на резултатот со ограничувањата/
интервал на доверба

Следење на чекорите за спроведување на анализата



Избирање на аналитичка метода

Методата е примена на определена техника врз даден аналит во дадена матрица.

Пр. Определување на концентрацијата на олово во води за пиење:

- **гравиметриска** метода (нерастворливи соли од олово како PbSO_4 и PbCrO_4)
- **титриметриска** метода со градење на комплекси
- **спектрофотометриска** метода со комплекси што апсорбираат
- **атомска апсорпциона** спектроскопија со олово како слободен атом во гасна состојба.
- **кулометриските, потенциометриските** и волтаметриските методи на Pb , Pb^{2+} , Pb^{4+})

Потребите на анализата ја определуваат најдобрата метода. Во избирањето на метода се дава важност на некои или на сите следни критериуми: **точност, прецизност, осетливост, селективност, робустност, издржливост, ниво на работење, време на анализа, достапност на опрема и цена.**

Споредба на различни аналитички методи

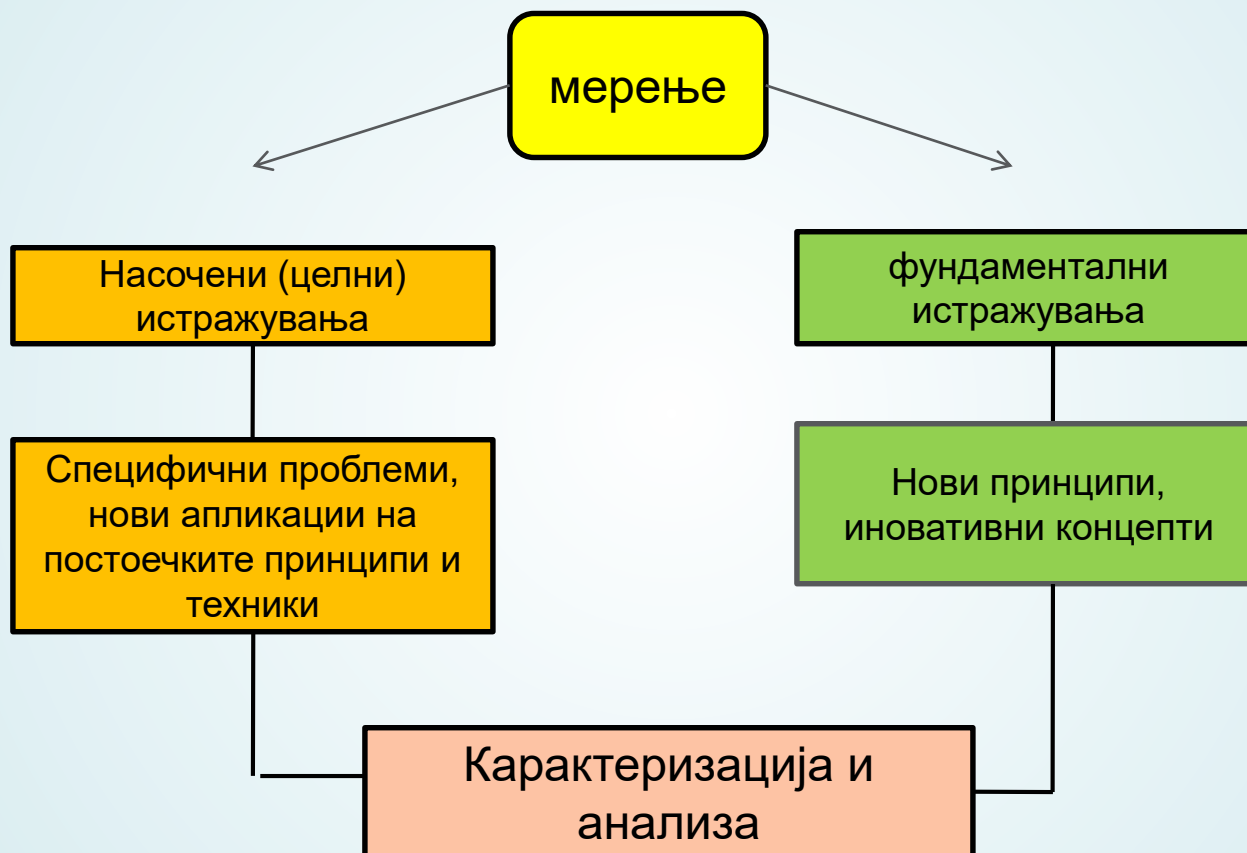
Method	Approx. Range (mol/L)	Approx. Precision (%)	Selectivity	Speed	Cost	Principal Uses
Gravimetry	10^{-1} – 10^{-2}	0.1	Poor–moderate	Slow	Low	Inorg.
Titrimetry	10^{-1} – 10^{-4}	0.1–1	Poor–moderate	Moderate	Low	Inorg., org.
Potentiometry	10^{-1} – 10^{-6}	2	Good	Fast	Low	Inorg.
Electrogravimetry, coulometry	10^{-1} – 10^{-4}	0.01–2	Moderate	Slow–moderate	Moderate	Inorg., org.
Voltammetry	10^{-3} – 10^{-10}	2–5	Good	Moderate	Moderate	Inorg., org.
Spectrophotometry	10^{-3} – 10^{-6}	2	Good–moderate	Fast–moderate	Low–moderate	Inorg., org.
Fluorometry	10^{-6} – 10^{-9}	2–5	Moderate	Moderate	Moderate	Org.
Atomic spectroscopy	10^{-3} – 10^{-9}	2–10	Good	Fast	Moderate–high	Inorg., multielement
Chromatography	10^{-3} – 10^{-9}	2–5	Good	Fast–moderate	Moderate–high	Org., multicomponent
Kinetic methods	10^{-2} – 10^{-10}	2–10	Good–moderate	Fast–moderate	Moderate	Inorg., org., enzymes

