

Аналитичка и инструментална хемија
Предавања

Инструментална хемија

Оптички методи

Студии по биохемија и физиологија
и молекуларна биологија

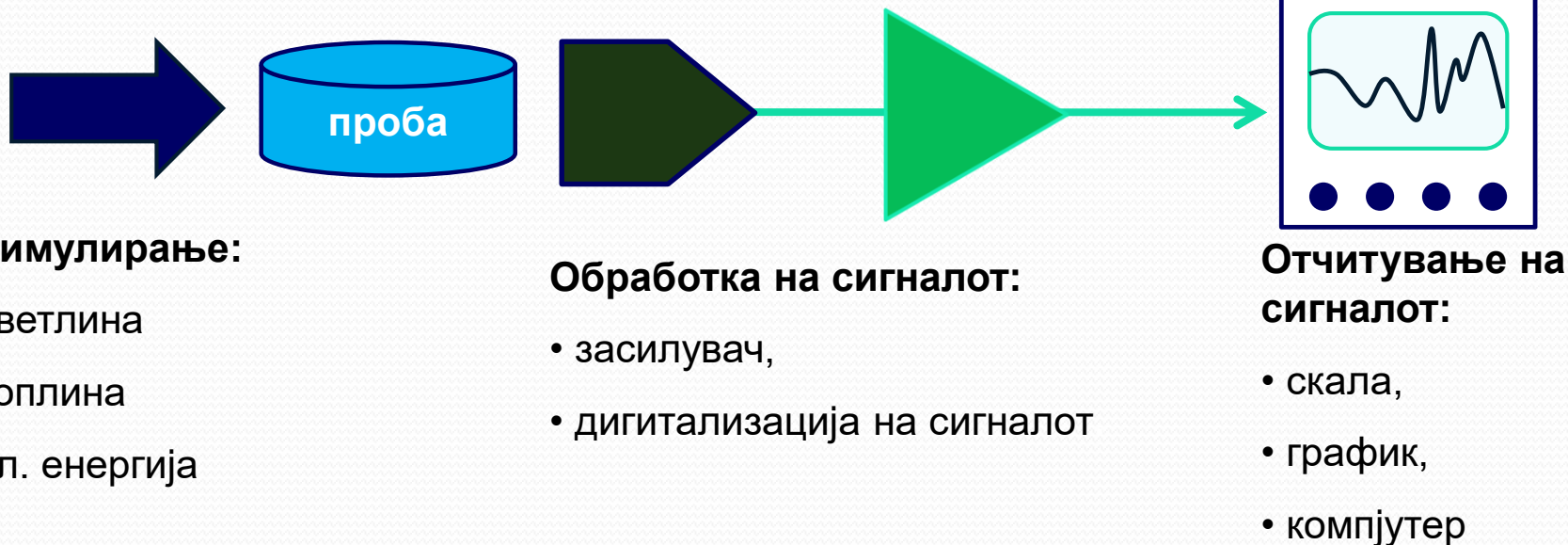
ИНСТРУМЕНТАЛНИ МЕТОДИ НА АНАЛИЗА

Класична анализа

- Се користат хемиските својства на супстанците.
 - волуметрија
 - гравиметрија

Инструментална анализа

- Се користат физичките својства на супстанците:
 - интеракции со светлината
 - електрохемиски својства
 - физички интеракции помеѓу супстанците...



Предности на инструменталните техники:

- Висока осетливост - до 10^{-9} mg
- Голема селективност
- Брзо определување
- Автоматизација и компјутеризација
- Анализа без уништување на примерокот
- Анализа на самото место

Недостатоци на инструменталните техники:

- ✓ Грешката е до ± 5 % (и до 20 %), додека, за гравиметрија 0,01-0,005 %; за титриметрија 0,1-0,05 %
- ✓ Репродуцибилноста во разни техники е полоша од класичните техники
- ✓ Неопходна е употреба на стандарди, стандардни раствори, инструмент и цртање графици
- ✓ Опремата е комплексна, скапа, а скапи се и стандардите

Некои видови на инструментални методи

- оптички методи,
- електрохемиски методи,
- методи за раздвојување,
- термичка анализа,
- хроматографија
- хибридни техники,
- микроскопија.

ОПТИЧКИ МЕТОДИ

Оптичките методи се базираат на заемодејство на електромагнетното зрачење со пробата.

Еластично заемодејство ($E = E_0$):

- Микроскопска анализа (оптичка, електронска, јонска)
- Дифрактометриски методи (рендгенска дифракција на редгенски зраци, електрони, неутрони и јони)
- Рефрактометриски методи (рефрактометрија, полариметрија)

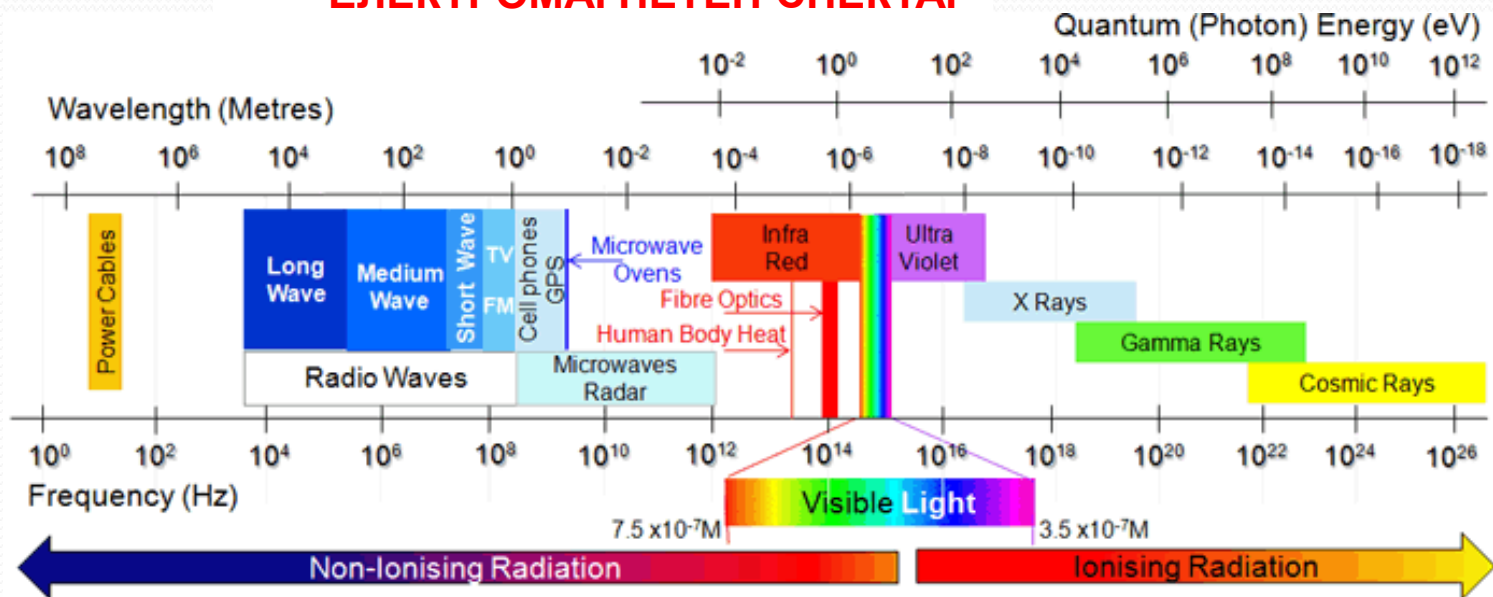
Нееластично (инеластично) заемодејство ($E < E_0$):

- Молекулска спектроскопија (микробранова, инфрацрвена, ултравиолетова и видлива, флуоресцентна, нуклерно-магнетна резонанца, ...)
- Атомска спектроскопија (емисиона и апсорпциона, флуоресцентна, рендгенска емисиона и флуоресцентна, ...)

Електромагнетно зрачење

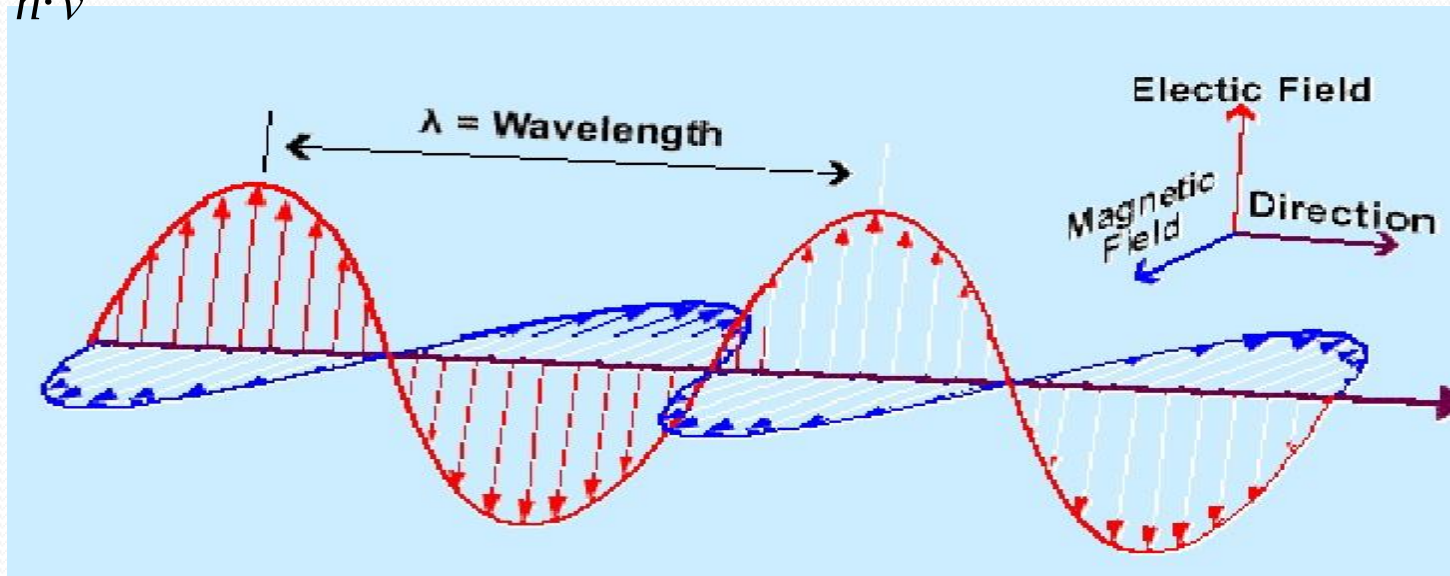
Електромагнетното зрачење е форма на енергија што се ослободува при различни електромагнетни процеси и е во различни форми: радио бранови, микро бранови, рендгенски зраци, гама зраци. Сончевата светлина е електромагнетно зрачење. ЕМ зрачење покрива широк интервал на бранови должини и фреквенции т.н. електромагнетен спектар. Поделен е главно на седум региони, во правец на намалување на брановата должина и зголемување на фреквенцијата и енергијата: радио бранови, микро бранови, инфрацрвено, видливо, ултравиолетово зрачење, рендгенско зрачење и гама зрачење. По правило, зрачењето со ниска енергија, како што се радио брановите се прикажува како фреквенција; микро брановите, инфра црвените, видливите и УВ брановите се прикажуваат како бранови должини, додека зрачењето со висока енергија како рендгенските и гама зраците се прикажува како енергија по фотон.

