

Универзитет Св.Кирил и Методиј
Фармацевтски факултет, Скопје

ИНСТРУМЕНТАЛНИ ФАРМАЦЕВТСКИ АНАЛИЗИ

*Учебник за теоретска настава по предметите
- Инструментални фармацевтски анализи
од студиска програма: магистри по фармација и
- Лабораториски техники и инструментални методи од
студиската програма: лабораториско биоинженерство*

Проф. д-р Анета Димитровска

Проф. д-р Зоран Кавраковски

Проф. д-р Катерина Брезовска

Проф. д-р Јелена Ацевска

Проф. д-р Наталија Наков

Скопје, октомври 2020

Издавач:

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје
Бул. Гоце Делчев бр. 9, 1000 Скопје
www.ukim@ukim.edu.mk

Уредник за издавачка дејност на УКИМ:

проф. д-р Никола Јанкуловски, ректор

Уредник на публикацијата:

проф д-р Анета Димитровска, Фармацевтски факултет, Скопје

Рецезенти:

проф. д-р Сузана Трајковиќ-Јолевска, Фармацевтски факултет, Скопје
проф. д-р Гоше Стефков, Фармацевтски факултет, Скопје
проф. д-р Никола Гешковски, Фармацевтски факултет, Скопје

Техничка обработка:

авторите

Лектура на македонски јазик:

д-р Лилјана Пандева

CIP - Каталогизација во публикација

Национална и универзитетска библиотека "Св. Климент Охридски", Скопје

615.074:543(075.8)

ИНСТРУМЕНТАЛНИ фармацевтски анализи [Електронски извор] : учебник за теоретска настава по предметите - Инструментални фармацевтски анализи од студиска програма: магистри по фармација и - Лабораториски техники и инструментални методи од студиската програма: лабораториско биоинженерство / Анета Димитровска ... [и др.]. - Скопје : Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Фармацевтски факултет, 2021

Начин на пристапување (URL):

http://www.ukim.edu.mk/mk_content.php?meni=53&glavno=41. - Текст во PDF формат, содржи 410 стр., илустр. - Наслов преземен од екранот. - Опис на изворот на ден 22.09.2021. - Други автори: Зоран Кавраковски, Катерина Брезовска, Јелена Ацевска, Наталија Наков. - Библиографија: стр. 401-408

ISBN 978-9989-43-452-5

1. Димитровска, Анета [автор] 2. Кавраковски, Зоран [автор] 3. Брезовска, Катерина [автор] 4. Ацевска, Јелена [автор] 5. Наков, Наталија [автор]
а) Фармација -- Инструментални методи -- Високошколски учебници

COBISS.MK-ID 55015429

ПРЕДГОВОР

Учебникот „Инструментални фармацевтски анализи“ е наменет за студентите по фармација и за студентите од студиската програма Лабораториско биоинженерство за полесно совладување на теоретската настава од областа на инструменталните методи и техники, но може да послужи и како добар материјал на аналитичарите и на лабораторискиот персонал во академската средина и во индустријата.

Сметавме дека за студентите на додипломски и на постдипломски студии, а и за сите други што ќе го користат овој учебник, ќе биде интересно и корисно да се запознаат со принципот на современите инструментални методи и техники од подрачјето на спектроскопијата, на хроматографијата, на електрохемијата и на микроскопијата, со особено внимание на нивната примена за квалитативна и квантитативна анализа во различни полиња од фармацијата. Преку објаснувањето на принципот на работа, апаратурата и деталниот опис на нејзината примена, наша цел беше да понудиме текст што ќе овозможи стекнување на знаење за инструменталните методи и техники, како и за можностите за толкување на добиените резултати со извршените испитувања.

За подготовка на овој учебник користена е современа литература од којашто се преземени слики и примери¹, што се приспособени за потребите на наставната програма на Фармацевтскиот факултет, со цел да се следат најновите случувања во оваа област: континуираното подобрување на инструментите/апаратурата, примената на прецизни аналитички мерења при многу ниски концентрации со различни инструменти и потребното знаење за работа со нив. Поглавјата се дизајнирани не само да му дадат на студентот разбирање за основите на секоја техника, туку и да дадат идеи за тоа како да се примени секоја техника во различни полиња. Учебникот може да се смета за добар воведен материјал од кој потоа може да се оди на повеќе специјализирани книги за различни инструментални методи и техники.

Скопје, септември 2020

Од авторите

¹ Во согласност со *STM Guidelines for Quotation and Other Academic Uses of Excerpts from Journal Articles*.

СОДРЖИНА

1. СТАТИСТИЧКА ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ	1
Грешки во квантитативната анализа.....	1
Дефиниции на некои основни поими во статистиката	1
Нормална распределба.....	2
Стандардна девијација, варијанса и релативна стандардна девијација	5
Стандардна девијација на слепа проба.....	6
Стандардна девијација на аритметичка средина.....	6
Граници на доверливост на аритметичката средина	7
Отфрлување сомнителни резултати.....	8
Q-тест	8
Споредување стандардни девијации (F-тест).....	9
Споредување средни вредности (t –тест).....	9
Регресиска и корелациска анализа	10
Точност и прецизност на резултатите.....	12
Калибрација на инструментални методи	13
Метод на директна калибрација	13
Метод на стандардни додатоци	14
Метод на внатрешен стандард.....	15
2. ОСНОВИ НА СПЕКТРОСКОПСКИТЕ МЕТОДИ.....	17
Својства на електромагнетното зрачење	17
Бранови својства на светлината	17
Квантна природа на светлината	19
Електромагнетен спектар	19
Апсорпција на електромагнетно зрачење	21
Атомска апсорпција.....	22
Молекулска апсорпција	23
Процеси на релаксација	24
Емисија на електромагнетно зрачење.....	25
Емисиски спектри	25
Квантитативни аспекти на спектрохемиските мерења.....	28
Однос меѓу апсорбанцијата и концентрацијата: Ламбер-Беров закон.....	30
Адитивност на Ламберт-Беровиот закон	32
Ограничувања на Ламберт-Беровиот закон	32
3. АТОМСКА СПЕКТРОМЕТРИЈА	35
АТОМСКА АПСОРПЦИСКА СПЕКТРОМЕТРИЈА (AAS).....	35
Апсорпција на енергијата на зрачење од атоми (атомски апсорпциски спектри) .	36
Ширина на спектралните линии	37
Ефект на температурата врз атомските спектри	38
Атомизација на примерокот.....	39
Методи на внесување на примерокот	40
Методи на атомизација на примерокот	41
Пламена атомизација	41
Електротермална атомизација	45
Инструменти за атомска апсорпциска спектрометрија	47

Пламен спектрофотометри.....	51
Интерференции во атомската апсорпциска спектрометрија.....	52
Аналитички техники во атомската апсорпција.....	53
Подготовка на примерокот.....	53
Методи на квантитативно определување.....	54
АТОМСКА ЕМИСИСКА СПЕКТРОМЕТРИЈА (AES).....	55
Емисиска спектрометрија заснована на плазма извори.....	55
Пламена емисиска спектроскопија.....	59
МОЛЕКУЛСКА СПЕКТРОСКОПИЈА.....	61
4. УЛТРАВИОЛЕТОВА И ВИДЛИВА СПЕКТРОМЕТРИЈА.....	61
Апсорпција на зрачење.....	62
Апсорпција на зрачење од молекули што содржат σ , π и n електрони.....	62
Апсорпциски ленти во UV/Vis спектроскопијата.....	66
Хромофори.....	72
Боја и спектар во видливо подрачје.....	73
Апсорпција на неоргански анјони.....	74
Апсорпција при пренос на полнеж.....	74
Квалитативна анализа.....	75
Интерпретација на UV/Vis спектри.....	75
Квантитативна анализа.....	76
UV/Vis спектрофотометри.....	77
Едноканални спектрофотометри со еден зрак.....	79
Повеќеканални спектрофотометри со еден зрак.....	80
Спектрофотометри со два зрака (скенирачки).....	80
Деривативна спектрофотометрија.....	82
5. МОЛЕКУЛСКА ЛУМИНИСЦЕНТНА СПЕКТРОМЕТРИЈА.....	85
Теорија на флуоресценција и на фосфоресценција.....	85
Време потребно за апсорпција и емисија на светлината.....	87
Процеси на релаксација.....	89
Вибрациска релаксација.....	89
Внатрешна претворба.....	89
Надворешна претворба.....	90
Интерсистемски премин.....	90
Фосфоресценција.....	90
Меѓусебен однос помеѓу апсорпциските и флуоресцентните спектри.....	90
Фактори што влијаат на флуоресценцијата и на фосфоресценцијата.....	91
Молекули што флуоресцираат.....	91
Типови на премини во флуоресценцијата.....	91
Флуоресценција и структура.....	92
Влијание на ригидноста на структурата.....	92
Влијание на температурата и растворувачот.....	93
Влијание на pH врз флуоресценцијата.....	93
Влијание на концентрацијата врз интензитетот на флуоресценцијата.....	93
Инструменти за мерење на флуоресценцијата и на фосфоресценцијата.....	94
Примена на флуоресцентните методи.....	96
6. ИНФРАЦРВЕНА И РАМАНСКА СПЕКТРОСКОПИЈА.....	99
Апсорпција на IR зрачење од молекулите.....	100

Ротациски премини	102
Вибрациски/ротациски премини	102
Видови молекулски вибрации	102
Механички модел на истегнувачки вибрации во двоатомски молекул	103
Потенцијална енергија на хармониски осцилатор	104
Вибрациска фреквенција	105
Квантно-механички модел на вибрациите.....	106
Правило на избор.....	107
Нехармониски осцилатор.....	107
Вибрациски модови	108
Инструменти за инфрацрвена спектроскопија.....	111
Извори на зрачење.....	111
Инфрацрвени детектори (трансдуктори).....	113
Видови инструменти за инфрацрвена спектроскопија	115
Инструменти што работат на принцип на Фуриерова трансформација (FTIR)	115
Дисперзивни инструменти	120
ПРИМЕНА НА ИНФРАЦРВЕНАТА СПЕКТРОМЕТРИЈА.....	122
Подготовка на гасовити примероци за анализа.....	122
Подготовка на течни примероци за анализа	123
Подготовка на цврсти примероци за анализа.....	124
Квалитативна анализа.....	125
Фреквенции на функционални групи	126
Интерпретација на инфрацрвени спектри	129
Квантитативна анализа	129
РАМАНСКА СПЕКТРОСКОПИЈА.....	132
Механизам на Раманско и Рејлиевото расејување на зрачењето	133
Инструменти за Раманска спектроскопија.....	135
Примена на раманската спектроскопија.....	137
7. НУКЛЕАРНО-МАГНЕТНА РЕЗОНАНТНА СПЕКТРОСКОПИЈА	139
Магнетни особини на јадрото	140
Дозволен ориентации на спиновите на атомските јадра во магнетно поле и нивна интеракција со радиофреквентното зрачење.....	142
Термална распределба на спиновите во енергетските нивоа	146
Нуклеарна релаксација.....	147
Ширина на спектрална линија	149
Хемиско поместување.....	150
Магнетна анизотропија.....	153
Влијанието на растворувачот на константата на заштита	157
Спин-спин спрегнување.....	158
NMR спектрометар и добивање на NMR спектри	162
Интерпретација на NMR спектрите	165
Идентификација и структурна анализа	165
Квантитативна анализа	167
Примена на NMR спектроскопија	168
Примена на протонска (^1H) NMR спектроскопија.....	168
Примена на јаглерод (^{13}C) NMR спектроскопија.....	169
Примена на NMR спектроскопија на други јадра	170
Дводимензионална FT NMR спектроскопија	170
Томографија со нуклеарно магнетна резонанција	170

8. МАСЕНА СПЕКТРОСКОПИЈА	173
Принцип на масената спектрометрија	173
Молекулски масени спектри	173
Инструменти за масена спектрометрија.....	174
Системи за внесување примерок.....	175
Јонски извори	177
Извор на електронска јонизација	178
Извор на хемиска јонизација.....	180
Јонски извори базирани на принцип на десорпција.....	181
Извори на јонизација во услови на атмосферски притисок	182
Електроспреј јонски извор	182
Извор на хемиска јонизација при атмосферски притисок.....	183
Извор на матрикс олеснета десорпциска јонизација со ласер (MALDI).....	183
Извор на јонизација преку бомбардирање со брзи атоми	185
Извори на јонизација во неорганската масена спектрометрија	186
Извори со електрично празнење и искречки извори.....	187
Извор на индуктивно спрегната плазма (ICP).....	187
Масени анализатори	187
Моќ на разложување и резолуција на масените спектрометри	188
Анализатор со магнетен сектор.....	189
Квадрипол масени анализатори	191
Анализатор време-на-лет.....	193
MS-MS и MS ⁿ инструменти.....	195
Квадрипол јонска замка анализатор.....	196
Циклотрон резонантна јонска замка масени спектрометри на принцип на Фуриерова трансформација (FTICR).....	198
Детектори.....	199
Електронски мултипликатор	199
Фарадеева чаша	200
Подредени мултипли детектори	200
Пишувач	200
Интерпретација на масени спектри	201
Примена на масена спектрометрија	203
9. РЕФРАКТОМЕТРИЈА.....	205
Индекс на рефракција.....	205
Закон за рефракција	206
Фактори што влијаат на индексот на рефракција	207
Физички константи изведени од индексот на рефракција.....	209
Рефлексија на зрачењето	210
Инструменти за мерење на индексот на рефракција - рефрактометри.....	210
Видови рефрактометри	213
Примена на рефрактометријата	216
10. ПОЛАРИМЕТРИЈА	219
Поларизација на светлината	219
Оптички активни супстанции	221
Оптичка ротација.....	222
Фактори што влијаат на специфичната ротација	223
Полариметри	225
Примена на полариметријата	227

11. ОСНОВИ НА ОПТИЧКА И НА ЕЛЕКТРОНСКА МИКРОСКОПИЈА.....	229
Оптичка микроскопија	232
Стереомикроскоп.....	236
Фазно-контрастна микроскопија и микроскопија на темно поле	237
Поларизациска микроскопија.....	240
Флуоресцентна микроскопија	241
Конфокална ласерска скенирачка микроскопија	242
Електронска микроскопија.....	244
Напредни методи за супер резолутивно отсликување	246
12. ЕЛЕКТРОАНАЛИТИЧКИ МЕТОДИ	249
Електрохемиска ќелија	250
Потенцијал на електроаналитичка ќелија	252
Стандардна водородна електрода	252
Мерење на електродниот потенцијал	257
Струја во електрохемиската ќелија.....	257
Поларизација	257
ПОТЕНЦИОМЕТРИСКИ МЕТОДИ	259
Инструменти за мерење потенцијал на ќелија	259
Референтни електроди	260
Индикаторски електроди	261
Молекулско-селективни електродни системи	269
Директни потенциометриски мерења.....	269
Потенциометриски титрации	271
КУЛОМЕТРИЈА.....	273
Електрогравиметриски методи на анализа.....	273
Електрогравиметрија без контрола на потенцијалот на работната електрода ...	273
Електрогравиметрија при константен потенцијал на катодата	274
Кулометриски методи на анализа	275
Типови на кулометриски методи.....	275
Потенциостатска кулометрија.....	276
Кулометриски титрации (Амперостатска кулометрија)	277
ВОЛТАМЕТРИЈА	278
Инструменти за волтаметрија	280
Хидродинамички волтаметриски методи	283
Полагаграфија.....	284
13. ОСНОВИ НА ХРОМАТОГРАФИЈАТА	287
Дефиниции за хроматографија	288
Класификација на хроматографските методи.....	288
Хроматографија на колона со елуирање	290
Разредување на анализот.....	291
Хроматограми.....	292
Брзина на патување на растворените супстанции	293
Константа на дистрибуција.....	293
Време на ретенција	293
Врска помеѓу времето на ретенција и константата на дистрибуција	294
Брзина на патување на растворената супстанција, фактор на ретенција.....	295
Релативна брзина на патување, фактор на селективност	295
Ширење на зоните и ефикасност на колоната	296

Облик на хроматографските пикови.....	296
Методи за опишување на ефикасноста на колоната	297
Дефиниција за висина на под	297
Експериментално определување на H и N.....	298
Кинетички променливи што влијаат на ширењето на зоните.....	299
Влијание на брзината на протокот на мобилната фаза.....	300
Зависност помеѓу висината на подот и променливите вредности на колоната ...	300
Оптимизирање на перформансите на колона	305
Резолуција на колоната	305
Влијание на факторот на ретенција и селективноста врз резолуцијата.....	306
Влијание на резолуцијата врз времето на ретенција	306
Променливи што влијаат врз перформансите на колоната	307
Промена на бројот на подови.....	307
Промена на висината на подот	308
Промена на факторот на ретенција.....	308
Промена на факторот на селективност.....	309
Општ проблем со елуирањето во хроматографијата.....	310
Збир на важни равенки за хроматографија	311
Примена на хроматографијата	313
Квалитативна анализа – идентификација на аналити.....	313
Квантитативна анализа.....	314
Квантитативно определување преку висина на пикот	314
Квантитативно определување преку површина на пикот.....	314
Метод на баждарен дијаграм	315
Метод на внатрешен стандард.....	315
Метод на нормализација.....	315
14. ТЕНКОСЛОЈНА ХРОМАТОГРАФИЈА	317
Разделување со примена на тенкослојна хроматографија	317
Плочи за тенкослојна хроматографија	317
Стационарна фаза во TLC	318
Мобилна фаза во TLC.....	319
Нанесување (апликација) на примерок	319
Развивање хроматографска плоча	321
Сушење на развиениот хроматограм.....	322
Методи за детекција	323
1.Физички методи.....	323
2.Хемиски методи	324
3.Биолошки методи.....	326
Параметри за перформансите во тенкослојна хроматографија	327
Фактор на задржување	327
Фактор на ретенција.....	328
Висина на теоретски под	328
Примена на тенкослојна хроматографија	329
Квалитативна анализа	329
Полуквантитативна анализа.....	330
Дводимензионална планарна хроматографија.....	331
Квантитативна анализа.....	331
15. ВИСОКОПЕРФОРМАНСНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЈА	333
Ефикасност на колоната во течна хроматографија	334

Инструменти за течна хроматографија	334
Резервоари за мобилна фаза и системи за растворувачи	334
Системи за пумпање	336
Контрола на протокот и програмирачки системи	337
Системи за инјектирање примерок	337
Колони за течна хроматографија	338
Аналитички колони	338
Претколони	338
Термостат на колоната	339
Типови на материјал за пакување на колоните	339
Детектори	339
Детектори базирани на апсорбација	340
UV детектори со филтри	341
UV детектори со можност за скенирање	341
IR детектори	342
Детектори базирани на флуоресценција	342
Детектори базирани на индекс на рефракција	343
Испарувачки детектор со принцип на расејување на светлината (<i>Evaporative light scattering detector, ELSD</i>)	343
Електрохемиски детектор	344
Детектори базирани на масена спектрофотометрија	344
Партициска хроматографија	344
Колони за хроматографија на врзана фаза	345
Пакувања со нормално-фазна и реверзно-фазна стационарна фаза	345
Развој на метод во партициската хроматографија	347
Избор на колона во партициската хроматографија	347
Избор на мобилна фаза во партициската хроматографија	348
Влијание на јачината на растворувачот на факторот на ретенција	348
Влијание на мобилната фаза на селективноста	349
Примена на партициската хроматографија	349
Хроматографија на јонски парови	350
Хроматографија на хирална стационарна фаза	350
Атсорпциска хроматографија	350
Избор на растворувач за атсорпциска хроматографија	351
Јачина на растворувачот	351
Избор на систем од растворувачи	351
Примена на атсорпциската хроматографија	351
Јоноизменувачка хроматографија	352
Гел-хроматографија (<i>Size-exclusion chromatography</i>)	352
16. ГАСНА ХРОМАТОГРАФИЈА	353
Принцип на гасно-течна хроматографија	353
Волумени на ретенција.....	353
Однос помеѓу V_g и K	355
Ефект на брзина на проток на мобилна фаза.....	355
Инструменти за гасно-течна хроматографија	355
Снабдување со носечки гас	355
Систем за инјектирање на примерокот	356
Конфигурација на колони и колонски печки	357
Детекторски системи.....	358
Пламен-јонизациски детектор (FID)	359

Детектор што работи на принцип на мерење на топлотна проводливост (TCD).....	360
Сулфур хемилуминисцентен детектор (SCD)	361
Електрон-врзувачки детектор (ECD)	361
Атомски емисионски детектор (AED).....	362
Термијонски детектор (TID)	363
Други типови на детектори.....	363
Колони и стационарни фази за гасна хроматографија	364
Отворени цевчести колони	364
Пакувани колони	365
Атсорпција на пакувањето или на капиларните сидови	366
Стационарна фаза	367
Примена на гасно-течна хроматографија	369
Квалитативна анализа	369
Квантитативна анализа.....	371
Гасно-цврста хроматографија	372
Колони за гасно-цврста хроматографија	372

17. КАПИЛАРНА ЕЛЕКТРОФОРЕЗА И КАПИЛАРНА

ЕЛЕКТРОХРОМАТОГРАФИЈА	373
Принцип на електрофорезата	373
Начини на изведување на електрофорезата.....	374
Теорија на електрофоретските разделувања.....	374
Капиларна електрофореза	375
Брзина на патување во капиларната електрофореза.....	375
Фактори што влијаат на ефикасноста	375
Висина на подовите во капиларната електрофореза	376
Дијаметар на капилара	377
Резолуција	377
Електроосмотски проток	377
Инструменти за капиларна електрофореза.....	380
Модови на капиларна електрофореза	385
Зонска капиларна електрофореза	385
Капиларна гел-електрофореза.....	387
Капиларна изотахофореза	387
Капиларно изоелектрично фокусирање.....	388
Капиларна електрохроматографија	390
Електрохроматографија на пакувана колона	390
Мицеларна електрокинетичка капиларна хроматографија.....	391

Листа на слики и табели	393
--------------------------------------	------------

Литература	401
-------------------------	------------

Користена литература за сликите	403
--	------------

Авторски права	407
-----------------------------	------------

СТАТИСТИЧКА ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Грешки во квантитативната анализа

Кога се врши мерење на некоја величина, независно од тоа дали се користат едноставни постапки или современи инструментални методи, колку и да се внимава, мерењето никогаш не е идеално точно. Причина за таа појава се бројните фактори што влијаат врз мерењето. Така, мерењето, всушност, претставува постапка со која се утврдува колку одредена вредност отстапува од вистинската вредност на мерената величина.

Отстапувањето на измерената вредност од вистинската се нарекува **грешка во мерењето**. Во пракса се стремиме што повеќе да се приближиме до вистинската вредност, да ги избегнуваме грешките и да ја определиме сигурноста (точноста и исправноста) на добиените резултати.

Според карактерот, грешките во квантитативната анализа може да се поделат во две групи: определени или **систематски** грешки и неопределени или **случајни** грешки.

Систематски грешки се грешки чијашто појава може да се предвиди, а нивната вредност може да се измери и да се земе предвид со воведување соодветни корекции.

Систематските грешки може да бидат предизвикани од: *апаратурата и реагенсите* (контаминирани и недоволно чисти реагенси, слаба прецизност, лошо калибрирање, грешки при употребата на инструментите, грешки при отчитување на вредностите), *лични грешки на аналитичарот* (неискуство при мерењето, брзоплетост при мерењето, грешки при запишување на резултатите и грешки при пресметка на резултатите), *грешки на методот* (недоволна квантитативност на реакцијата, појава на индуктивни или споредни реакции, градење нестабилни соединенија, испарливост на супстанциите, губиток на аналитот при подготовка на примерокот со испарување или таложење и сл.).

Карактеристика на овие грешки е тоа што тие најчесто имаат **одреден (ист) правец** при повторување на мерењето (тие се постојано или само поголеми или само помали).

И по откривањето и по отстранувањето на систематските грешки во некоја аналитичка процедура, таа сè уште е подложна на т.н. случајни или неопределени грешки. **Случајни** грешки се грешки чишто причини за појавување не се точно познати, се јавуваат случајно (со подеднаква можност да бидат позитивни или негативни), не можат да се исклучат со воведување корекција, обично се мали и предизвикуваат меѓусебно отстапување на резултатите добиени од паралелни определувања. Тие се обработуваат статистички.

Дефиниции на некои основни поими во статистиката

Аритметичка средна вредност (\bar{x}) претставува нумеричка вредност што се добива кога збирот од сите измерени вредности на иста мерена величина ќе се подели со бројот на мерења, n .

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (1.1)$$

\bar{x} е пресметана средна вредност од сите резултати на мерењата (позната како средна вредност на примерок)

$$\mu = \lim_{n \rightarrow \infty} \bar{x} \quad (1.2)$$

μ е вистинска вредност на аритметичката средина, добиена од бесконечно голем број мерења (позната како популациона средна вредност)

Како вредност за μ се зема:

- позната вредност (зададена вредност на стандардот)
- однапред зададена вредност
- вредност одредена со посебно точен метод
- вредност определена од многу голем број анализи ($n > 100$)

Апсолутната грешка претставува разлика помеѓу добиената вредност и вистинската вредност ($x_i - \mu$) и се изразува во исти единици како и величината што се пресметува:

$$A = x_i - \mu \quad (1.3)$$

Релативната грешка е безимен број и најчесто се изразува во проценти.

$$\frac{x_i - \mu}{\mu} \times 100\% \quad (1.4)$$

Имајќи предвид дека никогаш не можеме да ја определиме вистинската вредност на мерењата, останува оваа величина да ја процениме врз основа на многубројни повторени мерења. Отстапувањето на поединечните резултати од аритметичката средина се нарекува **апсолутна вредност** (или апсолутно отстапување):

$$\Delta x = x_i - \bar{x} \quad (1.5)$$

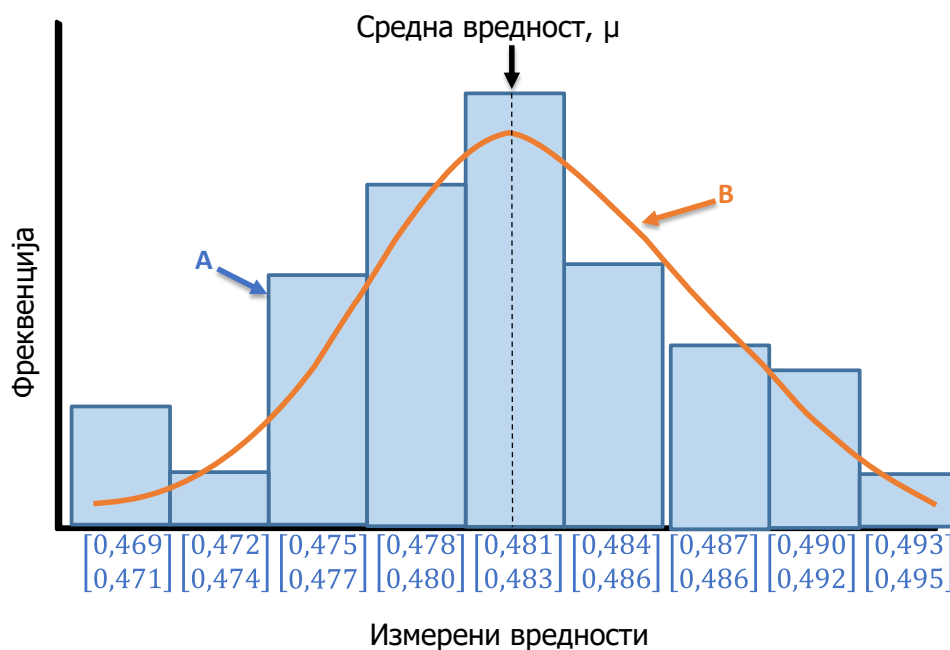
каде што \bar{x} е средната вредност на мерењата.

Релативната вредност (или релативно отстапување) на поединечниот резултат на определување од средната вредност се пресметува со формулата:

$$G = \frac{x_i - \bar{x}}{\bar{x}} \times 100 \quad (1.6)$$

Нормална распределба

Во случај кога се вршат поголем број мерења на одредено својство (величина) во една популација и кога добиените резултати се прикажуваат графички во однос на нивната зачестеност (фреквенција на јавување при мерењето), се добива крива што ја следи нормалната (природна) распределба, позната како Гаусова крива (**Gauss**) на распределба. Графичкиот приказ на поединечните резултати од мерењата и нивната фреквенција на јавување (мерењето се повторува голем број пати, а добиените резултати се групираат во групи со блиски вредности) се нарекува **хистограм**. Бројот на мерења во секоја група (фреквенциите) се нанесува на ординатата (y-оска), а измерените вредности на групите на апцисата (x-оска). На Слика 1.1 е прикажан хистограм, на кој се претставени 50 резултати, односно вредности за апсорбанција добиени од примероци што содржат 10 ppm Fe³⁺ јони и вишок на тиоцианатен јон. Добиените резултати за вредноста на апсорпцијата се дадени во Табела 1.1.



