

Примена на ултравиолетовата и видливата спектроскопија

Рутински анализи:

- За идентификација на органски и неоргански супстанции,
- Квантитативна анализа на определен вид аналити (проверка на чистота на супстанции),
- За рутински клинички испитувања
- Идентификација и потврда на типови дроги, проверка на фалсификувани лекови.

Научноистражувачки цели:

- За идентификација на супстанции,
- Структурни анализи – структурна аналитика,
- Кинетички анализи.

Структурна анализа

Табела 3. Апсорпциони карактеристики на некои поважни хромофори

Хромофор	Пример	Растворувач	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$
Алкен	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}=\text{CH}_2$	<i>n</i> -хексан	177
Конјугирани алкени	$\text{CH}_2=\text{CHCH}=\text{CH}_2$	<i>n</i> -хексан	217
Алкини	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{CC}-\text{CH}_3$	<i>n</i> -хексан	178, 196, 225
Карбонилна група	$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{O}$	<i>n</i> -хексан	186, 280
Карбоксилна група	CH_3COOH	Етанол	204
Амидо	CH_3CONH_2	Вода	214
Азо	$\text{CH}_3\text{N}=\text{NCH}_3$	Етанол	339
Нитро	CH_3NO_2	Изооктан	280
Нитрозо	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$	Диетил етер	300, 665
Нитрат	$\text{C}_2\text{H}_5\text{ONO}_2$	Диоксан	270
Ароматски прстен	Бензен	<i>n</i> -хексан	204, 256

Апсорпцијата на ултравиолетовото и видливото зрачење се должи на електронските премини и се манифестира со појава на апсорпциони ленти кои се состојат од густо спакувани дискретни линии

Често применувани реагенси:

Органски:

дитизони, оксини, ализарини, дифенил карбазид,...

Неоргански:

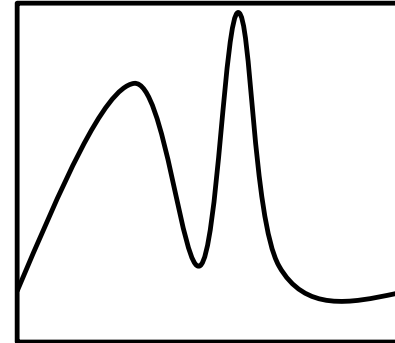
водород пероксид во кисела средина, $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, тиоцијанат, цијанид,...

Растворот треба да поседува:

- Стабилна боја во подолг временски период;
- Бојата треба да биде интензивна,
- Зголемување на моларниот апсорпционен коефициент со: менување на растворувачот или реагенсот за обојување;
- Да важи беровиот закон.

Постапки при спектрофотометрирањето

- *Избор на соодветна бранова должина*
- *Променливи кои влијаат врз апсорбанцата*
- *Чистење и одржување на киветите*
- *Определување на зависноста помеѓу концентрацијата и апсорбанцата*



❖ **Избор на бранова должина**
Широки и интензивни ленти

❖ **Променливи кои влијаат врз апсорбанцата:**

- ✓ Природата на растворувачот,
- ✓ pH на пробата,
- ✓ Температура,
- ✓ Присуство на електролит,
- ✓ Присуство на други супстанции

❖ **Чистење и одржување на киветите:**

❖ **Определување на зависноста помеѓу апсорбанцата и концентрацијата:**

Приготвените стандарди треба да се што е можно послични по состав и концентрација на анализираните проби

Калибрација кај инструменталните методи

- При квантитативни определувања, кај сите аналитички методи се користи калибрација. Калибрацијата го поврзува мерениот сигнал со концентрацијата на аналитот. Не е можно да се мери сигналот без позната калибрација односно позната врска помеѓу сигналот и концентрацијата.