ЕЛЕКТРОМАГНЕТЕН СПЕКТАР

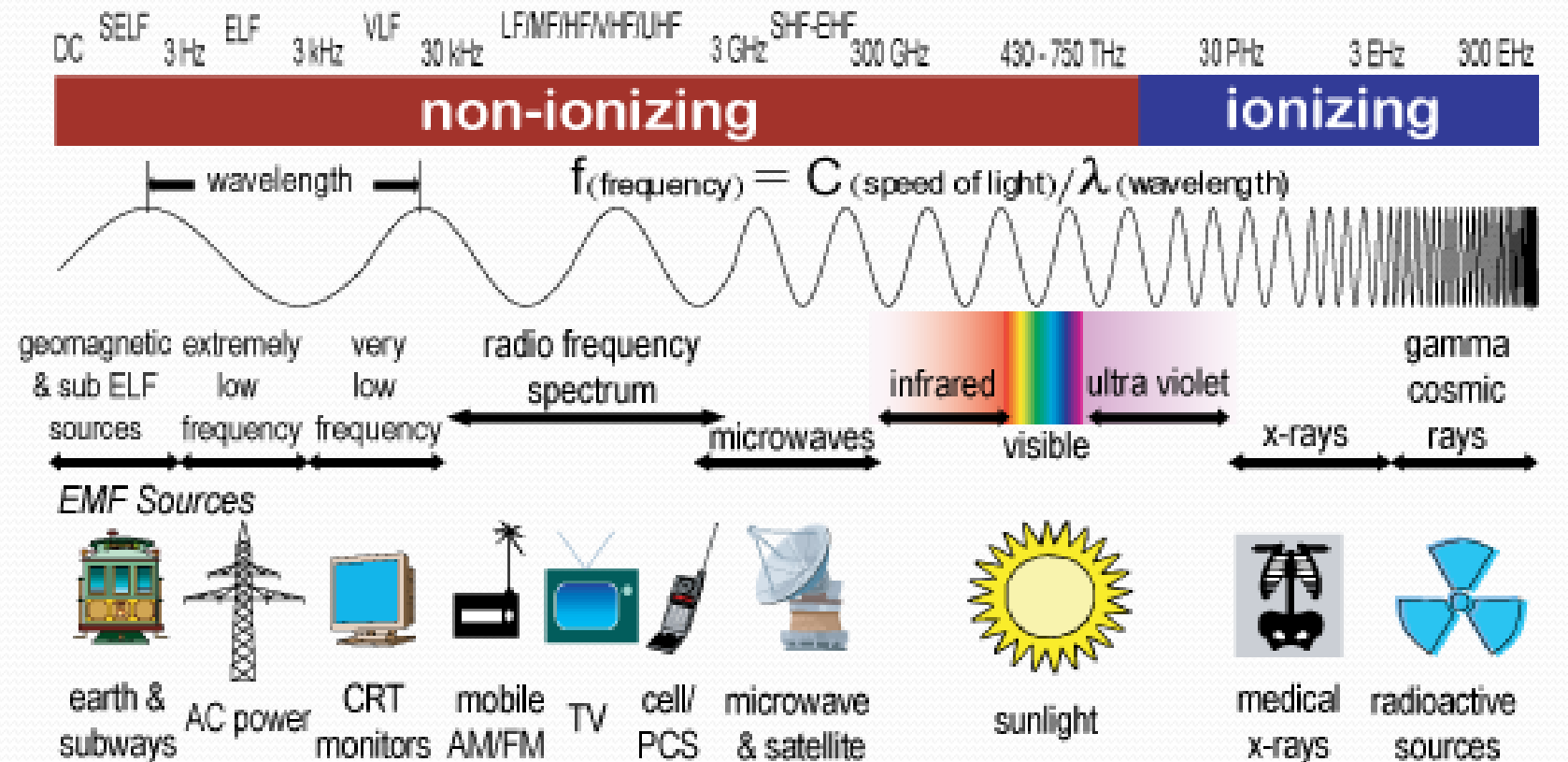


Својства на електромагнетното зрачење

- бранова должина, λ , е растојание меѓу две најблиски точки кои осцилираат во фаза.
- фреквенција, ν , претставува број на осцилации на бранот во една секунда, ($1 \text{ Hz} = 1 \text{ s}^{-1}$)
- брзина на светлината (c):
 - Во вакуум $\approx 3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$
 - Во друг медиум: c/n
- бранов број: $\tilde{\nu} = 1/\lambda$
- производот од фреквенцијата и брановата должина $\nu \cdot \lambda = c$
- $E = h \cdot \nu$



THE ELECTROMAGNETIC SPECTRUM



Gigahertz (GHz) 10-9 Terahertz (THz) 10-12 Petahertz (PHz) 10-15 Exahertz (EHz) 10-18 Zettahertz (ZHz) 10-21 Yottahertz (YHz) 10-24

Корпускуларна природа на зрачењето доаѓа до израз при:

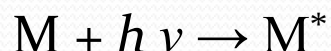
- апсорпција и
- емисија.

Енергија на фотоните: $E = h \cdot \nu$

Спектралната анализа се темели на: $\Delta E = h \cdot \nu$, $\Delta E = E_2 - E_1$

Состојбата со најниска енергија, се нарекува основна состојба: M

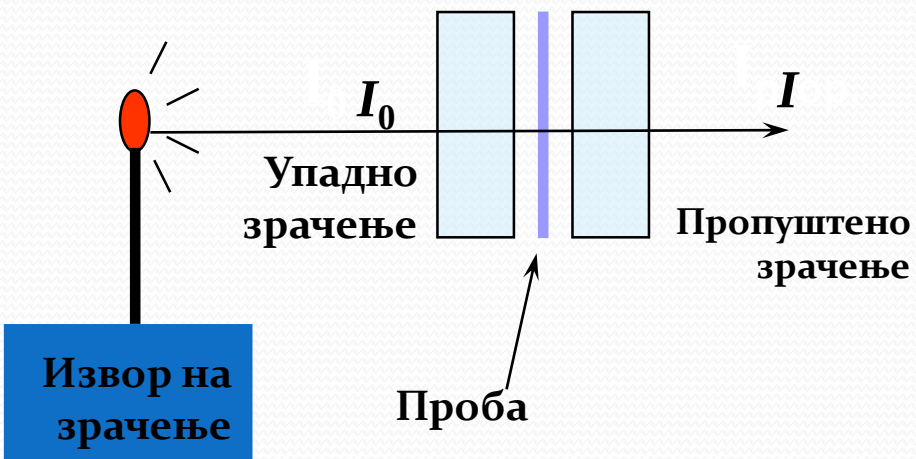
Со апсорпција на фотон – ексцитирана состојба M^*



Релаксацијата, односно враќањето во основната состојба, настанува по 10^{-6} до 10^{-9} s