Слика 1.1 Хистограм (ја прикажува дистрибуцијата на 50 резултати прикажани во Табела 1.1)

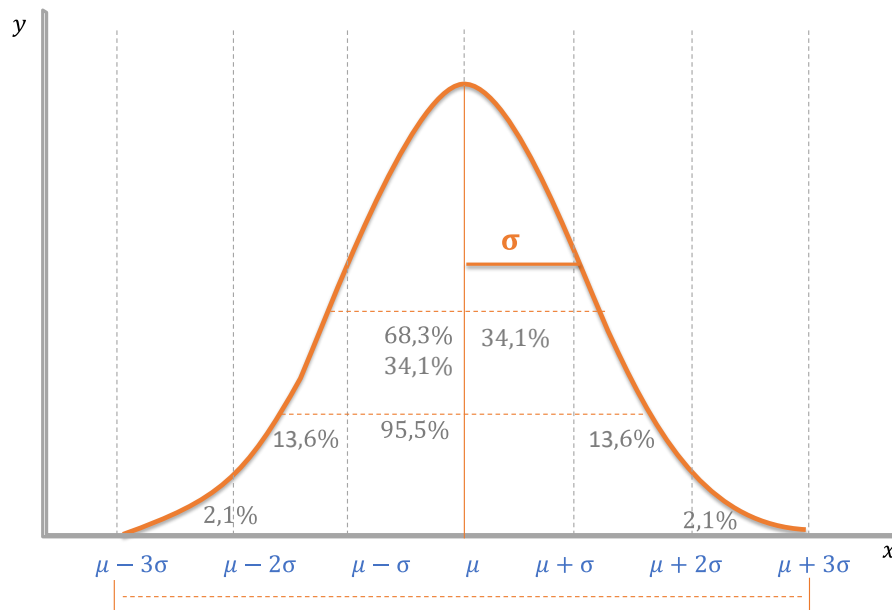
Табела 1.1 Измерени вредности за апсорпција од примероци што содржат Fe^{3+} јони

Мерење	Апсорпција	Мерење	Апсорпција	Мерење	Апсорпција
1	0,488	18	0,475	35	0,476
2	0,480	19	0,480	36	0,490
3	0,486	20	0,494	37	0,488
4	0,473	21	0,492	38	0,471
5	0,475	22	0,484	39	0,486
6	0,48	23	0,481	40	0,478
7	0,486	24	0,487	41	0,486
8	0,482	25	0,478	42	0,482
9	0,481	26	0,483	43	0,477
10	0,490	27	0,482	44	0,477
11	0,480	28	0,491	45	0,486
12	0,489	29	0,481	46	0,478
13	0,478	30	0,469	47	0,483
14	0,471	31	0,485	48	0,480
15	0,482	32	0,477	49	0,483
16	0,483	33	0,476	50	0,479
17	0,488	34	0,483		

Средна вредност=0,482

Стандардна девијација=0,0056

Ако бројот на мерења биде бесконечен, а резултатите се редат во бесконечно тесни (по вредност x) групи, се добива кривата на **Гаусовата** распределба (крива на нормална распределба) (Слика 1.2).



Слика 1.2 Гаусова распределба (крива на нормална распределба)

Основни својства на кривата на нормалната распределба се:

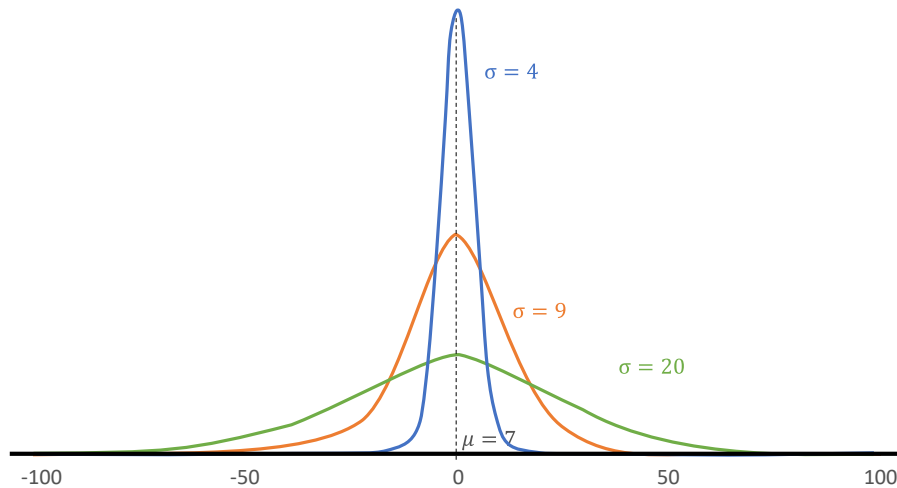
- а) средината на кривата се наоѓа во средишната точка со најголема фреквенција (максимум);
- б) постои симетрична распределба на позитивните и на негативните отстапувања околу максимумот и
- в) фреквенцијата на точките што лежат на кривата експоненцијално се намалува со зголемување на отстапувањето од максимумот.

Површината ограничена со Гаусовата крива и x -оската претставува 100 % од добиените резултати. Математички може да се покаже дека:

- **68,3 %** од сите резултати ќе се најдат во интервалот $\mu \pm 1\sigma$
- **95,5 %** од сите резултати ќе се најдат во интервалот $\mu \pm 2\sigma$
- **99,7 %** од сите резултати ќе се најдат во интервалот $\mu \pm 3\sigma$

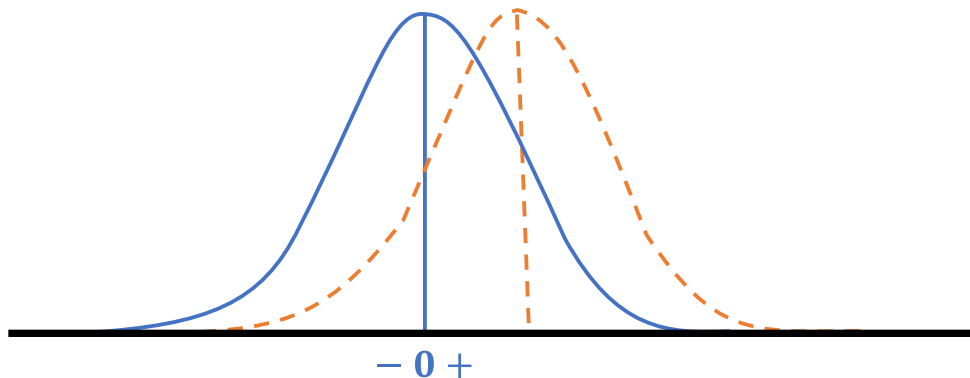
Со други зборови, ако постои нормална распределба со доверливост од 68,3% можеме да тврдиме дека измерениот резултат нема да биде надвор од интервалот на \pm една стандардна девијација (σ); постои 95,5% доверливост дека измерениот резултат ќе се најде во интервалот на \pm две стандардни девијации (2σ), односно речиси е сигурно (поточно 99,7% веројатно) дека резултатот ќе се најде во интервалот на \pm три стандардни девијации (3σ) од аритметичката средина (Слика 1.3).

Вистинската вредност на аритметичката средина ја определува положбата на Гаусовата крива (по должината на апцисата). Од друга страна, вредноста на стандардната девијација го определува обликот на кривата (дали таа ќе биде потесна и повисока или поширока и пониска). При **прецизно** изведени мерења, σ ќе биде помала, а кривата **потесна и повисока**.



Слика 1.3 Крива на нормална распределба со различни стандардни девијации

Кривата добиена од бесконечно големиот број мерења е симетрична околу аритметичката средина (аритметичката средина, \bar{x} е еднаква со вистинската вредност на аритметичката средина, μ). Ако добиените резултати носат во себе одредена грешка, кривата на нормална распределба не го менува обликот, туку се поместува за одреден износ по должината на апцисната оска налево или надесно (средната вредност е различна од вистинската вредност) (Слика 1.4.). Кривата има две точки на инфлексија. Оддалеченоста на секоја од овие точки од средната вредност μ е еднаква на стандардната девијација, σ .



Слика 1.4 Отстапување од вистинската вредност

Стандардна девијација, варијанса и релативна стандардна девијација

Кога измерените вредности се блиски меѓусебно и малку отстапуваат од нивната средна вредност, тогаш велиме дека мерењето е **прецизно**. Мерка за прецизноста на мерените вредности е стандардната девијација. Колку е помал бројот на мерења толку е поголемо отстапувањето од нормалната распределба. Бидејќи во пракса обично се изведуваат мал број мерења оваа појава е редовен случај и пресметаната стандардна девијација се однесува на стандардната девијација на примерок што се означува со S и се пресметува според равенката:

$$S^2 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1} \text{ односно } S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (1.7)$$

каде што $n - 1$ е број на степени на слобода, dF (n е број на мерења).

Степените на слобода се дефинираат како број на **независни споредувања** што може да се извршат помеѓу поделни членови на низот и средната вредност. Кога бројот на мерењата е голем, во равенката за стандардна девијација, бројот на степени на слобода се заменува со n , а S со σ (стандардна девијација на популација). Со зголемување на бројот на извршени мерења, вредноста на S се доближува до вредноста на σ ($S \rightarrow \sigma$, $\bar{x} \rightarrow \mu$), а кога бројот е поголем од 25-30, пресметаната S е многу добра апроксимација за σ . Единиците на стандардната девијација се исти како и кај мерената величина.

Квадратот од стандардната девијација S^2 се нарекува **варијанса**. Таа е воведена во статистичката теорија како израз за процена на прецизноста.

Од изнесеното се гледа дека стандардната девијација е апсолутна мерка на дисперзија на добиените резултати околу средната вредност и не е погодна за споредување на дисперзијата на две групи на резултати со различни аритметички средини (што имаат различни димензии). Затоа во праксата за такви споредувања се користи **релативна стандардната девијација**, што најчесто се изразува во проценти (%).

$$RSD = \frac{S}{\bar{x}} \quad \text{односно} \quad RSD (\%) = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 \quad (1.8)$$

Стандардна девијација на слепа проба

Во случаите кога во квантитативната анализа се користи слепа проба, треба да се одреди т.н. реална стандардна девијација S_c , во која се вклучени стандардните девијации на испитуваната проба, S_a и на слепата проба, S_b .

$$C = A - B$$

A - количина на нечистотија во пробата

B - количина на нечистотија во слепата проба

C - вистинска количина на нечистотија во пробата

$$S_c = \sqrt{S_a^2 + S_b^2} \quad (1.9)$$

S_c е вкупната стандардна девијација за количината на нечистотијата во пробата. Ако девијацијата на пробата е многу поголема од девијацијата на слепата проба ($S_a^2 \gg S_b^2$), тогаш влијанието на слепата проба врз прецизноста на определувањето е незначително.

Стандардна девијација на аритметичката средина

За низа од примероци (што им припаѓаат на иста популација), од којашто секој примерок содржи n случајно земени податоци од популацијата, аритметичката средина се помалку и помалку ќе отстапува од вистинската вредност на аритметичката средина μ како n се зголемува. Стандардната девијација на секоја аритметичка средина (од вистинската вредност) на примероците е позната како **стандардна грешка** и се означува како $S_{\bar{x}}$.

Стандардната девијација ја карактеризира прецизноста на поделните мерења во серијата. Меѓутоа прецизноста на аритметичката средина е поголема, бидејќи во неа делумно се компензирани случајните грешки со спротивна насока. Стандардната грешка на аритметичката средина е \sqrt{n} - пати помала од стандардната девијација на поединечното мерење:

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (1.10)$$

$S_{\bar{x}}$ се користи за процена на граничниот интервал на доверливоста на некој метод.

Граници на доверливост на аритметичката средина

Вистинската вредност μ за една популација на податоци не може никогаш точно да се одреди, бидејќи за нејзино одредување е потребно да се извршат бесконечен број мерења. Меѓутоа, со помош на статистиката може да се постават граници околу експериментално добиената аритметичка средина \bar{x} , во коишто се очекува да се најде вистинската вредност на аритметичката средина μ со даден степен на веројатност. Границите добиени на тој начин се нарекуваат **граници на доверливост**, а интервалот што го ограничуваат е познат како интервал на доверливост.

Честопати сме соочени со ограничено време и со ограничена големина на примерок, што не ни дозволуваат точно да ја одредиме вредноста за стандардната девијација на популацијата σ . Тогаш, обично, една група истородни вредности мора да ја даде не само аритметичката средина, туку и мерката за прецизност (девијацијата). Пресметувањето на S од мала група податоци може да биде доста несигурно. Затоа границите на доверливост нужно се пошироки, ако не е позната вредноста за σ . За да се објасни променливоста на S , се користи статистичкиот параметар t , што се дефинира како отстапување на вредностите од аритметичката средина изразено во единици стандардни девијации, односно:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{S} \quad (1.11)$$

На пример, кога отстапувањето на поединечната вредност од аритметичката средина $(x - \mu)$ е бројно еднаква на стандардната девијација S , вредноста на t изнесува 1 (што значи дека таа вредност отстапува 1 стандардна девијација од аритметичката средина). Параметарот t се нарекува **Студентов коефициент**, што го зема предвид ограничениот број мерења (т.е. можното отстапување на \bar{x} од μ , како и користење на S наместо σ). Вредноста за t се отчитува од табела за соодветно ниво на веројатност (P') и за соодветен број степени на слобода dF (Табела 1.2).

Табела 1.2 Вредности на Студентовиот коефициент t

Број на степени на слобода (dF)	Вредност на t за избрана веројатност			Број на степени на слобода (dF)	Вредност на t за избрана веројатност		
	90 %	95 %	99 %		90 %	95 %	99 %
1	6,314	12,706	63,657	11	1,796	2,201	3,106
2	2,920	4,303	9,925	12	1,782	2,179	3,055
3	2,353	3,182	5,841	13	1,771	2,160	3,012
4	2,132	2,776	4,604	14	1,761	2,145	2,977
5	2,015	2,571	4,032	16	1,746	2,120	2,921
6	1,943	2,447	3,707	18	1,734	2,101	2,878
7	1,895	2,365	3,499	20	1,725	2,086	2,845
8	1,860	2,306	3,355	25	1,708	2,060	2,787
9	1,833	2,262	3,250	30	1,697	2,042	2,750
10	1,812	2,228	3,169	∞	1,645	2,000	2,576

Користејќи ја табеларната вредност за t за n истородни мерења ($n-1$, број на степени на слобода) и определено ниво на веројатност P' ($P'=0,05$ за 95% веројатност, $P'=0,01$ за 99% веројатност и сл.), границите на доверливост за средната вредност \bar{x} може да се пресметаат користејќи ја равенката:

$$\bar{x} \pm \frac{t \times S}{\sqrt{n}} \quad (1.12)$$

Со други зборови, вистинската вредност на аритметичката средина, за одредено ниво на веројатност, ќе се најде во интервалот:

$$\bar{x} - \frac{t \times S}{\sqrt{n}} \leq \mu \leq \bar{x} + \frac{t \times S}{\sqrt{n}} \quad (1.13)$$

Пример:

$n = 21$; $\bar{x} = 10,55$ mg; $S = 0,256$; $P' = 0,05$

$P' = 0,05$ $t_{0,05} = 2,086$ $df = 20$

Граници на доверливост = $10,55 \pm 0,117$

Интервал на доверливост = $10,433 - 10,667$

Веројатноста е помала од 5% ($P'=0,05$) дека вистинската аритметичка средина ќе биде помала од 10,433, односно поголема од 10,667.

Отфрлување сомнителни резултати

Кога група резултати (измерени вредности) содржи резултат чија вредност многу се разликува од просечната вредност, тогаш треба да одлучиме дали тој резултат треба да го задржиме или да го отфрлиме. Во случај кога некој резултат значајно отстапува од останатите заради **груба (систематска) грешка** тогаш тој се **отфрла**. Но ако не се знае причината за отстапување на ваквиот резултат, потребно е да се биде многу критичен во процената дали да се отфрли или не (особено кога има мал број мерења, влијанието на овој резултат врз средната вредност е големо).

Постојат неколку статистички постапки (меѓу кои е и Q - тестот) со коишто се одредува критериумот за отфрлање или за задржување на сомнителните резултати. Овие тестови подразбираат дека распределбата на резултатите во популацијата е нормална, т.е. Гаусова. За жал, овој услов не може да се докаже за примероци што имаат помалку од 50 резултати. Оттука следува дека статистичките правила што со голема сигурност се користат при нормална распределба на резултатите, треба да се користат со крајно големо внимание кога се применуваат на примероци што содржат само неколку резултати.

Q-тест

За мал број мерења ($n = 3-8$) се применува **Q-тестот** како еден од најсигурните критериуми и претставува едноставен статистички тест што често се употребува. Апсолутната вредност на разликата меѓу сомнителната вредност и до неа најблиската вредност, поделена со распонот (разликата меѓу најголемата вредност и најмалата вредност од мерењето) на целата група вредности ја дава експерименталната вредност за Q , т.е. $Q_{\text{експериментално}}$.

$$Q_{\text{експериментално}} = \frac{|\text{сомнителна вредност} - \text{до неа најблиска вредност}|}{|\text{најголема вредност} - \text{најмала вредност}|}$$

Добиената Q вредност ($Q_{\text{експериментално}}$) се споредува со Q вредноста дадена во табела ($Q_{\text{табела}}$) (Табела 1.3.), за даден степен на веројатност и даден број мерења. Ако $Q_{\text{експериментално}} > Q_{\text{табеларно}}$ тогаш резултатот се отфрла.

Табела 1.3 Вредности на коефициентот Q

Број на мерења	Вредност на Q за избрана веројатност		
	90% веројатност	95% веројатност	99% веројатност
3	0,941	0,970	0,994
4	0,765	0,829	0,926
5	0,642	0,710	0,821
6	0,560	0,625	0,740
7	0,507	0,568	0,680
8	0,468	0,526	0,634
9	0,437	0,493	0,598
10	0,412	0,466	0,568

Споредување стандардни девијации (F-тест)

F -тестот се применува за утврдување на постоењето значителна **разлика во прецизноста помеѓу две низи на резултати** добиени, на пример, со примена на два различни методи или од два експериментатора. Тестот се заснова на споредување на варијансите на двете низи на резултати:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (1.14)$$

Притоа, варијансата на групата од резултати што има поголема вредност S_1^2 (резултатите се помалку прецизни) секогаш се става во броителот, а варијансата на другата група резултати, што е помала (резултатите се попрецизни) се става во именителот на дропката во равенката за F . Пресметаната вредност на F се споредува со вредноста за F дадена во табела (Табела 1.4), за одредено ниво на веројатност и за даден број степени на слобода, за двете низи на резултати. Ако $F_{\text{експериментално}} > F_{\text{табеларно}}$, постои значителна разлика во прецизноста помеѓу двете низи на резултати.

Табела 1.4 Вредности за F за 95% веројатност ($P' = 0,05$)

Степени на слобода (именител)	Степени на слобода (броител)							
	2	3	4	5	6	12	20	∞
2	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,41	19,45	19,50
3	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,74	8,66	8,53
4	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	5,91	5,80	5,63
5	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,68	4,56	4,36
6	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,00	3,87	3,67
12	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,69	2,54	2,30
20	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,28	2,12	1,84
∞	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	1,75	1,57	1,00

Споредување средни вредности (t - тест)

Студентовата t -распределба се применува за примероци со ограничен (мал) број резултати (до 50). **t -распределбата** е зависна само од бројот на резултати и претставува **основа** на сите тестови за **споредување две средни вредности** добиени од мал број мерења. Бидејќи пресметките се вршат на мали примероци, σ се заменува со S , а μ со \bar{x} . Ако постои значајна разлика помеѓу стандардните девијации на двете групи податоци (F -тест), средните вредности не можат да се споредуваат.

Студентовиот t - тест се применува за да се провери со колкава веројатност разликата помеѓу две средни вредности \bar{x}_1 и \bar{x}_2 од две низи на резултати е статистички значајна или е предзвикана од случајна грешка.

Пример: споредување две групи резултати:

- добиени со различни аналитички методи, за одредена проба;
- добиени од разни експериментатори;
- добиени во разни лаборатории.

а) споредување две групи на примероци со ист број на резултати, $n_1 = n_2 = n$

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\frac{s_1^2 + s_2^2}{n-1}}; dF = 2n - 2; t_{2n-2}, \text{ се чита од табела} \quad (1.15)$$

б) споредување две групи на примероци со различен број на резултати, $n_1 \neq n_2$

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2 n_1 + s_2^2 n_2}{n_1 + n_2 - 2} \times \frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}}; dF = n_1 + n_2 - 2; t_{n_1 + n_2 - 2}, \text{ се чита од табела} \quad (1.16)$$

в) споредување на средната вредност на една група резултати за одреден примерок со вистинската вредност (μ) за тој примерок – определување на точноста на методот, на пример, со користење стандарден раствор од примерокот.

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}}; dF = n - 1; t_{n-1}, \text{ се чита од табела} \quad (1.17)$$

Ако $t_{\text{експериментално}} < t_{\text{табеларно}}$ тогаш не постои статистички значајна разлика помеѓу средните вредности на двете групи на резултати, а за случај с) разликата помеѓу \bar{x} и μ не е значајна т.е. методот е точен.

Регресиска и корелациска анализа

Регресиската и корелациската анализа се статистички методи што ја утврдуваат врската помеѓу две или повеќе статистички променливи. Регресиската анализа најчесто опфаќа две променливи и зборува во каков однос стои едната променлива во однос на другата (за повеќе променливи - мултиплина регресија).

Регресиската анализа се изведува со примена на **регресиската равенка**:

$$y_x = a + bx \quad (1.18)$$

y е **непозната** променлива што се пресметува на основа на вредностите на **познатата** променлива **x**. Регресиската равенка е равенка на права, што значи дека зависноста помеѓу двете променливи е **праволиниска**.

Константата **a** претставува точка во која регресиската линија (права) ја сече y-оската (y-intercept или y-отсечка) и **укажува на постоење систематски грешки** во тек на работата е (вредност на y, за x = 0).

Константата **b** е еднаква на тангенс од аголот на регресиската права со апцисата (x-оската), го определува наклонот на регресиската линија и **укажува на сложувањето помеѓу y и x**.

Податоците што меѓу себе се праволиниски (линеарно) зависни, т.е. покажуваат одредена корелација, можеме да ги претставиме графички, во координатен систем. Меѓутоа ретки се случаите во праксата кога корелацијата меѓу двете променливи (x и y) е толку висока (освен кај математичките закони), што кога ќе се нанесат вредностите за x и y во координатен систем се добие нивно

целосно сложување на регресиската права. Обично измерените вредности за величините што се нанесуваат на x и y оската не покажуваат идеално согласување на една иста права. Тогаш како би ја нацртале регресиската права што најточно ќе ја прикаже корелацијата меѓу вредностите на мерените величини?

Математичарите нашле решение на овој проблем: најточен е оној правец на регресиската права што има **најмала сума на квадратни отстапувања** на поединечните Y резултати од тој правец. Имено, ако вредностите на тој правец ги означиме со \hat{y} (регресиски y), тогаш за секој индивидуален резултат (т.е. за секоја точка од правата) ќе добиеме некоја разлика ($y - \hat{y}$). Сумата од квадратите на тие разлики (т.е. отстапувањата од правецот на регресионата права) треба да биде најмала од сите можни. Методот со кој тоа се постигнува се вика **метод на најмали квадрати**. Со други зборови, со овој метод математички се покажува дека со експериментално добиените податоци најдобро се сложува оној правец во кој сумата на квадратите од разликата на правите и измерените вредности за ординатата поприма најмал износ.

Математички е најдено дека константите a и b може да се пресметаат со формулите:

$$b = \frac{\sum xy - n \cdot \bar{x} \cdot \bar{y}}{\sum x^2 - n \cdot \bar{x}^2}; \quad a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (1.19)$$

Пример:

x	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	17,5
y	0,105	0,202	0,319	0,422	0,515	0,624	0,750

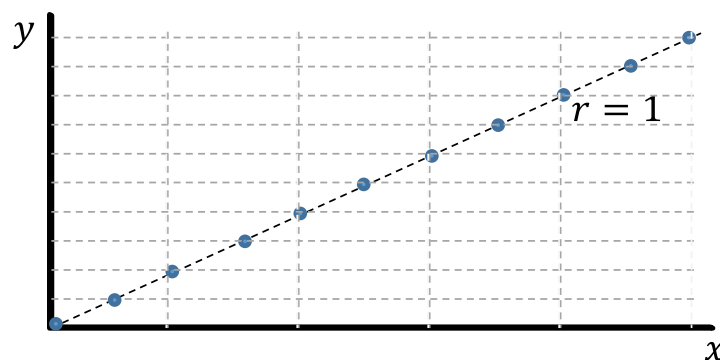
$$b = 0,0425; \quad a = -0,0054$$

$$y = a + bx \quad \text{за } x = 7,5$$

$$y = -0,0054 + 0,0425 \times 7,5; \quad y = 0,3135$$

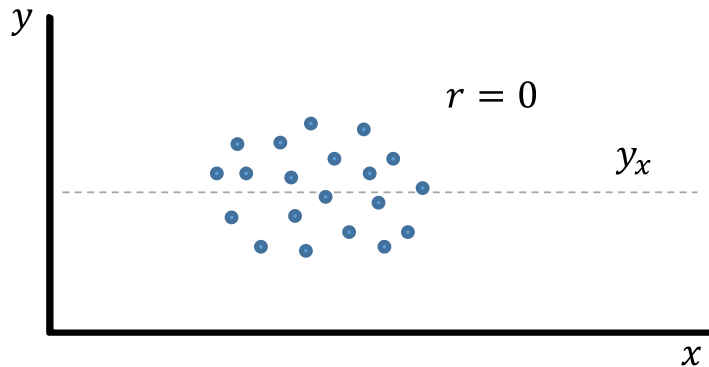
Корелациската анализа го покажува степенот на зависност помеѓу променливите. Степенот на зависноста помеѓу променливите се одредува преку големината на растурањето на податоците околу регресиската линија, а се изразува со **коэффициентот на корелација, r** .

Ако сите податоци лежат на регресиската линија, $r = 1$ (апсолутно сложување) (Слика 1.5).



Слика 1.5 Приказ на регресиска права во случај кога степенот на зависност помеѓу променливите $r = 1$

Во случај кога помеѓу променливите не постои зависност регресиската линија е паралелна со x -оската, $r = 0$ (Слика 1.6).



Слика 1.6 Приказ на регресиска права во случај кога степенот на зависност помеѓу променливите $r = 0$

$$r = \frac{\sum x \cdot y - n \cdot \bar{x} \cdot \bar{y}}{(\sum x^2 - n \cdot \bar{x}^2) \cdot (\sum y^2 - n \cdot \bar{y}^2)} \quad (1.20)$$

Коефициентот на корелација може да има:

- позитивна вредност, ако постои правопрпорционална зависност помеѓу променливите X и Y (т.е ако X се зголемува, тогаш и Y се зголемува и обратно)
- негативна вредност, ако постои обратнопрпорционална зависност меѓу променливите (т.е. ако X се зголемува, тогаш Y се намалува и обратно)

Регресиската и корелациската анализа се применуваат:

- при споредување два метода;
- определување на точноста на методот;
- пресметување на аналитичкиот принос, "recovery";
- конструирање баждарен дијаграм.

Точност и прецизност на резултатите

Точноста на резултатите подразбира споредување на еден резултат или на средната вредност од една група резултати со вистинската вредност или евентуално прифатената вистинска вредност. Точноста на резултатот ја означува близината на резултатот до неговата вистинска вредност (Слика 1.7). Честопати не може да се изрази со потполна сигурност (треба да се познава μ).

Точноста е мерка за сигурноста на еден метод, а проверување на точноста се врши со Студентовиот t -тест.

$$\text{Точност}(\%) = \frac{(\bar{x} - \mu)}{\mu} \cdot 100\% \quad (1.21)$$

Точноста се изразува преку добиениот аналитички принос за аналитот.

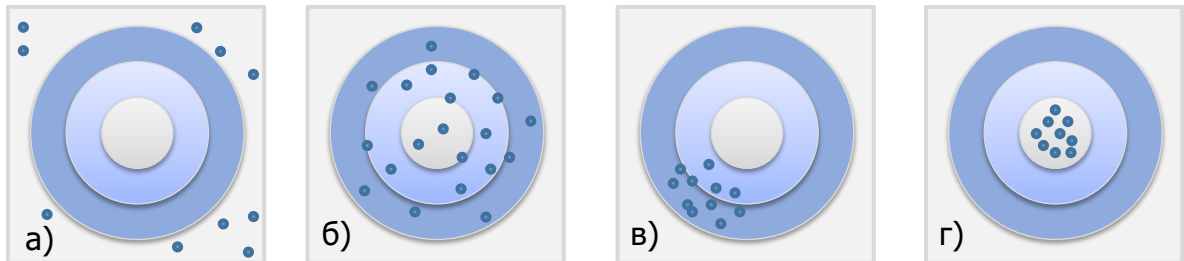
$$\text{Аналитички принос}(\%) = \frac{\bar{x}}{\mu} \cdot 100\% \quad (1.22)$$

Кога одреден примерок се мери повеќе пати, редок случај е резултатите да бидат идентични со претходните мерења. Наместо тоа резултатите се случајно расеани. **Прецизноста** е мерка за оваа варијабилност. Прецизност на резултатите се дефинира како сложување помеѓу нумеричките вредности на мерењата, изведени на идентичен начин (Слика 1.7).