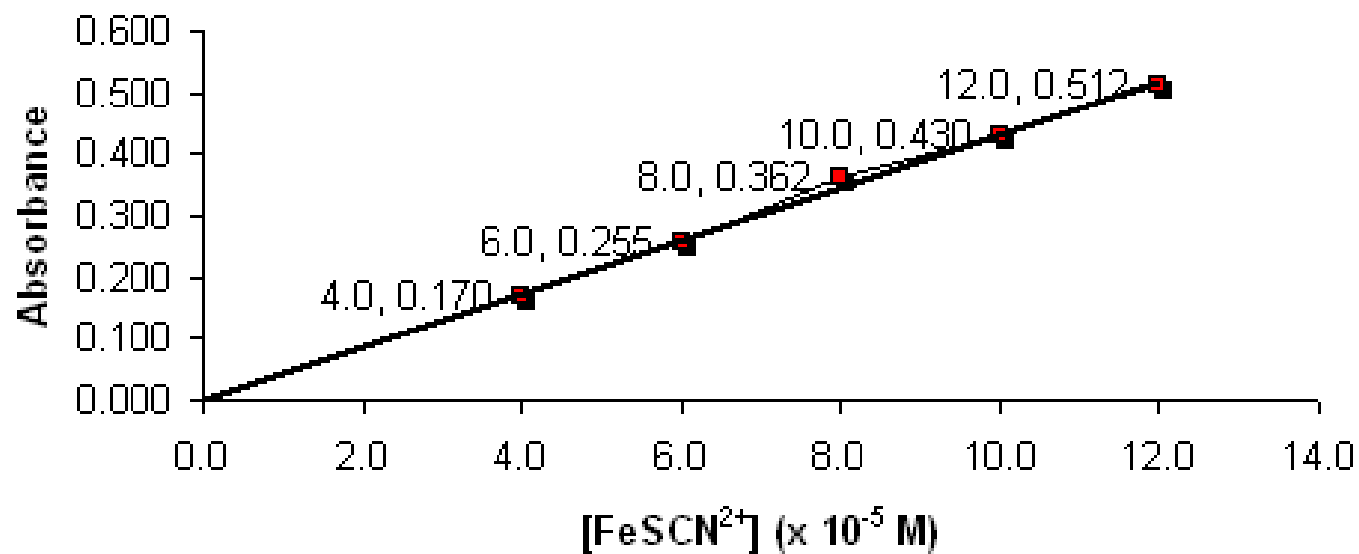
Трите најчести калибрациони методи се:

- Калибрациона крива
- Метода на стандарден додаток
- Метода на внатрешен стандард

Калибрациона крива

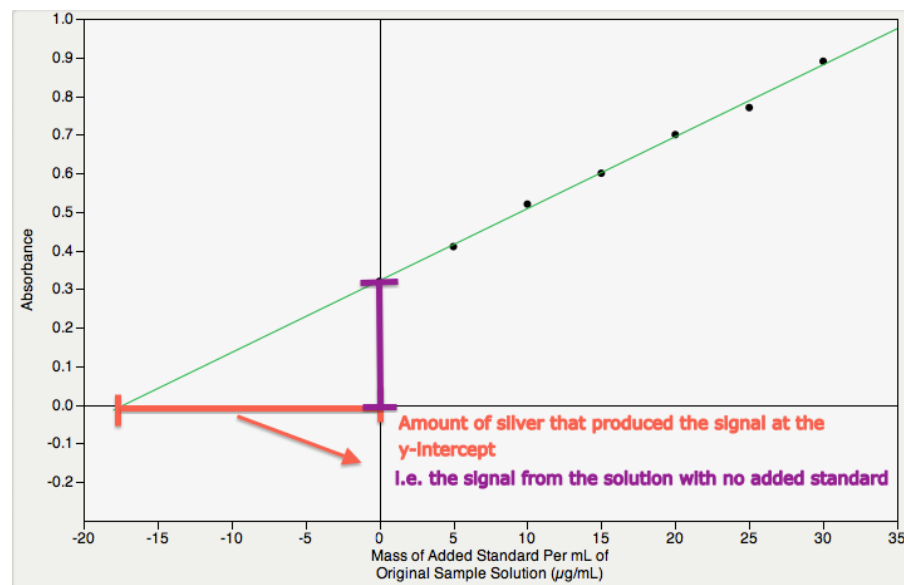
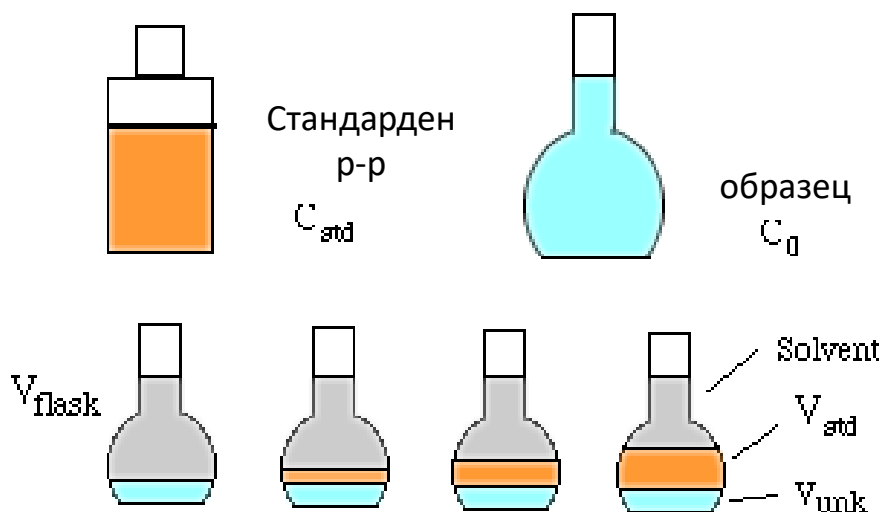
- Неколку стандарди (со различна, но точно позната, концентрација) се мерат и вредностите се запишуваат.
- Се конструира график сигнал (апсорбанца) во однос на познатата концентрација на стандардите.
- Образецот, со непозната концентрација на анализот се мери. Сигналот треба да е во граници на претходно измерената серија и вредноста за концентрација се отчитува од график. Ако одговорот е во рамки на калибрационата права, тогаш таа концентрација може да се мери и квантифицира.
- Калибрационите криви зависат од точноста на стандардните концентрации.
- Матрицата на стандардите треба да е иста со онаа на образецот, во таков случај калибрационата крива е добра метода.
- Ако влијанието на матрицата е мало, методата на калибрациона крива е задоволителна. Ако постои разлика помеѓу матрицата на стандардите и непознатиот раствор, оваа метода не е добра.
- Кога матриците на стандардите и образецот не се исти, не може да се користи калибрациона крива.
- **Секогаш се работи само во линеарниот дел од кривата.**