Видови интеракции на електромагнетното зрачење (ЕМЗ) со материјата



Физичко-хемиски
методи

- АПСОРПЦИОНИ
- ЕМИСИОНИ

1. Спектрофотометриски:
IR, UV, VIS

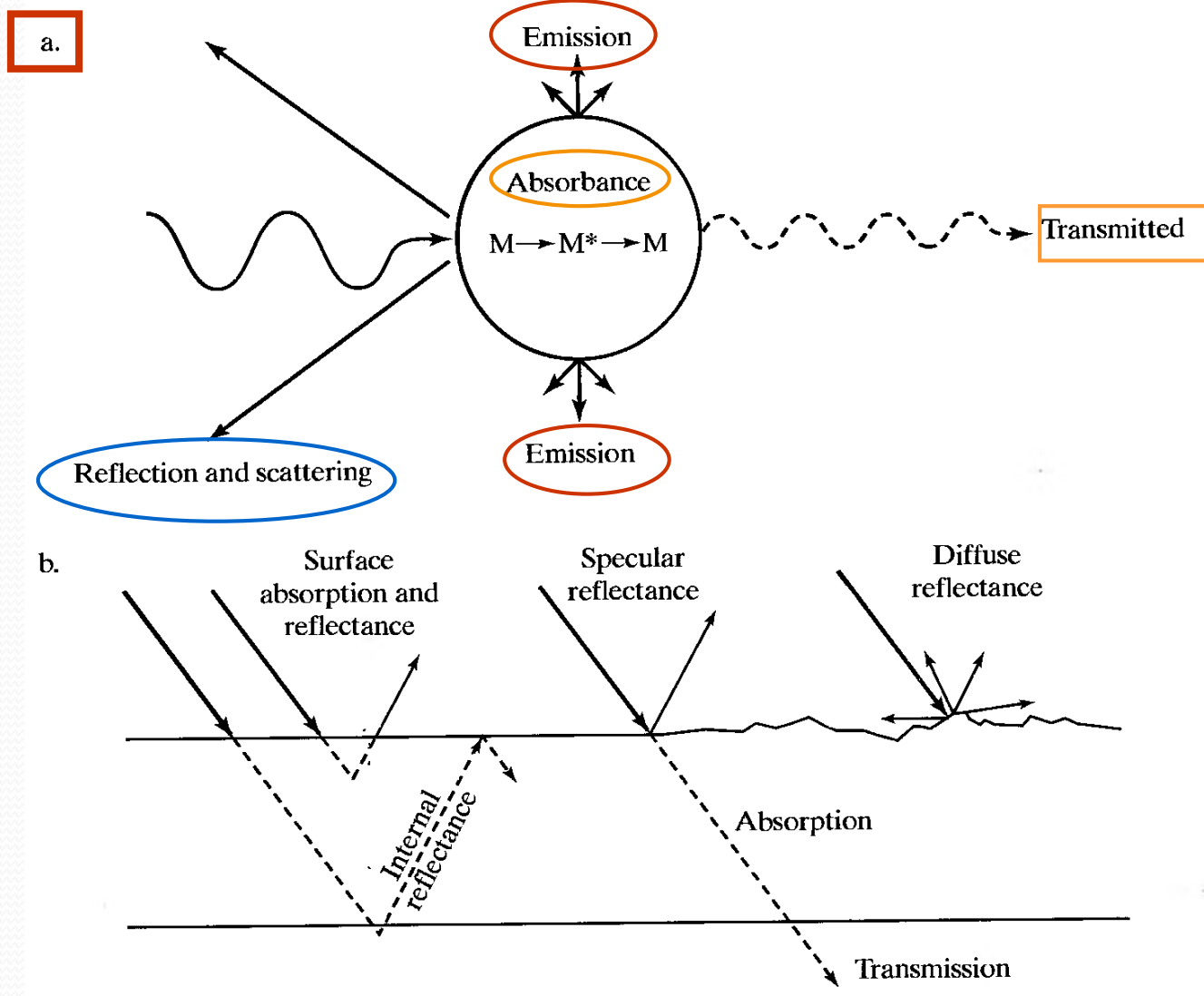
2. Магнетна резонанца

1. Флуоресценција

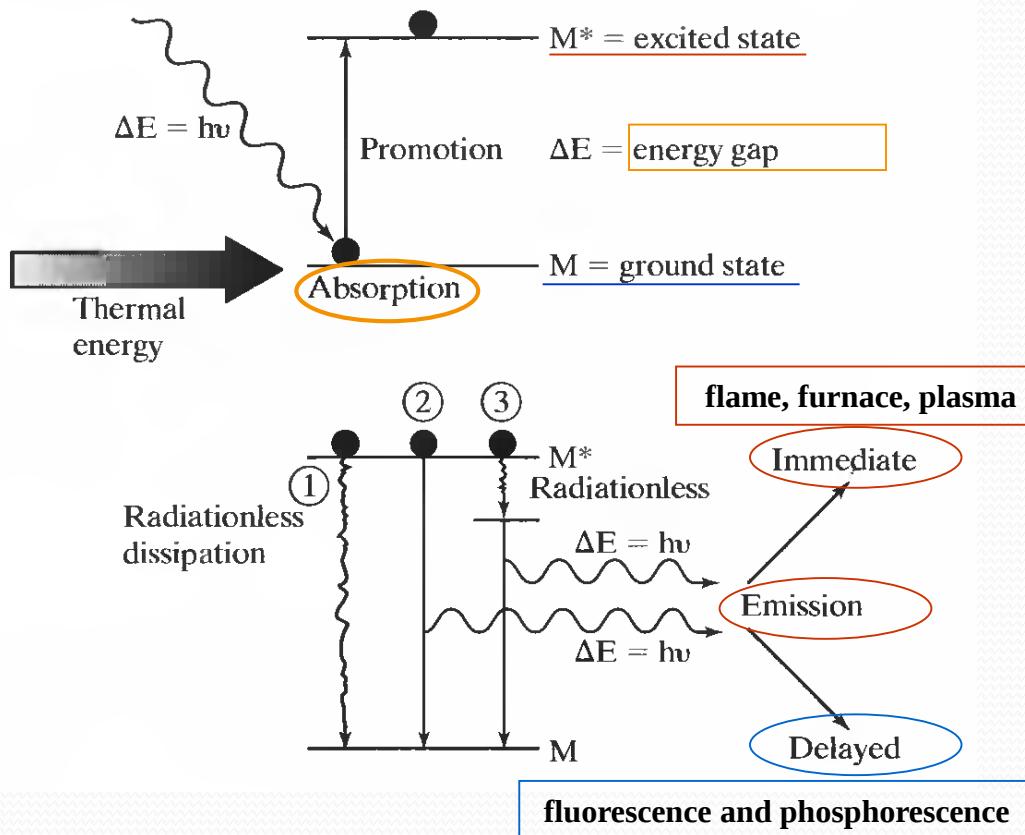
2. Фосфоресценција

3. Ласерска спектроскопија

интеракција на електромагнетното зрачење со материјата

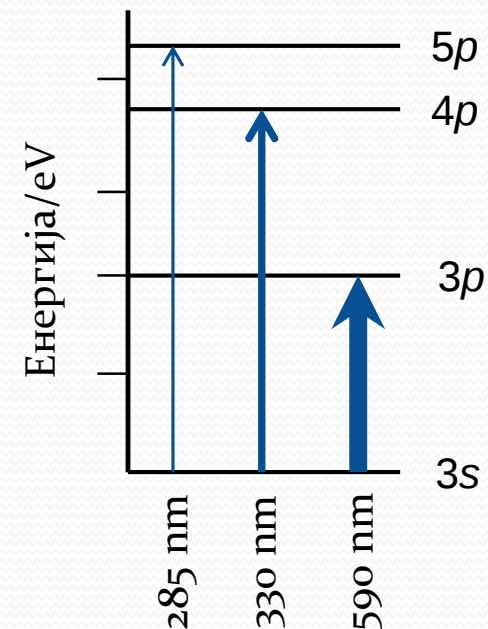
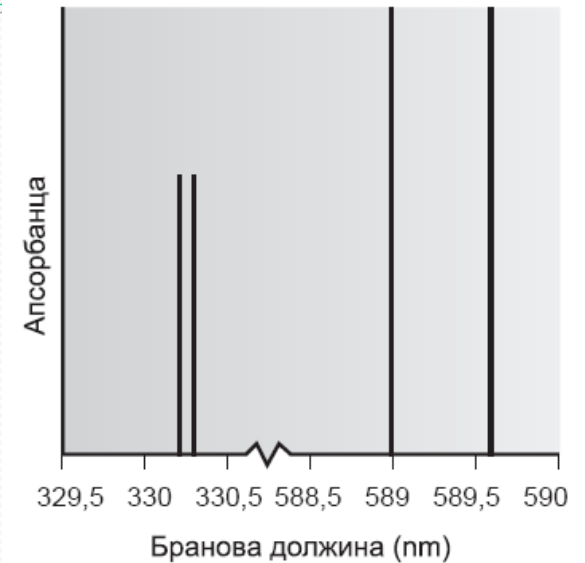
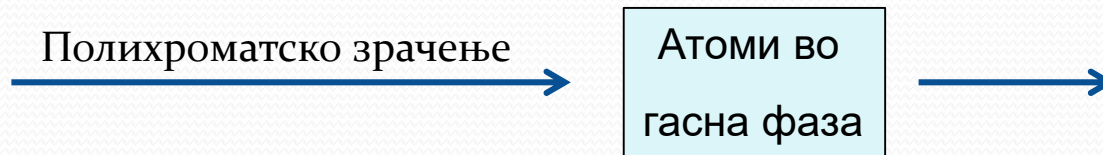


M (основно ниво) $\Rightarrow$ M* (ексцитирано): ΔE апсорбирана = одговара на разликата во E на двете нивоа



Преминот на честичка во ексцитирана состојба е предизвикан од апсорпција на енергија (електромагнетна, термална ...) при што апсорбираната енергија е еднаква или поголема од енергетскиот премин. По процесот на апсорпција, системот е нестабилен и настојува да се ослободи од вишокот енергија. Брановидната линија покажува конверзија во кинетичка енергија (топлина) додека другите конверзии вклучуваат емисија на фотони, чија енергија одговара на енергетскиот премин.

Атомска апсорпција



Молекулска спектроскопија

Вкупната енергија на молекулата може да се претстави на следниот начин:

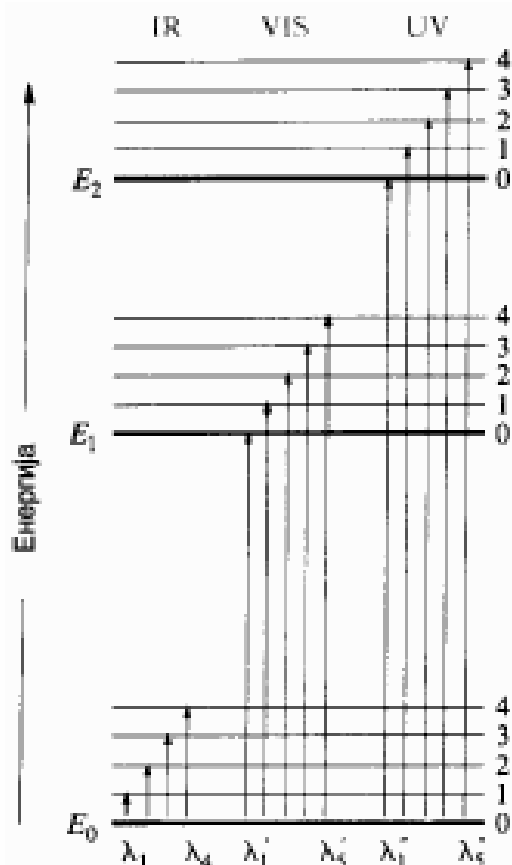
$$E = E_{\text{електронска}} + E_{\text{вибрациона}} + E_{\text{ротациона}} + E_{\text{транслациона}}$$

каде $E_{\text{електронска}}$ е енергијата во врска со електроните во надворешните орбитали на молекулата, $E_{\text{вибрациона}}$ е енергијата на целата молекула што се должи на меѓуатомските вибрации, а $E_{\text{ротациона}}$ се однесува на енергијата поврзана со ротацијата на молекулата околу нејзиниот центар на гравитација. Последниот член во изразот ја претставува транслационата енергија на молекулата.

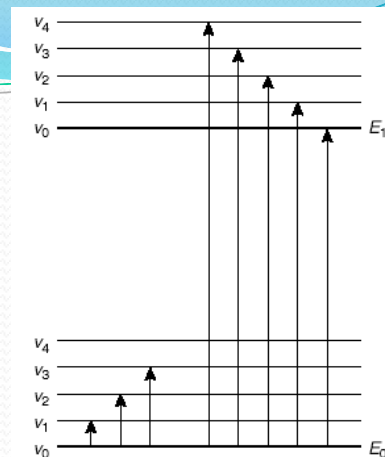
Односот на големините на енергетските разлики помеѓу соодветните енергетски нивоа е следниот:

$$\begin{aligned}\Delta E_{\text{електронска}} &\approx 10 \Delta E_{\text{вибрациона}} \\ &\approx 100 \Delta E_{\text{ротациона}} \\ &\gg \Delta E_{\text{транслациона}}\end{aligned}$$

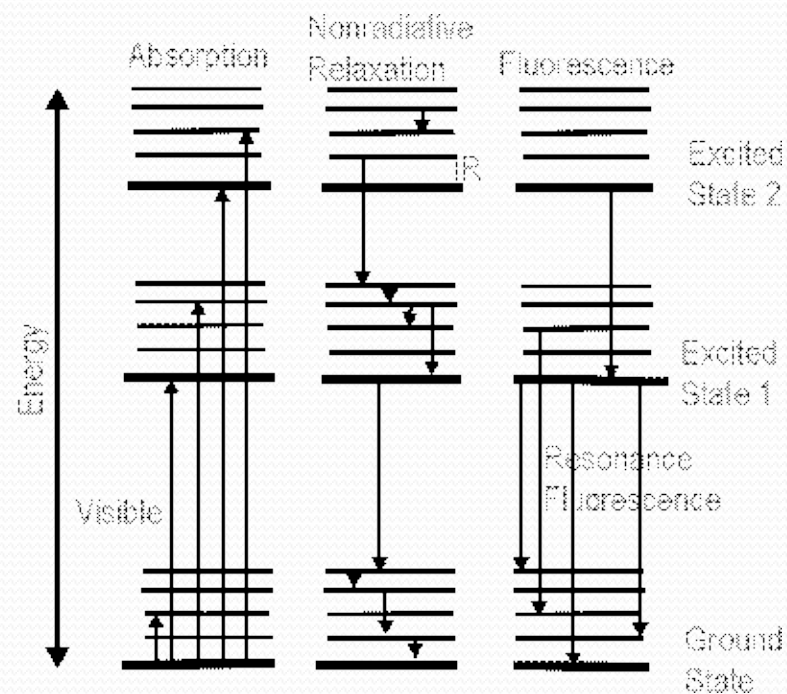
Молекулска апсорпција



Електронски енергетски нивоа со
вибрациони нивоа



Разликата меѓу апсорпцијата на инфрацрвено зрачење
(лево) и ултравиолетово/видливо зрачење (десно)



Видови емисиони процеси

...и кај атомска и кај молекулската апсорпција

Не секој премин е можен!!!

Можни се само т.н. **дозволен премини** врз основа на т.н. правила на избори.

Ексцитираната молекула:

- нестабилна:
 - молекулата брзо се враќа во основната состојба – емисионен спектар
- стабилна и метастабилна:
 - молекулата ќе се *задржи* во ексцитирана состојба – апсорпционен

Апсорпциони спектроскопски методи - основни термини

Термин и симбол	Дефиниција	Алтернативно име и симбол
моќ на зрачење P, P_0	Енергија на зрачење која паѓа на единица површина на детекторот во секунда	Интензитет на зрачење I, I_0
апсорбанца A	$\log(P_0/P)$	Оптичка густина D Екстинкција E
трансмитанца T	P/P_0	Трансмисија T
пат на зрачењето ⁴ b		l, d
Апсорпционен коефициент ⁴ a	A/bc	Коефициент на екстинкција k
моларен апсорпционен коефициент ⁵ ε	A/bc	Моларен коефициент на екстинкција ε

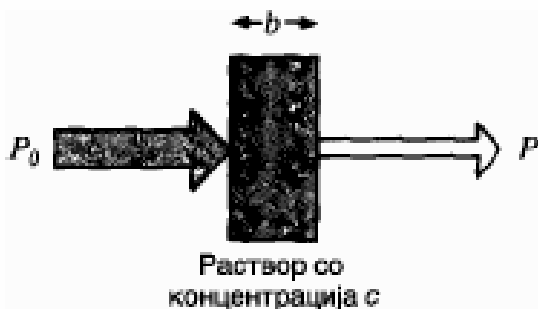
УВ/Видлива СПЕКТРОСКОПИЈА

Трансмитанца и апсорбанца

Пригушувањето на електромагнетното зрачење при негово минување низ примерокот квантитативно може да се опише преку:

- трансмитанца
- апсорбанца.

Трансмитанца: однос на моќноста на електромагнетното зрачење по минувањето низ примерокот, P , спрема моќноста на зрачењето што упаѓа во примерокот од изворот, P_0 ,



$$T = \frac{P}{P_0}$$

$$A = \log \frac{P_0}{P} = -\log \frac{P}{P_0}$$

- Пригушувањето на зрачењето е причина трансмитанцата да е помала од 1.
- Може да се изрази во проценти: 100 % (нема апсорпција) и 0 % (целосна апсорпција).
- Сите методи на детекција, ја мерат трансмитанцата на електромагнетното зрачење.

Апсорбанца, A , се дефинира како:

$$A = -\log T = -\log \frac{P_T}{P_0} = \log \frac{P_0}{P_T} \quad \text{или} \quad A = -\log \left(\frac{P}{P_0} \right) = \log \left(\frac{P_0}{P} \right)$$

Апсорбанцата е попрактична единица за изразување на пригушувањето на зрачењето, затоа што, **таа е линеарна функција од концентрацијата на аналитот.**

Пример

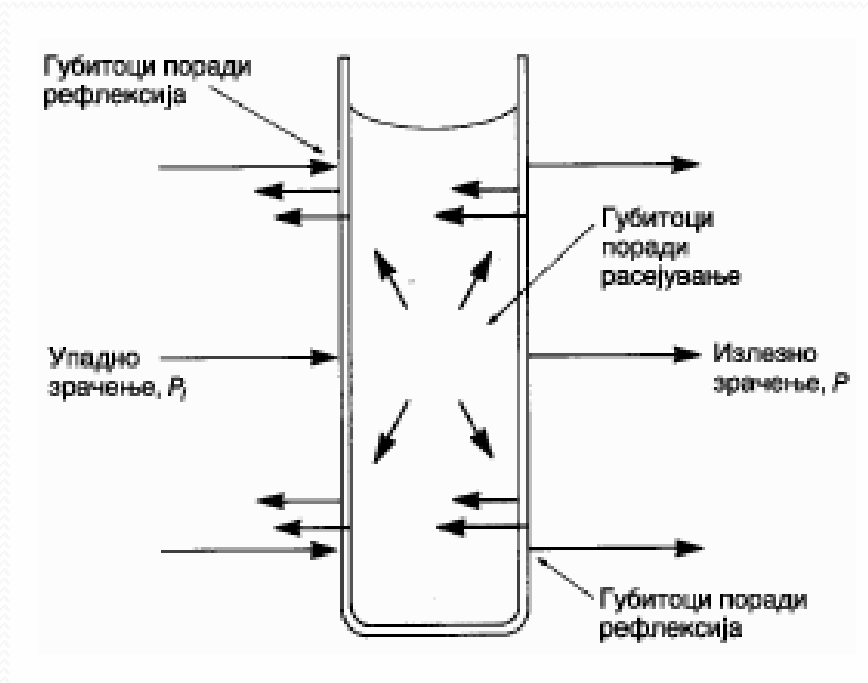
Примерокот покажува процентна трансмитанца од 50,0 %. Колкава е апсорбанцата?