За изразување на прецизноста најчесто се користи **стандардната девијација**, варијансата и релативната стандардна девијација. Ако сакаме да ја споредиме прецизноста на два метода се применува F -тестот. Постигнувањето на

добра прецизност (за една низа на мерења на иста величина и на идентичен начин) се користи како одреден критериум за точноста.

Општо, прецизноста е поделена во две категории: повторливост и репродуцибилност. **Повторливоста** (рипитабилност) е прецизност добиена кога сите мерења се извршени од ист аналитичар при исти услови на работа и опрема во тек на еден период на лабораториска работа. Позната е уште како *short-term precision* или прецизност на краток период. **Репродуцибилноста** на резултатите добиени со еден метод е дефинирана како варијабилност на процесот во подолг временски период: добиени во една лабораторија, но во различни денови; од различни оператори во различни лаборатории; на различна апаратура или нивни комбинации.



Слика 1.7 Прецизност и точноста на резултати: а) резултатите не се прецизни и не се точни (системска грешка), б) резултатите се непрецизни, но во просек се точни, в) резултатите се прецизни, но не се точни, г) резултатите се прецизни и точни.

Калибрација на инструментални методи

Со исклучок на гравиметриските и кулометриските методи, сите аналитички методи бараат калибрација, процес што го споредува измерениот аналитички сигнал со концентрацијата на аналитот. Трите најчести калибрациони методи се: метод на директна калибрација (изработување баждарен дијаграм), метод на стандардни додатоци и метод на внатрешен стандард.

Метод на директна калибрација

За изработка баждарен дијаграм се подготвува серија стандарди што содржат позната концентрација на аналит и одговорот се забележува на инструментот. Одговорот на инструментот се коригира со одговор на слепа проба¹. Од добиените податоци, одговор на инструментот во однос на концентрацијата на аналитот, се конструира баждарен дијаграм.

Со обработка на баждарниот дијаграм со метод на најмали квадрати, се добива регресиската равенка, од која потоа директно може да се пресмета концентрацијата на примерокот. Пожелно е да се добие права што демонстрира линеарност во широк опсег на концентрации.

Успешноста на методот на директна калибрација најмногу зависи од тоа со колкава точноста се подготвени стандардите и колку е сличен матриксот² на стандардите со примероците што се испитуваат. За жал, подготовката на стандарди чиј матрикс би се совпаднал со матриксот на комплексни примероци често е многу тешко или невозможно, па ефектот на матриксот може да биде причина за појава на грешки од интерференција. Во вакви случаи, за да се намалат ефектите од

¹ Слепата проба ги содржи сите компоненти на испитуваниот примерок, освен компонентата од интерес – аналитот.

² Терминот матрикс се однесува на сите различни конституенти содржани во испитуваниот примерок, вклучувајќи го и аналитот.

матриксот, често е неопходно анализот да се одвои од компонентите на матриксот што интерферираат.

Метод на стандардни додатоци

Методот на стандардни додатоци е особено корисен за испитување комплексни примероци, поради тоа што овозможува делумно или целосно отстранување интерференции предизвикани од матриксот на примерокот.

Најчесто се изведува со додавање еден или повеќе волумени на стандарден раствор на еднакви волумени од примерокот. Овој процес често се нарекува „спајкување“ на примерокот. Потоа примероците се разредуваат до ист волумен. Ако количината на примерокот е ограничена, методот на стандардни додатоци се изведува со мерење на истиот примерок по секое последователно додавање стандард. Матриксот на примерокот по секое додавање стандард е практично идентичен, се разликува единствено концентрацијата на анализот.

Според овој метод, еднакви волумени од растворот на анализот со непозната концентрација c_x , се пренесуваат во волуметриски садови со определен волумен V_t . Во секој од овие садови се додаваат различни волумени V_s од стандардниот раствор на анализот со позната концентрација c_s . Потоа, ако е потребно се додаваат соодветни реагенси и волуметриските садови се дополнуваат до деклариранiot волумен V_t . На крај, се мерат аналитичките сигнали S (апсорбацијата) на подготвените раствори. Ако одговорот на инструментот е пропорционален со концентрацијата на анализот, како што всушност мора да биде ако се употребува методот на стандардни додатоци, може да се напише:

$$S = \frac{k \cdot V_s \cdot c_s}{V_t} + \frac{k \cdot V_x \cdot c_x}{V_t} \quad (1.23)$$

каде што k е константа на пропорционалност. Зависноста на S од V_s е линеарна и може да се прикаже со равенката на права:

$$S = m \cdot V_s + b \quad (1.24)$$

каде што $m = k \cdot c_s / V_t$, преставува наклонот на правата, а $b = k \cdot V_x \cdot c_x / V_t$ е y -отсечката.

Со примена на методот на најмали квадрати може да се пресметаат вредностите за b и m , а потоа и за c_x :

$$\frac{b}{m} = \frac{k \cdot V_x \cdot c_x / V_t}{k \cdot c_s / V_t} = \frac{V_x \cdot c_x}{c_s} \quad (1.25)$$

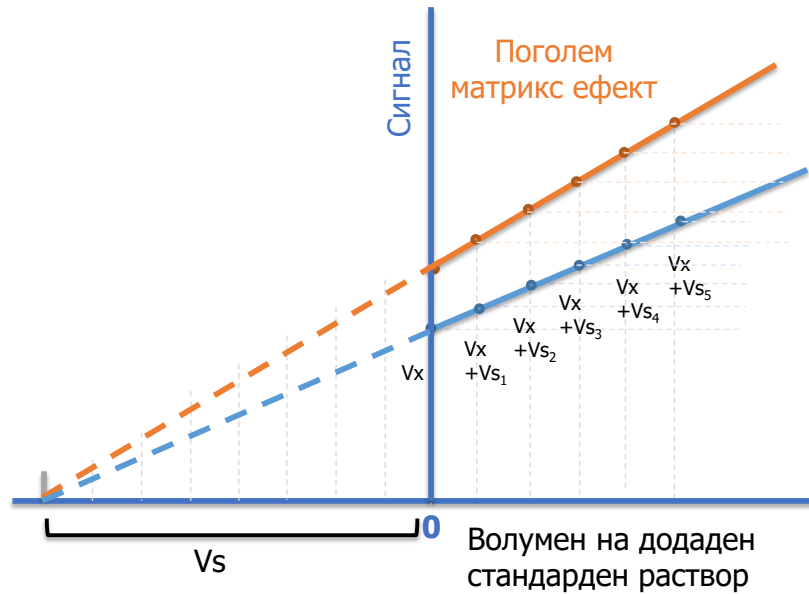
односно

$$c_x = \frac{b \cdot c_s}{m \cdot V_x} \quad (1.26)$$

Алтернативно, може да се конструира баждарен дијаграм (Слика 1.8) и со екстраполација на правата до негативниот дел од апцисата да се отчита вредноста за V_s :

$$\begin{aligned} S &= \frac{k \cdot V_s \cdot c_s}{V_t} + \frac{k \cdot V_x \cdot c_x}{V_t} = 0 \\ \frac{k \cdot V_x \cdot c_x}{V_t} &= -\frac{k \cdot V_s \cdot c_s}{V_t} \\ c_x &= -\frac{V_s \cdot c_s}{V_x} \end{aligned} \quad (1.27)$$

Бидејќи баждарниот дијаграм на стандардните додатоци е конструиран за одреден примерок, тој не може да се искористи за определување содржина на друг примерок со ист аналит.



Слика 1.8 Графички приказ на метод на стандардни додатоци

Метод на внатрешен стандард

Внатрешниот стандард претставува супстанција што се додава во точно одредена количина на сите примероци, слепи проби и стандарди, вклучени во испитувањата. Методот на внатрешен стандард вклучува конструирање баждарен дијаграм, при што на ординатата се нанесува односот помеѓу сигналот на стандардите и сигналот на внатрешниот стандард, а на апцисата концентрацијата на стандардите. Концентрацијата на аналитот во примероците се пресметува од баждарниот дијаграм, графички или од регерсината равенка (метод на најмали квадрати). Внатрешниот стандард, ако е одбран и употребен соодветно, може да компензира неколку типови систематски и случајни грешки. Така, ако сигналите на аналитот и на внатрешниот стандард поединечно се зависни од одредени варијации на инструментот или на методот, тогаш односот на овие два сигнала е независен од овие варијации. Ако матриксот влијае на ист начин на двата сигнала, со методот на внатрешен стандард овој ефект се компензира. Главна потешкотија при употреба на методот на внатрешен стандард е да се одбере соодветна супстанција како внатрешен стандард, како и додавањето на таа супстанција во примероците и стандардите на репродуцибилен начин. Внатрешниот стандард треба да даде сигнал што е сличен со сигналот на аналитот, но сепак доволно различен за да може инструментот да ги разликува двата сигнала. Најчесто како внатрешен стандард се одбира супстанција што не е присутна во матриксот на примерокот, така што единствен извор на сигналот на внатрешниот стандард е додадената количина на внатрешен стандард.

При развој на нов метод на внатрешен стандард, мора да се води сметка промената на концентрацијата на аналитот да не влијае на интензитетот на сигналот на внатрешниот стандард.

ОСНОВИ НА СПЕКТРОСКОПСКИТЕ МЕТОДИ

Спектроскопијата како метод за изучување на структурата на соединенијата почнала да се развива откако Њутн успеал да ја разложи белата светлина, пуштајќи светлосен сноп низ призма, на компоненти со различни бранови должини при што е добиен **електромагнетен спектар**¹. Предмет на спектроскопијата е изучувањето на интеракцијата меѓу електромагнетните бранови и материјата, при што се добиваат многу значајни податоци за структурата на соединението. Ова заемнодејство не е случајно, туку се темели на добро утврдени закони и правила, зависно од брановите должини на светлината што се апсорбираат или што се емитираат и од обемот на апсорпцијата или на емисијата.

Спектроскопските методи претставуваат голема група на аналитички методи што се темелат на атомската и на молекуларната спектроскопија.

Својства на електромагнетното зрачење

Природата на електромагнетното зрачење претставувала нерешлив проблем за научниците многу години. Во определени случаи светлината (електромагнетното зрачење) се однесува како бран, а во други како да е составена од мали честички. Изучувањето на законите за зрачење на црно тело, како и фотоелектричниот и Комптоновиот² ефект, покажале дека електромагнетното зрачење не се простира во средината во вид на континуирани бранови, туку во вид на кванти (порции) што имаат определена енергија. Имено, многу од својствата на електромагнетното зрачење се опишуваат врз основа на класичниот модел на синусоидални бранови. Од друга страна, со овој модел не може да се објасни феноменот поврзан со апсорпцијата и емисијата на енергијата на зрачењето. Според моделот на честичките, електромагнетното зрачење е претставено како проток од одделни честички или бранови од честички, наречени фотони или кванти. Па според тоа, енергијата на зрачење (светлината) има дуалистичка природа:

- бранова и
- квантна природа.

Таквото двојно објаснување на електромагнетното зрачење меѓусебно не се исклучува. Напротив, тоа е комплементарно.

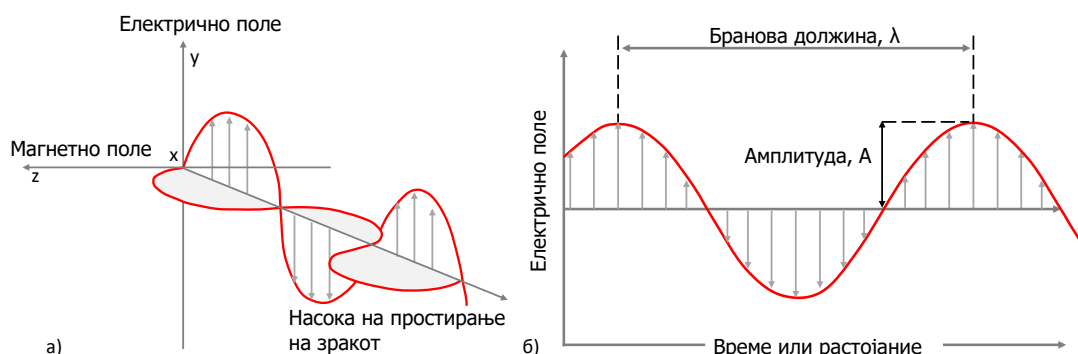
Бранови својства на светлината

Енергија на зрачење е енергија што се простира во облик на **трансверзални**³ електромагнетни бранови (Слика 2.1).

¹ Електромагнетни зрачења што се разложени на погоден начин, така што зрачење со една бранова должина физички е одделено од зрачењата со други бранови должини се нарекуваат електромагнетен спектар.

² Комптонов ефект е појава на намалување на енергијата (односно зголемување на брановата должина) на фотон од X- или γ -зрачење при интеракција со материја.

³ Бран чишто осцилации се нормални на насоката на неговото ширење се вика **трансверзален** бран.



Слика 2.1 Приказ на зрак на монохроматска, планарно поларизирана светлина: а) насока на простирање на зракот и правец на простирање на електричното и на магнетното поле (трансферзална поставеност); б) дводимензионален приказ на векторот на електричното поле.

Електромагнетното зрачење се претставува со векторот на магнетното поле и со векторот на електричното поле, поставени под прав агол, коишто се менуваат на синусоиден начин. Светлосните осцилации се протегаат во нормален правец на овие два вектора и го даваат светлосниот бран. Кај рамнополаризираното електромагнетно зрачење сите осцилации на електричното и магнетното поле лежат во една рамнина.

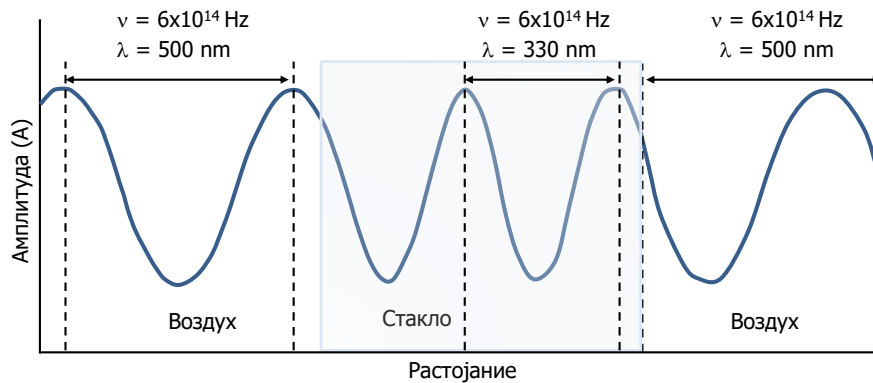
Бранови параметри преку коишто се дефинира енергијата на зрачење се:

- *амплитуда* (A) на синусоидниот бран се дефинира како должина на електричниот вектор на максимум на бранот;
- *период* (p) на електромагнетното зрачење е времетраењето на една полна осцилација на електромагнетниот бран (време, изразено во секунди, потребно последователните максимуми или минимуми да поминат низ точно определена точка во просторот);
- *фреквенција* (ν) претставува однос од бројот на полни осцилации на електромагнетниот бран и времето за коешто тие се извршуваат; единица на оваа физичка величина е реципрочна вредност на единицата за време, s^{-1} или *hertz* (Hz), што одговара на една полна осцилација во секунда;
- *бранова должина* (λ) претставува линеарно растојание меѓу кои било две еквивалентни точки на еден бран што се во фаза (меѓу два соседни максимуми или минимуми на брановата функција); се мери во единици за должина: метри (m), сантиметри (cm), микрометри (μm), нанометри (nm);
- *брзина на простирање* на бранот

Во вакуум, брзината на простирање на бранот (c) е независна од брановата должина и е најголема. Брзината на простирањето на бранот во воздух се разликува многу малку од c (околу 0,03 % помала) и оттука за воздух или за вакуум важи равенката:

$$c = \lambda \cdot \nu = 3,00 \cdot 10^8 m/s = 3,00 \cdot 10^{10} cm/s \quad (2.1)$$

- Во кој било друг медиум освен во вакуум, брзината на ширење на електромагнетниот бран се намалува поради интеракција на електромагнетното поле на бранот и валентните електрони во медиумот. Бидејќи фреквенцијата на зрачење е непроменлива и одредена од изворот на зрачење, брановата должина се намалува при премин на зрачењето од вакуум во друг медиум (т.е. во друга материјална средина), како што е прикажано на Слика 2.2.



Слика 2.2 Влијание на промената на медиумот врз монохроматската светлина

- **бранов број** ($\bar{\nu}$) претставува реципрочна вредност од брановата должина (број на бранови на должина од 1 метар). Единици за оваа физичка величина се реципрочни вредности од единиците за должина. Како единица најчесто се користи cm^{-1} . Брановиот број најчесто се употребува во инфрацрвената спектроскопија.

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} (\text{cm}^{-1}) \quad (2.2)$$

- **сила на зрачењето** (P) е енергија на сноп зрачење што паѓа на дадена површина за време од 1 секунда.
- **интензитет на зрачењето** (I) е сила на зрачење на единица просторен агол.

Квантна природа на светлината

Светлината има квантна природа и претставува збир од елементарни кванти на енергија, коишто се однесуваат како своевидни честички, т.н. **фотони**. Фотоните имаат сопствена енергија, што е зависна од фреквенцијата на електромагнетното зрачење на коешто му припаѓаат:

$$E = h \cdot \nu \quad (2.3)$$

каде што E е енергијата на фотонот изразена во џули (J), h е Планкова (*Planck*) константа, што има вредност $6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$, а ν е фреквенцијата на зрачењето. Од равенката (2.1):

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (2.4)$$

Од равенките (2.3 и 2.4) се добива:

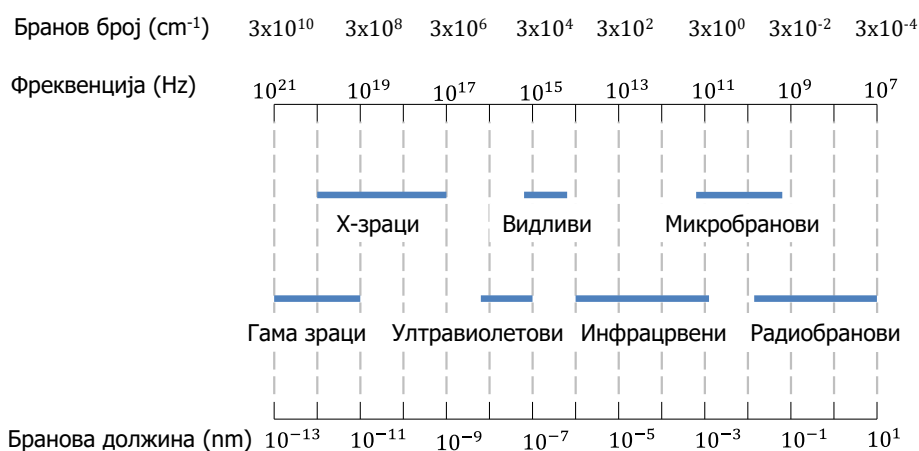
$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (2.5)$$

Енергијата на електромагнетното зрачење е директно пропорционална со фреквенцијата, а обратно пропорционална со брановата должина на зрачењето.

Електромагнетен спектар

Електромагнетниот спектар опфаќа големо подрачје на бранови должини и фреквенции (енергии). Во него се опфатени зрачења со ниска енергија (големи бранови должини и со ниски фреквенции), како што се радиобрановите и микробрановите и зрачења со многу висока енергија (кратки бранови должини и високи фреквенции), како што се X-зраците. Фотоните на X-зрачење ($\lambda \cong 10^{-10} \text{ m}$) имаат приближно 10 000 пати поголема енергија од фотоните емитирани од

вжарена волфрамова жица ($\lambda \cong 10^{-6}m$), а 10^{11} пати поголема енергија од фотоните од радиофреквентното подрачје. Делот од електромагнетниот спектар што опфаќа зрачења видливи за човечкото око се вика **видлив** дел од спектарот и претставува многу мал дел од целиот електромагнетен спектар (Слика 2.3).



Слика 2.3 Подрачја на електромагнетскиот спектар

Во Табела 2.1 прикажани се одредени спектроскопски методи со брановите должини и фреквенциите за подрачјата на спектарот значајни за аналитички цели, како и видот на нуклеарна, на атомска или на молекуларна квантна промена што се користи како основа за различните спектроскопски техники.

Табела 2.1 Спектроскопски методи зановани на електромагнетно зрачење

Вид спектроскопија	Вообичаена бранова должина Подрачје*	Вообичаен бранов број Подрачје, cm^{-1}	Вид квантна промена
Емисија на γ -зраци	0,005-1,4 Å	–	Нуклеарна
Апсорпција, емисија, флуоресценција и дифракција на X-зраци	0,1-100 Å	–	Внатрешни електрони
Вакуум ултравиолетова апсорпција	10-180 nm	1×10^6 до 5×10^4	Валентни електрони
Ултравиолетова и видлива апсорпција, емисија и флуоресценција	180-780 nm	5×10^4 до $1,3 \times 10^4$	Валентни електрони
Инфрацрвена апсорпција и Раманово расејување	0,78-300 μm	$1,3 \times 10^4$ до $3,3 \times 10^1$	Ротација/вибрација на молекули
Микробранова апсорпција	0,75-3,75 mm	13-27	Ротација на молекули
Електрон спин резонанција	3 cm	0,33	Вртење на електрони во магнетно поле
Нуклерано магнетна резонанција	0,6-10 m	$1,7 \times 10^{-2}$ до 1×10^3	Вртење на нуклеони во магнетно поле

*1 Å = 10^{-10} nm = 10^{-8} cm

1 nm = 10^{-9} m = 10^{-7} cm

1 mm = 10^{-6} m = 10^{-4} cm

Апсорпција на електромагнетно зрачење

Интеракцијата на електромагнетното зрачење со материјата се темели на законите на квантната механика. Во 1900 година Макс Планк ја објавил својата револуционерна идеја според која енергијата на т.н. **квантни честички** (атоми, јони или молекули) е дисконтинуирана, односно дека тие може да постојат само во серии од квантизирани состојби (нивоа) со определена енергија. Според законите на квантната механика, промени на квантните состојби (нивоа) може да настанат само со апсорпција или со емисија на енергија. Во спектроскопската терминологија, апсорпцијата е процес во кој некоја супстанција присутна во транспарентна средина селективно го намалува интензитетот на некоја фреквенција на електромагнетното зрачење.

На собна температура најголем број атоми и молекули се наоѓаат во **основна** состојба - состојба на најмала енергија за таа температура (основно енергетско ниво E_0). При апсорпција на енергија атомите, јоните и молекулите поминуваат во повисоко енергетско ниво, во **ексцитирана** или **побудена** состојба, E_1 . Апсорбираната енергија бројно е еднаква на енергетската разлика меѓу нивоата на почетната (основна) и крајната (побудена) состојба. Таа промена во енергијата на квантните честички што настанала со апсорпција (или пак со емисија) на зрачење се нарекува **премин** и математички може да се изрази како:

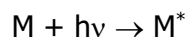
$$\Delta E = E_1 - E_0 = h \cdot \nu \quad (2.6)$$

Апсорпцијата на зрачење ја зголемува енергијата на квантните честички (т.е. $E_1 > E_0$). Поаѓајќи од равенката (2.1), следува:

$$\Delta E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (2.7)$$

Од равенките може да се заклучи дека материјата може да апсорбира зрачење само со определени фреквенции или бранови должини што соодветствуваат на точната енергетска разлика меѓу двете состојби.

Побудувањето⁴ на квантната честичка М во ексцитирана форма M^* , може да се прикаже со равенката:



Побудените состојби се енергетски неповолни и молекулата (или атомот) тежнее да се врати во основната состојба (со најниска енергија) преку ослободување (емисија) на енергијата. Бидејќи ексцитираните состојби се енергетски неповолни, квантните честички (атоми, молекули, јони) само кратко време⁵ (10^{-9} до 10^{-6} s) се наоѓаат во побудена состојба. Потоа побудената честичка се релаксира⁶ до својата претходна или основна состојба, пренесувајќи го притоа вишокот енергија на другите честички во нејзината околина. Тој процес, што предизвикува благо зголемување на температурата на околината, може да се прикаже со равенката:



⁴ **Побудување** е физички процес при кој квантната честичка апсорбира топлинска, електрична или енергија на електромагнетно зрачење и така преминува во побудена состојба

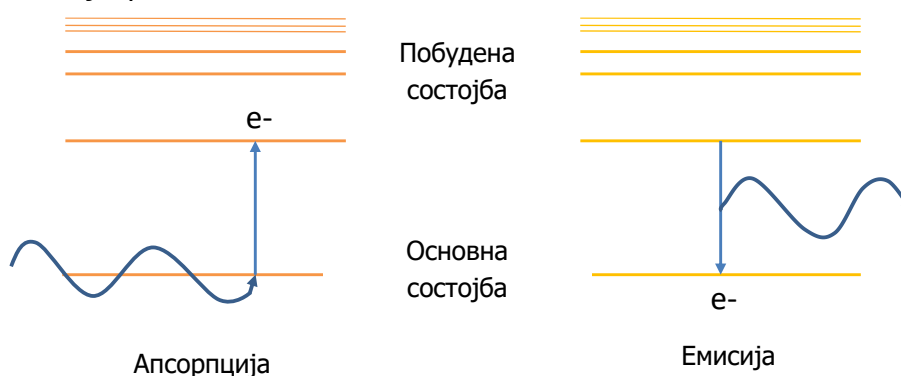
⁵ Од ова правило е исклучен процесот на **флуоресценција** (вид на луминисценција), каде што честичките подолго се задржуваат во ексцитираната состојба (и до неколку десетици секунди)

⁶ **Релаксација** е физички процес во кој побудената честичка го отпушта вишокот енергија, при што се враќа во пониска енергетска состојба

Релаксацијата може да биде придружена со ослободување на вишокот енергија во вид на топлина што побудените честички ја оддаваат на околината или со појава на **флуоресцентна** или **фосфоресцентна** емисија на зрачење.

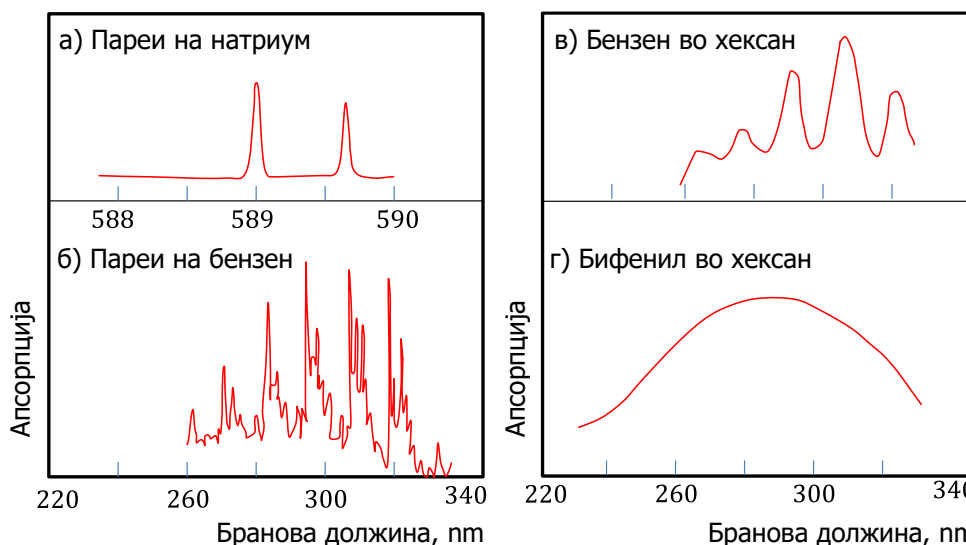
Атомска апсорпција

При минување на полихроматска, на ултравиолетова или на видлива светлина низ медиум што содржи моноатомски честички, како, на пример, жива или натриум во гасовита состојба, доаѓа до апсорпција, но само на одредени фреквенции. Релативната едноставност на атомските спектри се должи на малиот број можни енергетски премини на атомите. Побудувањето може да настане само со преминување на еден или повеќе електрони на атомот на повисоки енергетски нивоа (Слика 2.4). Ултравиолетовото и видливото зрачење има доволна енергија да предизвика премин на валентните (врзувачките) електрони. Фреквенциите на X-зрачењата, од друга страна, се карактеризираат со поголема енергија, доволна за да предизвика премини на електроните што се наоѓаат близу до атомското јадро.