Класификација на аналитичките методи според количеството примерок

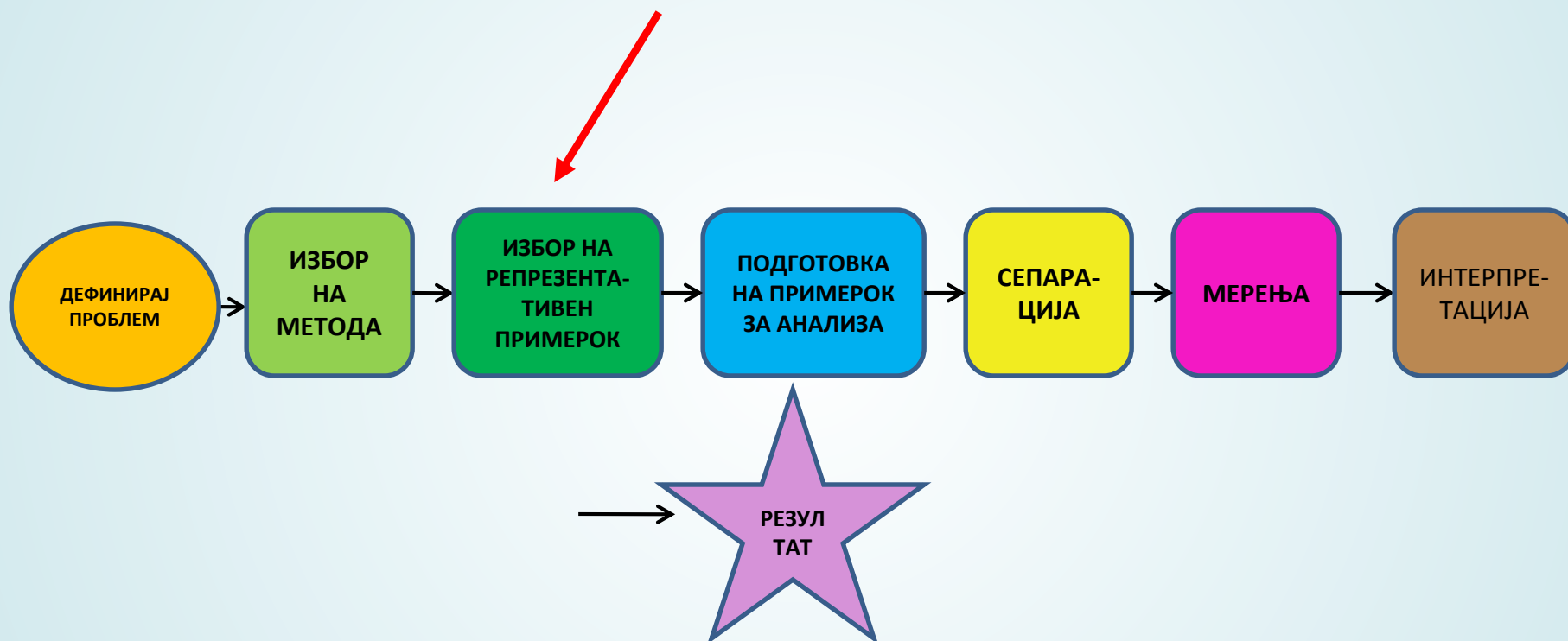
Method	Sample Weight (mg)	Sample Volume (μ L) ^a
Meso	>100	>100
Semimicro	10–100	50–100
Micro	1–10	<50
Ultramicro	<1	

^a μ L = Microliter.

Напредокот во науките што се базираат на **мерења**
се темели на фундаментални и насочени истражувања



Следење на чекорите за спроведување на анализата



1. Дизајнирање план за земање примерок:

1. Од каде, во рамки на целната популација, треба да се земат примероци?
2. Каков вид на примероци треба да се земат?
3. Колку е минималното количество од примерок потребно за секоја анализа?
4. Колку примероци треба да бидат анализирани?
5. Како може вкупната варијанца да се минимизира?