РЕШЕНИЕ:

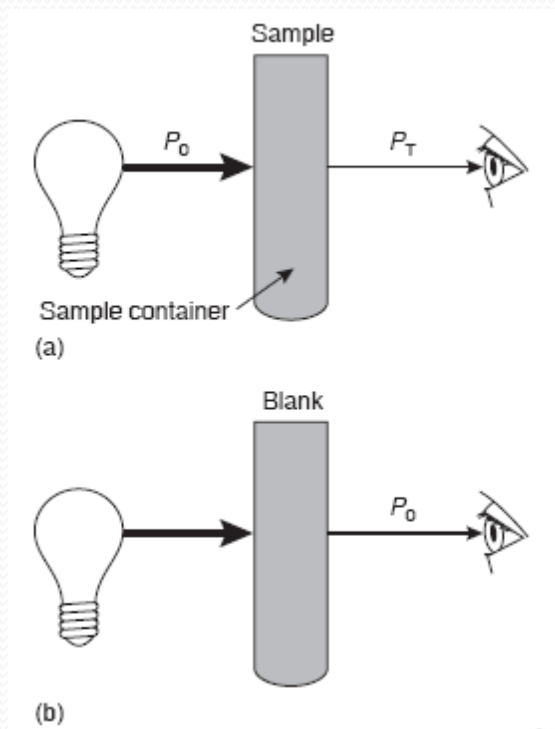
$$A = -\log T = -\log (0,500) = 0,301 = 30,1 \%$$

КОИ СЕ ПРИЧИНИТЕ ШТО ДОВЕДУВААТ ДО ПРИГУШУВАЊЕ?

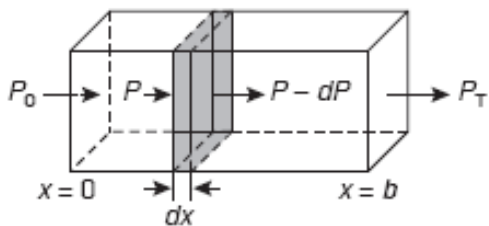
- **АПСОРПЦИЈАТА ОД СТРАНА НА АНАЛИТОТ,**
- И други феномени учествуваат во вкупното пригушување на зрачењето:
 - рефлексијата од садот во кој се наоѓа примерокот
 - апсорпцијата од садот во кој се наоѓа примерокот
 - апсорпцијата од компонентите во матрицата на примерокот различни од аналитот
 - расејувањето на зрачењето.



За компензирање на овие губитоци на моќноста на електромагнетното зрачење, користиме метода на т.н слепа проба. Моќноста на зрачењето што излегува од садот со т.н слепа проба се означува со P_0 .



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 . **Фракционото опаѓање на вредноста на моќноста е пропорционално со дебелината на примерокот и концентрацијата на аналитот, C ;**

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

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 од $P = P_0$ до $P = P_T$, и 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 ($\log$), во

се добива: $A = abc$

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

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

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot b \cdot c$$

БЕРОВ ЗАКОН

Однос меѓу апсорбанцата на примерокот и концентрацијата на хемиските видови што учествуваат во апсорпцијата

$$(A = \epsilon/c).$$

Пример: Раствор на аналит, со концентрација $5,00 \times 10^{-4}$ 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 Ламбер-Беровата равенка по ϵ , и извршувајќи соодветни замени, се добива:

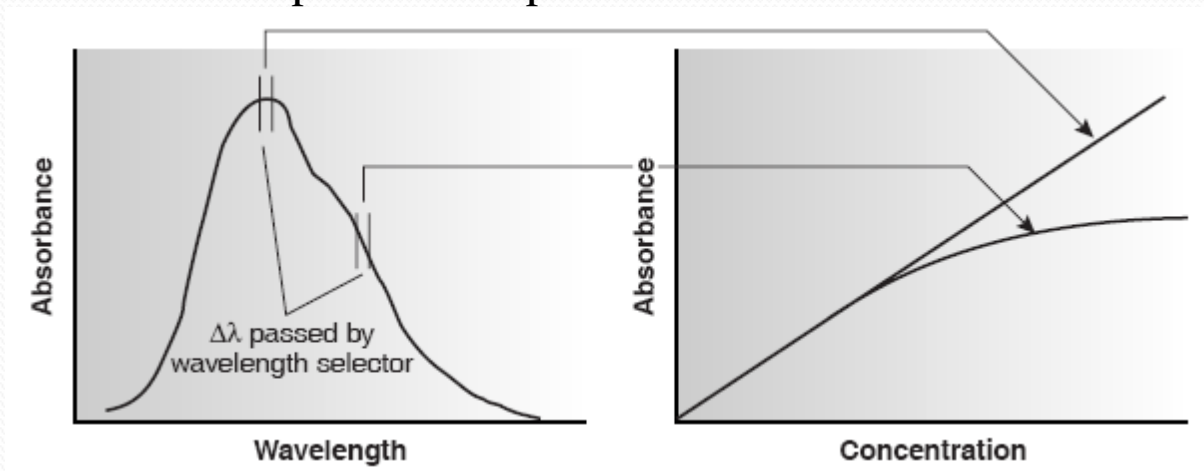
$$\epsilon = \frac{A}{lc} = \frac{0,338}{1 \text{ cm} \cdot 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}} = 676 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$$

Ограничувања на Беровиот закон

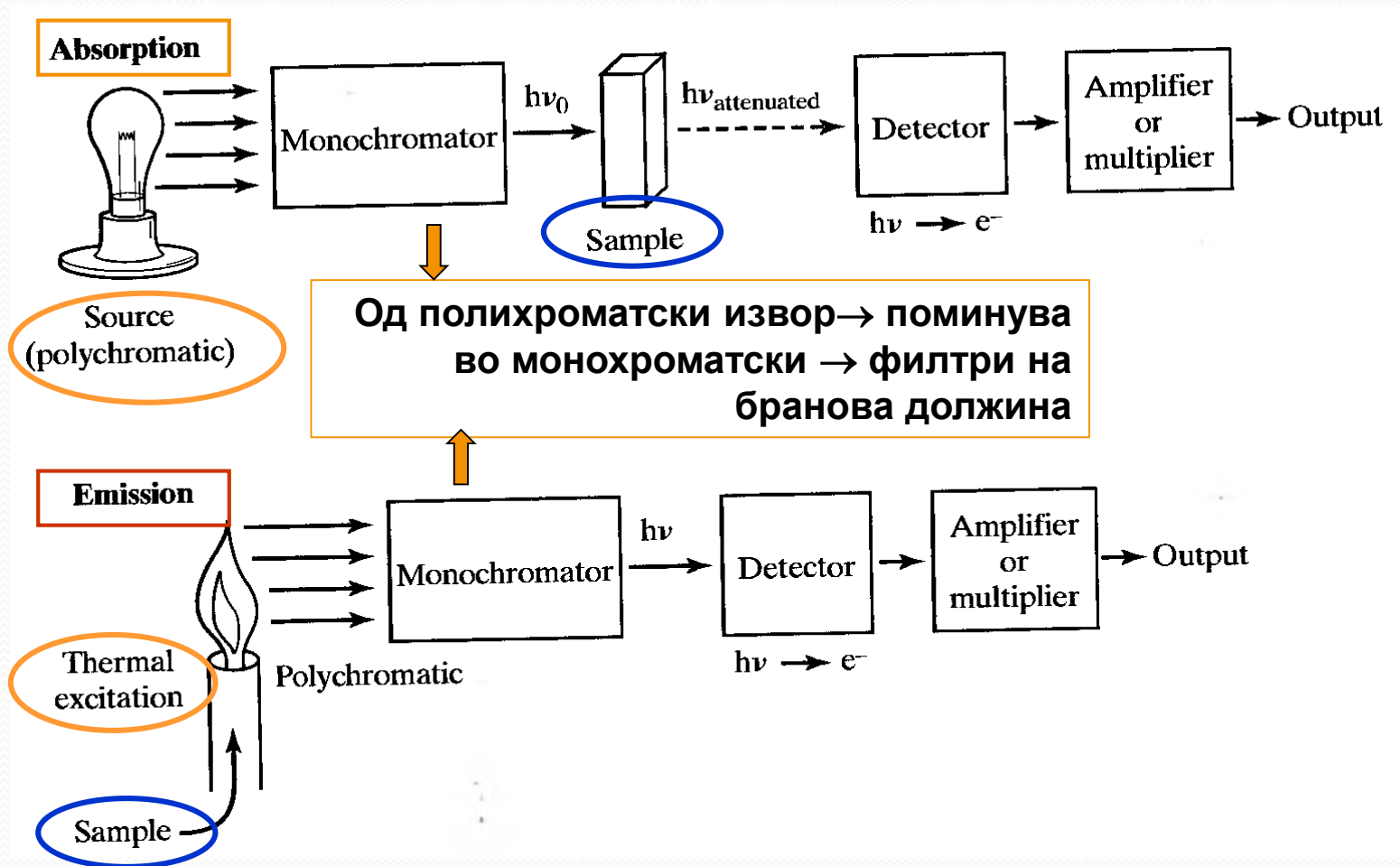
- едноставен закон,
- не ги зема предвид интеракциите меѓу молекулите,
- расејувањето, рефлексивната на светлината

Ограничувањата се делат на:

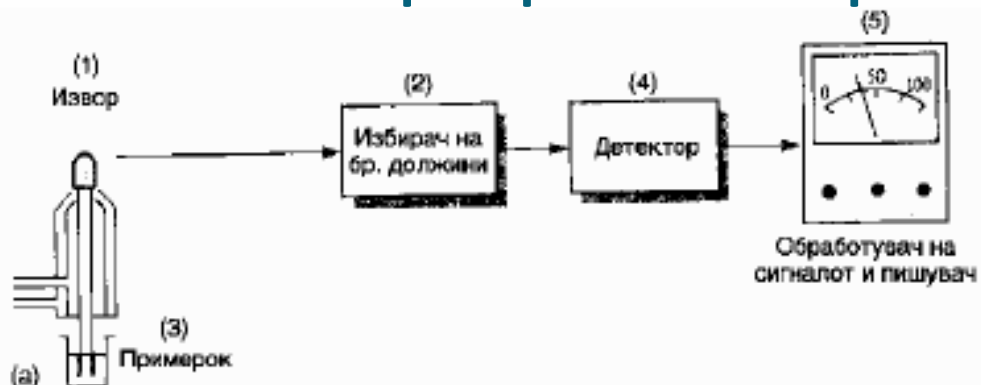
- **реални:**
 - обично $c < 0,01 \text{ mol/L}$,
 - при поголеми концентрации – молекулски интеракции.
- **хемиски :**
 - хемиски рамнотежи
 - формирање на комплекси,
 - киселинско базни рамнотежи – слаби киселини/бази при бескрајно разредување.
- **инструментални.**
 - важи за монохроматско зрачење



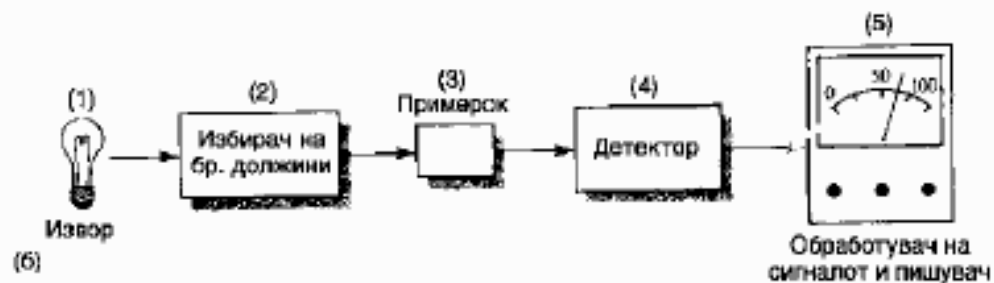
Приказ на влијанието на брановата должина врз линеарноста на калибрациона крива добиена со примена на Беров закон