Слика 2.4 Електронски премин кај атоми

Атомските спектри се состојат од многу тенки апсорпциски линии. Затоа уште се нарекуваат и **линиски** спектри (Слика 2.5 а). Апсорпциските спектри на атомите на алкалните метали се многу поедноставни од спектрите на елементите со повеќевалентни електрони. Атомските спектри на преодните метали особено се богати со линии, а постојат елементи што даваат и по неколку илјади апсорпциски линии.



Слика 2.5 Карактеристични ултравиолетови апсорпциски спектри: а) атомски спектар; б) и в) молекулски спектар; г) континуиран спектар.

Молекулска апсорпција

Апсорпциските спектри на полиатомните молекули се значително покомплексни од атомските спектри бидејќи бројот на енергетските состојби во молекулите е огромен во споредба со бројот на енергетски состојби кај изолираните атоми.

Вкупната енергија на молекулата може да се прикаже со равенката:

$$E = E_{\text{електронска}} + E_{\text{вибрациска}} + E_{\text{ротациска}}$$

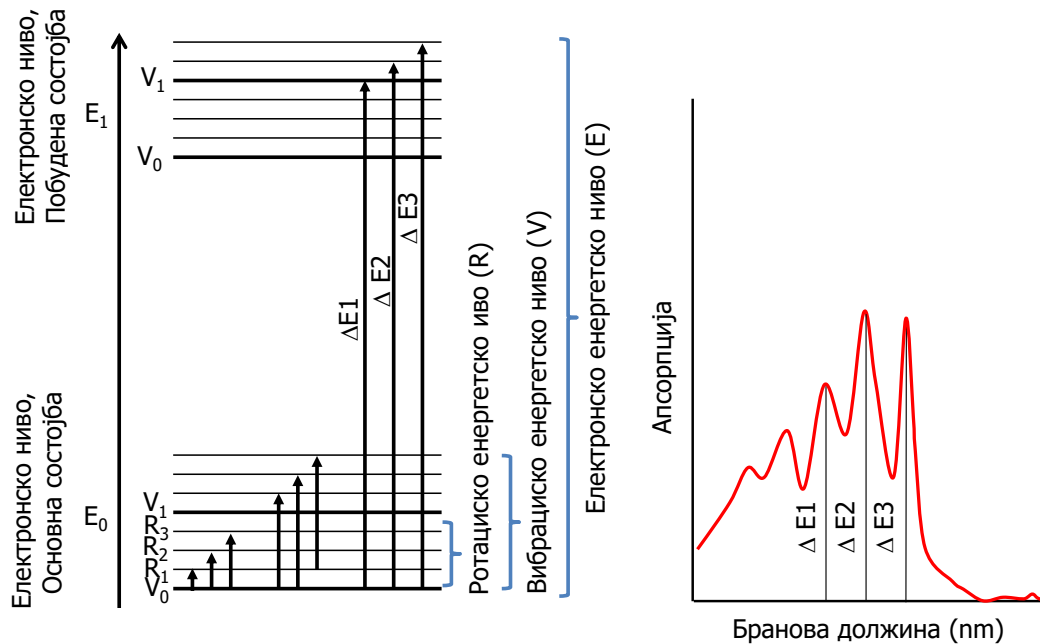
$E_{\text{електронска}}$ ⁷ ја опишува електронската енергија на молекулот што потекнува од енергетските состојби на нејзините валентни (врзувачки) електрони, $E_{\text{вибрациска}}$ ја опишува енергијата на меѓуатомските вибрации во молекулата како целина, а $E_{\text{ротациска}}$ е енергијата на ротација на молекулата околу тежиштето на молекулата. Општо, молекулата има повеќе квантизирани електронски нивоа. Во рамките на секое електронско ниво нормално постојат повеќе вибрациски нивоа, а во секое вибрациско ниво можни се бројни ротациски нивоа (состојби). Како резултат на тоа, бројот на можни енергетски нивоа во молекулата е ред величина многу поголем од бројот на енергетски нивоа во атомот.

Молекулите подлежат на три вида квантни премини при побудување со зрачења од ултравиолетовата, видливата и инфрацрвената област. Побудувањето со зрачење од ултравиолетовата и видливата област предизвикува премин на електроните од молекулските орбитали со ниска енергија на орбиталите со повисока енергија. Преминот на електроните меѓу две орбитали се нарекува **електронски премин**, а апсорпцискиот процес - **електронска апсорпција**.

Покрај електронските, во молекулите се јавуваат уште два вида премина, предизвикани од апсорпција на зрачење, и тоа **вибрациски** и **ротациски** премини. Енергијата на вибрациските нивоа е квантизирана и само определен квант енергија (еднаков на енергетската разлика меѓу две вибрациски нивоа) може да предизвика вибрациски премин. Молекулата има мноштво квантизирани ротациски состојби поврзани со ротациското движење на молекулата околу оската што минува низ неговиот центар на маса (гравитациско тежиште). За побудување на ротациските премини потребно е најмало количество енергија (во споредба со вибрациските и електронските премини) (Слика 2.6).

За разлика од атомските спектри што се составени од серија на остри и добро дефинирани линии, при минување на електромагнетни зрачења од ултравиолетовото и видливото подрачје од електромагнетниот спектар низ примерок што содржи молекули се добиваат комплексни **лентести** апсорпциски спектри (Слики 2.5 б, 2.5 в). Тие се карактеризираат со апсорпциски подрачја што често опфаќаат широко подрачје на бранови должини. Молекулската апсорпција вклучува електронски премини. Секој електронски премин дава посебна апсорпциска линија. Блиску поставените апсорпциски линии, соодветни на секој електронски премин, се должат на постоење бројни вибрациски нивоа и огромен број ротациски енергетски нивоа во рамките на секое вибрациско ниво. Како резултат на тоа, молекулскиот спектар содржи серии на блиску поставени апсорпциски линии што ја сочинуваат апсорпциската лента. Серијата од апсорпциски линии, што го карактеризира електронскиот премин во апсорпциските молекулски спектри (со апсорпциска лента), настанува како резултат на бројните премини од основното електронско ниво на различните вибрациски поднивоа во рамките на исто побудено електронско ниво. Во кондензирана состојба и во присуство на молекули на растворувач, поединечните линии имаат тенденција на проширување и на крај се добива континуиран спектар (Слика 2.5 г).

⁷ $\Delta E_{\text{електронска}} \approx 10 \Delta E_{\text{вибрациска}}$, $\Delta E_{\text{електронска}} \approx 100 \Delta E_{\text{ротациска}}$, $\Delta E_{\text{електронска}} \gg \Delta E_{\text{транслациска}}$



Слика 2.6 Добивање лентест спектар. Електронски премин кај молекула

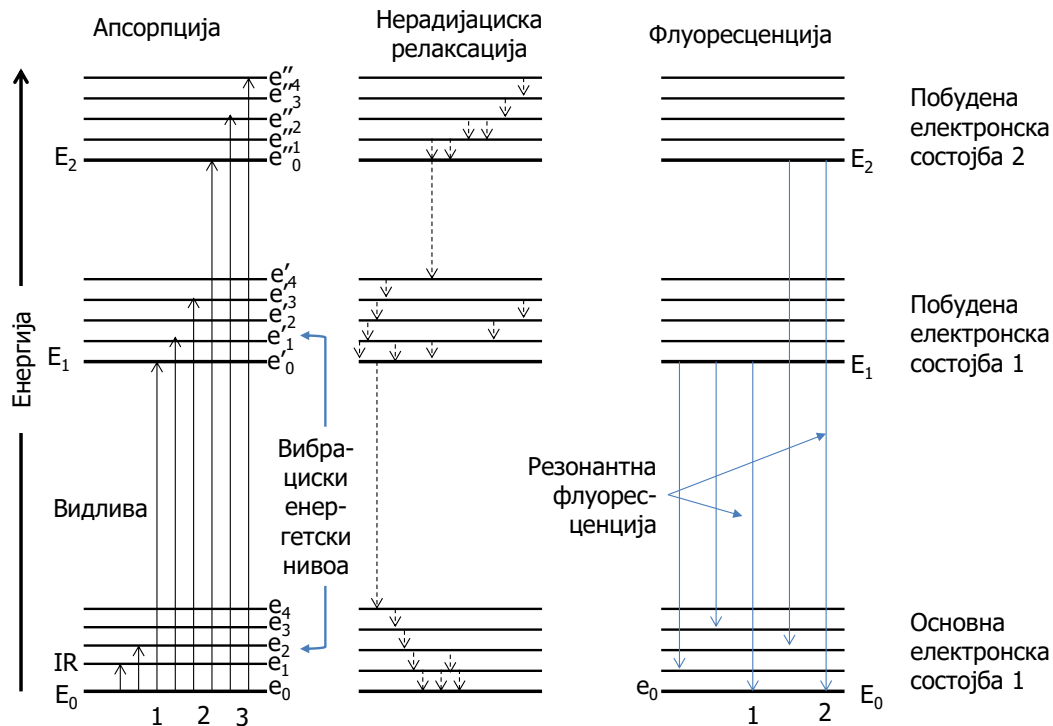
Процеси на релаксација

Времетраењето на атом или молекула во побудена состојба е многу кратко, бидејќи постојат неколку процеси на релаксација што им овозможуваат ослободување на вишокот енергија и враќање во основната енергетска состојба. Меѓу најважните процеси на релаксација се **релаксација без емитување на зрачење, флуоресцентна и фосфоресцентна релаксација.**

Релаксација без емитување на зрачење е постепено ослободување на енергијата на побудената молекула во мали порции при што таа во облик на кинетичка енергија се предава на другите молекули од средината коишто се судриле со неа. Целиот тој процес резултира со незначително зголемување на температурата на средината. Ослободувањето на енергијата на побудената молекула во серии на мали порции настанува како резултат на постепено отпуштање на енергија при квантните премини на молекулата од енергетски повисоките во енергетски пониските вибрациски нивоа во рамките на исто побудено електронско ниво. Овој тип релаксација е познат како **вибрациско отпуштање** или **деактивирање**. Претставува краткотраен и ефикасен процес на ослободување на енергија бидејќи просечното времетраење на молекулата во побудена вибрациска состојба е околу 10^{-15} секунди. Меѓутоа релаксација без емитување на зрачење може да настане и при квантен премин на побудената молекула од најниското вибрациско ниво во некое побудено електронско ниво на највисокото вибрациско ниво во енергетски пониско електронско ниво. Овој процес е помалку делотворен од вибрациското отпуштање, затоа што просечното времетраење на молекулата во побудена електронска состојба е помеѓу 10^{-6} и 10^{-9} секунди.

Флуоресценцијата и фосфоресценцијата се важни процеси на емисија на зрачење при коишто атомите или молекулите се побудуваат со апсорпција на електромагнетно зрачење. Побудените честички се релаксираат во основната состојба преку отпуштање на вишокот енергија во облик на фотони, по извршено вибрациско релаксирање или деактивирање. Флуоресценцијата настанува побрзо од фосфоресценцијата, односно завршува за околу 10^{-5} секунди по побудувањето.

Фосфоресцентната емисија може да трае со минути, па дури и со часови, по побудувањето (Слика 2.7).



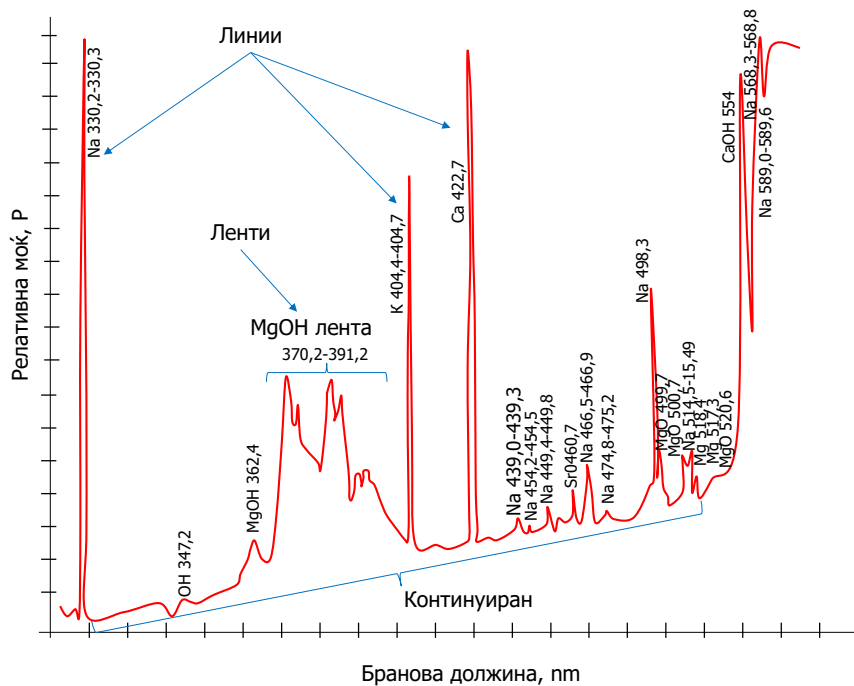
Слика 2.7 Дијаграм на енергетски нивоа за органска молекула што покажува флуоресценција

Емисија на електромагнетно зрачење

Атомите, јоните или молекулите може да се побудат на различни начини. Процеси што може да го предизвикаат тоа се: бомбардирање со електрони или со други елементарни честички, изложување на високонапонска изменична искра, термичко побудување во пламен или електричен лак, или, пак, изложување на извор на електромагнетно зрачење. Времетраењето на побудената честичка е многу кратко (10^{-6} - 10^{-9} s), а релаксацијата во пониска или во основна состојба се одвива со ослободување на вишокот енергија во облик на електромагнетно зрачење, топлина или со двата процеси истовремено.

Емисиски спектри

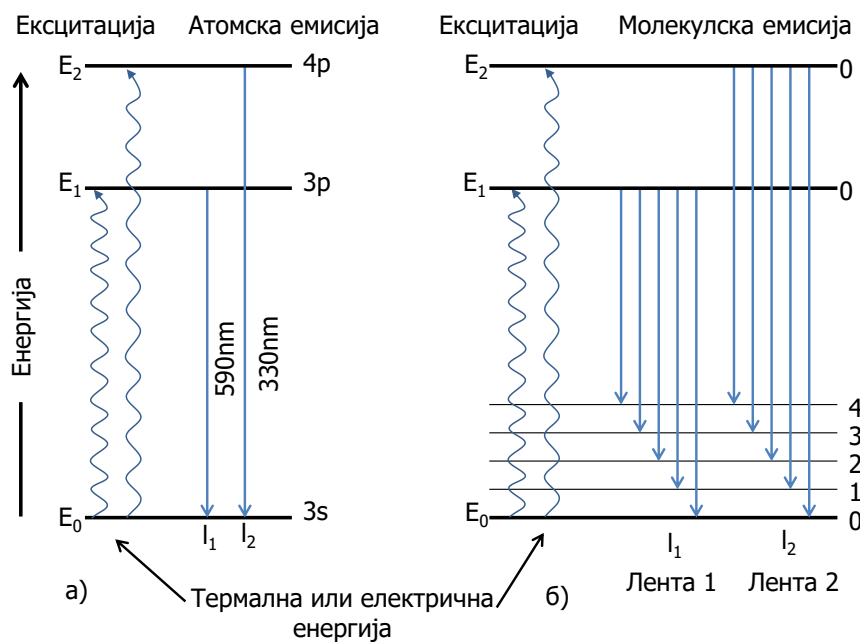
Зрачењето од побудениот извор главно се опишува со помош на **емисискиот спектар**, што претставува приказ на релативната сила на емитираното зрачење како функција од брановата должина или од фреквенцијата. Постојат три вида емисиски спектри: **линиски**, **лентести** и **континуирани**. Линискиот спектар содржи повеќе остри, добро дефинирани линии што настануваат со побудување на поединечни атоми или јони во состојба на пара по апсорпција на соодветна енергија. Лентестиот спектар се состои од неколку групи линии, поставени меѓусебно така блиску што не можат целосно да се одделат. Лентестите спектри се добиваат со релаксација на побудени мали молекули или радикали. На Слика 2.8 прикажан е типичен емисиски спектар, добиен со внесување солена вода во пламен. Добиениот емисиски спектар се состои од три видови спектри: линиски, лентест и континуиран.



Слика 2.8 Емисиони спектар на солена вода

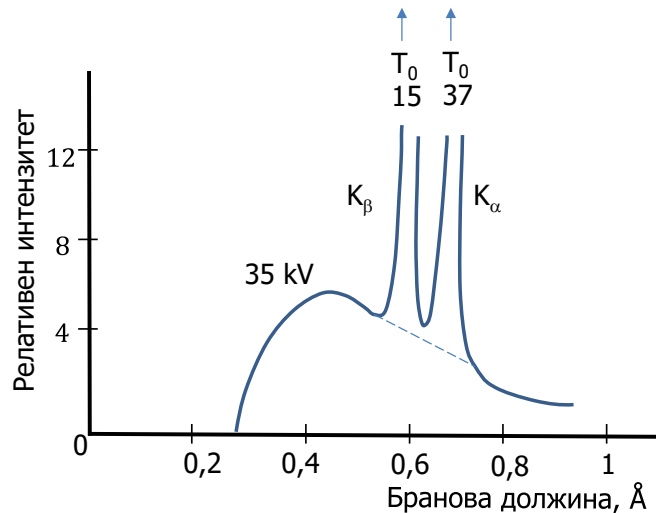
Линиски емисиони спектри

Линиски емисиони спектри во ултравиолетовата и во видливата област од спектарот, се добиваат кога честичките што емитуваат зрачење се индивидуални атоми или јони во гасна состојба (Слика 2.9 а).



Слика 2.9 Дијаграм на енергетски нивоа за: а) атом на натриум (линиски емисиони спектар); б) едноставен молекул (лентест емисиони спектар).

Индивидуалните честички во гасна состојба се независни една од друга па така емисиониот спектар се состои од остри линии широки околу 10^{-5} nm. Емисиони спектри може да се добијат и во областа на X-зраците со таа разлика (во однос на UV/Vis спектрите) што електроните што се побудуваат се наоѓаат во внатрешните орбитали на атомите (Слика 2.10).



Слика 2.10 X-зраци емисиски спектар добиен од металот молибден

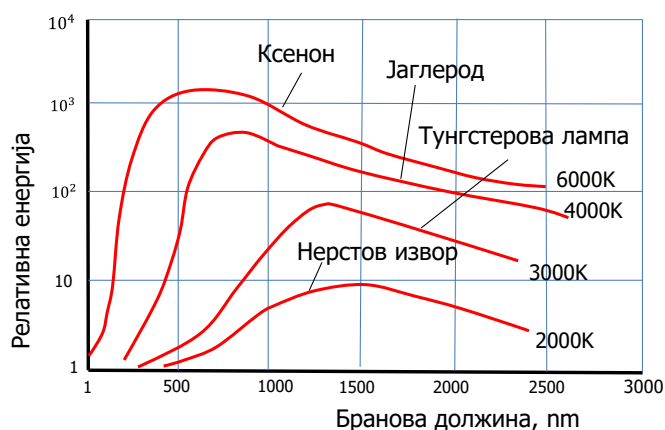
Лентести емисиски спектри

Лентестите емисиски спектри настануваат при релаксација на молекулите што биле побудени со апсорпција на надворешна енергија (на пример, топлинска или електрична). Слично како кај апсорпциските лентести спектри и емисиските спектри содржат повеќе (емисиски) линии, блиску поставени, што одговараат на одреден премин и формираат емисиска лента (Слика 2.9 б).

Кај молекулите, во состав на секое електронско ниво, се наоѓаат повеќе вибрациски поднивоа. Кога ќе дојде до експитација на електронот на повисоко вибрациско ниво, во рамките на повисокото електронско ниво најнапред доаѓа до вибрациски премин во рамките на побуденото електронско ниво, и тоа од повисокото вибрациско до најниското вибрациско ниво. Тоа настанува поради фактот што престојот на електронот во побудените вибрациски нивоа е пократок (10^{-15} s) отколку во побудените електронски нивоа (10^{-8} s). Така, прво настанува вибрациски премин (во рамките на побуденото електронско ниво), а потоа електронски премин во основното електронско ниво. Како резултат на премините од основното вибрациско подниво на побуденото електронско ниво на кое било вибрациско подниво на основното електронско ниво, се јавуваат серија на емисиски линии групирани во емисиски ленти.

Континуирани спектри

Континуирано зрачење настанува при загревање на цврсто тело до усвитување. Зрачење од овој вид (што се нарекува **зрачење на црно тело**) повеќе зависи од температурата на површината што емитува зрачење отколку од нејзиниот состав. Зрачењето на црно тело настанува како резултат на безбројните атомски и молекулски осцилации, што се побудени со топлинска енергија. Енергетскиот максимум на континуираното зрачење се поместува кон помали бранови должини при зголемување на температурата. Потребни се многу високи температури за топлинскиот извор на зрачење да емитува голем дел од својата енергија во облик на ултравиолетово зрачење (Слика 2.11). Загреаните цврсти тела се важен извор на инфрацрвено, видно и ултравиолетово зрачење од блиската UV област и се користат како извори на зрачење во аналитичките инструменти.



Слика 2.11 Зрачење од црно тело

Квантитативни аспекти на спектрохемиските мерења

Спектроскопските методи се засноваат на интеракција помеѓу молекулите, атомите и јоните на некоја супстанција и енергијата на електромагнетното зрачење.

Квантитативните апсорпциски методи се базираат на мерење на интензитетот на светлинскиот (електромагнетниот) сноп пред да мине низ медиумот што го содржи анализот⁸ (I_0) и неговиот интензитетот по минувањето низ медиумот (I). Два поима што широко се употребуваат во апсорпциската спектроскопија и се поврзани со односот меѓу I_0 и I , се **транспаренција** – T и **апсорбанција** – A .

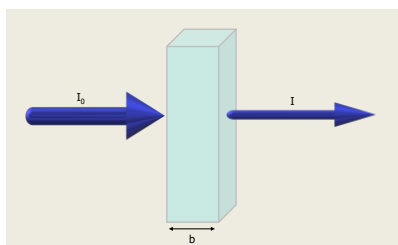
Кога светлината минува низ примерокот за анализа, се намалува нејзиниот интензитет како резултат на апсорпција од примерокот. Со други зборови $I < I_0$. Ако при минувањето на светлината низ примерокот не доаѓа до апсорпција на зрачење тогаш $I = I_0$. **Транспаренцијата** T се дефинира како однос меѓу интензитетот на пропуштеното и влезното зрачење. Или, со други зборови, транспаренцијата е дел од влезната светлина што останала неапсорбирана:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.7)$$

Транспаренцијата често се изразува во проценти:

$$\%T = \frac{I}{I_0} \cdot 100\% \quad (2.8)$$

Според тоа, вредностите на транспаренцијата може да движат од 0 (односно 0%), кога влезната светлина целосно е апсорбирана до 1 (односно 100%), кога влезната светлина целосно е пропуштена (Слика 2.12).



Слика 2.12 Ослабување зрак на зрачење од страна на раствор (со концентрација c) што апсорбира зрачење при премин низ кивета (должината на патеката b). Поголемата стрелка на влезниот зрак означува поголема моќност на зрачење отколку што се пренесува од растворот.

⁸ Супстанцијата што е предмет на мерење во аналитичката хемија се вика **аналит**.

Апсорпцијата се дефинира како процент на апсорбирана влезна светлина. Математички се изразува преку равенката:

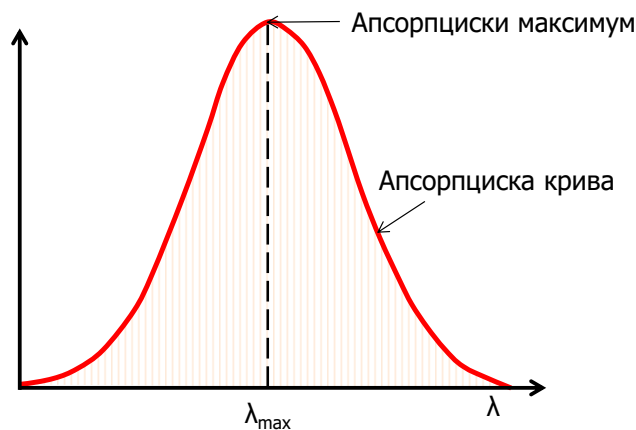
$$\text{Апсорпција} = \frac{I_0 - I}{I} \cdot 100\% \quad (2.9)$$

За квантитативното изучување на апсорпцијата на зрачење од страна на примерокот за анализа, корисно е да се дефинира уште една величина, **апсорбанцијата A** ,

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T} = -\log T \quad (2.10)$$

$A = 0$, кога интензитетите на влезната и на пропуштената светлина се исти ($I = I_0$).

Апсорпциски спектар се добива кога во координатен систем ќе се нанесат вредности на апсорбанцијата или транспаренцијата во функција од брановата должина, фреквенцијата или брановиот број на зрачењето (Слика 2.13).



Слика 2.13 Апсорпциски спектар

Во зависност од испитуваната супстанција, спектарот може да содржи една или повеќе максимуми (ленти). Кривата што ги ограничува спектралните ленти се нарекува **апсорпциска крива**. Највисоката вредност на апсорбанцијата, односно најниската вредност на транспаренцијата во апсорпцискиот спектар на испитуваната супстанција се вика **апсорпциски максимум** или **пик**. Брановата должина на која, во спектарот на супстанцијата, соодветствува најголема вредност за апсорбанцијата (односно на која се наоѓа апсорпцискиот максимум) се означува како λ_{max} (бранова должина на максимум апсорпција). λ_{max} е карактеристична вредност за една супстанција при дефинирани услови (растворувач, рН) и служи за идентификација на супстанцијата (за квалитативна анализа).

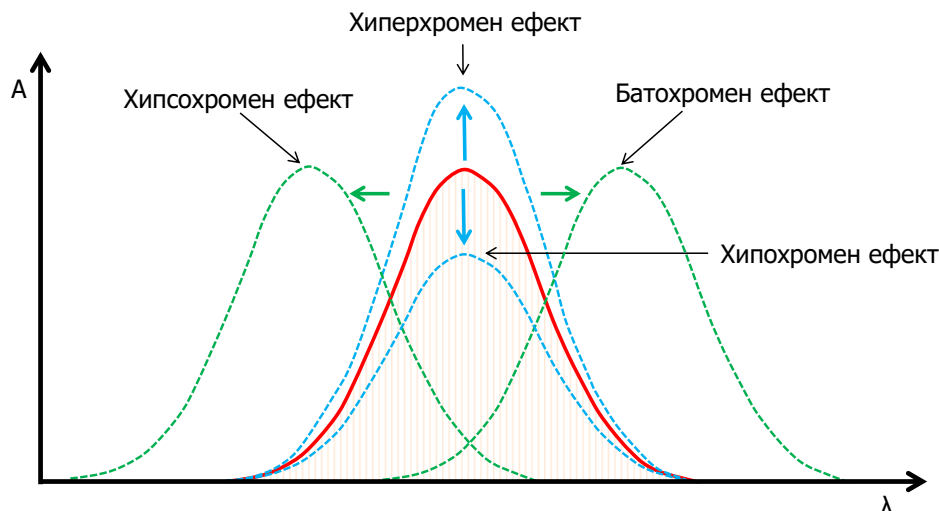
Во одредени случаи може да дојде до различни ефекти кои се однесуваат на положбата на максимумот на апсорпција и интензитетот на линиите или лентите во спектарот.

Појавата кога апсорпцискиот максимум се поместува кон поголеми бранови должини е позната како **батохромно поместување (или црвено поместување** - поместување на λ кон црвениот крај од спектарот на светлината). Односно појавата кога апсорпцискиот максимум се поместува кон пократки бранови должини е позната како **хипсохромно поместување (или сино поместување** - поместување на λ кон синиот крај од спектарот) (Слика 2.14).

Зголемување на интензитетот на апсорпциската лента (односно зголемување на вредноста на коефициентот на апсорпција) се нарекува

хиперхромизам, а намалувањето на интензитетот на апсорпциската лента (односно намалување на коефициентот на апсорпција⁹) е познато како **хипохромизам** (Слика 2.13).

Овие поместувања на брановата должина и на интензитетот на лентите зависат од молекулската структура и од интеракцијата на молекулите на анализот со молекулите на растворувачот.



Слика 2.14 Поместување на положбата и на интензитетот на апсорпцискиот максимум

Однос меѓу апсорбанцијата и концентрацијата: Ламберт-Беровиот (Lambert-Beer) закон

За монохроматско зрачење апсорбанцијата е право пропорционална на должината на патот на зрачењето (b) низ медиумот (должина на оптичкиот пат) и на концентрацијата (c) на испитуваниот примерок:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = a \cdot b \cdot c \quad (2.11)$$

каде што a е константа на пропорционалност наречена апсорптивност (апсорпциски коефициент). Бидејќи апсорбанцијата е бездимензионална величина, единиците за апсорпцискиот коефициент зависат од единиците користени за b и c . Кога концентрацијата c во равенката се изразува во молови на литар, а b во сантиметри, константата на пропорционалност се нарекува **моларна апсорптивност** (моларен апсорпциски коефициент) и се означува со ε .

