

1. Аналитика, аналитички процес, стадиуми

2. Методологија на решавање на аналитички проблеми

3. Избор на аналитичка метода

4. Подготовка на проба за анализа

Предавање 2, Инструментални аналитички методи (А), М. Стефова, 2022

1

1. Аналитика, аналитички процес, стадиуми

- **АНАЛИТИЧКА ХЕМИЈА**
- **АНАЛИТИКА** (хемија, физика, информатика, техника)

Задача - добивање информации за:

- природата и бројот на составните делови на системите
- нивните количества
- просторниот распоред и промени со текот на времето
- разработка на методика потребна за постигнување на овие цели

2

1. Аналитика, аналитички процес, стадиуми

Аналитичката информација може да се претстави како **функција** од:

- величини карактеристични за **природата** на составните делови (ознака z , т.е. $z_1, z_2, z_3 \dots z_i$)
- величини кои го карактеризираат **количеството** на составните делови (ознака y , т.е. $y_1, y_2, y_3 \dots y_i$)
- величини кои се **просторни координати** на испитуваниот објект (x_i, x_j, x_k)
- **време** или друг параметар што зависи од времето (t).

3

1. Аналитика, аналитички процес, стадиуми

КОМПОНЕНТНА АНАЛИТИКА

⇒ определување на **квалитативниот** и **квантитативниот** состав на пробата при што **компонента** = елемент, соединение, атом, јон, молекула, радикал и сл.

Еднодимензионална аналитичка информација

- Како е секое (или некое) z_i , т.е. присутна ли е или не определена компонента? ⇒ **квалитативна анализа**

Дводимензионална аналитичка информација

- Колкаво е количеството на даден составен дел од системот?
⇒ **квантитативна анализа**

⇓

истовремено и квалитативна и квантитативна анализа

4

1. Аналитика, аналитички процес, стадиуми

Тродимензионална аналитичка информација



ДИНАМИЧКА АНАЛИТИКА – анализа на процесите:

- добивање на аналитички информации каде **времето t** е една од независно променливите величини
- за анализа на процесите – *брза* аналитичка метода – *инструментална*
- **Пр. молекуларно-динамичка анализа** – анализа на процесите на молекуларни прегрупирања, изомеризации и сл. – специјални инструментални методи кои овозможуваат мерења во интервали од по 10^{-3} - 10^{-9} s!

5

1. Аналитика, аналитички процес, стадиуми

ЛОКАЛНО-РАСПРЕДЕЛИТЕЛНА АНАЛИТИКА

- една, а обично две или три просторни координати – независно променливи величини $\Rightarrow$ аналитичка функција зависна и од x_i
- **просторна распределба на компонентите и/или количество**
↓
- дводимензионална аналитичка информација
- тродимензионална
- четиридимензионална?!
- **На атомско, молекуларно ниво**
↓
- **структурна аналитика** – структура на молекули, кристали
- **квалитативна структурна информација** (постоење на врски помеѓу два елементи од структурата; структурна формула, матрица)
- **квантитативна структурна информација** (должина на врски, големина на валентни агли, симетрија на молекулата или кристалот).

6

1. Аналитика, аналитички процес, стадиуми

АНАЛИТИЧКИ ПРОЦЕС



низа од меѓусебно поврзани етапи кои овозможуваат да се добие информација за испитуваниот објект