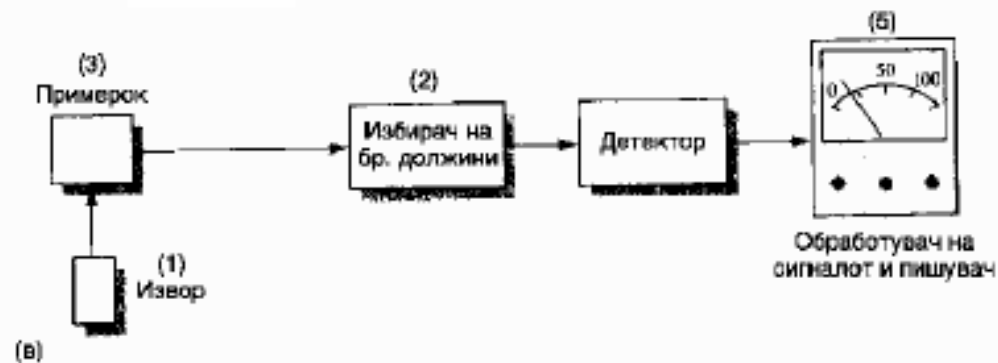
Спектрофотометри



Емисионен спектрофотометар



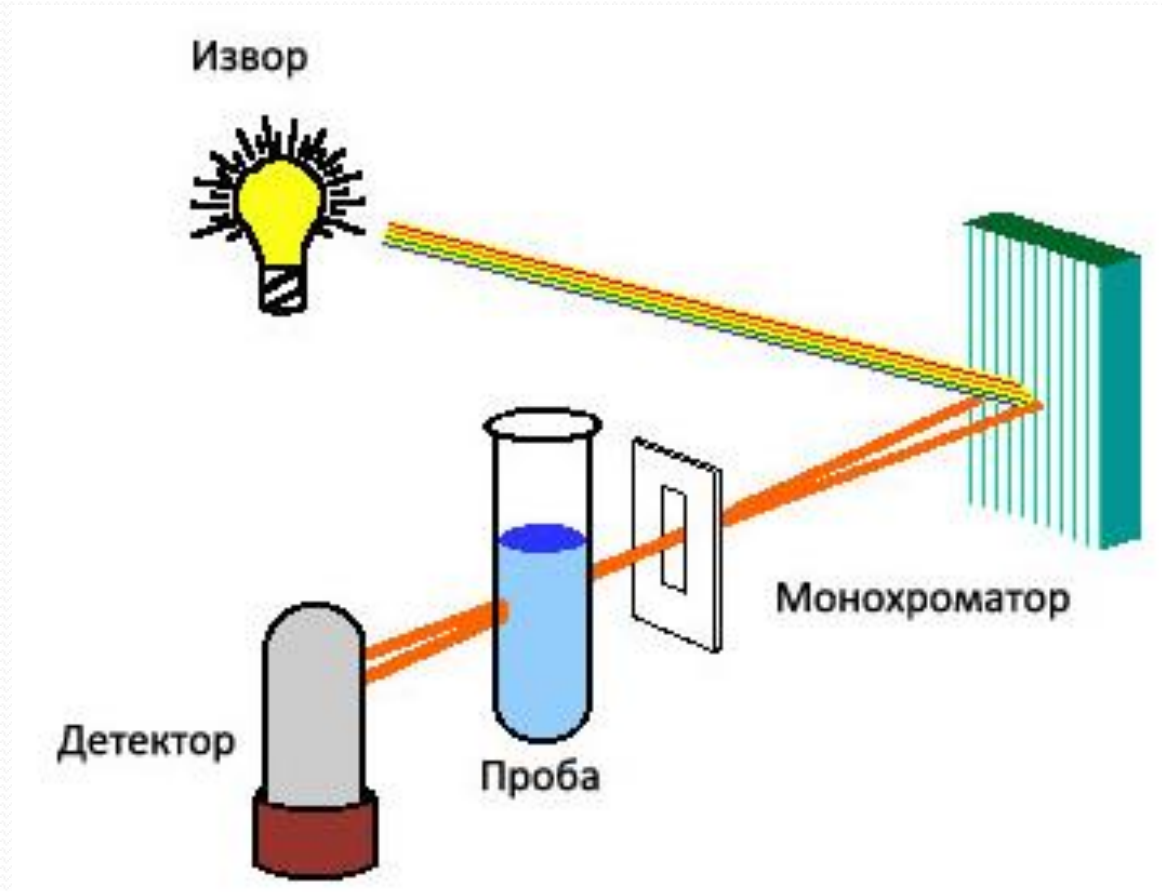
Апсорпционен спектрофотометар



Флуоресцентен спектрофотометар

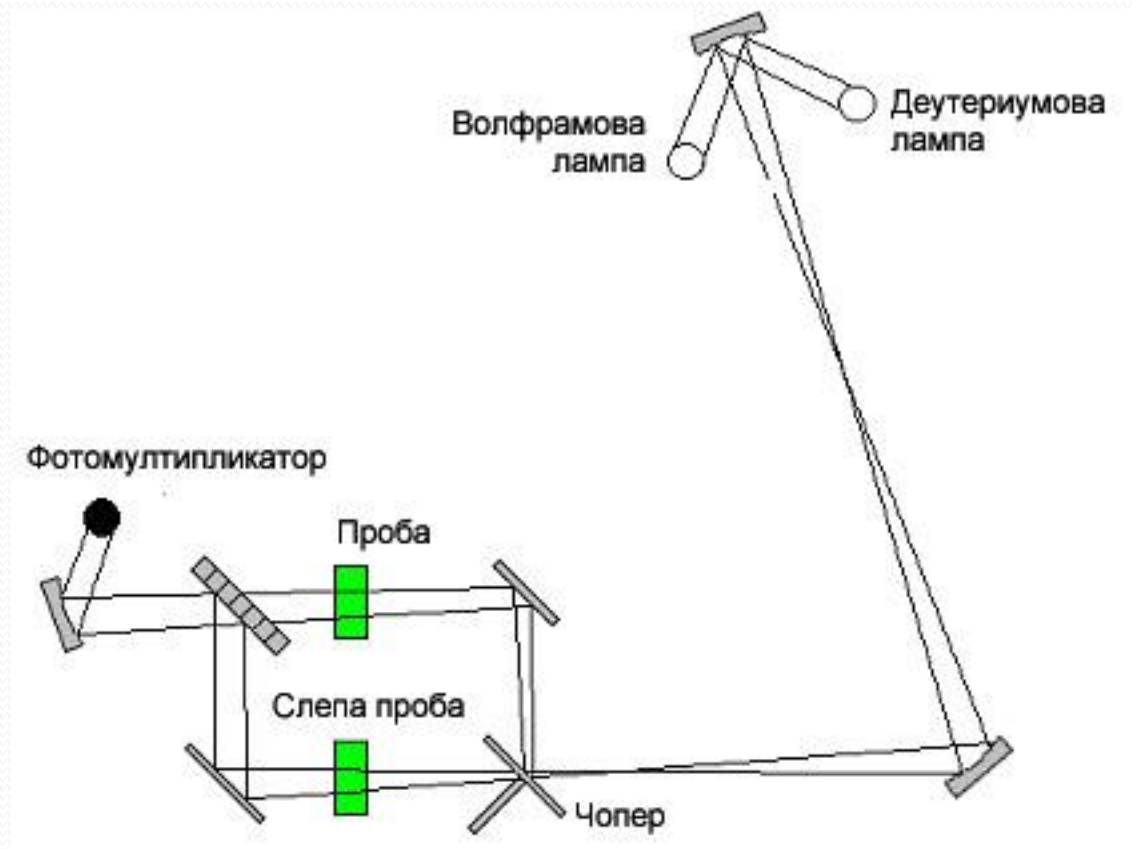
Спектрофотометрите може да бидат со:

- еден сноп (*single-beam*)



Спектрофотометрите може да бидат со:

- со два снопа (*double-beam*).



Делови кај спектрофотометрите

- **Извор на зрачење** (електричен лак, искра, пламен, загреана површина, ...): континуирани и линиски
- **Избирачи на бранова должина** (филтри, монохроматори, интерферометри)
- **Садови за примерокот**
- **Детектори** (фотографски филм, фотон детектор, топлински детектор, окото како детектор)

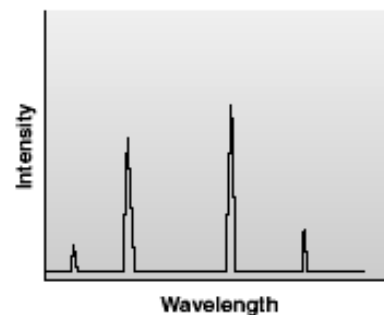
Извори

Извори на електромагнетно зрачење

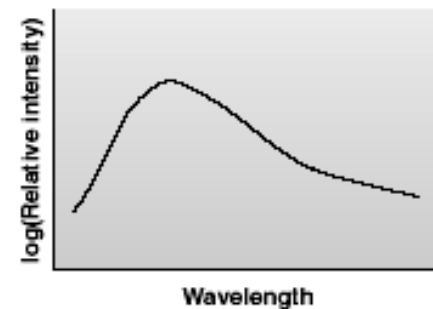
Изворот на електромагнетно зрачење треба да обезбеди доволно интензивно и стабилно зрачење во одреден дел од електромагнетниот спектар. Изворите на електромагнетно зрачење може да бидат **континуирани** и **линиски**.

Континуиран извор емитира зрачење во широк интервал на бранови должини, со релативно мали варијации во интензитетот како функција од брановата должина.

Линискиот извор емитира зрачење во неколку избрани, тесни подрачја на бранови должини.



емисионен спектар
на линиски извор



емисионен спектар
на континуиран
извор на зрачење

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

Извор	Спектрално подрачје λ/nm	Спектроскопија
КОНТИНУИРАНИ ИЗВОРИ		
Ксенонова лампа	250 600	Молекулска флуоресцентна; Раманска
H₂ и D₂ лампи	160 380	UV молекулска апсорпција
Волфрамова лампа	350 2200	UV/Vis/блиско-IR молекулска апсорпција
Нернстово стапче	400 - 20 000	IR молекулска апсорпција
ЛИНИСКИ ИЗВОРИ		
Лампа со шуплива катода	UV/Vis	Атомска апсорпција; Атомска флуоресценција
Лампа со електрично празнење	UV/Vis	Атомска апсорпција; молекулска флуоресценција; Раман
Ласер	Uv/Vis/IR	Раман; молекулска апсорпција; молекулска флуоресценција

Избирачи на бранова должина

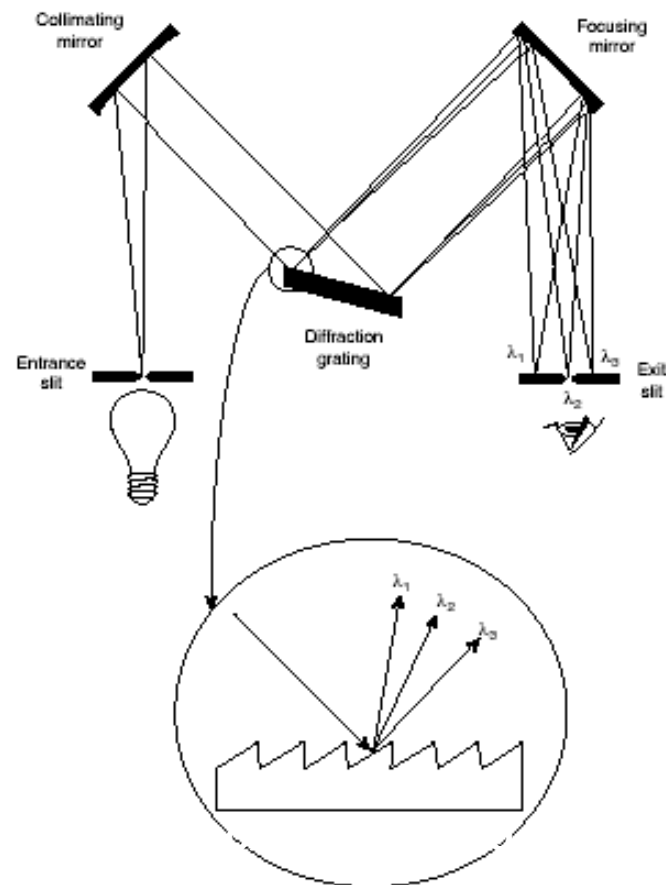
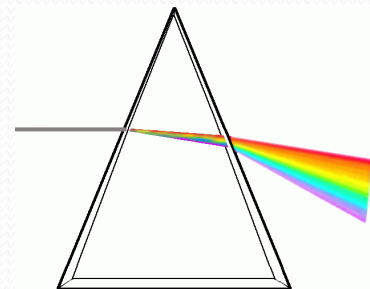
- Се избира зрачење со определена бранова должина, каде **аналитот ќе биде единствениот хемиски вид што ќе апсорбира**

- За да се изолира зрачење со една бранова должина од континуиран извор се **користи селектор на бранови должини (монохроматор)**. Тој пропушта еден тесен сноп од зрачењето што се карактеризира со точно **определена бранова должина**

- **филтри**
- **монохроматори**

Избирач на бранови должини којшто користи **призма** или **дифракциона решетка** овозможува континуирана промена на брановата должина

- **Дифракциони призми** и
- **Дифракциони решетки**
- **интерферометри**





Садови за образецот (димензии 0,1 до 10 cm):
за УВ/Вид:

кварцни ($\lambda < 350 \text{ nm}$),
стаклени ($350 \text{ nm} > \lambda > 2000 \text{ nm}$) или
пластични ($\lambda > 375 \text{ nm}$).