Тогаш,

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (2.12)$$

каде што ε се изразува во $L \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1}$.

Моларниот апсорпциски коефициент е карактеристичен за дадена супстанција, бранова должина и растворувач, но не зависи од концентрацијата на супстанцијата ниту од должината на оптичкиот пат (должината на осветлениот слој низ примерокот). Интензитетот на апсорпциските ленти се изразува во вредност на моларниот апсорпциски коефициент при бранова должина λ_{max} и се обележува со ε_{max} .

⁹ Коефициент на апсорпција е мерка за способноста на молекулите во примерокот да апсорбираат зрачење на одредена бранова должина. Таа е константна вредност за одредена супстанција на одредена бранова должина.

Често пати, кога не е позната молекулската маса на испитуваната супстанција, наместо моларниот апсорпциски коефициент во равенката на Ламберт-Беровиот закон се користи **специфичниот апсорпциски коефициент** (специфична апсорптивност) што е бројно еднаков на апсорбанцијата што ја дава 1% раствор на супстанцијата, кога должината на оптичкиот пат (b) изнесува 1 cm.

$$A_{1cm}^{1\%} = \frac{A}{c \cdot b} \quad (2.13)$$

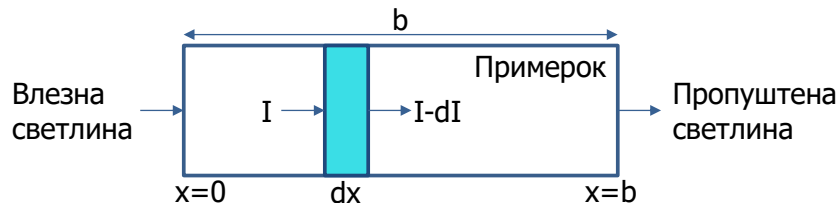
односно:

$$c = \frac{A}{A_{1cm}^{1\%} \cdot b} \quad (2.14)$$

Ламберт-Беровиот закон важи само за монохроматска светлина и за ниски концентрации од вистински молекулски раствори. Доколку концентрацијата на растворот се менува поради одредени хемиски реакции што се случуваат, како што се: протолиза, димеризација, солватација, таутомеризација и др., тогаш доаѓа до отстапување од Ламберт-Беровиот закон. Истото може да се случи и поради флуоресценција на ексцитираните молекули во растворот, растурање на светлината и нелинеарниот сигнал на детекторот.

Изведување на Ламберт-Беровиот закон

Делот од влезната светлината што минува низ примерокот (транспаренцијата) е логаритамски зависна од концентрацијата на примерокот.



Да претпоставиме дека светлина со интензитет I минува низ бескрајно тенок слој чија дебелина е dx . Намалувањето на интензитетот на влезната светлина (dI) е пропорционално со интензитетот на влезната светлина (I), концентрацијата на честичките што апсорбираат (c) и дебелината на слојот (dx):

$$dI = -\beta \cdot I \cdot c \cdot dx$$

каде β е константа на пропорционалност, а знакот минус означува дека I се намалува со зголемување на x . Ако равенката се преуреди и се интегрира, се добива:

$$-\frac{dI}{I} = \beta \cdot c \cdot dx \Rightarrow \int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = \beta \cdot c \cdot \int_0^b dx$$

Интегрирањето се врши во границите $I = I_0$ за $x = 0$ и $I = I$ за $x = b$.

$$-\ln I - (-\ln I_0) = \beta \cdot b \cdot c \Rightarrow \ln \frac{I_0}{I} = \beta \cdot b \cdot c$$

Конечно, со преведување на природниот логаритам во декаден, користејќи ја равенката $\ln x = 2,303 \cdot \log x$ се добива Ламберт-Беровиот закон:

$$\log \frac{I_0}{I} = \frac{\beta}{2,303} \cdot b \cdot c \Rightarrow A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

каде што A е вредноста за апсорбанцијата, c е концентрацијата на аналитот, b е должина на оптичкиот пат (дебелината на слојот) и ε е моларната апсорптивност.

Адитивност на Ламберт-Беровиот закон

Ламберт-Беровиот закон може да се примени и на раствори што содржат повеќе различни супстанции што апсорбираат. Под услов да не постои никаква физичка или хемиска интеракција меѓу супстанциите, вкупната апсорбанција на повеќекомпонентниот систем е еднаква на збирот од сите апсорбанции:

$$A_{\text{вкупно}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \varepsilon_1 b c_1 + \varepsilon_2 b c_2 + \dots + \varepsilon_n b c_n$$

каде што n е бројот на компонентите што апсорбираат.

Ограничувања на Ламберт-Беровиот закон

Не е познат ниту еден исклучок од линеарниот однос меѓу апсорбанцијата и должината на оптичкиот пат при одредена концентрација на супстанцијата што апсорбира. Меѓутоа често пати се јавуваат отстапувања од директната пропорционалност меѓу апсорбанцијата и концентрацијата при константна вредност за должината на оптичкиот пат. Некои од тие отстапувања се основни и претставуваат вистински ограничувања на законот. Други пак, се последица или на начинот на мерење на апсорбанцијата (инструментални отстапувања) или на хемиските промени поврзани со концентрациските промени (хемиски отстапувања).

Вистински ограничувања на законот

Ламберт-Беровиот закон успешно го опишува линеарниот однос меѓу апсорбанцијата и концентрацијата само кај разблажени раствори. При високи концентрации (најчесто поголеми од 0,01M) се намалува просечното растојание меѓу честичките на супстанцијата што апсорбира, до тој степен што секоја честичка влијае на распределбата на полнежот на соседните честички. Тоа заемнодејство може да ја смени нивната способност за апсорпција при одредена бранова должина. Бидејќи степенот на заемнодејство зависи од концентрацијата, таа појава е причина за отстапување од линеарниот однос меѓу апсорбанцијата и концентрацијата. Сличен исход се јавува ако во разредениот раствор на супстанцијата што апсорбира има висока концентрација на други супстанции, особено електролити. Овие супстанции го менуваат моларниот апсорпциски коефициент на супстанцијата што апсорбира и на тој начин предизвикуваат отстапување од законот.

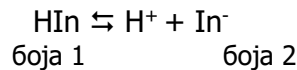
Отстапувања од Ламберт-Беровиот закон се јавуваат и заради зависноста на апсорпцискиот коефициент од индексот на рефракција на растворот. Така, ако промените во концентрацијата се причина за значајна промена во индексот на рефракција на растворот, се јавува отстапување од законот. Општо ова влијание е мало и ретко се јавува при концентрации помали од 0,01M.

Хемиски отстапувања

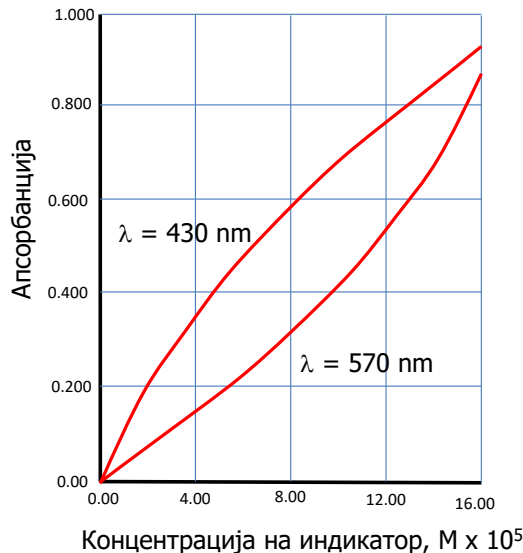
Видливи отстапувања од Ламберт-Беровиот закон често пати се последица на асоцијација, дисоцијација или реагирање на молекулите на растворената супстанција (аналитот) со молекулите на растворувачот, при што настануваат продукти што имаат апсорпциски спектар различен од оној на анализот. Овие отстапувања лесно можат да се предвидат од податоците за константите на рамнотежа на реакциите и моларните апсорпциски коефициенти на анализите.

На Слика 2.15 е прикажано отстапување од Беровиот закон во случај кога испитуваниот примерок (воден раствор на киселинско / базен индикатор) е

подложен на дисоцијација или асоцијација. Промената на бојата на индикаторот HIn настанува со поместување на рамнотежата:



Поради дисоцијација на некоја обоена супстанца, таа може да помине во безбојни јони и обратно, што доведува до апсорпција на светлина во различни спектрални подрачја.



Слика 2.15 Хемиско отстапување од Беровиот закон за индикатор

Исто така, мора да се води сметка и за влијанието на растворувачот. За спектрална анализа се употребува чист растворувач, со минимална апсорпција во спектралното подрачје на мерење. Поларноста на растворувачот влијае врз оптичките особини на растворената супстанца, што може да биде причина за помесување на апсорпцискиот максимум, како и за промена на спектралната распределба. Од овие причини секогаш мора да се назначи со каков растворувач се работи.

Инструментални отстапувања

Ламберт-Беровиот закон важи само под услов при мерењето да се користи монохроматска светлина¹⁰. Отстапувања од овој закон често се јавуваат при примена на полихроматска светлина¹¹ за мерење на апсорбанцијата. Што би се случило ако две бранови должини поминуваат низ растворот?

Пример: на λ_1 одговара ϵ_1
 λ_2 одговара ϵ_2

Ламберт-Беровиот закон за секоја бранова должина гласи:

$$I_1 = I_{01} \cdot 10^{-\epsilon_1 \cdot b \cdot c}; \quad I_2 = I_{02} \cdot 10^{-\epsilon_2 \cdot b \cdot c} \quad (2.15)$$

¹⁰ Монохроматска светлина е светлина со точно определена бранова должина, односно фреквенција (пр. електромагнетно зрачење со $\lambda = 540 \text{ nm}$)

¹¹ Полихроматска светлина е светлина со повеќе зрачења со различни бранови должини, односно фреквенции (пр. видливата светлина – претставува континуум од електромагнетни зрачења со бранови должини од 400 до 800 nm)

Инструментот мери:

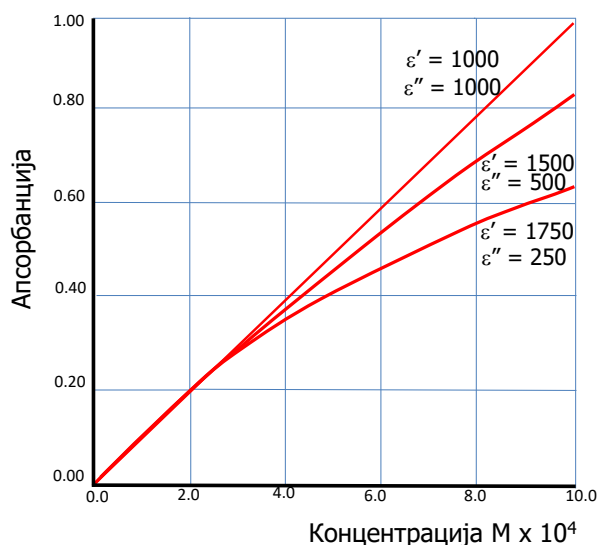
$$A = \log \frac{I_{01} + I_{02}}{I_1 + I_2} \quad (2.16)$$

со замена се добива:

$$A = \log \frac{I_{01} + I_{02}}{I_{01} \cdot 10^{-\varepsilon_1 \cdot b \cdot c} + I_{02} \cdot 10^{-\varepsilon_2 \cdot b \cdot c}} \quad (2.17)$$

само ако $\varepsilon_1 = \varepsilon_2 \Rightarrow A = \varepsilon bc$ – ќе постои линеарна зависност.

Колку е разликата помеѓу вредностите за ε поголема, се забележува поголемо отстапување од законот. Или, колку е подобар инструментот, толку помалку е подложно мерењето на нелинеарност заради полихроматската светлина (Слика 2.16).



Слика 2.16 Инструментално отстапување од Ламберт-Беровиот закон при примена на полихроматска светлина. Прикажани се моларните апсорптивности на молекулата на две различни бранови должини λ_1 и λ_2

Отстапувања од Ламберт-Беровиот закон може да се јават и заради неправилности во паралелноста на светлинскиот сноп, рефлексивност од површината на киветата¹² или употреба на нееднакви кивети, нехомогена апсорпциска средина и др.

¹² Кивета е вид стаклен сад (ќелија) со форма на четириаголна призма, со рамни ѕидови, во која се сместуваат растворот за анализа или слепата проба при спектрофотометриските определувања.

АТОМСКА СПЕКТРОМЕТРИЈА

Трите главни спектрометриски методи за идентификација на елементите во примероците за анализа и за определување на нивната концентрација се:

1. Оптичката спектрометрија
2. Масената спектрометрија и
3. Спектрометрија со X-зраци (*X-ray spectrometry*)

Оптичка атомска спектрометрија

Во оптичката спектрометрија, елементите присутни во примерокот за анализа се преведуваат во гасовити атоми со процес наречен атомизација, а потоа се мери ултаравиолетовата/видливата апсорпција, емисија или флуоресценција на атомските видови.

Оптичката атомска спектрометрија опфаќа две основни атомски спектрометриски методи:

- Атомска апсорпциска спектрометрија (AAS)
- Атомска емисииска спектрометрија (AES)

Атомска апсорпциска спектрометрија (AAS)

Атомската апсорпциска спектрометрија (*Atomic Absorption Spectrometry, AAS*) речиси половина век е најшироко употребуван метод за квантитативно определување на поединечни елементи (околу 70 метали и металоиди) во различни примероци за анализа. Како техника за квантитативна анализа на елементи, AAS е независна од формата во која се наоѓа елементот во примерокот. На пример, при определување кадмиум во вода не е значајно дали кадмиумот е присутен како хлоридна, сулфатна или нитратна сол, или е во форма на комплекс или органометално соединение. AAS се карактеризира со голема чувствителност. Со примена на оваа техника може да се определуваат ниски концентрации од редот на ppm¹ (*parts per million*) и ppb² (*parts per billion*) и ppt³ (*parts per trillion*) концентрации. Друга предност на методот е можноста за определување на некој елемент во присуство на други елементи што не интерферираат со апсорпција на брановите должини на кои апсорбира испитуваниот елемент. Во тој случај не е потребно дополнително разделување на испитуваниот елемент од другите елементи присутни во примерокот за анализа и од остатокот на примерокот (матриксот). Тоа овозможува брза анализа и намалување на можностите за грешка. Сепак, мораме да напоменеме дека при мерењата во атомската апсорпциска спектрометрија интерференциите од различна природа мора да бидат земен предвид, заради неможноста целосно да се елиминираат.

Од друга страна, главен недостаток на AAS е неможноста да се добијат информации за хемиската форма на анализот (соединението во коешто е присутен испитуваниот елемент) и често пати не е возможно едновременно да се утврди присуството на повеќе елементи во примерокот за анализа, поради што е намалена примената на методот во квалитативната анализа. AAS главно се користи за **квантитативна** анализа на елементи, па оттука и доаѓа терминот „спектрометрија“ во името на оваа техника наместо „спектроскопија“.

¹ 1 ppm = 1 mg/kg

² 1 ppb = 1 µg/kg

³ 1 ppt = 1 ng/kg

Апсорпција на енергијата на зрачење од атоми (атомски апсорпциски спектри)

Атомската апсорпциска спектрометрија е заснована на апсорпција на изолирани бранови должини од електромагнетното зрачење од страна на атоми што се наоѓаат во гасовита состојба. За разлика од молекулите, атомите не вибрираат и не ротираат, поради што немаат вибрациска и ротациска енергија. Енергијата на атомите речиси целосно е определена од енергијата на нивните електрони (ако не се земе предвид транслаторната кинетичка енергија како и енергијата на ориентација на спинот на јадрото и на електроните, што имаат релативно мали вредности во однос на електронската енергија). Оттука, атомските апсорпциски спектри содржат само неколку тесни апсорпциски линии што се должат на електронските премини при апсорпција на зрачење од атомите.

Секој елемент, во атомските орбитали, има одреден број електрони што е карактеристичен за тој елемент. Состојбата на атомот во којашто тој има најниска електронска енергија се нарекува **основна состојба**. Ако на слободните атоми во гасовита состојба им се донесе точно определено количество на енергија ΔE , ќе дојде до апсорпција на енергијата од страна на атомите. Надворешните (валентни) електрони со апсорпција на енергија ќе се побудат и ќе поминат во состојба со повисока енергија. Фреквенциите или брановите должини на зрачењето апсорбирани од атомите може да се пресметаат од равенката $\Delta E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$. Апсорбираната енергија, ΔE е еднаква на разликата меѓу повисоката (побудената) и основната енергетска состојба.

Ако претпоставиме дека E_0 е енергијата на основната состојба, а E_1 , E_2 и E_3 се енергиите на побудените состојби (т.е. енергетски нивоа) и ако се познати вредностите за енергиите на нивоата, тогаш може да се пресметаат брановите должини на електромагнетните зрачења што ќе ги предизвикаат електронските премини од основното енергетско ниво E_0 во повисокото енергетско ниво (E_1 , E_2 и E_3):

$$\Delta E' = h \frac{c}{\lambda_1} = E_1 - E_0 \quad (3.1)$$

$$\Delta E'' = h \frac{c}{\lambda_2} = E_2 - E_0 \quad (3.2)$$

$$\Delta E''' = h \frac{c}{\lambda_3} = E_3 - E_0 \quad (3.3)$$

Апсорпциските линии што настануваат како резултат на премините помеѓу основната состојба и побудените електронски состојби се нарекуваат **резонантни линии**. Не е исклучена можноста за премин на електрони што веќе се наоѓаат во побудена состојба, во повисока (побудена) состојба при апсорпција на зрачење. Меѓутоа во AAS најголемиот број од премините започнуваат од основната состојба.

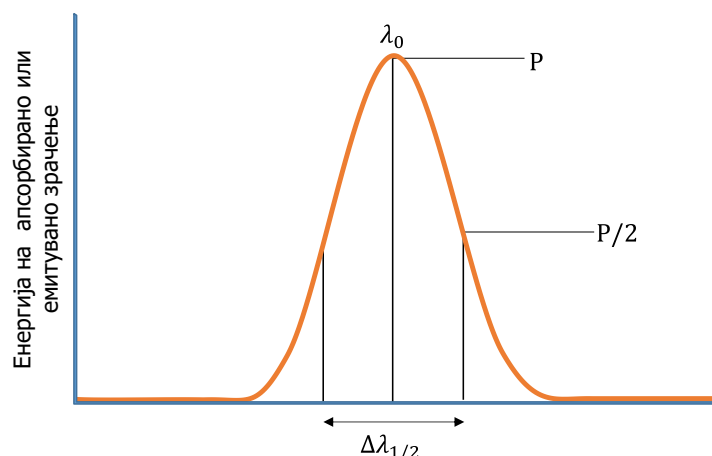
Квантната теорија ги дефинира електронските орбитали во атомот и ја предвидува нивната конфигурација со најниска можна енергија (од редоследот на пополнување на орбиталите со електрони). Имено, единаесетте електрони во атомот на натриумот во основната состојба ја имаат конфигурацијата: $1s^2 2s^2 2p^6 3s^1$. Внатрешните електронски нивоа (со вредности за главниот квантен број $n = 1$ и 2) се целосно пополнети со електрони. Во надворешното (трето, $n = 3$) електронско ниво се наоѓа само еден електрон. Овој електрон учествува во премините при апсорпција на зрачење од натриумовите атоми. Атомите во AAS може да ги апсорбираат зрачењата од ултравиолетовиот (UV) или од видливиот дел (Vis) од спектарот. Енергијата на UV/Vis зрачењето не е доволна да ги побуди електроните од внатрешните електронски нивоа, туку само електроните од надворешното електронско ниво (валентните електрони).

Бројот на енергетските нивоа во атомот може да се предвиди користејќи ги принципите на квантната теорија. Точните разлики во енергиите меѓу овие нивоа се добиени од студиите на атомските спектри. Овие нивоа може да се нанесат во т.н. *Гротрианови (Grotrian) дијаграми*. Тие претставуваат дијаграми на енергетските нивоа за даден атом, каде што на y -оската е нанесена енергијата на нивоата изразена во електрон волти (eV), а можните енергетски нивоа на атомот се дадени како хоризонтални линии. Енергетските нивоа се поделени поради тоа што електронот може да има две ориентации на спинот што овозможуваат да се побуди до две можни нивоа со слична енергија, па поради тоа да даде две можни апсорпциски линии, а не само една (синглет). При премин на натриумовиот атом од основната до првата побудена состојба, електронот прескокнува од 3s орбиталата во празната 3p орбитала (првата орбитала што следи по 3s орбиталата според вредноста на енергијата во растечка низа). Како резултат на двете ориентации на спинот што може да ги има побудениот електрон во 3p орбиталата доаѓа до поделба на две енергетски нивоа во рамките на 3p орбиталата (означени со $^2P_{1/2}$ и $^2P_{3/2}$). Според тоа, можни се два електронски премина од 3s во 3p. Овие енергетски нивоа меѓусебно малку се разликуваат во вредностите за енергијата, така што брановите должини што одговараат на овие премини се 589,5 и 589,0 nm, т.е. одговараат на добро познатите натриумови λ линии.

Ширина на спектралните линии

Ширината на атомските спектрални линии е од голема важност во атомската спектрометрија. На пример, тенките линии се од големо значење како за процесот на апсорпција, така и за процесот на емисија, затоа што ја намалуваат веројатноста за појава на интерференција како резултат на препокривање на спектрите.

Атомските апсорпциски и емисиски линии се опишуваат како симетрични дистрибуции на бранови должини околу средната бранова должина λ_0 , што всушност е брановата должина на максимумот на апсорбираното зрачење, односно брановата должина што одговара на максималниот интензитет на емитуваното зрачење. Енергијата на апсорбираното или емитуваното зрачење што соодветствува на λ_0 е еднаква на енергетската разлика меѓу двете квантни состојби (енергетски состојби) при апсорпцијата, односно емисијата на зрачење. Според Боровиот модел на атомот, ширината на атомските апсорпциски и емисиски линии треба да биде бесконечно мала, бидејќи линијата е резултат на премин на електронот помеѓу две одвоени, поединечно дефинирани енергетски состојби (т.е. постои само една вредност за енергијата на одреден квантен премин). Меѓутоа постојат неколку фактори што придонесуваат за ширење на спектралните линии, така што сите спектрални линии имаат одредена ширина (Слика 3.1).



Слика 3.1 Приказ на ефективна ширина на линија $\Delta\lambda_{1/2}$

Ширината на линијата или ефективната ширина на линијата $\Delta\lambda_{1/2}$ на атомската апсорпциска или емисиска линија се дефинира како ширина на половина од максимумот на линијата, изразена во единици на брановата должина.

На ширењето на атомските спектрални линии влијаат четири фактори, и тоа: Хајзенберговиот (*Heisenberg*) принцип за неодреденост, Доплеровиот (*Doppler*) ефект, ефектите на притисокот како резултат на судирите меѓу истородните и разнородните атоми во атомизерите и ефектите на електричното и магнетното поле.

1. Природната ширина на спектралните линии е определена со **Хајзенберговиот** принцип на неодреденост и од животниот век на електронот во побудена состојба. Имено, ако животниот век на електронот во двете состојби (на пр., основна и побудена) тежнее кон бесконечност, тогаш ширината на атомската спектрална линија што настанува при премин меѓу двете состојби тежнее кон нула. Во реални услови, додека животниот век на електроните во основната состојба е долг, нивниот животен век во побудените состојби е обично краток, од ред на големина од 10^{-7} до 10^{-8} s. Појавата на неодреденост во енергијата на електроните малку ја проширува спектралната линија и е позната како природна ширина на линиите (со ред на големина од 10^{-5} nm).

2. **Доплеровото** проширување настанува како резултат на кинетичкото движење на атомите кон детекторот и спротивно од него и резултира со проширување на спектралната линија со ред на големина од 10^{-3} – $5 \cdot 10^{-3}$ nm. Притоа доаѓа до намалување на брановата должина на зрачењето апсорбирано или емитирано од атомот што се движи кон детекторот, односно зголемување на брановата должина на апсорбираното или емитираното зрачење кога атомот се оддалечува од детекторот. Овој ефект е познат како Доплеров ефект и наједноставно може да се објасни со движење на автомобилот со активирана сирената кон набљудувач (пешак) во мирување. Како што автомобилот се приближува кон пешакот, тој сè посилено ја слуша неговата сирена, како резултат на зголемување на фреквенцијата на звучниот бран. Сирената сè послабо се слуша кога автомобилот се оддалечува од пешакот, поради намалувањето на фреквенцијата на звучниот бран. Истиот ефект се јавува и кај електромагнетните бранови. Доплеровото проширување зависи од атомската маса, од температурата и од брановата должина на зрачењето.

3. Проширувањето на линиите од притисокот или судирите произлегува од судирите меѓу атомите што апсорбираат или што емитираат зрачење со други атоми или јони во услови на вжештениот медиум во атомизерот. Судирите предизвикуваат мали промени во енергијата на основната состојба, а оттука и во вредностите на апсорбираните или емитираните бранови должини. Ова проширување, познато уште како **Лоренцово** (*Lorenze*) проширување, зависи од притисокот и од својствата на атомите.

4. **Старково** (*Starck*) проширување на спектралните линии настанува кога атомите што апсорбираат или што емитираат зрачење влегуваат во силно електрично поле. Во присуство пак на силно магнетно поле доаѓа до разделување на енергијата на електронските нивоа на атомите, при што доаѓа до појава на неколку апсорпциски линии за секој електронски премин. Овие линии се разделени една од друга за околу 0,1 nm, при што збирот на апсорбациите на линиите е идентичен со оној на оригиналната линија од којашто потекнуваат. Овој феномен е познат како **Земанов** (*Zeeman*) ефект. Со примената на надворешно магнетно поле Земановиот ефект на разделување се користи за да се подобри корекцијата на заднинската апсорпција (*background* апсорпција) во инструментите за атомска апсорпциска спектрометрија.

Ефект на температурата врз атомските спектри

Температурата има големо влијание врз односот на бројот на побудените и на непобудените атоми во атомизерот. Односот меѓу бројот на атомите во побудена и бројот на атомите во основната состојба може да се пресмета користејќи ја Максвел-Болцмановата (*Maxwell-Boltzmann*) равенка, позната како Болцманова дистрибуција:

$$\frac{N_1}{N_0} = \frac{g_1}{g_0} e^{-\Delta E/kT} \quad (3.4)$$

каде N_1 е бројот на атомите во побудената состојба; N_0 е бројот на атомите во основната состојба; g_1 и g_0 одговараат на бројот на состојби што имаат иста енергија во рамките на побуденото, односно основното ниво (g е познато како дегенерација на нивото); ΔE е разликата во енергиите на побудената и на основната состојба (во џули, J); k е Болцмановата константа = $1,381 \cdot 10^{-12}$ J/K; и T е апсолутната температура (во келвини, K).

На пример: со Максвел-Болцмановата равенка може да се пресмета дека само 1 атом ќе биде во побудена состојба на секои 10^{10} атоми (што се во основна состојба), ако пареа од цинк (Zn^0 гас) со резонантна апсорпција на 213,9 nm се загрее на температура од 3000 K. На цинковите атоми им е потребна поголема енергија за да преминат во побудена состојба. Затоа цинкот не може да се определи со техника на емисиска спектрометрија, ако за екситација се користи пламен (со температура до 3000 K). Од друга страна, атомите на натриумот се побудуваат многу полесно во однос на атомите на повеќето елементи. Но сепак, на 3000 K само 1 атом на натриум се побудува на секои 1000 атоми во основна состојба.

Во услови на висока температура во атомизерот на комерцијалните AAS системи, најголем дел од атомите се наоѓаат во најниската енергетска состојба (основна состојба). Многу мал број атоми се наоѓаат во побудени енергетски состојби E_1 , E_2 , E_3 и.т.н. Количеството на апсорбираното зрачење зависи, меѓу другото, од бројот на атоми што се наоѓаат во основна состојба со ниска енергија и коишто се слободни да апсорбираат зрачење и да преминат во побудена состојба. Поради тоа, апсорпцијата на зрачење е најголема од атомите што се наоѓаат во основната состојба. Премините од побудена на повисока побудена состојба се многу ретки, поради малиот број веќе побудени атоми. Оттука, за аналитички цели во AAS се користат само **резонантните линии од основната состојба**.

AAS се користи за квалитативна и квантитативна анализа на околу 70 елементи, од кои речиси сите се метали или металоидни елементи. Многу често се присутни само три или четири употребливи линии во UV/Vis подрачјето од спектарот за секој елемент (кај некои елементи бројот на линиите е помал). За разлика од металите и од металоидните елементи, неметалите не може да се побудат со UV зрачење ($\lambda > 190$ nm). Резонантните линии на неметалите лежат во вакуум UV подрачјето (100 - 200 nm). Поради присуството на воздух долж оптичкиот пат во AAS системите, неметалите не може директно да се определат. Но и покрај тоа, постојат индиректни методи што се користат за нивно определување.