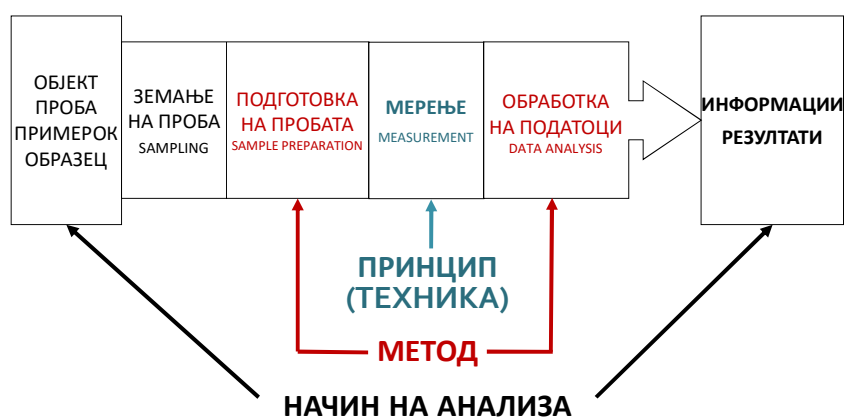
– проба, образец, примерок (sample)

Стадиуми:

- земање на проба
- подготовка на пробата
- мерење
- обработка на податоците од мерењето

7

1. Аналитика, аналитички процес, стадиуми



8

1. Аналитика, аналитички процес, стадиуми

Принципите на анализа се темелат на мерење на физички величини:

- **општи својства** на супстанцата (маса, волумен)
- **механички својства** на супстанцата (густина, површински напон, вискозност...)
- **појави** што произлегуваат од **интеракцијата меѓу супстанцата и електромагнетно зрачење** (апсорпција и емисија на електромагнетно зрачење, рефлексија, дифракција, рефракција, Раман-ов ефект, нуклеарно-магнетна резонанца...)
- **електрични и магнетни својства** (електродни потенцијали, електрична спроводливост, магнетна суспендибилност...)
- **термички својства** (температура на премин, топлина на реакција, топлинска спроводливост...)
- **нуклеарни својства** (радиоактивност)
- ...

и сето тоа со цел да се определи:

- **хемискиот состав, концентрацијата, структурата и/или промените со текот на времето на анализираниот образец**

9

1. Аналитика, аналитички процес, стадиуми

ЗОШТО ИНСТРУМЕНТАЛНИ МЕТОДИ?

- Скоро секое физичко својство на било кој елемент или соединение може да послужи за развивање на инструментална метода

Инструменталните методи се супериорни поради тоа што со нив:

- СЕ ДОБИВААТ ИНФОРМАЦИИ КОИ НЕ Е МОЖНО ДА СЕ ДОБИЈАТ СО ПРИМЕНА НА КЛАСИЧНИ МЕТОДИ (особено динамичка, локално распределителна аналитика) ПОРАДИ НИВНАТА:
- **БРЗИНА** (рутински анализи, анализи со голем број паралелни мерења на иста величина)
- **СЕЛЕКТИВНОСТ** (се анализираат различни компоненти, некогаш дури и без нивно претходно разделување со употреба на селективни/специфични методи)
- **ТОЧНОСТ И ОСЕТЛИВОСТ** (особено кога $w < 1\%$)

како и можноста да

- се анализираат **мали количества на образец** (10^{-3} - 10^{-6} g)
- се намалува **субјективниот фактор...**

10

Во нашиот курс:

- Оптички (спектроскопски) методи
- Масена спектрометрија
- Електроаналитички методи
- Хроматографски методи

Но, пред тоа уште:

- Методологија на решавање на аналитички проблеми
- Подготовка на проба за анализа

11

2. Методологија на решавање на аналитички проблем***Хемиски информации*****АНАЛИТИЧКИ ПРОЦЕС****РЕШАВАЊЕ НА ПРОБЛЕМИ ОД:**

- компонентна аналитика
- динамичка аналитика
- локално-распределителна (структурна аналитика)

АНАЛИТИЧКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НА ПРОБАТА:

- *хемиска аналитика*
- *биохемиска аналитика*
- *судско-медицинска аналитика*
- *аналитика на прехранбените производи*
- *аналитика на лекови*
- ...