Одржувањето на киветите е важно за добивање
на квалитетни резултати

Типичен изглед на кивети
што се користат во
UV/видлива спектроскопија.

Детектори:

Фотоелемент;
Формултипликатор;
Низа од диоди

Окото како детектор – колориметрија;

Мерење на апсорпцијата

Ултравиолетова и видливо ел. магнетно зрачење:

- Видливо подрачје: 380 – 770 nm,
- Ултравиолетово: 100 – 380 nm

Експериментални методи:

- Колориметрија;
- Спектрофотометрија и фотометрија

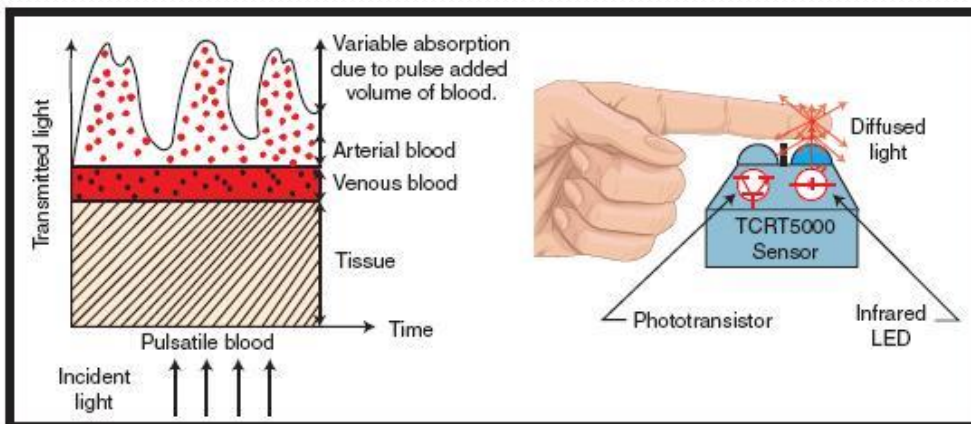
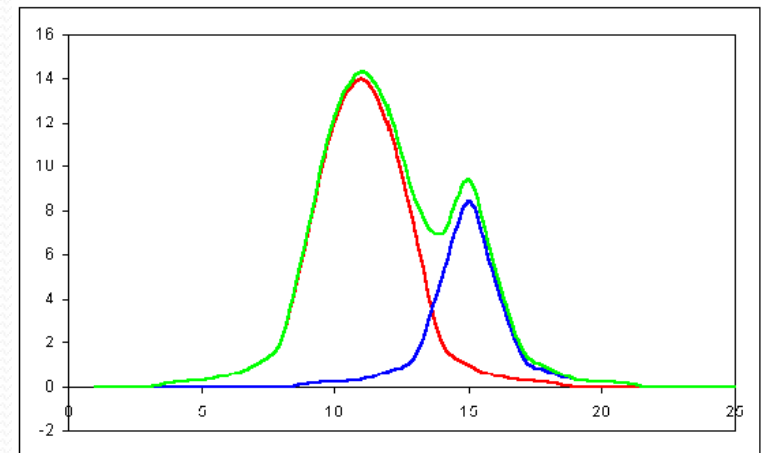
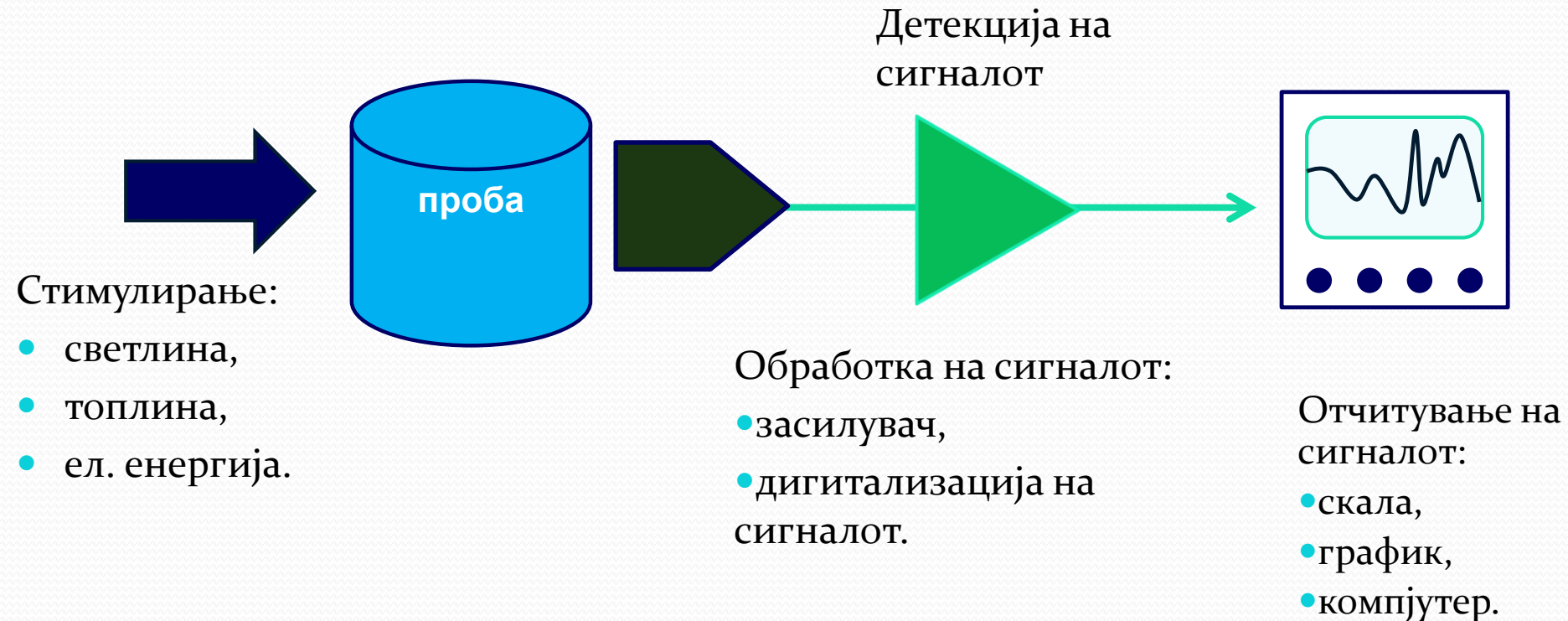


Figure 1—Optical pulse measurement is based on a few principles. The light intensity changes when it passes through your finger. The pulsometer takes the measurement.



Колориметрија

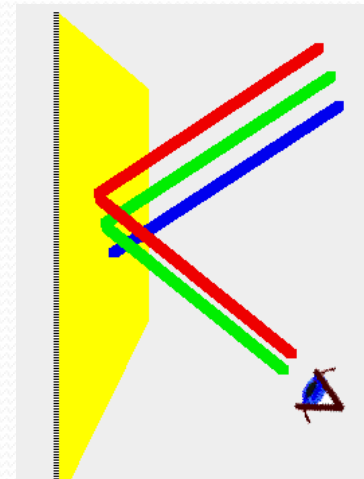
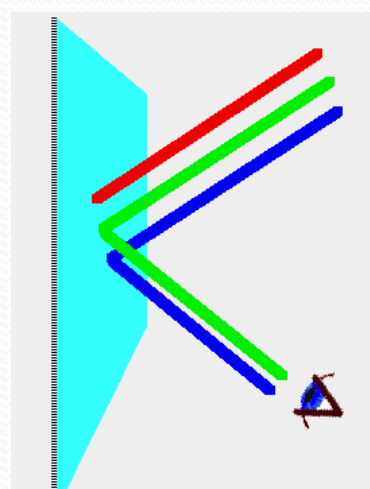
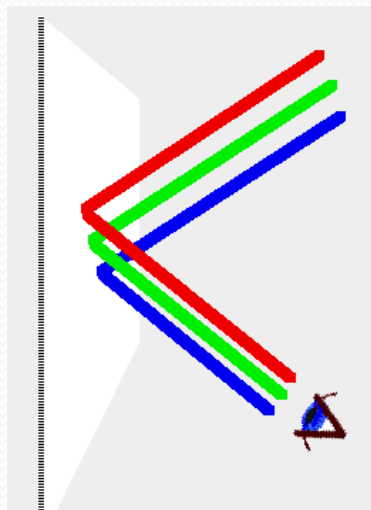
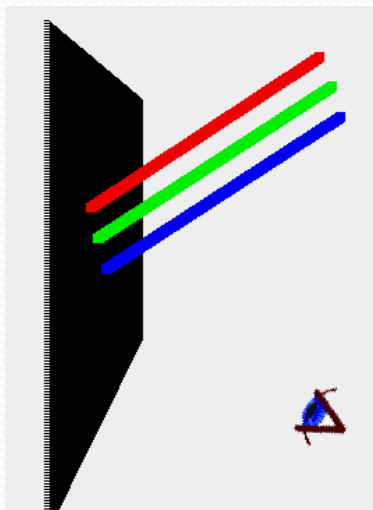


Често, растворите на разни анализи се со карактеристично обојување. Интензитетот на тоа обојување е пропорционално со концентрацијата на анализот.

Во видливиот дел од спектарот се мери интензитетот на бојата- КОЛОРИМЕТРИЈА

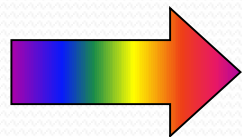
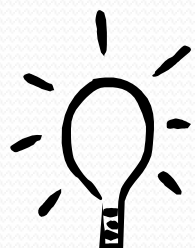
Бојата претставува визуелен феномен кој се јавува како резултат на селективна апсорпција на определени фреквенции од упадното зрачење.

- Ако сè се **апсобира** – црна,
- Ако сè се **рефлектира** – бела

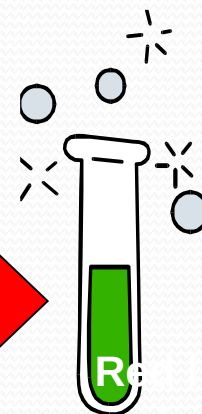
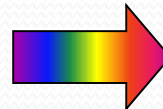
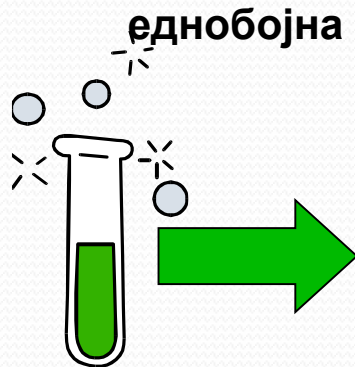


Бранова должина, nm	Боја	Комплементарна боја
400-435	виолетова	жолто-зелена
435-480	сина	жолта
480-490	сино-зелена	портокалова
490-500	зелено-сина	црвена
500-560	зелена	пурпурна
560-580	жолто-зелена	виолетова
580-595	жолта	сина
595-650	портокалова	сино-зелена
650-750	црвена	зелено-сина

Бела светлина
(сончева) – сите бои
полихроматска



Монохроматска светлина
еднобојна

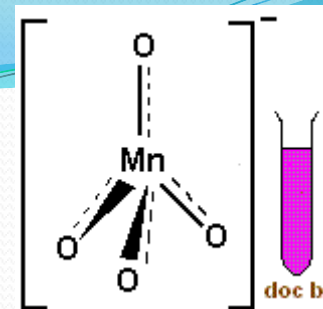


**Раствор е зелениот зошто ја апсорбира
црвено-виолетовата светлина**

Како до обоените раствори?