1 . Од каде да се земе примерок од целната популација

- грешки при земање примерок за: **хомоген материјал** / **хетероген материјал** (во време или простор).
- **случаен примерок** (примерок земен по случаен избор од целната популација)
- **проценето земање примерок** (примероци земени од целната популација, употребувајќи достапна информација за распространетоста на аналитот во популацијата)
- **систематско земање примерок** (примероци земени од целната популација во точни временски или просторни интервали)
- **слоевито земање примерок** (план за земање примерок кој ја дели популацијата на одделни слоеви од кои се земаат случајни примероци)
- **погодно земање примерок** (план за земање примерок, во кој примероци се земаат бидејќи е лесно да се обезбедат)
- **одвоен примерок** (еден примерок земен од целната популација)
- **композитен примерок** (неколку одвоени примероци комбинирани за да формираат единствен примерок)
- **in situ земање примерок** (земање примерок во популацијата без физичко отстранување на примерок)

II. Примена на план за земање примерок:

1. Физичко отстранување на примерокот од неговата целна популација,
2. Конзервирање на примерокот
3. Подготовка на примерокот за анализа.

1. Отстранување на примерокот од целната популација → анализа

Садови за земање примероци: од стакло или пластика.

Стаклени садови секогаш се употребуваат кога се земаат примероци за анализа на **пестициди, масла и масти** и **органски супстанции**, бидејќи овие соединенија често заемодејствуваат со пластичната површина.

Бидејќи стаклената површина лесно апсорбира јони од метали, **пластичните шишиња** се подобри за примероци за анализа на **метали во траги**.

2. Конзервирање (За биолошки примероци –смрзнување, органски растворувачи)

Методи на конзервирање и максимално време на задржување, за одбрани параметри во вода и отпадна вода

ИЗБОР НА РЕПРЕЗЕНТАТИВЕН ПРИМЕРОК

Параметар	Конзервирање	Максимално време на задржување
амонијак	разлади до 4 °C, H ₂ SO ₄ до pH<2	28 дена
хлорид	ништо не е потребно	28 дена
метали – Cr(VI)	разлади до 4 °C	24 h
метали – Hg	HNO ₃ до pH<2	28 дена
метали – сите останати	HNO ₃ до pH<2	6 месеци
нитрати	ништо не е потребно	48 h

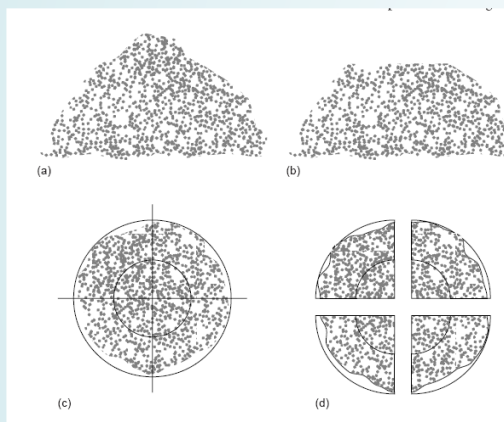
Material	Optimal	Acceptable	Do not use
Genomic DNA	-20°C or less	-20°C – 4°C for a few months	> 4°C
Plasmid DNA	-20°C or less	-20°C – 4°C for a few months	> 4°C
Cultured Eukaryotic Cells, growing	Growth temp to 4°C	Will stop growing at lower temps	Significantly above growth temp or freezing will kill them.
Cultured Eukaryotic Cells, fixed	4°C for years	Room temp for several months	Can be damaged by excessive heat.
Eukaryotic Cells in storage media	Liquid nitrogen	NA	NA
Whole tissue/Body Parts	Up to -20°C	-20°C to 4°C	> 4°C
Bacterial cultures, growing	Growth temp to 4°C	Will stop growing at lower temps	Significantly above growth temp or freezing will kill them.
Bacterial cultures, pelleted	-20°C or less	4°C for 1 hr or so	>4°C
RNA	-80°C or less	-80°C to 4°C	>4°C for >18hrs
Whole blood	-80°C or less	4°C for 1 hr or so	>4°C
Saliva	-80°C or less	4°C for 1 hr or so	>4°C
Sampled cells (e.g. cheek swab)	-80°C or less	4°C for 1 hr or so	>4°C
Enzymes	-20°C	Some okay at 4°C	>-20°C
PCR Products	-20°C	-20°C to 4°C	>4°C for >a few min
Dinucleotide triphosphates (dNTPs)	-20°C, can be thawed for regular use at 37°C or less and refrozen.	-20°C to 30°C	Multiple freeze-thaw cycles, or prolonged exposure to heat can be damaging.
Chemically Competent <i>E. coli</i>	-80°C, can be refrozen but not recommended	Ice, 30 minutes	>0°C for > 30-60 minutes