12

2. Методологија на решавање на аналитички проблем

- **АНАЛИТИЧКИОТ ПРОБЛЕМ** - најчесто е **дел од покомплексен проблем** (индустриско производство на некој производ, медицински или биохемиски проблем, загадување/заштита на околината...)
- **ЗАТОА** аналитичарот треба да има доволно податоци за целосниот проблем за да избере најпогодна

методологија за решавање на аналитичката задача

13

2. Методологија на решавање на аналитички проблем

ДВЕ МОЖНОСТИ

1. **проблемот е напoлно нов** и претходно не бил никогаш решаван ⇒ **истражувачки пристап!**

долготрајна тимска работа на дефинирање на барањата од анализата, карактеризација на објектот на испитување и пробата, испитување на можностите што ги имаат различните принципи на анализа, и конечно формување, прецизирање и проверка на аналитичките постапки

2. **проблемот бил претходно решаван**, во иста или слична форма - почест случај - **ПОЛЕСНО!**

14

2. Методологија на решавање на аналитички проблем

Како ќе знаеме дали проблемот е нов или веќе познат?

⇒ од *сопственото искуство и знаење*, како и од она на *колегите и лабораторијата* во која се работи

⇒ **бавно, несигурно!?**

⇒ од *целокупното знаење на човештвото*, неговата колективна меморија ⇒ **посигурно!**

различни публикации (списанија, книги, прирачници...)



ХЕМИСКА ЛИТЕРАТУРА



огромен фонд на знаења



СИСТЕМ НА ИНФОРМАЦИИ

15

2. Методологија на решавање на аналитички проблем

ИЗВОРИ НА ХЕМИСКИ ИНФОРМАЦИИ

1. примарни - содржат податоци за *оригинални истражувања* и за резултатите добиени во нив (научни списанија, патентна литература, докторски, магистерски и дипломски работи, зборници на трудови од научни манифестации и на научни установи итн.)

2. секундарни - во скусена форма *реферираат* (известуваат) за она што е објавено во примарните извори (регистри на наслови, изводи на трудови, прегледи на трудови). Најпознат: **CHEMICAL ABSTRACTS (CA)**

3. терцијарни - сите други публикации во кои може да се најдат научни и стручни публикации (учебници, монографии и монографски серии, енциклопедии, прирачници, речници, табеларни информации, практикуми и сите публикации кои содржат информации корисни за еден хемичар)

16

2. Методологија на решавање на аналитички проблем

КАДЕ СЕ БАРААТ ХЕМИСКИ ИНФОРМАЦИИ?

1. Во библиотеката на Институтот за хемија – Chemical Abstracts, Science Citation Index, Beilstein, Chemical Titles итн.
Одамна веќе не!

2. Реферален центар во НУБ Св. Климент Охридски преку кој има пристап до **ИНФОРМАЦИОНИ СЕРВИСИ (Dialog, STN)**.
И тоа веќе не!

3. ИНТЕРНЕТ – од општи пребарувачи (Google, Google Scholar) до специфични научни бази, од кои некои се бесплатни (Scirus, PubMed...), а некои со претплата (Scopus, Web of Knowledge...) и може да водат до апстракти или целосни научни статии. **ВЕЖБА – пребарување на податоци за аналитички метод за анализа на даден/и аналит/и во даден примерок! → СЕМИНАРСКА РАБОТА!**

17

2. Методологија на решавање на аналитички проблем

КАДЕ СЕ НАОЃААТ АНАЛИТИЧКИ МЕТОДИ?

1. Во практикуми, прирачници, лабораториски записи, упатства од производители на опрема (handbook, manual, application note...)

2. Во научни списанија достапни на интернет (апстракти секако иако тоа е недоволно, сè повеќе и full text 😊)

3. Стандардни методи (EN, ISO, EPA, ASTM...) – проверени т.е. **валидирани** и препорачани за соодветната намена.

На пр.

EN 14214 is a European Standard that describes the requirements and test methods for FAME - the most common type of biodiesel.

EN590 describes the physical properties that all automotive diesel fuel must meet if it is to be sold in the European Union, Iceland, Norway, Switzerland.