Некои раствори се обоени (KMnO_4 ; $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$,...);

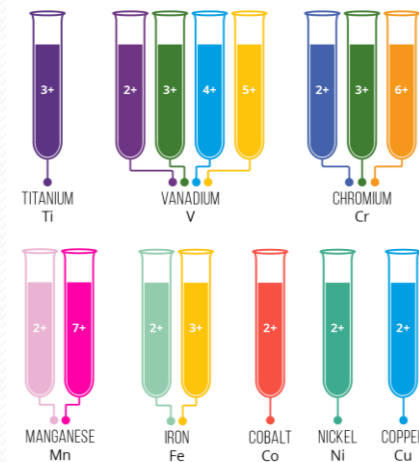
Безбојните и слабо обоени раствори се обојуваат:



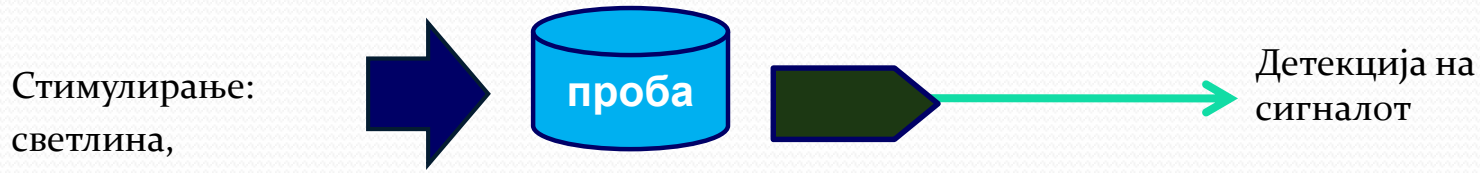
- Реагенси за комплексирање;
- Редокс реакции,
- Реакција со т.н хромофори што содржат слободни електронски парови или незаситени врски

Реагенсите за обојување треба:

- Брзо да реагираат со анализот,
- Продуктот на реакцијата да е стабилен,
- Да реагира во стехиометриски однос со анализот;
- Реагенсот треба да е провиден на одбраната бранова должина;
- Да биде специфичен за анализираната супстанца;
- Да може да се користи во повеќе растворувачи.



ОКОТО КАКО ДЕТЕКТОР



Колориметријата е метода за определување на концентрацијата врз основа на **споредба на интензитетот на обојувањето** на растворот на анализот со растворот на станард(и).

Колориметриски методи:

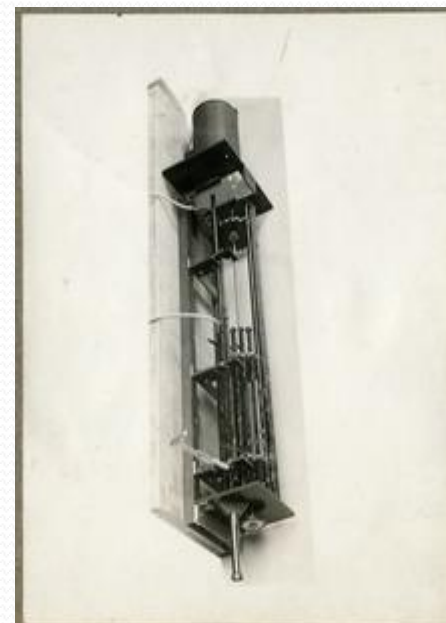
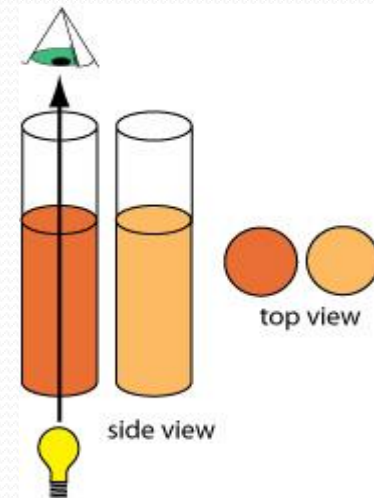
- Метода на стандардна серија
- Метода на изедначување и
- Метода на колориметриски титрации

Методата на Неслер за определување на концентрацијата на амонијак, предложена во 1856 година.

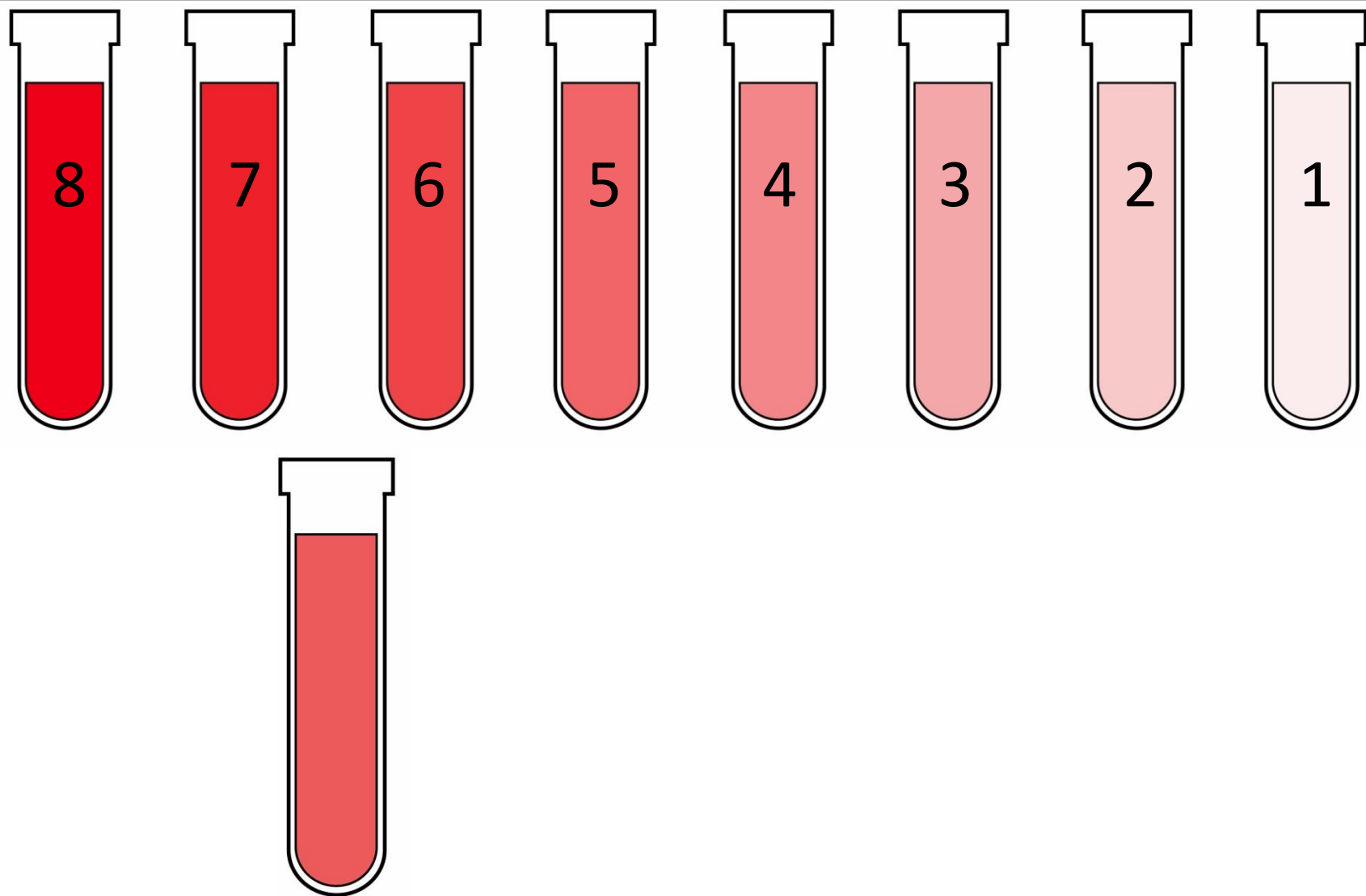
Неслер утврдил дека при додавање на алкален раствор на HgI_2 и KI на разреден раствор од амонијак, се создава жолт до црвено-кафеав колоиден раствор, при што обојувањето зависи од концентрацијата на амонијакот. Определувањето на концентрацијата на амонијакот се вршела споредувајќи ја бојата на растворот на анализираниот примерок со обојувањето на серија стандардни раствори.

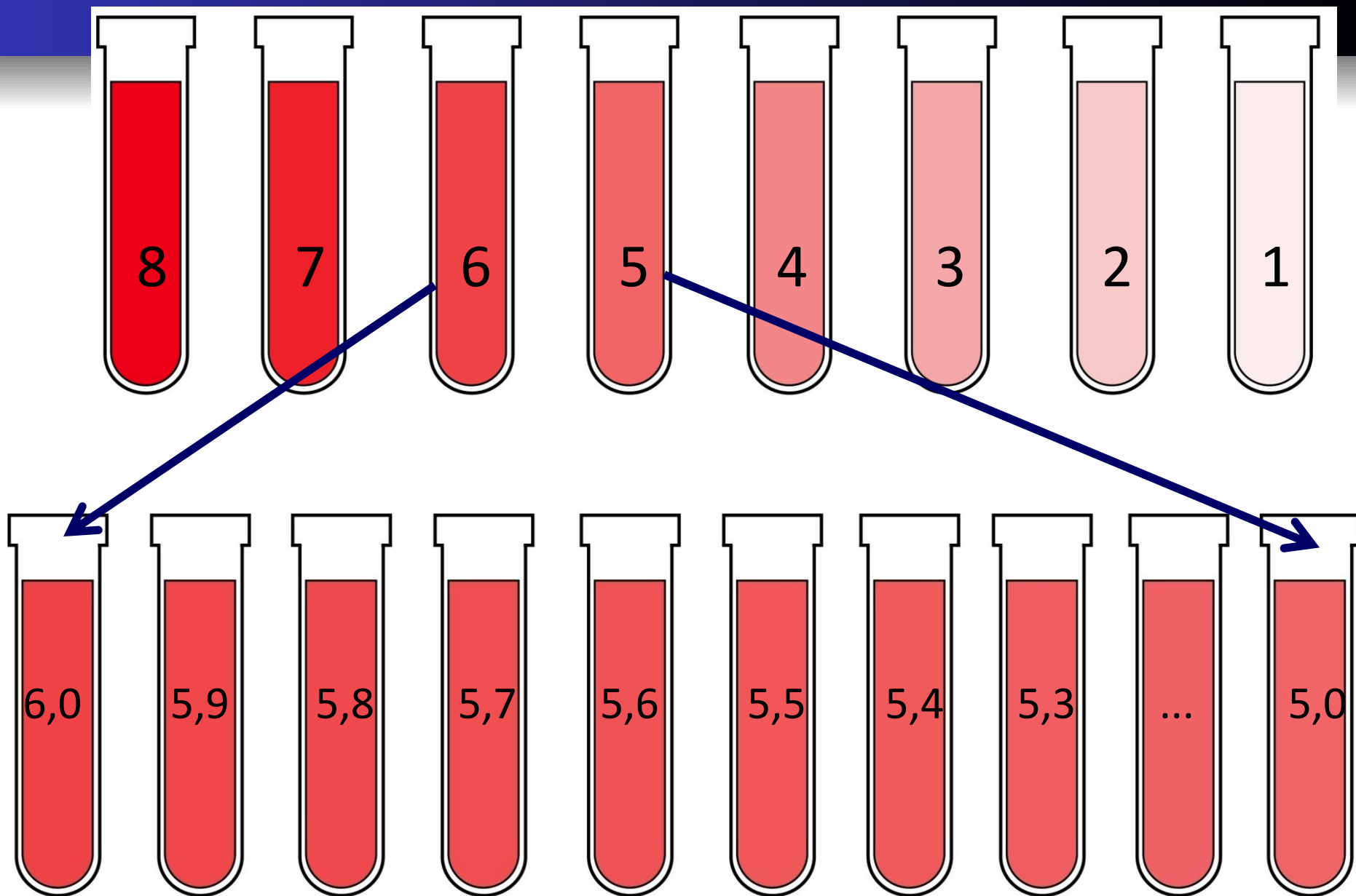
Епрувети со рамно дно биле наполнети со еднакви волумени раствори на примерокот и на стандардите, и поставени на статив со рефлектирачка површина, којашто овозможувала светлината да минува низ растворите. Боите на растворите на примероците и на стандардите биле споредувани, набљудувајќи го секој раствор во насоката од површината кон дното.