Атомизација на примерокот

За да се добијат атомски спектри, потребно е елементите во примерокот за анализа да се преведат во гасовита состојба (гасовити атоми), за да може потоа да се определат со примена на апсорпциски, емисиски или флуоресцентни спектрални мерења. Слободните атоми во гасовита состојба се формираат во **атомизер** на висока температура, со процес наречен **атомизација**. Прецизноста и точноста на методите во атомската спектрометрија многу зависат од типот на атомизацијата и од методот на внесување на примерокот во *атомизерот* (местото на атомизација).

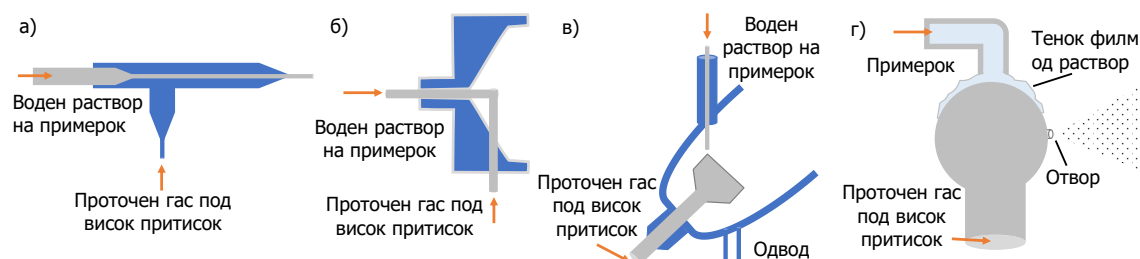
Методи на внесување на примерокот

Системот за внесување на примерокот во атомската спектрометрија овозможува внес на репрезентативен дел од примерокот во атомизерот на репродуцибилен начин, со висока ефикасност и без несакани ефекти од интерференција. Моносите за реализација на оваа цел многу ќе зависат од физичката и од хемиската состојба на анализот и матрицот на примерокот. Најчесто примерокот во атомизерот се внесува во форма на раствор (најчесто воден) или многу поретко во форма на суспензија. За примероци што тешко се раствораат, се применуваат методи што овозможуваат внесување на примероците во цврста состојба или во форма на fino иситнети прашоци. Општо, системите на внесување на примероците во цврста состојба се помалку репродуцибилни и повеќе подложни на грешки од системите на внесување на примероците во течна состојба.

1. Внесување примероци во форма на раствор

Во атомизерите растворите вообичаено се внесуваат со систем на *небулизација*, при што примероците се преведуваат во ситни капки (аеросол - магла од fino иситнети капки) со помош на млаз од компримиран гас. Проточниот гас го носи примерокот на местото каде што настанува атомизацијата. Постојат четири начини на внесување на растворените примероци во атомизерите:

а) Пневматска небулизација. Примерокот се раствора во воден медиум и преку небулизатор се внесува во атомизерот во форма на фина магла т.е аеросол. Најчестиот тип на небулизатор е концентрично-цевчестиот пневматски тип, каде што течниот примерок се вшмукува низ капиларна цевка со помош на проточен гас под висок притисок - Бернулиев (*Bernoulli*) ефект. Овој процес на транспорт на течности се вика *аспирација*. Гасот со голема брзина ја разбива течноста на мали фини капки, што потоа се носат во атомизерот. За овој тип на небулизација се користи и небулизатор со вкрстен проток, небулизатор со перфориран диск и Бабингтонов (*Babington*) небулизатор (Слика 3.2)



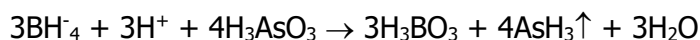
Слика 3.2 Видови пневматски небулизатори: а) концентрично-цевчест небулизатор, б) небулизатор со вкрстен проток, в) небулизатор со перфориран диск, г) Бабингтон небулизатор

б) Ултрасонична небулизација. Примерокот за анализа се носи на површината на пиезоелектричен кристал што вибрира со фреквенција од 20 kHz до неколку MHz. Овие небулизатори создаваат погусти и похомогени аеросоли отколку пневматските небулизатори.

в) Електротермална вапоризација (испарување). Примерокот се испарува во електротермален евапоратор, сместен во затворена комора, низ која протекува инертен гас (аргон) што го носи гасовитиот примерок во

атомизерот. Мала количина течен или цврст примерок се поставува на проводник (графитната прачка или танталова жица). Протекувањето на електрична струја низ проводникот предизвикува негово загревање и брзо испарување на примерокот. За разлика од системите на небулизација, коишто даваат континуиран сигнал, електротермалниот систем дава поединечен сигнал. Како што примерокот поминува низ атомизерот, сигналот на аналитот се зголемува до максимум, а потоа се намалува до нула.

г) *Техники на создавање хидриди.* Преку овие техники е овозможено внесување на примероци (во гасовита состојба), што содржат елементи како што се: арсен, антимон, калај, селен, бизмут, олово во атомизерот. Оваа постапка го **зголемува лимитот на детекција** за овие елементи за 10–100 пати. Бидејќи некои од овие елементи се многу токсични, нивното определување во ниски концентрации е многу значајно. Нивната токсичност, исто така, наложува добиените гасови да се спроведат на сигурен и ефикасен начин. Брзо добивање испарливи хидриди се постигнува со додавање мал волумен од 1% воден раствор на натриум борхидрид на закиселен воден раствор на примерокот што се наоѓа во затворен стаклен сад. Механизмот на формирање на хидриди е прикажан со реакцијата:



Испарливиот хидрид (во овој случај арсин) со помош на инертен гас се воведува во атомизерот. Атомизерот во овој случај е кварцна цевка што се загрева на неколку стотини степени (700-800 °C) со пламен или со електрична струја (печка), низ која поминува зрачење со определена бранова должина. Притоа доаѓа до термичка дисоцијација на хидридот и формирање слободни атоми на елементот (аналитот), чија концентрација се определува со мерење на апсорпциското или емисиското зрачење.

2. Внесување примероци во цврста состојба

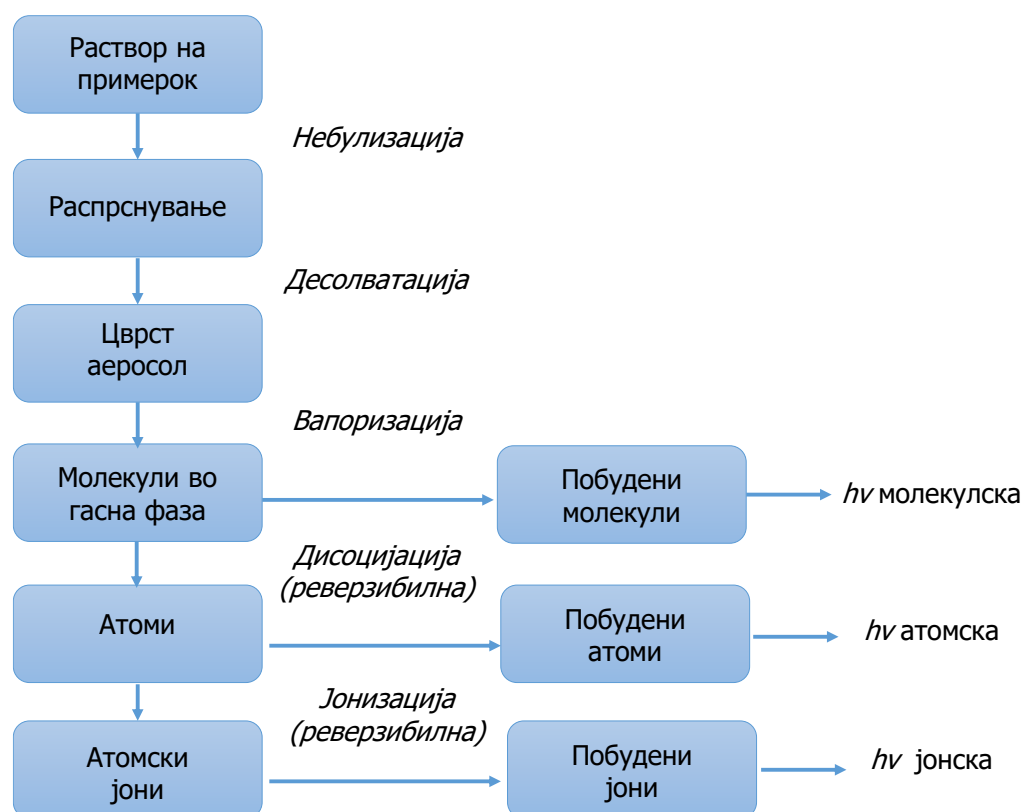
Со внесување цврсти супстанции во пламен (или плазма) атомизери се избегнува процесот на подготовка и растворање на примерокот. Меѓутоа при оваа постапка се појавуваат сериозни проблеми поврзани со калибрацијата, обезбедување на повторливоста при внесувањето на примерокот, прецизноста и точноста на мерењето.

Методи на атомизација на примерокот

Постојат два основни методи што се применуваат за атомизација на примерокот во атомската апсорпциска спектрометрија: пламената атомизација и електротермалната атомизација.

Пламена атомизација

Во пламениот атомизер растворот на примерокот се преведува во аеросол со гасот оксиданс (*небулизација*), што измешан со гасот што гори го носи примерокот во пламенот каде што се случува постапката на атомизацијата (Слика 3.3).



Слика 3.3 Процеси што се одвиваат за време на атомизација на примерокот

Атомизацијата во пламенот се одвива преку низа меѓусебно поврзани процеси, и тоа:

а) десолватација - процес на испарување на растворувачот при што се добива фин цврст молекуларен аеросол;

б) вапоризација - преведување на цврстите честички во гасовита состојба со понатамошно загревање;

в) дисоцијација - процес што води кон создавање атомски гас (облак од слободни атоми) со дисоцијација на најголем број молекули. Некои од овие атоми дисоцираат во јони на повисока температура (процес на *јонизација*).

Во зависност од температурата на пламенот, во него можат да бидат присутни молекули, атоми или јони што даваат молекулски, атомски и јонски емисионски спектри. Големиот број сложени процеси што се случуваат во пламенот укажува на фактот дека атомизацијата е најкритичен чекор во пламената спектрометрија и ја ограничува прецизноста на овој метод. Оттука, од голема важност е да се проучат карактеристиките на пламенот и факторите што влијаат врз нив.

Типови пламен

Во Табела 3.1 се дадени најчесто користените горивни и оксидирачки гасови што наоѓаат примена во пламената спектрометрија, како и приближните температурни подрачја што се добиваат со нивно мешање.

Табела 3.1 Карактеристики на пламените

Гас што гори	Оксиданс	Температура, °C	Максимум согорување Брзина (cm s^{-1})
Природен гас	Воздух	1700-1900	39-43
Природен гас	Кислород	2700-2800	370-390
Водород	Воздух	2000-2100	300-440
Водород	Кислород	2550-2700	900-1400
Ацетилен	Воздух	2100-2400	158-266
Ацетилен	Кислород	3050-3150	1100-2480
Ацетилен	Азот (I) оксид	2600-2800	285

Температурата на пламенот од 1700°C до 2400°C се добива со мешање на различни односи на горивни гасови и воздух како гас-оксиданс. На овие температури се атомизираат примероци што лесно се распаѓаат. За примероците што се стабилни на одредена температура, како оксиданс се користи кислород или азот (I) оксид. Кога овие оксиданси се мешаат со вообичаено користените горивни гасови, температурата на пламенот се движи од 2500°C до 3100°C. Брзината на согорување е особено значајна, бидејќи пламенот е стабилен само во одредени подрачја на проток на гасот.

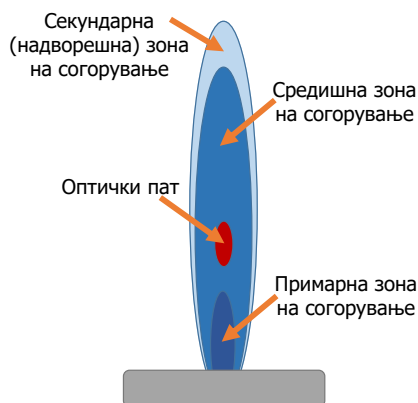
Нискотемпературните пламени (од 1750°C до 1850°C) што се добиваат со согорување пропан или природен гас во воздух (како оксиданс), имаат доволна енергија за добивање спектри на алкалните метали. Бидејќи бројот на други елементи што може да се побудат со овој пламен е мал, добиените спектри се едноставни, а спектралните линии може лесно да се изолираат дури и со помош на апсорпциски (стаклени) филтри.

Пламенот што настанува со согорување на ацетилен во воздух (чијашто температура се движи од 2100 до 2400°C) се користи многу често во ААС испитувањата. Овој пламен не може да се користи за определување алуминиум, силициум, земноалкални метали и ванадиум, бидејќи се создаваат нивни стабилни оксиди, чија атомизација е непотполна во тој температурен интервал.

За добивање на емисионските спектри на бројни елементи, се употребува ацетиленот како горивен гас и кислород или азот (I) оксид како гас-оксиданс. Тие смеси даваат пламен со температура од 2950°C до 3050°C.

Структура на пламенот

Значајни делови на пламенот се: примарна зона на согорување, средишна зона и секундарна (надворешна) зона на согорување. Појавата и големината на овие зони ќе зависи од гасот што гори и оксидансот, како и од нивниот однос при мешањето. Средишната зона е најзначајниот дел од пламенот за добивање слободни атоми, за разлика од примарната зона каде што вообичаено не се постигнува топлотна рамнотежа и секундарната зона каде што постои можност од добивање стабилни молекуларни оксиди (Слика 3.4). Во однос на температурниот профил на пламенот, утврдено е дека максималната температура се постигнува на околу 1 cm над примарната зона на согорување.



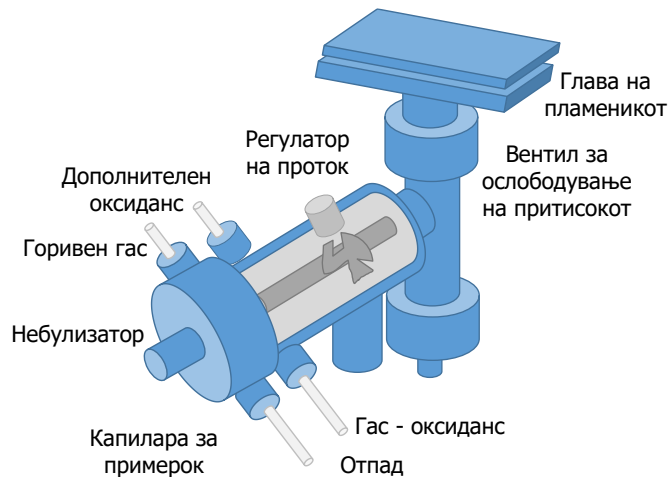
Слика 3.4 Делови на пламен

Пламен атомизери

Во пламената спектрометрија се применуваат два типа пламен атомизери: пламеник со турбулентен проток и пламеник со ламинарен проток.

Кај пламеникот со турбулентен проток (или пламеник со потполно согорување) распршувачот (небулизаторот) и пламеникот се вградени во една целина. Примерокот се внесува во пламенот преку капилара. На врвот од капиларата под дејство на протокот на горивните гасови околу капиларата доаѓа до распршување на примерокот и негово внесување во пламенот. Брзината на внесување на примерок во пламеникот е 1-3 mL во минута. Предност на пламеникот со турбулентен проток е можноста за внесување релативно големи и репрезентативни количини од примерокот во пламенот. Недостаток на овој пламеник е релативно краткиот пат на примерокот низ пламенот и можноста за запушување на врвот од капиларата. Многу ретко се користи во пософистицираните инструменти за атомска спектрометрија.

Современите инструменти за атомска апсорпциска спектрометрија исклучиво користат пламеник со ламинарен проток (или пламеник со претходно мешање) (Слика 3.5). Примерокот се распршува со проток на гасот-оксиданс покрај врвот на капиларата. Аеросолот што притоа настанува, се меша со горивниот гас и протекува низ повеќе препреки што овозможуваат пропуштање само на најфините небулизирани капки од примерокот. Сите заедно во смеса (аеросолот, горивниот и гасот-оксиданс) влегуваат во пламеникот со процеп, а пламенот што притоа се добива има должина од 5 - 10 cm. Предност на пламеникот со ламинарен проток е добивањето на подолг пламен, со што се зголемува осетливоста и репродукцибилноста на методот. Ретко се јавува запушување на врвот од капиларата преку која се внесува примерокот во системот. Недостатоци на пламеникот се малата брзина на внесување на примерокот и можноста за селективно испарување на смешаните растворувачи во комората на пламеникот, што може да предизвика систематски грешки.



Слика 3.5 Пламеник со ламинарен проток

Во поглед на репродукцибилноста, пламената атомизација има предност во однос на другите техники на атомизација во случај кога примерокот се внесува во форма на раствор. Меѓутоа, во поглед на ефикасноста на внесувањето на примерокот, а со тоа и на осетливоста другите техники имаат предност. Постојат две причини за помалата ефикасност на внесување на примерокот, а тоа се: големата количина примерок што се внесува и краткото време на престој на поединечните атоми во оптичкиот пат во пламенот ($\approx 10^{-4}$ s).

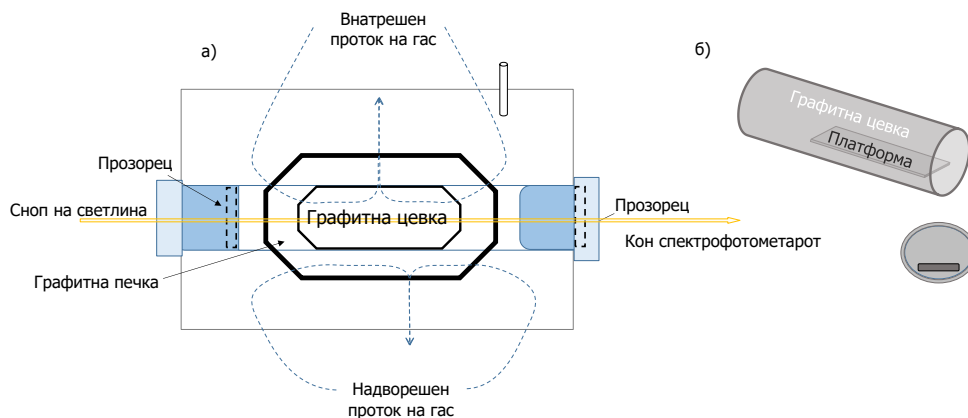
Електротермална атомизација

Електротермалниот атомизер обезбедува поголема осетливост, бидејќи целиот примерок се атомизира за кратко време, а просечното време на престој на атомите во оптичкиот пат е релативно долго (секунда или повеќе).

Во електротермалниот атомизер најпрво се испарува растворувачот (неколку микролитри) од примерокот на ниска температура, а потоа се врши спалување на органските материи на висока температура во електрично загреана графитна цевка (печка) или графитна кивета. По спалувањето, струјата нагло се зголемува до неколку стотини ампери, што предизвикува зголемување на температурата на приближно 2000°C до 3000°C во зависност од елементот. Атомизацијата на примерокот се случува за време од неколку милисекунди до неколку секунди. Апсорпцијата на зрачење од атомизираните честички се мери во делот непосредно над усвитената површина.

На Слика 3.6 а е даден пресек на електротермален атомизер, сместен пред влезниот отвор на монохроматорот. Атомизацијата настанува во цилиндричната графитна цевка отворена на двата краја, што има средишен отвор за внесување на примерокот со микропипета. Графитната цевка е долга околу 5 cm, со пречник нешто помал од 1 cm. Примерокот се внесува директно во графитната цевка што се загрева со електрична струја. Графитната цевка е сместена во метална комора што овозможува нејзино ладење со протекување вода. Протокот на гасот во и околу графитната цевка овозможува истовремено спречување на влезот на воздухот од надвор и спалување на графитната цевка. Парите од матриксот создадени за време на стадиумите на загревање, испарување и жарење, пред процесот на атомизација, се отстрануваат од цевката со употреба на внатрешен проток на инертен гас, најчесто аргон. Светлосниот сноп поминува низ средината на цевката. Системот на графитна цевка овозможува да се намали брзината на гасниот проток за време на атомизацијата на елементите, па дури и сосема да се запре со цел да се постигне најдолго можно престојување на слободните атоми во

светлосниот сноп. Со тоа се овозможува најголема можна апсорпција и соодветно - најголема можна осетливост што може да се зголеми за 100 до 1000 пати. За зголемување на осетливоста придонесува краткото време на атомизација на примерокот и малиот волумен/маса за анализа. На истата слика под б) е прикажана графитната цевка со платформа по Лвов (*L'vov*) што често се користи во електротермална атомизација. Платформата е направена од графит и е сместена под отворот за внесување на примерокот. На неа примерокот се испарува и спалува. При брзо зголемување на температурата во цевката, атомизацијата е забавена бидејќи примерокот не е поставен директно на сидот на цевката. Атомизацијата се случува во околина во која нема брза промена на температурата, при што се добиваат репродуцибилни пикови.



Слика 3.6 а) Пресек на електротермален атомизер, б) Платформа по Лвов и нејзина позиција во графитната цевка.

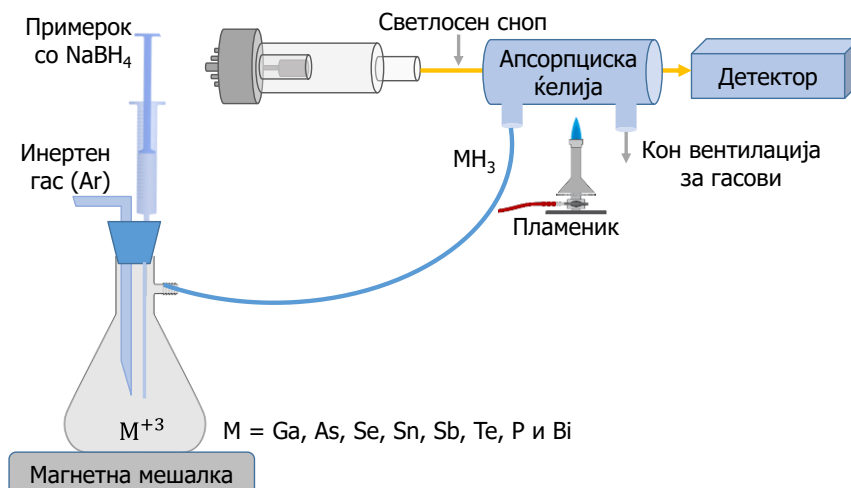
Предноста на електротермалниот атомизер е големата осетливост - во релативно мал волумен од примерокот. Вообичаено се користат волумени помеѓу $0,5 \mu\text{L}$ и $10 \mu\text{L}$. Во вакви услови, апсолутните граници на детекција лежат во подрачјето од 10^{-10} до 10^{-13} g од аналитот. Покрај тоа, освен раствори, можат да се анализираат хомогени суспензии, емулзии и прашкасти супстанции. Недостаток на електротермалниот атомизер е помалата прецизност, подолгото време за анализа (по неколку минути за елемент) и малиот линеарен опсег (помал од два реда на величини). Како резултат на тоа, електротермалната атомизација се користи во случаи кога со пламената (или плазма) атомизација не може да се постигнат соодветните лимити на детекција.

Исто така, постојат и неколку други техники на атомизација. Меѓу нив најпознати се **атомизација со хидриден систем** и **атомизација на ладни пареи**.

Беспламената атомизација на ладни пареи е метод на атомизација што се користи само за определување на живата, бидејќи таа е единствениот метал што има значителен парен притисок на собна температура. Определувањето на живата во различни примероци е особено значајно заради токсичноста на органските живини компоненти и нивната широка распространетост во животната околина. Метод од избор за овие анализи е ладно испарување проследено со атомска апсорпциска спектрометрија. За изведување на овие анализи живата хемиски се преведува во меркури јони (Hg^{2+}) под дејство на оксидирачка смеса од азотна и сулфурна киселина. Добиените меркури јони се редуцираат до метална жива (елементарна жива) под дејство на калај (II) хлорид SnCl_2 или натриум борхидрид NaBH_4 . Реакцијата се одвива во затворен систем. Парите на живата со струја од

инертен гас се воведуваат во апсорпциската ќелија што е поставена на оптичкиот пат на светлосниот сноп.

Шематски приказ на атомизација со хидриден систем (описана кај методите за внесување на примероците во форма на раствор, со техника на создавање хидриди) е прикажан на Слика 3.7.



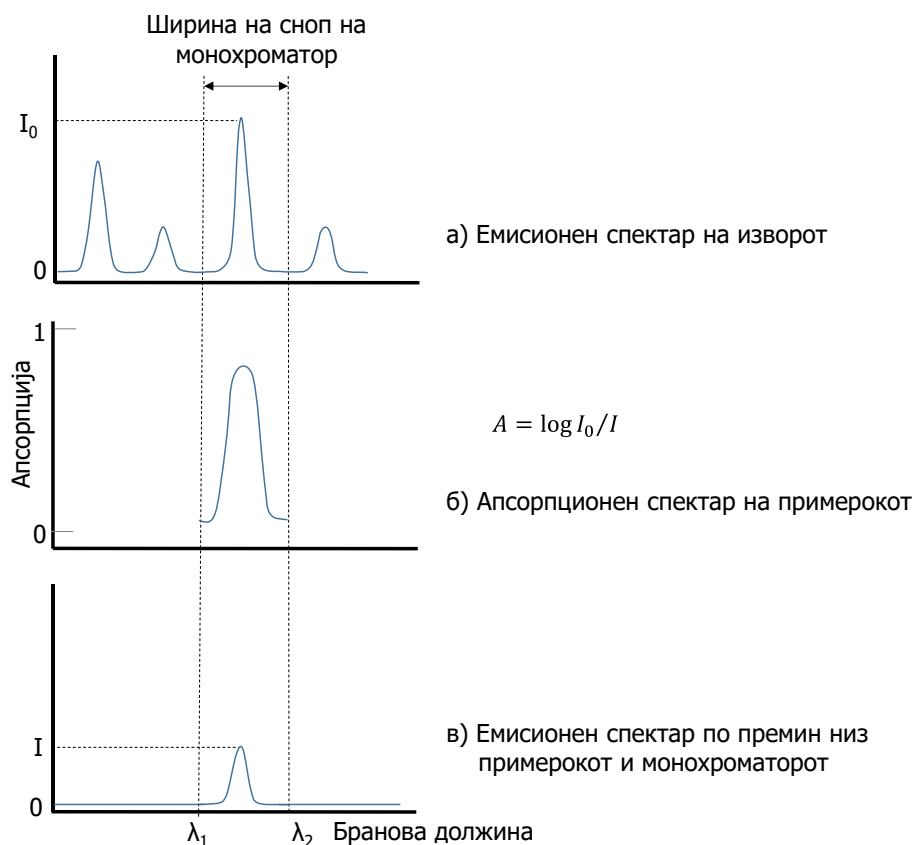
Слика 3.7 Атомизација со хидриден систем за атомска апсорпциска спектрометрија

Инструменти за атомска апсорпциска спектрометрија

Инструментот за атомска апсорпциска спектрометрија се состои од: извор на зрачење, атомизер и систем за мерење на апсорбираното зрачење.

Извори на зрачење

Аналитичките методи што се засноваат на атомската апсорпција се високо специфични, бидејќи атомските апсорпциски линии се извонредно тесни (0,002 nm до 0,005 nm) и бидејќи енергијата потребна за електронски премини во атомите е карактеристична за секој елемент. Наспроти тоа, тесните линии создаваат проблем во квантитативната анализа, што не постои кај молекулската апсорпција. Познато е дека за да се обезбеди линеарна зависност меѓу аналитичкиот сигнал (апсорбанцијата) и концентрацијата (Беров закон), потребно е снопот на зрачење од изворот да биде тесен во однос на ширината на апсорпцискиот пик. Дури и квалитетните монохроматори имаат ефективни ширини на светлосниот сноп што се значајно поголеми од ширината на атомските апсорпциски линии (што доведува до инструментално отстапување од Беровиот закон, во случај кога се користи извор со континуирано зрачење). Проблемот со ограничената ширина на атомските апсорпциски пикови е решен со употреба на линиски извори на зрачење со ширина на сноп помала од ширината на апсорпциските пикови. На пример, лампа со живини пареи се користи како надворешен извор на зрачење за определување на жива. Атомите на жива во гасовита состојба побудени по електричен пат, се враќаат во основната состојба преку емисија на зрачење со бранови должини еднакви со оние што ги апсорбираат живините атоми (од примерокот) во пламенот. Бидејќи ламбата работи на температура пониска од онаа во пламенот, Доплеровото и Лоренцовото проширувањето на живините емисиски линии е помало од соодветното проширување на апсорпциските пикови на примерокот во пламенот. Како последица од тоа, ефективната ширина на линиите што ги емитува живината лампа е многу помала од ширината на апсорпциските пикови на примерокот во пламенот.