18

3. Избор на аналитичка метода

АНАЛИТИЧКА МЕТОДА = примена на определена техника за определување на даден аналит во дадена матрица

КРИТЕРИУМИ

1. **ТОЧНОСТ** – видовме

2. **ПРЕЦИЗНОСТ** – видовме

3. **ОСЕТЛИВОСТ и/или ГРАНИЦА НА ДЕТЕКЦИЈА** – најмало количество од аналит што може со сигурност да се **детектира (идентификува)** и **ГРАНИЦА НА КВАНТИФИКАЦИЈА** – најмало количество од аналит што може со сигурност да се **квантифицира (измери количество)**

4. **СЕЛЕКТИВНОСТ** – мерка за независноста на мерењето на даден аналит од присуство на можни **интерферентни супстанции**

5. **РОБУСТНОСТ И ОТПОРНОСТ** – можност за примена на различни примероци (матрици), неосетлива на мали промени на експерименталните услови

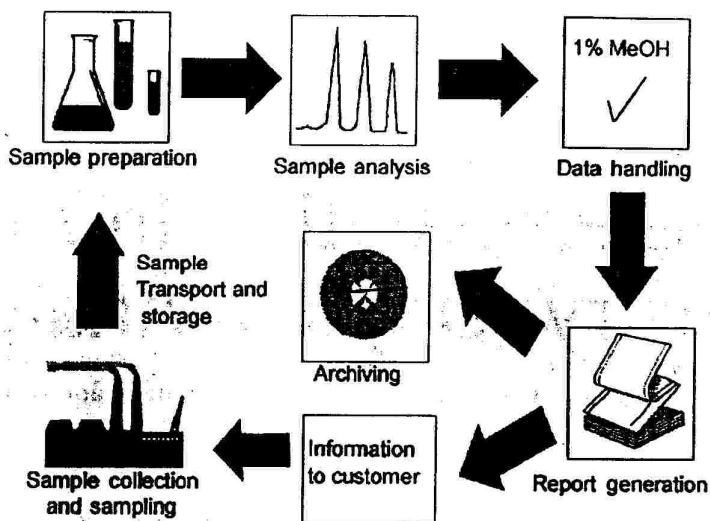
6. **ИНТЕРВАЛ НА ПРИМЕНА** - колкаво количество проба имаме, во кое конц. подрачје е аналитот: **главна** ($>1\%$) или **споредна** ($1\% > w > 0,01\%$) компонента, во **траги** ($0,01\% > w > 10^{-7}\%$) или **ултратраги** ($w < 10^{-7}\%$)

19

УТРЕ ПРОДОЛЖУВАМЕ ...

20

4. Подготовка на проба за анализа



Главни фази во аналитичкиот процес

21

4. Подготовка на проба за анализа

ЗЕМАЊЕ НА ПРОБА

Примарно земање на проба - процес на избор и собирање (земање) на примерокот за анализа.

Цел - намалување на масата или волуменот на објектот на анализа, кој може да биде хомоген или хетероген.

Клучно: земениот примерок за анализа - *статистички репрезентативен* - одраз на целиот објект за анализа (образец од популација).

ТРАНСПОРТИРАЊЕ И СКЛАДИРАЊЕ НА ПРОБАТА

Банална работа!

Не, ако анализираниот систем е динамички, т.е. ако содржи испарливи, нестабилни и/или реактивни супстанции и може да се случат промени во примерокот од земање проба до анализа, и тоа:

- **физички промени** (атсорпција, дифузија, испарување...)
- **хемиски промени** (оксидација, микробиолошко разградување...)

Затоа - конзервирање што може да се изведе со: избор на погоден сад за чување на примерокот, додавање на хемиски стабилизатори (антиоксиданси, антибактериски агенси), замрзнување, атсорпција на погодна цврста фаза...