До скоро, модифицираната форма на оваа метода се цитираше како стандардна метода за определување содржина на амонијак во отпадни води и во води за пиење.

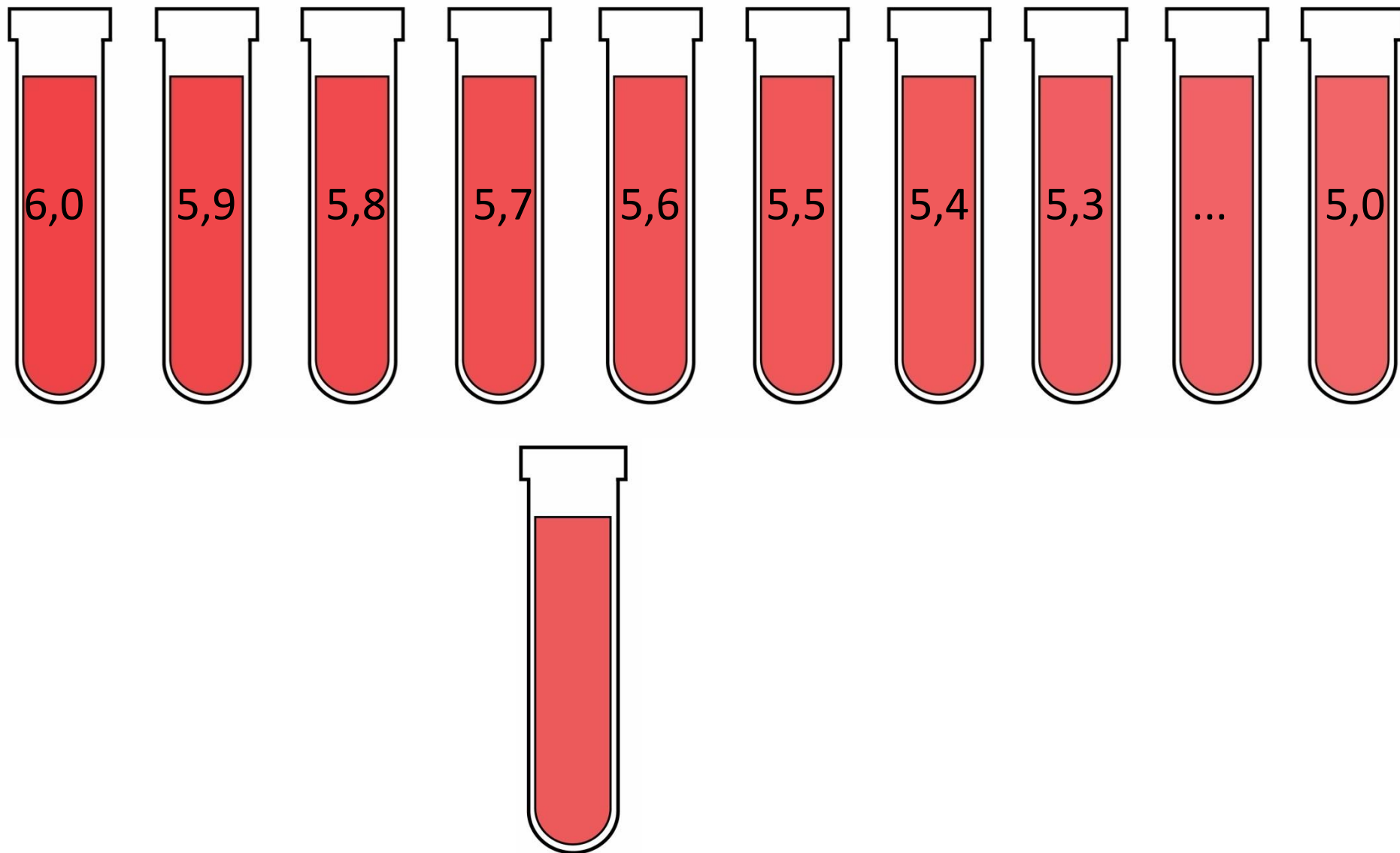


Метода на стандардни серии

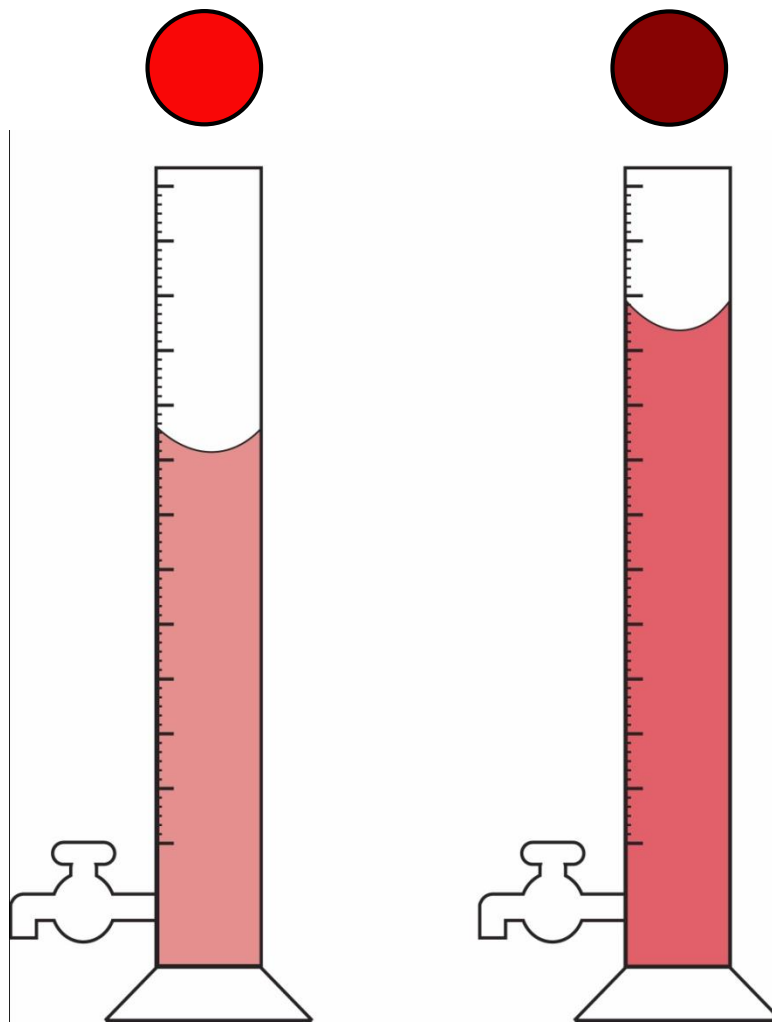




Метода на стандардни серии



Метода на изедначување (Хехнерова метода)

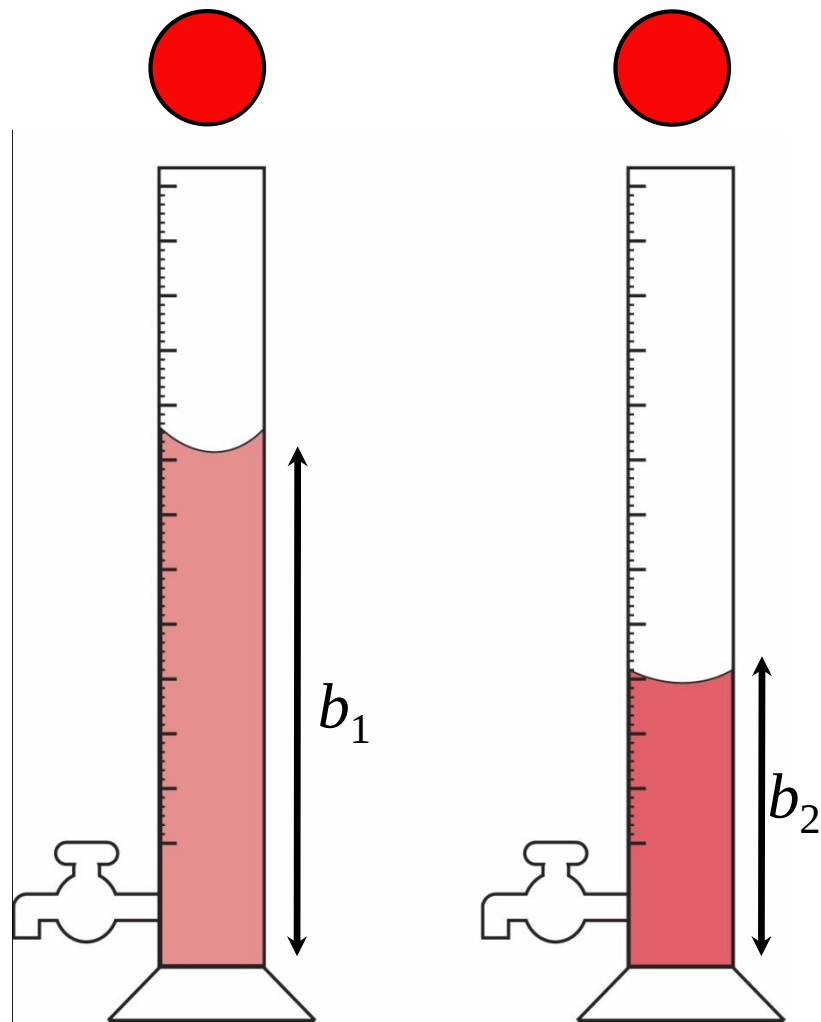


Метода на изедначување

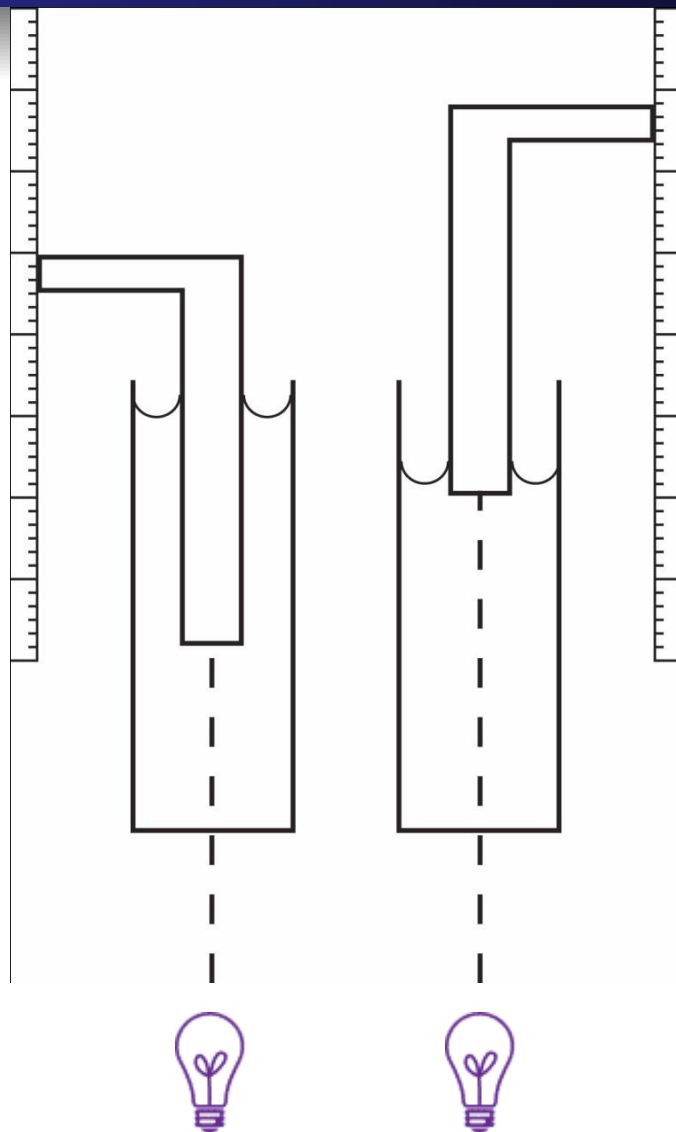
$$A_1 = A_2$$

$$\varepsilon b_1 c_1 = \varepsilon b_2 c_2$$

$$b_1 c_1 = b_2 c_2$$



Дубосков колориметар (Louis Jules Duboscq)



Колориметриски тест за жива

- Модерен пример за спот-тест :
- Определување на Hg^{2+} со DNA преку формирање на тимидин- Hg^{2+} -тимидин комплекс
- LOD = 100 nM (20 ppb), во вода
- Линеарен однос од наномоларни до микроларен интервал
- Селективно за Hg^{2+} неселективно кон Mg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} ,