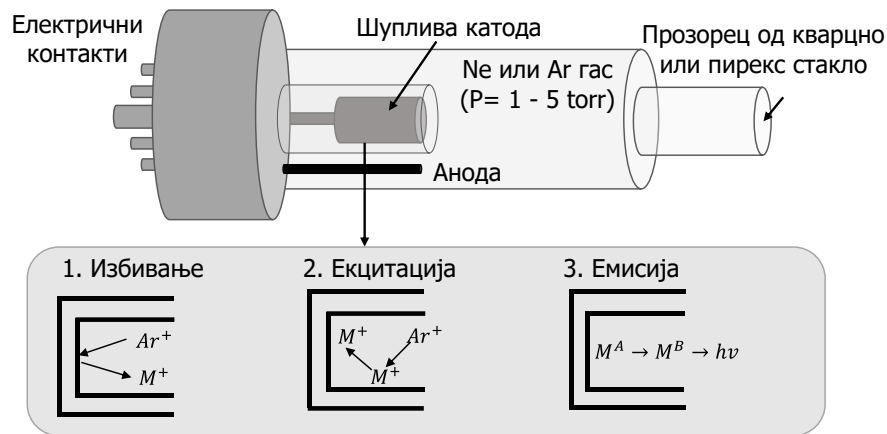
Слика 3.8 Апсорпција на резонантни линии на атоми

На Слика 3.8 а се прикажани четири тесни емисиски линии на еден типичен атомски извор. Само една од нив е изолирана со помош на филтер или монохроматор. На сликата под б е даден апсорпцискиот спектар на примерокот во пламен во подрачјето на бранови должини од λ_1 до λ_2 . Притоа ширината на апсорпцискиот пик е поголема од ширината на емисиската линија на изворот. Интензитетот на влезниот сноп на зрачење од изворот I_0 се намалува при премин низ пламенот (примерокот) до вредност I (Слика 3.8 в); апсорбанцијата ($A = \log I_0/I$) е линеарно зависна од концентрацијата на анализот во примерокот (бидејќи ширината на емисиската линија на изворот е помала од ширината на апсорпцискиот пик во пламенот).

Во инструментите за атомска апсорпциска спектрометрија се употребуваат два вида ламби: **ламби со шуплива катода** и **ламби со електрично празнење**.

Ламби со шуплива катода (HCL-ламби, Hollow cathode lamps)

Ламбите со шуплива катода се најчесто применувани ламби во атомската апсорпциска спектрометрија. Составени се од волфрамова анода и цилиндрична катода, херметички затворени во стаклена цевка исполнета со инертен гас (неон или аргон) под притисок од 100 до 600 Pa. Катодата е направена од металот што се анализира или, пак, што служи како подлога на слој од тој метал (Слика 3.9).



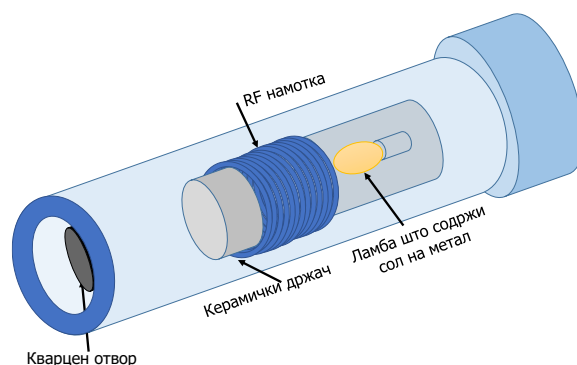
Слика 3.9 Пресек на ламба со шуплива катода

Кога на електродите ќе се примени потенцијал од околу 300 V настанува јонизација на инертниот гас. Притоа како резултат на движењето на јоните на инертниот гас кон катодата, а електроните кон анодата, се создава струја од околу 5 до 15 mA. Ако потенцијалот меѓу електродите е доволно голем, катјоните на инертниот гас се здобиваат со доволна енергија за избивање метални атоми од површината на катодата. Притоа се создава облак од метални атоми. Атомите на металот во судир со јоните на инертниот гас примаат енергија и поминуваат во побудена состојба. При враќање во основната состојба доаѓа до емисија на зрачење со определена бранова должина карактеристична за металот. Избиените атоми во ламбата може да преминат назад на површината на катодата или да се исталожат на стаклените ѕидови на ламбата.

За секој елемент потребна е различна ламба, но постојат и мултиелемент ламби што содржат поголем број елементи, поради што е потребен филтер за селекција на брановата должина. Примената на HCL ламбата е ограничена за определување на некои помалку стабилни метали (арсен, селен и кадмиум) заради нискиот интензитет на емитираното зрачење.

Ламби со електрично празнење (EDL-ламби, *Electrodeless discharge lamps*)

Ламбите со електрично празнење се извори на атомски линиски спектри, а интензитетот на зрачењето им е за еден до два реда величина појако од она на ламбите со шуплива катода. EDL-ламба се состои од херметички затворена кварцна цевка што содржи инертен гас (аргон под притисок од неколку стотини Pa) и мало количество на метал (што е идентичен со испитуваниот елемент), во чиста состојба или во облик на негова сол. Не содржи електроди, а јонизацијата на инертниот гас што понатаму ги ексцитира атомите на металот се врши под дејство на силно радиофреквентно поле или под дејство на микробраново зрачење. Овие ламби овозможуваат највисок интензитет на зрачење и најтесни емисионски линии. Меѓутоа нивните карактеристики не се толку сигурни како на ламбите со шуплива катода (Слика 3.10).



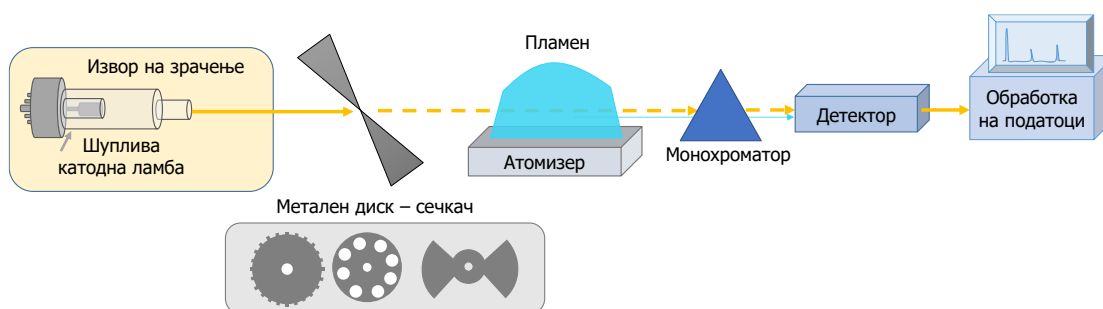
Слика 3.10 Ламба со електрично празнење

Модулација на изворот

Во инструментите за атомска апсорпциска спектрометрија неопходно е да се отстранат интерференциите предизвикани од емисијата на зрачење од пламенот. Голем дел од емитираното зрачење од пламенот се отстранува со помош на монохроматорот. Сепак, термички побудените атоми на елементот во примерокот за анализа, чиј број е незначителен во однос на непобудените атоми, во пламенот емитираат зрачење со бранова должина на која е поставен монохроматорот. Бидејќи ова зрачење не се отстранува, претставува можен извор на интерференција.

Со цел да се елиминираат ефектите од пламената емисија на зрачење (од термички побудените атоми на елементот и од матриксот), неопходно е да се модулира излезното зрачење на ламбата, така што нејзиниот интензитет ќе пулсира со постојана фреквенција. На тој начин, детекторот прима два вида сигнали: испрекинат од изворот (ламбата) и непрекинат од пламенот и ги претвора во соодветни електрични сигнали (струја). Релативно едноставниот електронски систем ги отстранува немодулираните непрекинати сигнали од пламенот, а ги пропушта испрекинатите сигнали од изворот.

Модулацијата најчесто се постигнува со употреба на кружен метален диск (*chopper*) на патот на снопот на зрачење меѓу изворот и пламенот. Наизменично отстранетите четвртини од дискот овозможуваат минување на светлината. Ротацијата на овој диск со постојана брзина овозможува испрекинато пропуштање на светлинскиот сноп со определена фреквенција. Алтернативно, изворот може да се намести на испрекинатата емисија на зрачење со одреден интензитет (Слика 3.11).

Слика 3.11 Приказ на метален диск - сечкач (*chopper*) на патот на снопот на зрачење меѓу изворот и атомизерот

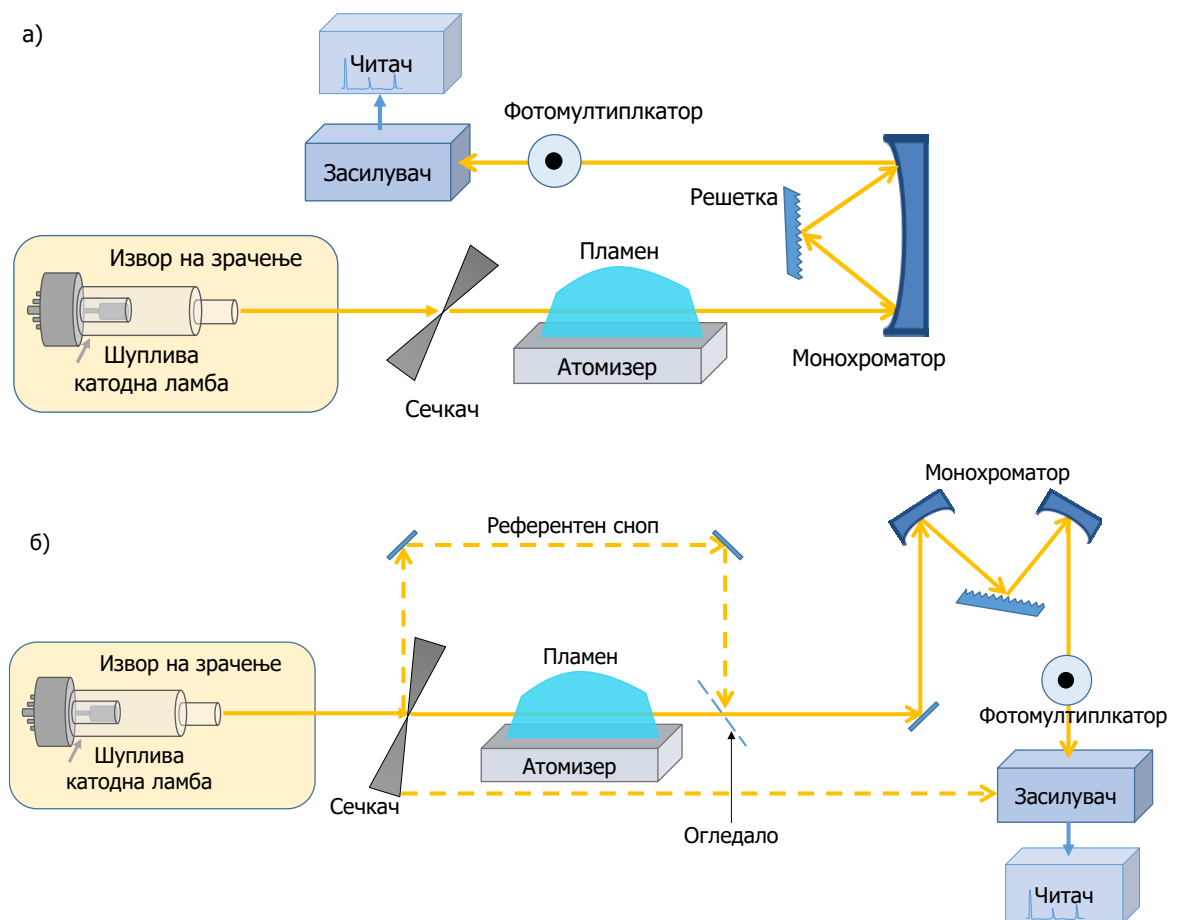
Систем за мерење на апсорбираното зрачење

Системот за мерење на апсорбираното зрачење е составен од: **монохроматор** (за спректрална дисперзија на светлината со излезен отвор за селекција на резонантната линија), **детектор** (фотомултипликатор што ја претвора енергијата на фотоните во електричен импулс), **засилувач** и **регистратор на сигналот**.

Пламен спектрофотометри

Во атомската апсорпциска спектрометрија се користат инструменти со еден сноп или со два снопа на зрачење. Мерењата во атомската апсорпциска спектрометрија најчесто се изведуваат со помош на инструменти во кои како монохроматор се користи дифракциска решетка. На Слика 3.12 шематски е прикажан инструмент со два снопа на зрачење. Светлината што доаѓа од шупливата катода со помош на огледала се дели на два снопа. Еден поминува низ пламенот, а другиот покрај него. По соединувањето доаѓаат до монохроматорот и детекторот што го регистрира односот на интензитетите на овие два снопа.

Референтниот светлински сноп кај инструментите со два снопа не минува низ пламенот, па така не може да се изврши корекција на намалувањето на интензитетот на зрачење, што настанува поради апсорпција или расејување на светлинскиот сноп од пламенот. Методите за корекција на овие губитоци ќе бидат објаснети во делот што се однесува на интерференциите во AAS.



Слика 3.12 Пламен спектрофотометар: а) со еден сноп на зрачење, б) со два снопа на зрачење.

Интерференции во атомската апсорпциска спектрометрија

Во атомските апсорпциски методи се јавуваат два вида интерференции. *Спектралните* интерференции се јавуваат кога апсорпцијата или емисијата на интерферирачката супстанција ги прекрива или е толку блиску до апсорпциските или емисиските линии на анализот, што не е можно да се постигне добра резолуција меѓу линиите со помош на монохроматорот или кога некоја (интерферирачка) супстанција го расејува влезното зрачење од изворот. *Хемиските* интерференции се резултат на различните хемиски процеси што може да се случат во текот на атомизацијата, а кои ги менуваат апсорпциските карактеристики на анализот.

Спектрални интерференции

При употреба на ламби со шуплива катода многу ретко се јавуваат интерференции како резултат на преклопување на спектралните линии, затоа што тие даваат многу тесни емисиски линии. Ако дојде до преклопување на блиските спектрални линии на анализот и интерферирачкиот елемент, за анализа може да се користат други линии на анализот или пак да се отстрани интерферирачкиот елемент.

Спектрални интерференции настануваат и како резултат на присуството на честички или молекулски продукти од согорувањето во пламенот, што го расејуваат зрачењето, односно даваат широки апсорпциски ленти. Во двата случаи се намалува интензитетот на пропуштениот сноп зрачење, што дава позитивни аналитички грешки. Кога причината за појава на тие продукти е само смесата од горивниот и оксидирачкиот гас, може да се изврши корекција со употреба на слепа проба. Спектралните интерференции, што настануваат заради расејување на светлината од продукти на атомизацијата, често се јавуваат при аспирација во пламенот на концентрирани раствори што содржат елементи како титан, циркониум и волфрам, што градат стабилни оксиди во пламенот. Настанатите честички на металните оксиди што имаат поголем дијаметар од брановата должина на зрачењето го расејуваат влезниот светлински сноп.

Поголеми потешкотии се јавуваат кога апсорпцијата или расејувањето на зрачењето потекнува од матриксот на примерокот. Се јавува позитивна аналитичка грешка како резултат на намалување на интензитетот на пропуштениот сноп на зрачење од компонентите на матриксот. Овие интерференции не се толку чести во пламената спектрометрија и можат да се избегнат со промена на аналитичките параметри како што се температурата на пламенот или односот на горивниот и оксидирачкиот гас. Освен тоа, кога е познат изворот на интерференција, во примерокот и во стандардите може да се додаде вишок од интерферирачката супстанција. Додадениот вишок во стандардите е поголем во однос на концентрацијата во матриксот на примерокот, заради што интерференцијата од матриксот на примерокот станува незначителна. Во минатото, интерференцијата од матриксот претставувала поголем проблем при електротермалната атомизација, т.е претставувала една од главните причини за лошите резултати кај беспламените методи. Денес со усовршување на технологијата, овој тип на интерференции се сведени на ниво како кај пламен атомизацијата.

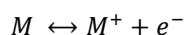
Хемиски интерференции

Хемиските интерференции се многу повообичаени од спектралните и може да се отстранат со избор на соодветни работни услови. Највообичаениот тип на хемиска интерференција е добивање слабо испарливи соединенија при реакција на анализот и некој анјон (интерферирачка супстанција). Како резултат на тоа се

намалува брзината на атомизација на примерокот и вредноста за апсорбацијата. На пример, намалување на апсорбацијата при анализа на калциумот се забележува при зголемување на концентрацијата на сулфатните или на фосфатните јони што со калциумот градат слабо испарливи соли. Овие интерференции се отстрануваат со зголемување на температурата или со додавање на т.н. „ослободувачки“ реагенси, чии катјони првенствено реагираат со интерферирачкиот анјон и ја спречуваат неговата реакција со анализот (на пример, додавање на вишок стронциумови или лантанови јони се намалува интерференцијата од фосфатите при одредувањето на калциумот). Постојат и примери на катјонска интерференција. На пример, алуминиумот може да даде пониски резултати при определувањето на магнезиумот, како резултат на формирање на стабилни алуминиум/магнезиумови компоненти (оксиди).

Различната тенденција на металните оксиди и хидроксиди да дисоцираат во пламен често е причина за појава на хемиска интерференција. Оксидите на алкалните метали лесно дисоцираат во пламен на слободни метални атоми, што резултира со висок интензитет на спектралните линии. Оксидите на земноалкалните метали се релативно стабилни. Присуството на молекулски ленти во нивниот спектар е резултат на малата дисоцијација на нивните оксиди во пламен. Освен на многу високи температури, молекулските ленти се поинтензивни од спектралните линии на атомите или на јоните на земноалкалните метали. Оксидите на алуминиумот, ванадиумот и титанот, исто така, не дисоцираат лесно во пламен. Овие интерференции се отстрануваат со употреба на пламени со многу висока температура или гасни смеси за согорување со висок процент на горивен гас (дисоцијацииските рамнотежи⁴ се поместуваат кон создавање слободни метални атоми).

Во горивните смеси со воздух како гас-оксиданс, мала е јонизацијата на атомите и молекулите. Меѓутоа во пламените со висока температура во кои како гас-оксиданс се користи кислород или азот (I) оксид, јонизацијата е значајна:



Најчесто спектарот на атомскиот или на молекулскиот јон (M^+) е различен од спектарот на атомот или на молекулата (M), што може да доведе до грешки во резултатите. Бидејќи и јонизацијата е рамнотежен процес, со поместување на рамнотежата кон лево се сузбива јонизацијата и интерференциите што произлегуваат од неа. Како *сузбивачи на јонизацијата* често се користат метали со низок јонизационски потенцијал (калиум, рубидиум, цезиум) што лесно јонизираат и даваат релативно голема концентрација на електрони во пламен. На тој начин ја поместуваат јонизационската рамнотежа кон лево.

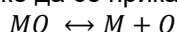
Интерференции може да се јават и поради различните физички својства на анализата и на стандардниот раствор (вискозитет, површински напон, густина). Разликите во овие својства доведуваат до разлики во степенот на распрскувањето. Проблемот се решава со додавање на т.н. спектрохемиски пуфери за изедначување на физичките својства на анализата и на стандардниот раствор.

Аналитички техники во атомската апсорпција

Подготовка на примерокот

Примерокот што се внесува во ексцитациониот извор мора да биде во форма на раствор (најчесто воден раствор), што е недостаток на пламен-спектроскопските

⁴ Дисоцијационска рамнотежа општо може да се прикаже со равенката:



каде што MO е метален оксид, а M слободен метален атом

методи. Многу примероци за анализа, како, на пример почва, животински ткива, делови од растенија, продукти на нафтата и минерали не се раствораат во вообичаено користените растворувачи, поради што е потребна претходна обемна подготовка за да се добие раствор на анализот во форма подготвена за атомизација. Разградувањето и фазите во подготовката на растворот често пати бараат многу време и внесуваат повеќе грешки отколку спектроскопското мерење.

Разградувањето на материјалот вообичаено се врши со ригорозен третман на примерокот на висока температура при што постои можност за губиток на анализот со испарување или во вид на честици во чадот. Исто така, реагенсите што се употребуваат за разградување на примерокот може да бидат причина за одредени хемиски или спектрални интерференции.

Некои од општите методи што се користат за разградување и растворање на примероците вклучуваат третман со топли минерални киселини; оксидација со течни реагенси, како на пример сулфурна, азотна или перхлорна киселина (влажно спалување); согорување во кислородна бомба или друг херметички затворен сад за да се избегне губиток на анализот; жарење на висока температура; соединување на висока температура со реагенси, како што се: борниот оксид, натриум карбонатот, натриум пероксидот или натриум пиросулфатот.

Една од предностите на електротермалната атомизација е што некои примероци можат да се атомизираат директно со што се избегнуваат фазите во подготовка на растворот за анализа.

Методи на квантитативно определување

Квантитативната анализа во атомската апсорпциска спектрометрија се врши, како и кај другите пламени техники на фиксна бранова должина со мерење и споредување на апсорбанциите добиени од стандардните раствори и испитуваните примероци. Резултатите најчесто се добиваат преку конструкција на баждарен дијаграм и метод на стандардни додатоци.

Метод на директна калибрација

Квантитативното определување со атомска апсорпција се заснова на Беровиот закон (апсорбанцијата е директно пропорционална на концентрацијата). Методот на директна калибрација опфаќа конструирање баждарен дијаграм од серија на стандардни раствори на испитуваниот елемент. Но отстапувањето од баждарниот дијаграм е доста често и многу тешко може да се изведуваат анализи без експериментално потврдување на линеарноста. Поради тоа, баждарниот дијаграм што се користи за определување на концентрацијата на анализот треба да го опфати концентрациското подрачје на испитуваниот анализ и да се повторува периодично.

Метод на стандардни додатоци

Методот на стандардни додатоци е широко употребуван метод во атомската апсорпциска спектрометрија, заради тоа што овозможува делумно или целосно отстранување на хемиските или на спектралните интерференции предизвикани од матрицот на примерокот.

Бидејќи баждарниот дијаграм на стандардните додатоци се конструира за одреден примерок, тој не може да се искористи за определување содржина на друг примерок со ист анализ.

Атомска емисиска спектрометрија (AES)

Атомската емисиска спектрометрија (*Atomic Emission Spectrometry, AES*) го проучува зрачењето емитирано од побудените атоми и моноатомски јони. Побудените атоми и јони се релаксираат до основната состојба, при што често доаѓа до емисија на електромагнетно зрачење, давајќи линиски спектри во видливото и UV подрачјето од електромагнетниот спектар. Емисиските линии на атомите или на јоните може да се искористат за квалитативна и за квантитативна анализа на елементите присутни во примерокот. Во минатото атомската емисиска спектрометрија се засновала на атомизација и побудување со пламен, електричен лак и електрична искра. Овие методи сè уште имаат значајна примена за анализа на металите.

Денес плазма изворите се најзначајните и најшироко употребувани извори во атомската емисиска спектрометрија, како што е индуктивно спрегнатата плазма (*Inductively coupled plasma, ICP*). Главните разлики меѓу различните видови AES техники се изворите на побудување и количеството енергија што се пренесува на атомите или на јоните (ефикасноста на изворот за побудување). Пламените извори даваат релативно ниско количество енергија на атомите настанати во пламенот. Притоа електроните се ексцитираат само на пониските побудени енергетски состојби што резултира со појава на едноставни емисиски спектри. Во пракса, пламената емисиска спектрометрија е најупотреблива за алкалните и за земноалкалните метали што лесно се побудуваат. Електричниот лак и електричната искра произведуваат значително повисока енергија од пламенот. Голем број елементи може да бидат атомизирани и побудени во овој вид извори. Повисоката енергија што ја примаат електроните во овие извори предизвикува нивна ексцитација на повисоки побудени енергетски состојби што резултира со појава на спектри со многу емисиски линии.

Плазма изворите, како ICP и еднонасочниот извор на плазма (*Direct current plasma, DCP*) се високоенергетски извори што овозможуваат побудување на голем број елементи, што резултира со појава на спектри богати со емисиски линии. Примената на плазма изворите во атомската емисиска спектрометрија овозможува истовремено да се определат повеќе елементи, метали и металоиди, но и некои неметали (хлор, бром, јод и сулфур). Друга предност на високоенергетските плазма извори е можноста за определување ниски концентрации на елементите што имаат склоност да формираат термостабилни компоненти (на пример, оксиди на бор, фосфор, волфрам, ураниум и циркониум). Конечно, методите базирани на плазма изворите се применуваат во широко концентрациско подрачје од неколку реда величини (може да се определат концентрации на аналитот од редот на ppb до концентрации од редот на %), за разлика од апсорпциските методи што се применуваат во концентрациско подрачје од два до три реда величини.

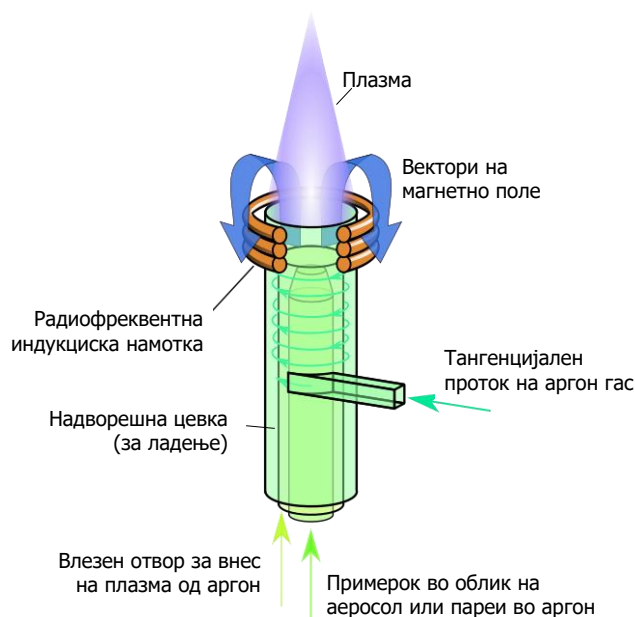
Емисиска спектрометрија заснована на плазма извори

По дефиниција, плазмата претставува неутрална, електрично спроводлива гасна смеса што содржи значителна концентрација на катјони и на електрони. Во аргонската плазма често применувана за емисиските анализи, јоните на аргонот и електроните се основните честички што спроведуваат електричество, иако во спроводливоста придонесуваат и катјоните од примерокот присутни во помала количина. Откако ќе се создадат, јоните на аргонот се способни за апсорпција на енергија од надворешен извор, што што ја

одржува температурата на ниво што овозможува непрекината јонизација и бесконечно одржување на плазмата. Температурата може да биде висока и до 10 000 K. Во емисиската спектрометрија базирана на плазма извори се применуваат три вида извори: (1) индуктивно спрегната плазма (ICP), (2) еднонасочен извор на плазма (DCP) и (3) микробраново индуцирана плазма (*Microwave induced plasma*, MIP). ICP и MIP се јаки генератори на радио и микробранова фреквенција, соодветно, низ коишто протекува аргон. Еднонасочниот извор на плазма (DCP) меѓу електродите што се вронети во аргонската плазма одржува струја со јачина од неколку ампери. Од овие три извора, најголема предност во поглед на осетливоста и бројот на интерференции има радиофреквентниот извор или индуктивно спрегнатата плазма.

Извор на индуктивно спрегната плазма

На Слика 3.13 е даден шематскиот приказ на изворот на индуктивно спрегната плазма. Тој се состои од три концентрични кварцни цевки низ коишто струи проток од аргон со брзина меѓу 5 и 20 L/min. Дијаметарот на најголемата цевка е околу 2,5 cm. Врвот на цевката е опкружена со индуктивни навивки – калем (што се лади со вода) поврзани со радиофреквентен генератор што произведува енергија од 0,5 до 2 kW фреквенции од 27 до 41 MHz. Јонизацијата на проточниот аргон се предизвикува со искра од Теслините навивки. Настанатите јони и нивните придружени електрони доаѓаат во интеракција со променливото магнетно поле создадено од индуктивните навивки. Таа интеракција е причина за кружното движење на јоните и на електроните во калемот, при што се создава топлина како резултат на отпорот од јоните и електроните при движењето (омско затоплување). Температурата на плазмата е многу висока, поради што мора да биде топлински изолирана од надворешната кварцна цевка. Изолацијата се постигнува со тангенцијален проток на аргон околу внатрешните сидови на цевката. Тангенцијалниот проток ги лади внатрешните сидови на средишната цевка и радијално ја насочува плазмата.