Следење на чекорите за спроведување на анализата

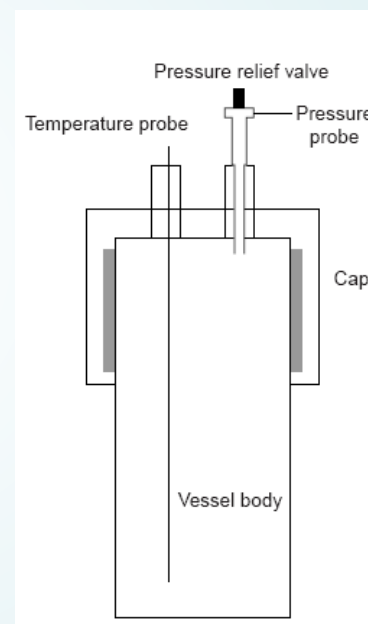


3. Подготовка на примерокот

- течности и гасови
- цврсти примероци (особено хетерогени), пр. анализа на руда
- преведување на примерокот во раствор



Добивање репрезентативна проба

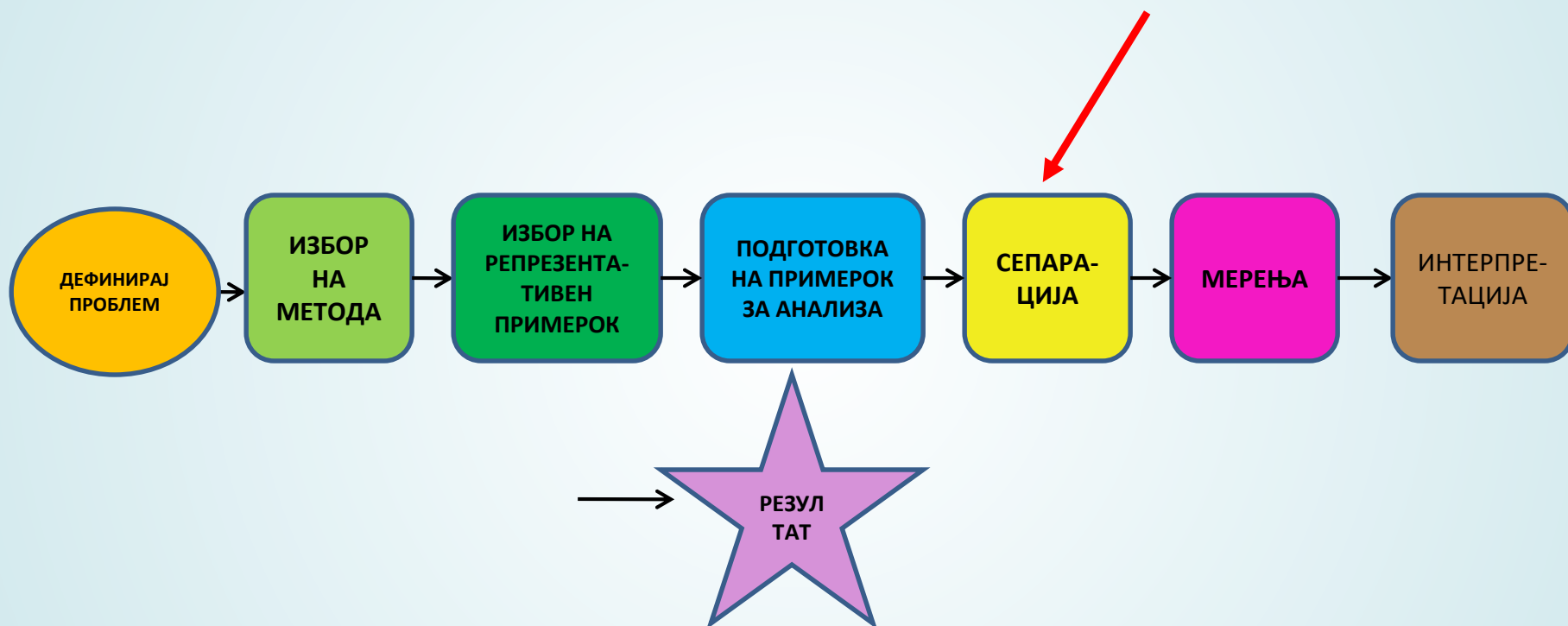


Шематски дијаграм на сад за растворање со микробрани.