Calibration Curve for Absorbance of FeSCN^{2+}



Метода на стандарден додаток

- Подobar приод, за ниски концентрации и кога влијанието на матрицата е значајно
- Стандардите се додаваат директно на порции од образецот, со што матрицата е иста.
- Процедура:
 - Се подготвува серија исти волумени од непознатиот образец.
 - Во нив се додаваат различни волумени од еден стандард
 - Се разредува смешата (образец+ стандард) до еднаков волумен
 - Се мери аналитичката концентрација.



Апсорбанца/маса на додаден стандард по ml непознат раствор

Примена

$$\frac{A_x}{A_{x+s}} = \frac{c_x}{(c_x + c_s)}$$

$$A_x c_x + A_x c_s = c_x A_{x+s}$$

$$c_x = \frac{A_x}{A_{x+s} - A_x} \cdot c_s$$

Со познати волумени

$$c_x = \frac{A_x \cdot c_s}{A_{x+s} - A_x} \cdot \frac{V_s + V_x}{V_x}$$

Метод на внатрешен стандард –

- погодна кога се јавуваат разлики во величината на обрасците, положбата, матрицата влијае на прецизноста на методата.
- Внатрешните стандарди компензираат неколку типови случајни и систематски грешки.

Внатрешниот стандард има слично однесување со аналитот но дава сигнал кој се разликува од сигналот на аналитот.

Во такви случаи, било кој фактор што влијае на сигналот на аналитот би влијаел и на сигналот на внатрешниот стандард. Така, односот на двата сигнали ќе покажува помалку отстапувања отколку само сигналот на аналитот.

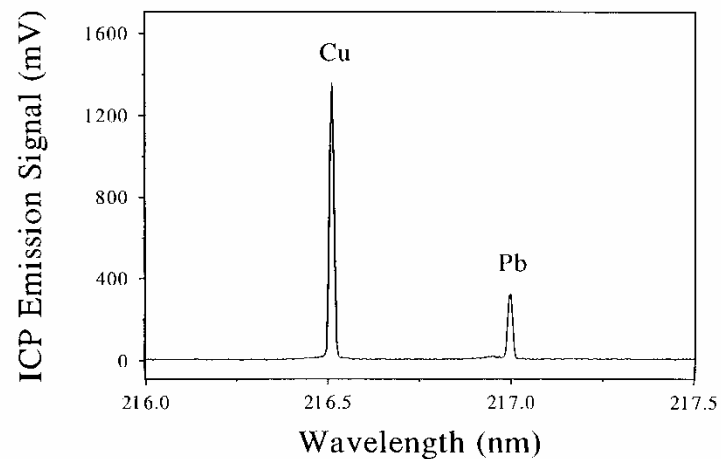
Се користи во атомска емисиона спектроскопија и за корекција на губитокот на аналитот при обработка и чување.