22

4. Подготовка на проба за анализа

СКЛАДИРАЊЕ - неопходно зачувување на примерокот до анализа

- термолабилни или испарливи проби: во добро затворени садови складирани во фрижидер или замрзнувач
- течни, цврсти проби: на ладно и темно место заштитено од сончева светлина
- ...

СЕКУНДАРНО ЗЕМАЊЕ НА ПРОБА

По пристигнувањето во лабораторија $\Rightarrow$ повторно земање на репрезентативен примерок

Повторно внимание при големи и/или нехомогени примероци за анализа и сл.

23

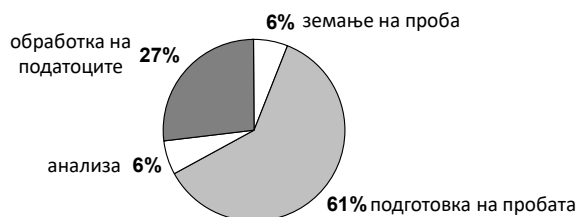
4. Подготовка на проба за анализа

ПОДГОТОВКА НА ПРОБАТА (Sample preparation)

ПОСЛЕДНИОТ ПРОБЛЕМ ВО АНАЛИТИЧКИОТ ПРОЦЕС!
НЕАВТОМАТИЗИРАН ИЛИ СЛАБО АВТОМАТИЗИРАН



ДОЛГОТРАЕН, ДОСАДЕН = ИЗВОР НА ГРЕШКИ!



24

4. Подготовка на проба за анализа

Успешната подготовка на примерокот за анализа е насочена кон доведување на компонентата од интерес:

- **во раствор** (не секогаш, но најчесто мерење на течен примерок)
- **ослободена од интерферентните матрични елементи** (супстанции од примерокот кои пречат при анализа на компонентата од интерес)
- **во концентрација погодна за детекција и мерење**

Главни цели на подготовката на проба:

- **квантитативен принос** - *recovery* ($\approx 99\%$)
- **минимален број на чекори** (покусо времетраење, помалку работа, но не за сметка на помал принос!)

25

4. Подготовка на проба за анализа

ТЕХНИКИ ЗА СЕПАРИРАЊЕ И ПРЕТКОНЦЕНТРИРАЊЕ ПРИ ПОДГОТОВКА НА ПРОБАТА

3 основни пристапи:

- избор на **селективна аналитичка техника** со која може да се измери некое карактеристично својство на аналитот без негова изолација (пр. јон-селективна електрода).
- претворање на аналитот, со употреба на **селективен реагенс**, во друг вид, кој може лесно да се определи во присуство на други супстанции (пр. добивање на обоен комплекс и негово спектрофотометриско определување).
- издвојување - **сепарирање на аналитот од матрицата** со постапка на **изолација или екстракција** - најчесто!

26

4. Подготовка на проба за анализа

Сепарација = одделување на аналитот од матрицата

Највообичаен пристап - двофазен систем каде аналитот и супстанците кои пречат на неговото определување се **распределуваат меѓу две фази**:

- течно-течна екстракција
- течно-цврста адсорпција
- но и **физичко или механичко** одделување на аналитот од матрицата со:
- таложење и филтрирање
- дестилација

Концентрирање - **зголемување на концентрацијата на аналитот присутен во траги** до ниво кое е лесно мерливо
 ⇒ пренесување од фаза со голем волумен во фаза со помал волумен (обично истовремено со други етапи од подготовка на пробата)

Одделувањето и концентрирањето на аналитот може да се изведе со примена на некоја постапка:

еднократно	повеќекратно	континуирано
- екстракција		- хроматографија
- таложење		

27

4. Подготовка на проба за анализа

Подготовка на цврсти и полуцврсти примероци за анализа

Претходно:

• **намалување на размерите на примерокот** (ситнење и хомогенизација) ⇒ подобро секундарно земање проба, полесно растворање и екстракција поради поголем однос површина-волумен

• **сушење** - влагата во примерокот директно влијае на резултатот од анализата - сушење во сушница до константна маса, но не над 100 °C за биолошки проби или проби со испарливи компоненти.