Киселини и бази кои се употребуваат за растворање на примероци

Раствор ($\approx w/\%$)	Примени и својства
HCl (37 %)	- раствора метали кои полесно се редуцираат од H_2 ($E^0 < 1$) - раствора нерастворливи карбонати, сулфиди, фосфати, флуориди, сулфати и многу оксиди
HNO ₃ (70 %)	- силен оксидационен реагенс - ги раствора најчестите метали освен Al и Cr - разложува органски и биолошки примероци (мокро спалување)
H ₂ SO ₄ (98 %)	- раствора многу метали и легури - разложува органски супстанции преку оксидација и дехидратација
HF (50 %)	- раствора силикати образувајќи испарлив SiF₄
HClO ₄ (70 %)	- топли, концентрирани раствори се силни оксидациони реагенси - раствора многу метали и легури - разложува органски супстанции (<i>реакциите со органски супстанции често се експлозивни, употреби ги во специјално опремени дигестори со заштитно стакло и после претходно разложување со HNO₃</i>)
HCl:HNO ₃ (3:1 v/v)	- познат уште како царска вода (aqua regia) - раствора Au и Pt
NaOH	- раствора Al и атмосферски оксиди од Sn, Pb, Zn и Cr.

Следење на чекорите за спроведување на анализата



Раздвојување на анализот од интерференти

- **Цел:** отстранување на анализот или интерферентот од матрицата;
- **Услови:** да постои барем една значителна разлика помеѓу хемиските или физичките својства на анализот и интерферентот;
- **Недостатоци:** раздвојување, во кое целосно се отстранува интерферентот може да доведе до делумно губење на анализот. Ако се адаптира раздвојувањето за да се минимизира загубата на анализ, може да заостане интерферентот;
- **Решение:** принос (recovery) на анализот, R_A .

$$R_A = \frac{c(A)}{c(A)_o} \quad 0 < R_A < 1$$

$c(A)$ – конц. по разделувањето

$c(A)$ – конц. на почетокот

Класификација на техниките за раздвојување

Основа на раздвојување	Техника на раздвојување
големина	филтрирање дијализа димензионо-исклучувачка хроматографија
маса и густина	центрифугирање
образување комплекси	маскирање
промена во физичка состојба	дестилација сублимација рекристализација
промена во хемиска состојба	таложeње јонска размена електродна депозиција испарување
одвојување помеѓу фази	екстракција хроматографија

Раздвојувања базирани на големина

Големина - физичко својство за раздвојување. Раздвојувањето се постигнува употребувајќи порозен медиум низ кој може да помине само анализот или интерферентот.

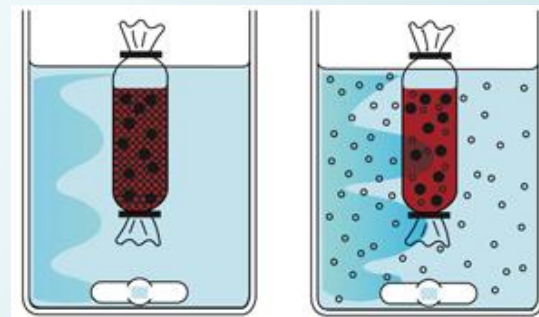
1. Филтрирање

- се базира на гравитационата сила,
- под намален или зголемен притисок.
- за издвојување на анализи, присутни како цврсти честички.



2. Дијализа

- семипермеабилна мембрана,
- материјал на мембрана: целулоза, со големина на пори од 1-5 nm.
- Се темели на различна концентрација на анализот во внатрешноста изолирана од мембраната и надворешниот р-р,
- употреба: за прочистување на протеини, хормони и ензими.
- дијализа на крв: метаболитичките отпадни продукти (уреа, уринска киселина и креатинин) се отстрануваат од крвта преку поминување над мембраната за дијализа.

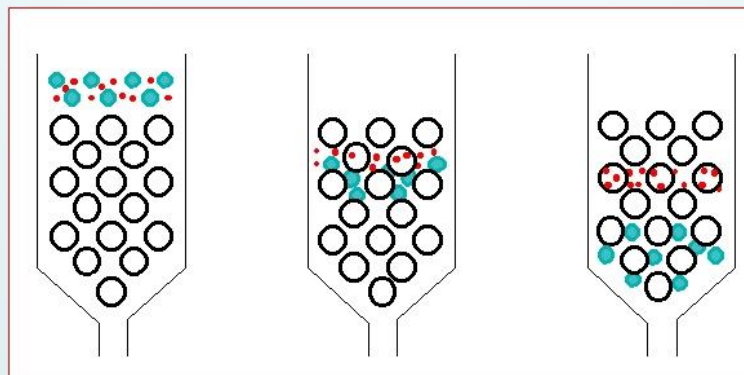


почеток крај
на дијализата

3. Димензионално-исклучувачка хроматографија

(хроматографија со раздвојување базирано на големина на молекулите или т.н. гел-пропустлива)

- **Полнење на колоната:** порозни честички 10 μm ,
- **Материјал на полнењето:** вкрстено-сврзан декстрин или полиакриламид.
- **Големината на порите:** контролира преку степенот на вкрстено сврзување. Поголемо вкрстено сврзување - помала големина на пори.
- **Мобилна фаза:** растворувач, се пумпа низ колоната со фиксирана брзина на течење.
- **Принцип:** големите честички не се задржуваат во малите пори и поминуваат низ колоната со иста брзина како и растворувачот. Подолго време им треба на честичките што можат да навлезат во порите, за да поминат низ колоната.
- **Употреба:** анализата на полимери, во биохемијата за раздвојување на **протеини**.