- Се подготвува серија раствори од аналитот (А), како за стандардна серија и се додава константно количество од ново соединение (Б) на сите проби, слепи проби и калибрациони стандардни раствори во анализата.
- Се подготвува график на сигналот од аналитот во однос на сигналот на внатрешниот стандард во функција од концентрацијата на аналитот во стандардите S_A/S_B во однос на $[A]$.

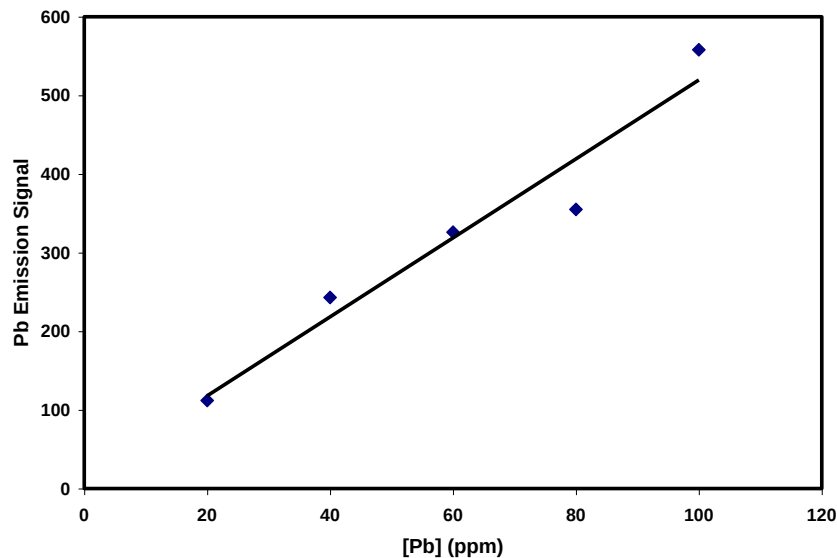
Пр.

	Signal		
[Pb] (ppm)	Pb	Cu	Pb/Cu
20	112	1347	0.083
40	243	1527	0.159
60	326	1383	0.236
80	355	1135	0.313
100	558	1440	0.388

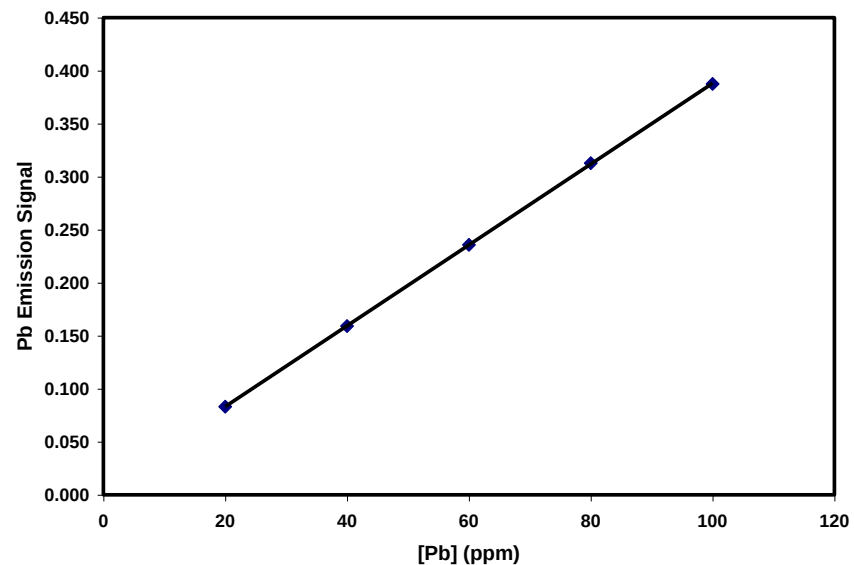
Секој раствор од Pb содржи 100 ppm Cu.