28

4. Подготовка на проба за анализа

Подготовка на цврсти и полуцврсти примероци за анализа

Традиционални екстракциони методи за цврсти проби

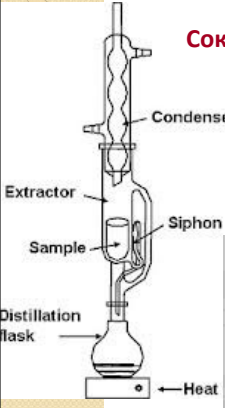
- | | |
|--|---|
| Растворање | - примерокот се третира со растворувач и добиениот раствор понатаму се користи за анализа |
| Цврсто-течна екстракција
<i>shake/filter метод</i> | - иситнет примерок се става во затворен сад со растворувач, кој може да се загрева или рефлуксира; се меша рачно или автоматски; се филтрира, декантира или центрифугира за да се издвои екстрактот од нерастворениот остаток |
| Хомогенизација | - примерокот се става во блендер, се додава растворувач и се хомогенизира; растворувачот се одделува за натамошна обработка. Погодно за растителни и животински ткива, храна и примероци од животната средина. |
| Soxhlet екстракција | - примерокот се става во подвижен порозен сад низ кој постојано минува растворувачот и ги "извлекува" аналитите, кои континуирано се собираат во долниот дел од екстракторот каде што врие растворувачот |
| Третирање со ултразвук | - иситнет примерок со растворувач се потопува во ултразвучна бања и се изложува на дејство на ултразвук (може истовремено и на зголемена температура). |

29

4. Подготовка на проба за анализа

Подготовка на цврсти и полуцврсти примероци за анализа

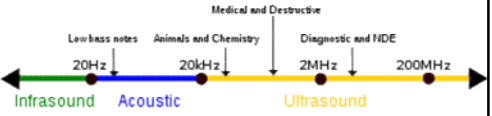
Традиционални екстракциони методи за цврсти проби



Сокслет екстрактор



Ултразвучна бања
20-400 kHz



Frequency spectrum diagram showing the range from 20Hz to 200MHz. Key markers include 20Hz (Low bass notes), 20kHz (Animals and Chemistry), 2MHz (Diagnostic and NDE), and 200MHz (Medical and Destructive). The spectrum is divided into Infrasound, Acoustic, and Ultrasound regions.

http://en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet_extractor

30

4. Подготовка на проба за анализа

Подготовка на цврсти и полуцврсти примероци за анализа

Современи екстракциони методи за цврсти проби

Забрзана (засилена) цврсто-течна екстракција (ASE, ESE)

- примерокот и растворувачот се ставаат во добро затворен сад и се загрева на температура над Т.В. при што се зголемува и притисокот; екстрахираниот примерок автоматски се пренесува во сад за натамошна анализа

Автоматизирана Soxhlet екстракција

- комбинација од извлекување во загреан растворувач и Soxhlet екстракција: пробата во порозниот сад се потопува во растворувачот кој врие и потоа се поставува во Soxhlet екстракторот со рефлукс на растворувачот

Суперкритична флуид екстракција (SFE)

- примерокот се става во проточен сад низ кој се пропушта суперкритичен флуид (најчесто CO₂) под висок притисок; по намалување на притисокот растворувачот се одделува, а екстрахираните компоненти се собираат во погоден растворувач или на атсорбент. Погодно за екстракција на неполярни и слабо поларни аналити.