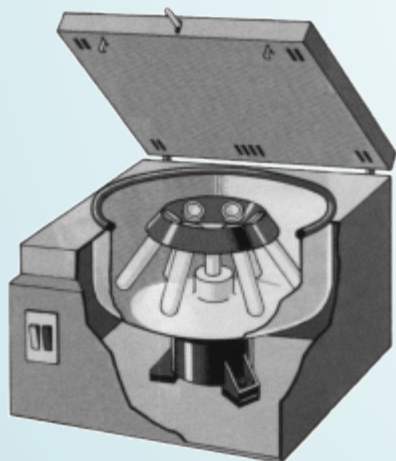


Раздвојувања базирани на маса и/или густина

Центрифугална сила – овозможува поголема брзина на седиментација на честичките со поголема маса.

1. Центрифугирање

- се користи уред наречен центрифуга,
- со контрола на бројот на вртежи во минута се овозможува ефикасно таложење.
- **Употреба:** за разделување на цврсти компоненти од матрицата.



Шематски приказ на центрифуга

Услови за раздвојувањето на одбрани клеточни компоненти со центрифугирање

Компоненти	Центрифугална сила ($\cdot g$)	Време (min)
еукариотски клетки	1000	5
мембрани од клетки, јадра	4000	10
митохондрии, клетки од бактерии	15 000	20
лизозоми, мембрани од бактерии	30 000	30
рибозоми	100 000	180



Кивета за центрифугирање

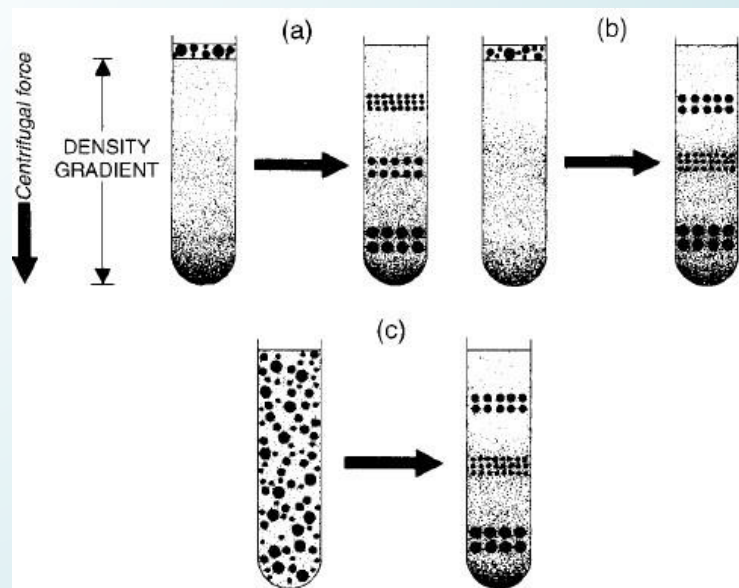
2. Центрифугирање со рамнотежна градиентна густина

- **Подготовка на примерок:** примерокот се наоѓа или се внесува во раствор со градиент на густина,
- **Подготовка на р-р :** со сахароза или CsCl се подготвува р-р со градиент на густина,
- **Брзина на таложење:** зависи од густината, големината на компонентите и центрифугалната сила,
- **Принцип:** кога анализот го достигнува нивото каде нејнеговата густина се изедначува со онаа на растворот, центрифугалната сила е нула и таложењето запира,
- **Резултат:** секоја компонента се издвојува како посебен прстен, онаму каде густината на компонентата е изедначена со густината на растворот

Пример: смеса од протеини, RNA и DNA

Градиентна густина: од $1,65 \text{ g/cm}^3$ до $1,80 \text{ g/cm}^3$ со CsCl

- Протеините, со густина помала од $1,3 \text{ g/cm}^3$ не таложат,
- RNA, со густина поголема од $1,8 \text{ g/cm}^3$ се собира како остаток на дното
- DNA, со густина од $1,7 \text{ g/cm}^3$ се раздвојува како прстен во близина на средината од киветата.



Раздвојувања базирани на образување комплекси

Техники за спречување на интерференциите е сврзување на интерферентот во форма на растворлив комплекс, спречувајќи го да интерферира во определувањето на аналитот - **МАСКИРАЊЕ**.