Добиен график без внатрешен стандард



Добиен график со внатрешен стандард



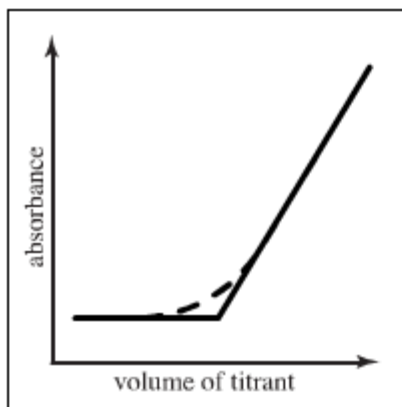
Спектрофотометриски титрации

Се следи промената на апсорбанцата на одбрана бранова должина

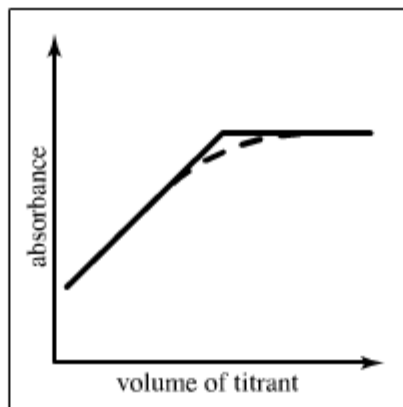
Предности:

- Поточно определување на завршната точка;
- Поголема селективност (се изведува на **одбрана бранова должина**);
- Можност за определување на повеќе компоненти во пробата
- Анализа на раствори со **ниски концентрации** на анализот;
- Автоматизирани титрации и
- Повисока прецизност во титрациите

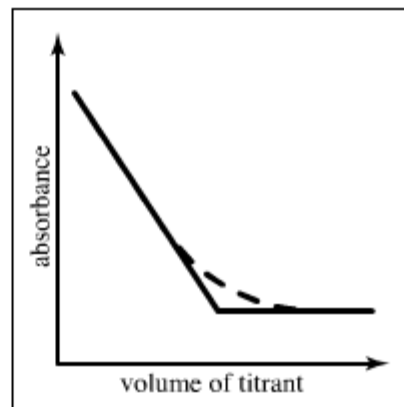
Спектрофотометриски титрации – БЕЗ индикатор



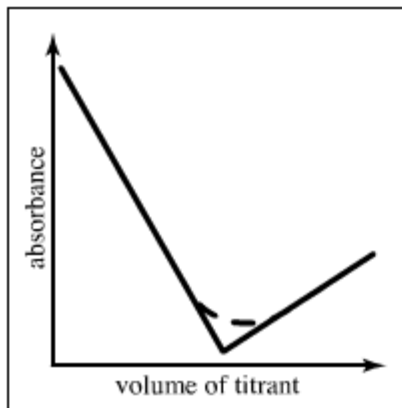
титрант



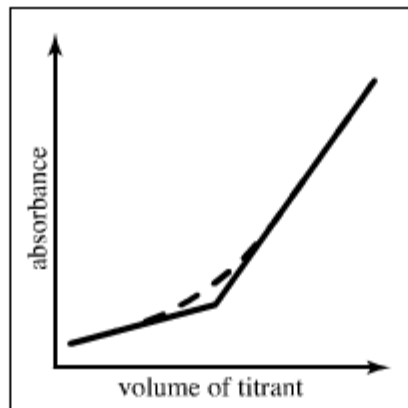
продукт



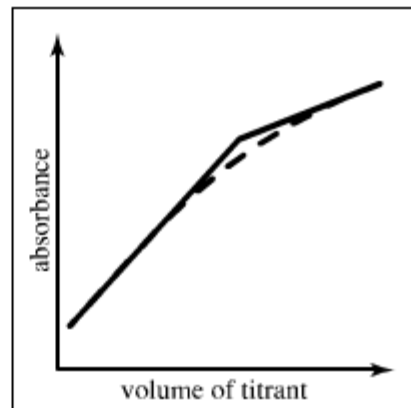
аналит



Аналит+титрант



Титрант > продукт



Продукт > титрант

$$\epsilon_A > \epsilon_T > 0$$

$$\epsilon_P = 0$$

$$\epsilon_T > \epsilon_P > 0$$

$$\epsilon_A = 0$$

$$\epsilon_P > \epsilon_T > 0$$

$$\epsilon_A = 0$$

$$\epsilon_A = \epsilon_P = 0$$

$$\epsilon_T > 0$$

$$\epsilon_A > 0$$

$$\epsilon_P = \epsilon_T = 0$$

$$\epsilon_P > 0$$

$$\epsilon_A = \epsilon_T = 0$$

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot l \cdot c$$

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

Аналит	Метода	λ (nm)
Метали присутни во траги		
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 неокуприн во неутрална до слабо кисела средина; екстрактот во $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ е жолто обоен	457
железо	реакција со <i>o</i> -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
Неоргански неметали		
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 срвено-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 модросина боја	592
фосфати	реакција со амониум молибдат, проследена со редукција со калај хлорид, при што се формира молибденско сино	690
Органски		
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 анјонска површински активна супстанца и катјонска боја метиленско сино, којашто се екстрахира во CHCl_3	652