Екстракција помогната со микробранови (MASE)

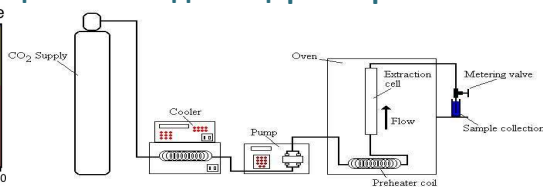
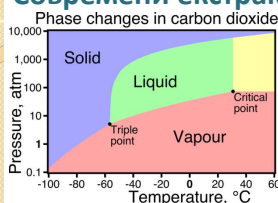
- примерок со растворувач (кој може да апсорбира или да не апсорбира микробранови) се става во отворен или затворен сад и се загрева со енергија на микробранови, што доведува до екстракција на компоненти од пробата.

31

4. Подготовка на проба за анализа

Подготовка на цврсти и полуцврсти примероци за анализа

Современи екстракциони методи за цврсти проби



SFE applications in the food, pharmaceutical, and fine chemical industries:

- Decaffeinating of coffee and tea
- Extraction of essential oils (vegetable and fish oils)
- Extraction of flavors from natural resources (nutraceuticals)
- Extraction of ingredients from spices and red peppers
- Extraction of fat from food products
- Extraction from natural products
- Photo-resist cleaning
- Precision part cleaning

http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_US&cid=10146521

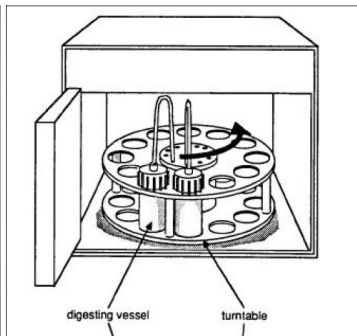
Super Critical Fluid Extraction (SCFE) may

32

4. Подготовка на проба за анализа

Подготовка на цврсти и полуцврсти примероци за анализа

Современи екстракциони методи за цврсти проби



**Екстракција
помогната со
микробранови
(MASE)**

- примерок со растворувач (кој може да апсорбира или да не апсорбира микробранови) се става во отворен или затворен сад и се загрева со енергија на микробранови 500-1000 W, што доведува до екстракција на компоненти од пробата. (Кај нас: лаб за AAC)

33

Table 2.5 Comparison of extraction methods for sample preparation of solids.

Parameter	Sonication	Soxhlet (traditional)	Soxhlet (modern)	SFE	ASE (ESE)	Microwave-Assisted (closed container)	Microwave-Assisted (open container)
Sample size, g	20-50	10-20	10-20	5-10	5-15	2-5	2-10
Solvent volume, ml	100-300	200-500	50-100	10-20*	10-15	30	20-30
Temperature, °C	Ambient-40	40-100	40-100	50-150	50-200	100-200	Ambient
Pressure	Atmospheric	Atmospheric	Atmospheric	2000-4000 psi.	1500-2000 psi	1500-2000 psi	Atmospheric
Time, hr	0.5-1.0	12-24	1-4	0.5-1.0	0.2-0.3	0.2-0.3	0.1-0.2
Degree of automation†	0	0	++	+++	+++	++	++
Number of samples‡	High	1	6	44	24	12	12
Cost‡	Low	Very low	Moderate	High	High	Moderate	Moderate

* When organic modifier is used to effect polarity.

† For the most complete commercial instrument; 0 = no automation, + = some automation, ++ = mostly automated, +++ = fully automated.

‡ Maximum number that can be handled in commercial instruments.

§ Very low = <\$1000, Low = <\$10,000, Moderate = \$10,000-20,000, High = >\$20,000.

34

4. Подготовка на проба за анализа

Подготовка на течни примероци и суспензии за анализа

Аналитот е во **раствор** и често треба да се изведе:

- **сепарирање** (од матричните интерферентни компоненти)
- **концентрирање** (во опсег на техниката на мерење)

Отстранување на суспендирани материи

филтрирање - течен примерок минува низ филтер хартија или мембрански филтер при што се отстрануваат суспендираните материи.

седиментација - примерокот се остава „да слегне“ во сад за седиментација...