Маскирањето не е техника на раздвојување. бидејќи аналитот и интерферентот не се физички раздвоени еден од друг туку е **на псеудо-раздвојување**, при што соединението не учествува во хемиската реакција затоа што се сврзува со маскирното средство во нереактивен комплекс

Маскирно средство	Јони за маскирање
CN ⁻	Ag, Au, Cd, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pd, Pt, Zn
SCN ⁻	Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Ni, Pd, Pt, Zn
NH ₃	Ag, Co, Cu, Fe, Pd, Pt
F ⁻	Al, Co, Cr, Mg, Mn, Sn, Zn
S ₂ O ₃ ²⁻	Au, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Pd, Pt, Sb
tartrate	Al, Ba, Bi, Ca, Ce, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, Pd, Pt, Sb, Sn, Zn
oxalate	Al, Fe, Mg, Mn, Sn
thioglycolic acid	Cu, Fe, Sn

Раздвојувања базирани на маса и/или густина

Најважната класа на техники за раздвојување е базирана на селективна распределба на анализот или интерферентот помеѓу две немешливи фази. Кога фаза, која содржи растворена супстанца, S , се доведе во контакт со втора фаза, растворената супстанца се распределува помеѓу двете фази.

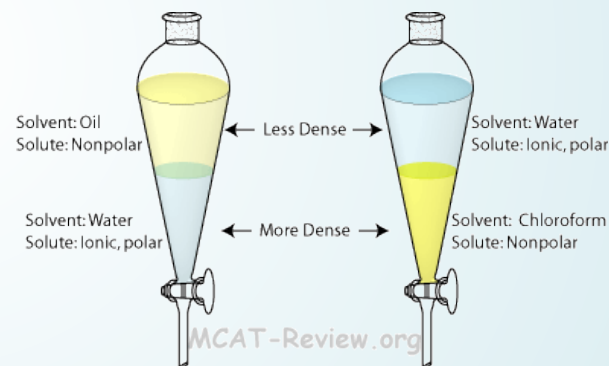
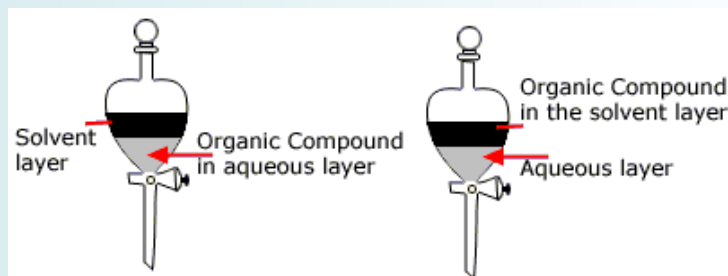
$$S_{\text{phase 1}} \rightleftharpoons S_{\text{phase 2}} \quad K_D = \frac{[S_{\text{phase 2}}]}{[S_{\text{phase 1}}]}$$

се нарекува константа на распределба или **коефициент на распределба**. Ако K_D е доволно голем, тогаш растворената супстанца ќе помине од фаза 1 во фаза 2. Растворената супстанца ќе остане во фаза 1 ако коефициентот на одвојување е мал. Ако фаза која содржи две растворени супстанции се доведе во контакт со втора фаза, и K_D е погоден само за една од растворените супстанции, возможно е раздвојување на растворените супстанции.

Екстракција помеѓу две фази Кога примерокот е првично присутен во една од фазите, раздвојувањето е познато како **екстракција**. При едноставна екстракција, примерокот се екстрахира еден или повеќе пати со делови од втората фаза. Едноставните екстракции се особено корисни за раздвојување кога само една од компонента има погоден однос на распределба. Неколку важни техники за раздвојување се базирани на екстракција, вклучувајќи течно-течни, течно-цврсти, цврсто-течни и гасно-цврсти екстракции.

1. Течно-течни екстракции

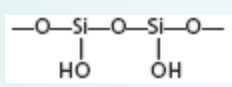
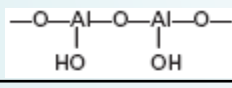
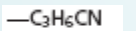
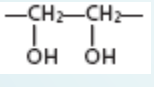
Течно-течни екстракции најчесто се изведуваат во одделителна инка. Двете течности се внесуваат во одделителната инка која се клумка за да се зголеми допирната површина помеѓу фазите. Кога екстракцијата е завршена, течностите се оставаат да се раздвојат, така што погустата фаза се одвојува на дното од одделителната инка. Течно-течна екстракција може да се изведе и во садот со примерок, со додавање на раствор за екстракција. Пестициди во вода, на пример, може да се конзервираат за подолг период, со екстракција во мал волумен од хексан кој се додава на примерокот, на терен.