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

Аналит	Метода	λ (nm)
вкупен серумски протеин	во реакција со 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	реакцијата со фосфоволфрамова киселина дава „волфрамово сино“	710
серумски барбитурати	барбитуратите се екстрахираат во CHCl_3 , а потоа во 0,45 M NaOH;	260
глукоза	при реакција со отолуидин 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 - определувањето на серум барбитурати.

Анализа на клинички примероци

- комплексноста на матрицата на примероците, има значителен удел во фонската апсорпција на определената бранова должина.

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 М NaOH (pH $\approx$ 13). Апсорбанцата на водниот екстракт се мери на 260 nm, при што во апсорпцијата учествуваат како барбитратите, 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,

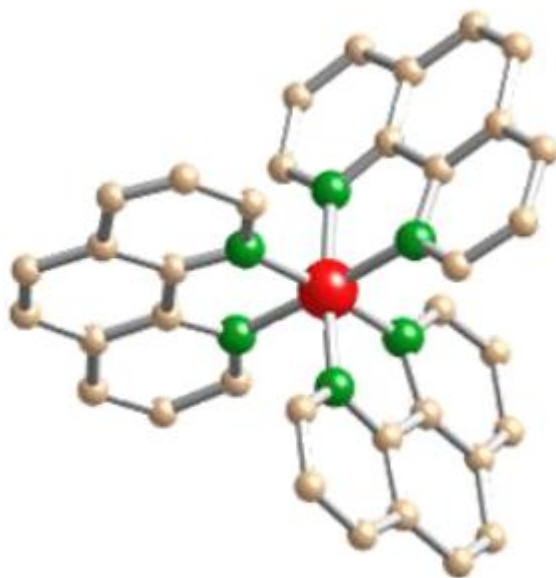
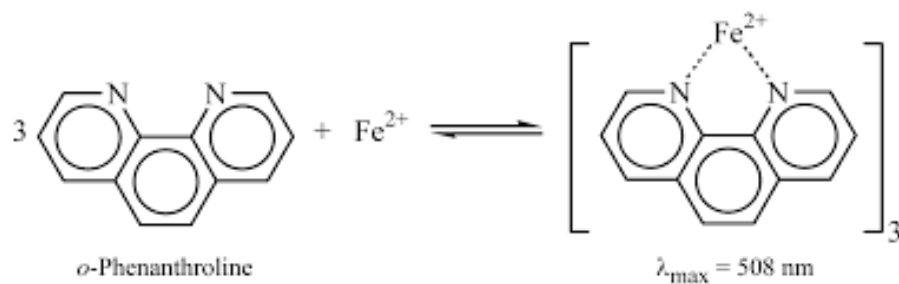
$$A_{\text{barb}} = A_{\text{pH } 13} - \left(\frac{V_{\text{samp}} + V_{\text{NH}_4\text{Cl}}}{V_{\text{samp}}} \right) A_{\text{pH } 10}$$

Форензички примени

UV /видлива молекулска апсорпција се користи рутински за анализа на наркотици и за тестирање на лекарства.

Пр. 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.

Определување на железо во чиста вода и во отпадна вода



Опис на методата.

Fe^{2+} , реагира со о-фенантролин и формира портокалово-црвен комплекс $\text{Fe}(\text{o-phen})_3^{2+}$. Интензитетот на обојувањето на растворот на комплексот зависи од киселоста на растворот и варира во интервал на рН од 3 до 9.

- Брзо формирање на комплексот во кисела средина, рН од 3,0 до 3,5.
- Доколку е присутно Fe во +3 состојба, се редуцира со хидроксиламин пред да се додаде о-фенантролин.

Супстанции што пречат : 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.

Апсорбанцата се мери на 510 nm во кивета од 1 cm. Беровиот закон важи за концентрации на Fe во интервал од 0,2 до 4,0 ppm.