центрифугирање - примерокот се става во кивета за центрифугирање и под дејство на центрифугална сила (неколку илјади вртежи во минута) суспендираните материи се одделуваат на дното, а растворот се декантира и анализира.

35

Разредување - примерокот се разредува со погоден растворувач кој е компатибилен на соодветната аналитичка техника која ќе се употреби за мерење и концентрацијата на аналитот се доведува во рамките на линеарниот опсег на соодветниот инструмент.

Течно-течна екстракција
liquid-liquid extraction (LLE) - примерокот се распределува меѓу две немешливи фази (растворувачи), кои се избрани така да разликата во растворливоста на аналитот во нив да е максимална; за мали волумени се користи одделителна инка.

Цврстофазна екстракција
solid-phase extraction (SPE) - течниот примерок минува низ цврста фаза која селективно го задржува аналитот (или матрицата); аналитот се елуира со погоден растворувач.

Испарување
(упарување, отпарување)
evaporation - течнота или растворувачот се отстранува со внимателно загревање при атмосферски притисок со проток на воздух или инертен гас или при намален притисок (вакуум); ротоевапоратори

Дестилација - примерокот се загрева до Т.В. на растворувачот и испарливите аналити се концентрираат во парната фаза, се кондензираат и собираат;
- дестилација со водна пара: вриење со вода или внесување на водна пара и собирање на дестилатот.

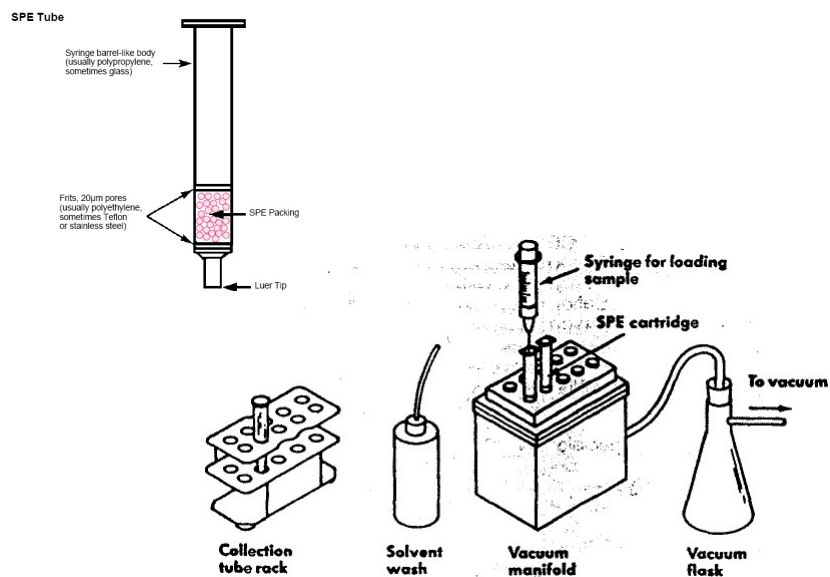
Микродијализа - полупропустлива мембрана се поставува помеѓу две течни водни фази и компонентите од примерокот поминуваат од едната во другата течност поради разлика во концентрацијата.

Леофилизација
freeze-drying - воден примерок се замрзнува и потоа водата се отстранува со намалување на притисокот (вакуум).

36

**Цврстофазна
екстракција
solid-phase
extraction (SPE)**

- течниот примерок минува низ цврста фаза која селективно го задржува анализот (или матрицата); анализот се елуира со погоден растворувач.



37



**Испарување
(упарување,
отпарување)
evaporation**

- течноста или растворувачот се отстранува со внимателно загревање при атмосферски притисок со проток на воздух или инертен гас или при намален притисок (вакуум); ротоевапоратори

**Лиофилизација
freeze-drying**

-воден примерок се замрзнува и потоа водата се отстранува со намалување на притисокот (вакуум) во лиофилизатори. Одлично за сушење и потоа екстракција на различни супстанции од интерес во биолошки материјал, храна итн.

38