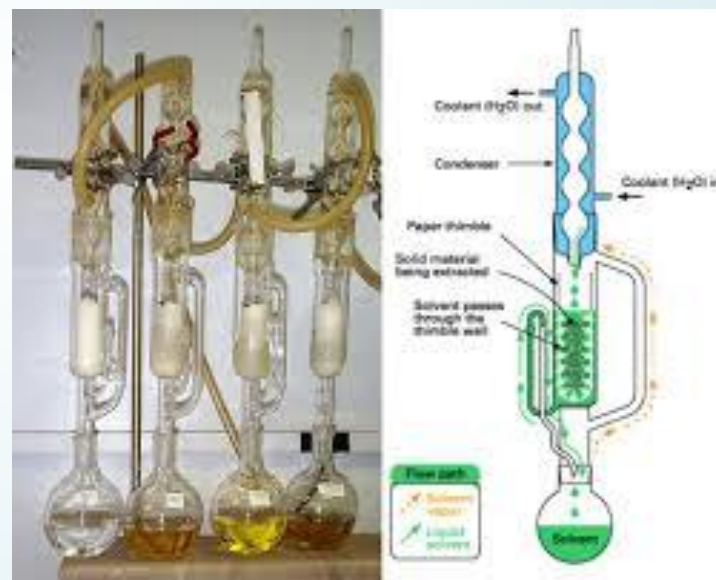
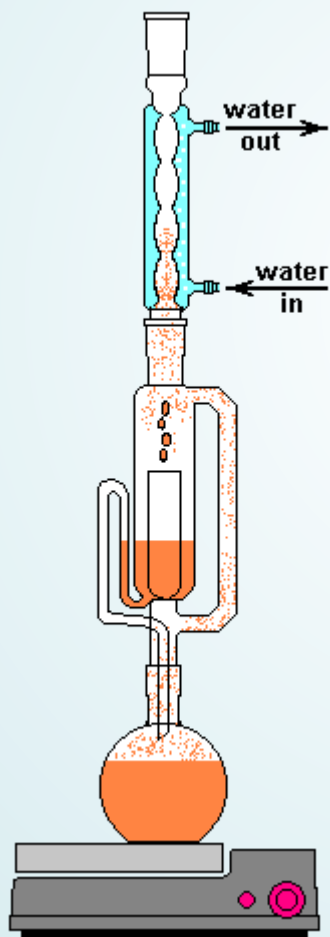
2. Цврсто фазни екстракции

Во цврсто фазни екстракции, примерокот поминува низ полнител кој содржи цврсти честички кои служат како материјал за адсорпција. За течни примероци, цврстиот адсорбент е изолиран или во носач во форма на диск или во колона. Изборот на адсорбент зависи од својствата на соединенијата кои ќе се задржуваат и од матрицата во која се наоѓаат. На пример седативи, како секобарбитал и фенобарбитал, може да се изолираат од серум со цврсто фазна екстракција употребувајќи C-18 цврст адсорбент. Вообичаено, 500 μL примерок од серум се пропуштаат низ полнителот, така што седативите се задржуваат со течно-течна екстракција. Полнителот се измива со дестилирана вода за да се отстранат заостанатите траги од серумската матрица. Задржаните седативи се елуираат од полнителот со цврсто-течна екстракција, употребувајќи 500 μL ацетон. За многу анализи, цврсто фазните екстракции ги заменуваат течно-течните екстракции заради нивната

лесна употреба, побрзи времиња на екстракција, намалување на волумен од растворувач и нивната голема способност за концентрирање на аналитите.

Адсорбент	Структура на површина	Својства и употреби
силициум диоксид		- задржува слабо до средно поларни соединенија од органски матрици - витамини растворливи во масти, стероиди
алуминиум оксид		- задржува хидрофилни соединенија од органски матрици
цијаноопропил		- задржува најразлични соединенија од водни и органски матрици - пестициди, хидрофобни пептиди
диол		- задржува голем број соединенија од водни и органски матрици - протеини, пептиди, фунгициди
октадецил (C-18)		- задржува хидрофобни соединенија од водни матрици - кофеин, седативи, полиароматични јаглеводороди, јаглехидрати, пестициди
октил (C-8) стирен дивинил бензен		- слично со C-18 - задржува голем број соединенија од водни матрици - полиароматични јаглеводороди

3. Континуирани екстракцији за компоненти од интерес што немаат погоден коефициент на одвојување, под услов дека сите останати компоненти имаат значително помал коефициент на одвојување.



4. Хроматографски раздвојувања

При екстракција, примерокот првично е присутен во една фаза а компонентата од интерес се екстрахира во втората фаза. Раздвојувања може да се постигнат и со континуирано поминување на една фаза без примерок, која се нарекува мобилна фаза, над втора фаза без примерок која останува фиксна или неподвижна. Потоа, примерокот се инјектира или се внесува во мобилната фаза. При движење на компонентите од примерокот со мобилната фаза, се распределуваат помеѓу мобилната и стационарната фаза. Оние компоненти со најголеми коефициенти на одвојување, најверојатно ќе се движат во стационарната фаза, и ќе им треба подолго време за да поминат низ системот. Ова е основата на сите хроматографски техники за раздвојување. Модерната хроматографија овозможува раздвојување на аналити и интерференти, но и квалитативна и/или квантитативна анализа на аналитот.