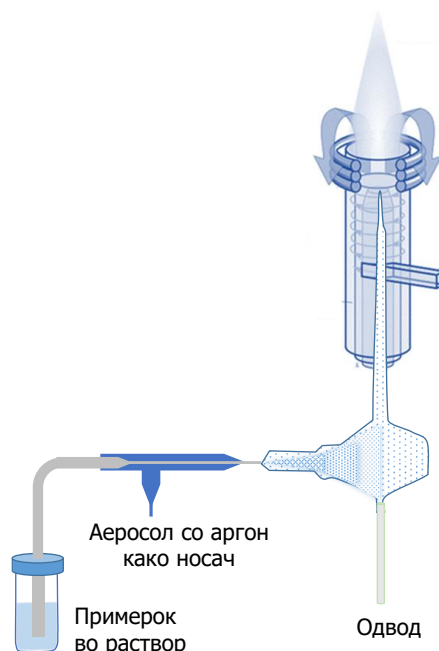


Слика 3.13 Шематскиот приказ на изворот на индуктивно спрегната плазма

Внесување на примерокот

Во жешката плазма примерокот се внесува со проток на аргон од приближно 1 L/min (0,3 до 1,5 L/min) низ средишната кварцна цевка. Внесувањето на примерокот се врши со кој било метод на внесување на примерокот, опишан во поглавјето на атомската апсорпциска спектрометрија. На Слика 13.14 е прикажан најчестиот начин на внесување на примерокот со примена на небулизатор со вкрстен проток и струја од аргон, што резултира со формирање наfino иситнети капки што се носат во плазмата.

За квалитативна и квантитативна анализа, ICP емисиската спектрометрија најчесто користи примероци добиени со растворање или суспендирање во водени или органски растворувачи. Исто така, се користи и методот на директна анализа за примероци во цврста состојба, што вклучува процес на електротермална вапоризација.



Слика 3.14 Приказ на небулизатор за внесување примерок во изворот на плазма

Изглед на плазмата и на спектрите

Типичната плазма има многу интензивно, сјајно бело, непроѕирно јадро покриено со пламеновидна опашка. Јадрото што се простира неколку милиметри над цевката произведува спектрален континуум, на кој е суперпониран атомскиот спектар на аргонот. Очигледно, континуумот е резултат на рекомбинација на аргонот и другите јони со електроните. На висина од 10 - 30 mm над јадрото континуумот бледнее и плазмата е оптички просирна. Набљудувањето на спектрите се врши на висина од 15 - 20 mm над индуктивните навивки. Во тоа подрачје заднинското зрачење е речиси без аргонските линии и е најсоодветно за спектрални мерења. Многу од најосетливите линии на анализата во овој дел од плазмата потекнуваат од јоните како Ca^+ , Ca^{2+} , Cd^+ , Cr^{2+} и Mn^{2+} .

Атомизација и јонизација на примерокот

До моментот кога атомите од примерокот доаѓаат во делот од плазмата погоден за набљудување, тие поминуваат приближно 2 милисекунди на температура од 4000 до 8000 K. Температурата на плазмата и времето на

примерокот поминато во плазмата се околу 2 до 3 пати поголеми од температурата и времето на престој на примерокот во најтоплите пламени (добиеени при согорување ацетилен во азот (I) оксид). Поради тоа, атомизацијата на примерокот во плазмата е речиси потполна и со помали хемиски интерференции, споредено со пламениот атомизер. Појавата на јонизациски интерференции е многу ретка или воопшто не постои, најверојатно поради тоа што концентрацијата на електрони што настануваат при јонизација на аргонот е значително поголема од онаа на електроните добиени со јонизација на примерокот. Големата концентрација на електрони што настануваат при јонизација на аргонот го одржува константно количеството на електрони во плазмата.

Плазма изворите имаат уште неколку предности во однос на пламените извори. Како прво, атомизацијата настанува во хемиски инертна околина (што го продолжува времето на живот на примерокот во плазмата, спречувајќи формирање оксиди). Температурниот профил на плазмата е релативно едноличен, во однос на температурниот профил на пламените извори. Како резултат на тоа не доаѓа до појава на самоапсорпција и добиените баждарни дијаграми се линеарни за неколку реда на величина за концентрацијата на аналитот.

Самоапсорпцијата е карактеристична за пламените извори. Претставува појава на апсорпција на емитуваното зрачење од центарот на пламенот од страна на непобудените атоми во надворешниот дел на пламенот. Како резултат на оваа појава се добива разделен пик, бидејќи емисискиот пик од зрачењето на побудените атоми е поширок од апсорпцискиот пик на апсорбираното зрачење од непобудените атоми. Оваа појава е особено честа кога се работи со повисоки концентрации, поради присуство на атомите во делови од пламенот со различна температура.

Инструменти

Постојат три основни типа на инструменти за емисиска спектрометрија, и тоа: секвенционален, истовремено повеќеканален и спектрометар со Фуриерова трансформација (*Fourier Transform, FT*).

Инструментите за ICP емисиска спектрометрија обично се состојат од висококвалитетен спектрофотометар за ултравиолетово и видливо подрачје со: плазма извор, дифракциска решетка и фотомултипликатор како детектор. Со ротација на решетката е овозможено различни бранови должини да бидат прецизно фокусирани на излезниот отвор и да паднат на фотомултипликаторната цевка. Многу од нив се автоматизирани, со можност да се снимат целиот спектар.

Примена на плазма изворите

Плазма изворите даваат спектри богати со карактеристични емисиски линии, што ги чини корисни за квалитативна и за квантитативна анализа на елементите. Плазма емисиската спектрометрија се користи за определување на околку 60 елементи. ICP емисиската спектрометрија е најшироко употребувана техника за квантитативна анализа, како резултат на високата стабилност на плазмата, нискиот шум, малото заднинско зрачење, како и отсуството на интерференции, кога се работи под соодветни експериментални услови. Предноста на ICP изворите произлегува и од нискиот лимит на детекција на елементите (Табела 3.2) и широкото концентрациско подрачје на примена (од неколку реда величини). Врз основа на овие предности, емисиските методи базирани на високоенергетски извори би можеле целосно да ги заменат

пламената и електротермалната атомска апсорпциска спектрометрија. Но се покажало дека атомските емисиски и апсорпциски методи се комплементарни. Добивањето задоволителни резултати со примена на поедноставна и поевтина апаратура, поевтината постапка на изведба што бара и помала вештина на аналитичарот, претставуваат предности на AAS.

Табела 3.2 Лимити на детекција (ng/mL) за различни елементи

Елемент	Пламена AAS	Електротермална AAS	Пламена AES	AES ICP	Пламена AFS*
Al	30	0,005	5	2	5
As	100	0,02	0,0005	40	100
Ca	1	0,02	0,1	0,02	0,001
Cd	1	0,0001	800	2	0,01
Cr	3	0,01	4	0,3	4
Cu	2	0,002	10	0,1	1
Fe	5	0,005	30	0,3	8
Hg	500	0,1	0,0004	1	20
Mg	0,1	0,00002	5	0,05	1
Mn	2	0,0002	5	0,06	2
Mo	30	0,005	100	0,2	60
Na	2	0,0002	0,1	0,2	-
Ni	5	0,02	20	0,4	3
Pb	10	0,002	100	2	10
Sn	20	0,1	300	30	50
V	20	0,1	10	0,2	70
Zn	2	0,00005	0,0005	2	0,02

* AFS = атомска флуоресцентна спектрометрија

Пламена емисиска спектрометрија

Атомската емисиска спектрометрија во која се користи пламен (често пати нарекувана пламена емисиска спектрометрија или пламен фотометрија) денес малку се употребува, освен во определувањето на алкалните метали и повремено калциумот. Овие елементи се побудуваат на релативно ниски температури на пламенот и даваат емисиски спектри што се релативно едноставни и без интерференции од другите елементи (метали). Спектрите на алкалните метали, општо, се состојат од неколку интензивни линии, од кои голем дел се во видливиот регион и се погодни за квантитативни мерења.

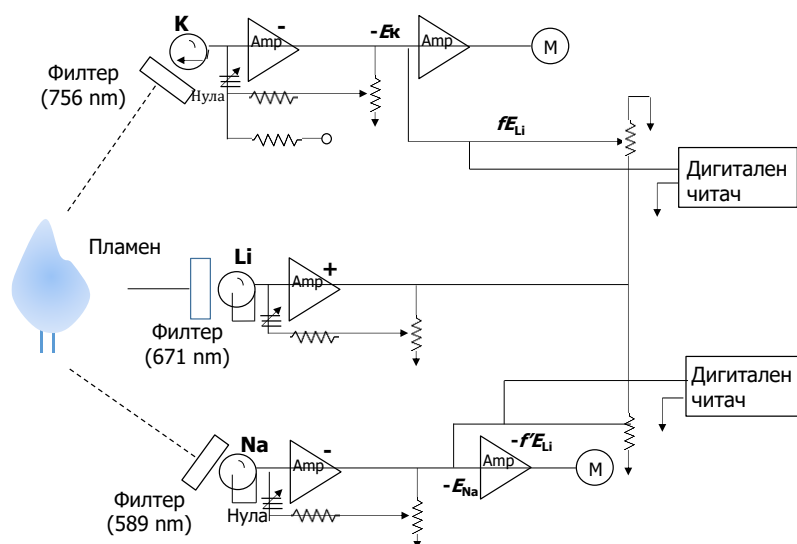
Инструменти за пламена емисиска спектрометрија

Инструментите за пламена емисиска спектрометрија се слични по градба со инструментите за пламена апсорпциска спектрометрија. Разликата е во изворот на зрачење. За разлика од пламен апсорпциските инструменти што користат извор на електромагнетно зрачење - ламба, кај пламен емисиските инструменти побудувањето на атомите се врши под влијание на температурата од пламенот. Постарите инструменти за пламена емисиска спектрометрија користеле пламеници со турбулентен проток. Во поново време широко се употребуваат пламениците со ламинарен проток. Некои инструменти имаат можност да мерат и емисија и апсорпција на зрачење.

Поради едноставноста на емисиските спектри, се користат едноставни фотометри со филтри за рутинско определување на алкалните и на

земноалкалните метали. Се користат нискотемпературни пламени за да се отстрани интерференцијата од другите метали (што не можат да се побудат при тие услови). Поради тоа, спектрите се едноставни и може да се искористат интерферентни филтри за изолација на посакуваните емисиски линии.

Денес се достапни комерцијални пламени фотометри за определување натриум, калиум и понекогаш калциум во крвен серум, урина или во други биолошки течности. Инструментот за определување натриум и калиум најчесто е триканален (Слика 13.15). Двата канала ја емитуваат натриумовата и калиумовата линија, соодветно. Третиот канал ја емитува литиумовата линија. Литиумот обично служи како *внатрешен стандард* за анализата. Во овие инструменти зрачењето од изворот е разделено на три снопа со приближно еднаква сила. Секој од нив минува низ посебен фотометриски систем составен од интерферентен филтер (што ја пропушта емисиската линија на еден од елементите, а ги апсорбира линиите на другите два), фотоцевка и засилувач. Излезните сигнали може да се мерат и одвоено. За определување на количеството на натриум или на калиум во анализата, во секој стандард и во секоја анализа се додава исто количество на литиум. Односите меѓу аналитичките сигнали од натриумот и од литиумот, односно меѓу калиумот и литиумот се користат како аналитички параметри (за определување на количеството на Na и K во примерокот). Овој метод на квантитативно определување е познат како метод на внатрешен стандард. Со примена на методот е отстранета грешката при определување предизвикана од варирањето на аналитичките варијабли, како што се температурата на пламенот, брзината на проток на горивниот гас и заднинското зрачење (коишто влијаат на интензитетот на емисиските линии на Li, Na и K). Притоа, очигледно, литиумот не смее да биде присутен во примерокот за анализа.



Слика 13.15 Триканален фотометар за определување на емисијата на калиум, на натриум и на литиум

Квантитативна анализа

Квантитативното определување во атомската емисиска спектрометрија се базира на употреба на баждарен дијаграм, метод на стандардни додатоци и метод на внатрешен стандард (последниот особено се употребува во пламен фотометријата).

МОЛЕКУЛСКА СПЕКТРОСКОПИЈА

Молекулската спектроскопија, заснована на ултравioletовото, на видливото и на инфрацрвеното зрачење, широко се применува за идентификација и определување на безброј неоргански и органски соединенија. Инфрацрвената апсорпциска спектроскопија е една од моќните, но истовремено и најдоступни техники за идентификација и определување на структурата на неорганските и на органските соединенија. Денес се предвидува нејзина широка употреба и во квантитативната анализа. Молекулските ултравioletови/видливи апсорпциски методи се едни од најупотребуваните спектроскопски методи за квантитативна анализа во хемиските и во клиничките лаборатории во светот.

Молекулските флуоресцентни методи, и покрај тоа што помалку се употребуваат од апсорпциските методи, значајни се заради високата селективност и големата осетливост. Овие методи наоѓаат широка примена за квантитативна анализа во биолошки материјал.

На полето на науката, нуклеарно магнетната резонантна спектроскопија е една од најмоќните техники за определување на структурата на хемиските соединенија, а масената спектрометрија е најшироко употребувана како техника што обезбедува информации за структурата на неорганските, на органските и на биолошките молекули, како и за квалитативниот и за квантитативниот состав на примероците.

УЛТРАВИОЛЕТОВА И ВИДЛИВА СПЕКТРОМЕТРИЈА

Еден од првите физички методи применети во аналитичката хемија се заснова на мерење на интензитетот на бојата на обоените раствори. Прво што забележуваме кај обоените раствори се нивната *боја (нијанса)* и *интензитетот* на бојата. Овој вид набљудување бил искористен за развој на нова техника во историјата, позната како *колориметрија*. Со колориметријата се овозможува идентификација на супстанцијата во растворот од која потекнува обојувањето на растворот и определување на концентрацијата на супстанцијата преку интензитетот на бојата на растворот. Оваа техника е првата практична примена на она што денес е познато под терминот молекулска *апсорпциска спектрометрија*.

Видливата светлина се протега во спектралното подрачје од 800 до 400 nm, а брановата должина на ултравioletовото (UV) зрачење започнува од синиот крај на видливата светлина (на околу 400 nm) и завршува на околу 200 nm. Затоа, спектрометрите што се применуваат за испитување во подрачјето на бранови должини од 800 до 200 nm често се нарекуваат и ултравioletови/видливи (или UV/Vis) спектрометри. Подрачјето на вакуум UV зрачењето во електромагнетниот спектар се протега од 200 nm до 10 nm (од каде што започнува областа на X-зраците).

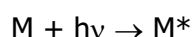
Имено, во ова подрачје кислородот, водената пара и другите молекули во воздухот апсорбираат UV зрачење на бранови должини <200 nm. Наречено е *вакуум UV* подрачје бидејќи за мерење во овие спектрометри оптичкиот сноп на светлината треба целосно да минува низ вакуум или во системот да се пропушти соодветен гас што не апсорбира во вакуум UV (како хелиумот).

Апсорбираното електромагнетно зрачење од ултравioletовото и видливото спектрално подрачје има доволно енергија да ги побуди валентните електрони, и како резултат на тоа брановата должина на апсорпцискиот пик може да се доведе во корелација со типовите на врски во испитуваниот аналит. Затоа, молекулската апсорпциска спектрометрија е значајна за идентификација на функционалните групи во молекулата. Многу позначајна е примената на ултравioletовата и

видливата апсорпциска спектрометрија за квантитативно определување компоненти што содржат групи што апсорбираат. За квантитативното определување на анализот се користи интензитетот на апсорпциската лента (максимум) во спектарот на анализот, со примена на Ламберт-Беровиот закон.

Апсорпција на зрачење

Апсорпцијата на UV и видливо зрачење од атомите или од молекулите претставува двостепен процес. **Првиот степен** вклучува побудување на валентните електрони на атомите, односно на молекулите (општо означени со M):



Продукт на реакцијата меѓу честичката M (атом или молекул) и фотонот $h\nu$ е побудена честичка означена како M^* . Времето на живот на побудената честичка е кратко (10^{-8} до 10^{-9} секунди). Враќањето на побудената честичка во основната состојба (со најниска енергија) е познато како *релаксација* на побудената честичка – **втор степен** од процесот на апсорпција. Најчест тип на релаксација е трансформација на енергијата на побудената честичка во топлинска енергија (ΔQ):



Релаксацијата може да резултира со разградување на M^* и формирање нова(и) честичка(и). Овој процес се нарекува *фотохемиска деградација*. На крај, релаксација може да настане со флуоресцентна или со фосфоресцентна емисија на зрачење.

Апсорпција на зрачење од молекули што содржат σ , π и n електрони

Честичките што апсорбираат и што содржат σ , π и n електрони се органски молекули и јони, како и бројни неоргански анјони. Сите органски соединенија се способни да апсорбираат електромагнетно зрачење поради присуството на валентните електрони што може да бидат побудени на повисоки електронски нивоа.

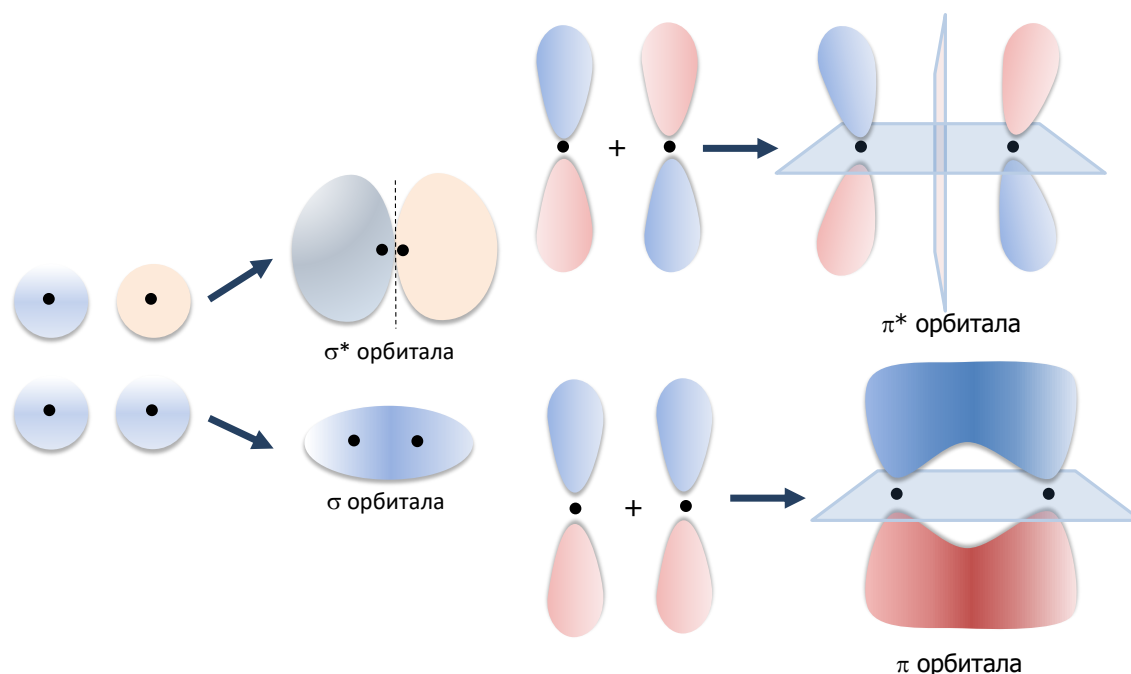
Електроните што се вклучени во апсорпцијата на електромагнетно зрачење од страна на органските молекули се поделени во две групи: (1) електрони што директно се вклучени во формирањето на хемиските врски меѓу атомите и (2) неврзувачки електрони или несподелени надворешни електрони што се среќаваат кај атомите на кислородот, халогените елементи, сулфурот и азотот.

Ковалентната врска настанува со преклопување на атомските орбитали на двата атома што ја градат врска. На тој начин настанува **молекулска орбитала** во која се наоѓаат валентните електрони од двата атома што учествуваат во врзувањето (т.е. во ковалентната врска). Кога ќе се преклопат две атомски орбитали се формира една **врзувачка** (со ниска енергетска содржина) и една **антиврзувачка молекулска орбитала** (со висока енергетска содржина). Врзувачките валентни електрони во основна состојба се наоѓаат во врзувачката молекулска орбитала, што има пониска енергија поради поголемата делокализација на електронската густина во однос на антиврзувачката молекулска орбитала.

Молекулските орбитали на единечните (прости) врски во органските молекули се означуваат како *сигма* (σ) *орбитали*, а соодветните електрони – σ електрони настануваат со преклопување на две атомски s орбитали. Распределбата на електроните во сигма орбиталите е ротациско симетрична околу оската на врска. Количеството енергија потребно да се побудат σ електроните обично е повисока од енергијата на UV фотоните со бранови должини над 200 nm. Поради

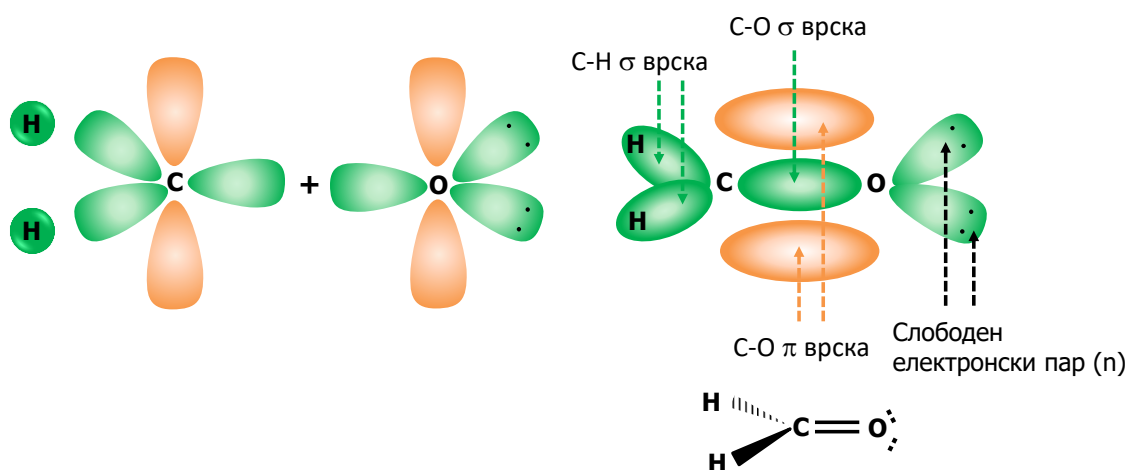
тоа, алканите и другите заситени соединенија (соединенија само со единечни ковалентни врски) не апсорбираат UV зрачење и може да се користат како транспарентни растворувачи за проучување на други молекули (што апсорбираат во UV областа).

Двојната врска во органските молекули содржи два типа молекулски орбитали: *сигма* (σ) *орбитала* претставена со еден пар врзувачки електрони и *пи* (π) *молекулска орбитала* претставена со друг пар електрони. *Пи* молекулските орбитали настануваат со странично преклопување на две атомски орбитали (*p* или *d*). *Пи* врската е понестабилна од *сигма* врската, бидејќи се наоѓа на повисоко енергетско ниво. Распределбата на електроните во *пи* орбиталите се карактеризира со: регион со ниска електронска густина по должината на оската на врската и со максимална густина во регионите над и под регионот со ниска електронска густина. Типични примери за соединенија со π орбитали (односно π врски) се алкените, алкините, конјугираните олефини и ароматичните соединенија. Електроните во π орбиталите може да се побудат релативно лесно, па затоа овие соединенија апсорбираат зрачење од UV или видливата област (Слика 4.1).



Слика 4.1 Распределба на електрони во σ и π молекулски орбитали

Многу органски соединенија, покрај σ и π електрони, содржат и неврзувачки n електрони. Кај заситените јаглеводороди, електроните од надворешниот електронски слој на атомите на јаглеродот и на водородот целосно се вклучени во образувањето на хемиските врски (ковалентни врски), па според тоа овие атоми немаат неврзувачки електрони. Органските соединенија што во својот состав содржат азот, кислород, сулфур или халогени елементи, вообичаено содржат неврзувачки електрони. Енергетското ниво на неврзувачките електрони лежи помеѓу енергетските нивоа на врзувачките и на антиврзувачките π и σ орбитали. За побудување на n електроните доволна е енергијата на фотоните од UV или видливото подрачје (Слика 4.2).

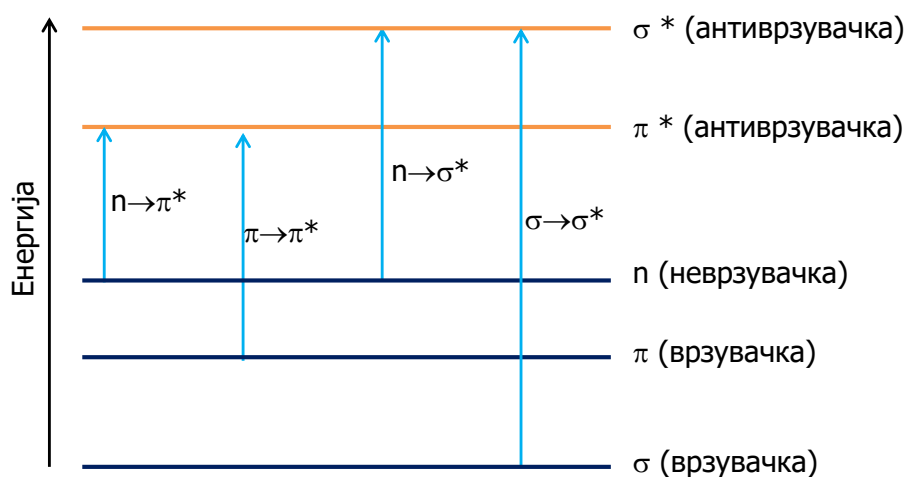


Слика 4.2 Видови молекулски орбитали кај формалдехид

Спарените електрони што влегуваат во составот на врзувачките σ и π орбитали имаат антипаралелни спинови и затоа овие молекулски орбитали имаат минимална енергија. Антиврзувачките σ и π орбитали (што се означуваат како σ^* и π^* орбитали) се наоѓаат на повисоко енергетско ниво во однос на нивните соодветни врзувачки орбитали, а електроните што при апсорпција на зрачење ги пополнуваат, имаат паралелни спинови. Бидејќи имаат повисока енергија, тие се непополнети кога молекулата се наоѓа во основна состојба.

Квантната механика ја дава теоретската основа за разбирање на релативните енергетски нивоа на молекулските орбитали, како и за нивната структура. Таа ги дефинира *правилата на избор* за да ги предвиди електронските премини што настануваат во молекулите. Премините во молекулите се потчинуваат на квантомеханичките правила на избор. Некои од премините се *дозволен*, додека други се *забранети* во согласност со овие правила. Дозволен електронски премини се оние каде што постои голема веројатност за премин (т.е. за промена на електронската состојба). Забранетите премини, од друга страна, иако е можно да настанат, се многу помалку веројатни од дозволените премини. Од вредноста на моларниот апсорпциски коефициент ϵ за одреден премин може да се заклучи дали тој е дозволен или забранет. Ако ϵ има вредност помала од $10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($\log \epsilon < 4$) станува збор за забранет премин.

При апсорпција на зрачење од UV или видливиот дел од спектарот, можни се четири типа електронски премини: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ и $\pi \rightarrow \pi^*$ (Слика 4.3).



Слика 4.3 Дијаграм на енергетски нивоа на четирите типа на електронски премини

$\sigma \rightarrow \sigma^*$ премини

При апсорпција на зрачење, електроните од врзувачките σ орбитали се побудуваат и преминуваат на соодветните антиврзувачки орбитали (σ^*). Во однос на другите премини, енергијата потребна за $\sigma \rightarrow \sigma^*$ преминот е најголема и соодветствува на фреквенциите на зрачење од вакуум UV подрачјето. Метанот има четири единечни C-H врски чии врзувачки електрони учествуваат само во $\sigma \rightarrow \sigma^*$ електронските премини со појава на апсорпциски максимум на 125 nm. Етанот дава апсорпциски максимум на 135 nm, што мора да потекнува од ист тип премин, но во овој случај се вклучени валентните електрони од C-C врската. Бидејќи јачината на C-C врската е помала од јачината на C-H врската, потребна е помала енергија за побудување. Поради тоа, апсорпцискиот максимум се јавува на поголема бранова должина.

 $n \rightarrow \sigma^*$ премини

Овој тип премини се можни кај ковалентно заситените органски соединенија што содржат неврзувачки n електрони, односно органски соединенија што содржат хетероатоми како: O, N, S, Cl, Br и J со слободни електронски парови. Општо, за овие премини потребно е помала енергија, за разлика од $\sigma \rightarrow \sigma^*$ премините. Електромагнетните зрачења во подрачјето од 150 до 250 nm може да предизвикаат $n \rightarrow \sigma^*$ премини, но повеќето апсорпциски максимуми се јавуваат под 200 nm. Количеството енергија потребно за овие премини, пред сè, зависи од типот на врската што е вклучена во преминот, а во помал степен од структурата на молекулата.

Апсорпцискиот максимум на $n \rightarrow \sigma^*$ преминот се стреми да се помести кон пократки бранови должини (повисоки фреквенции) во присуство на поларни растворувачи, како вода или етанол. Бројот на органските функционални групи што даваат $n \rightarrow \sigma^*$ апсорпциски максимуми е многу мал во достапното UV подрачје (200 – 400 nm).

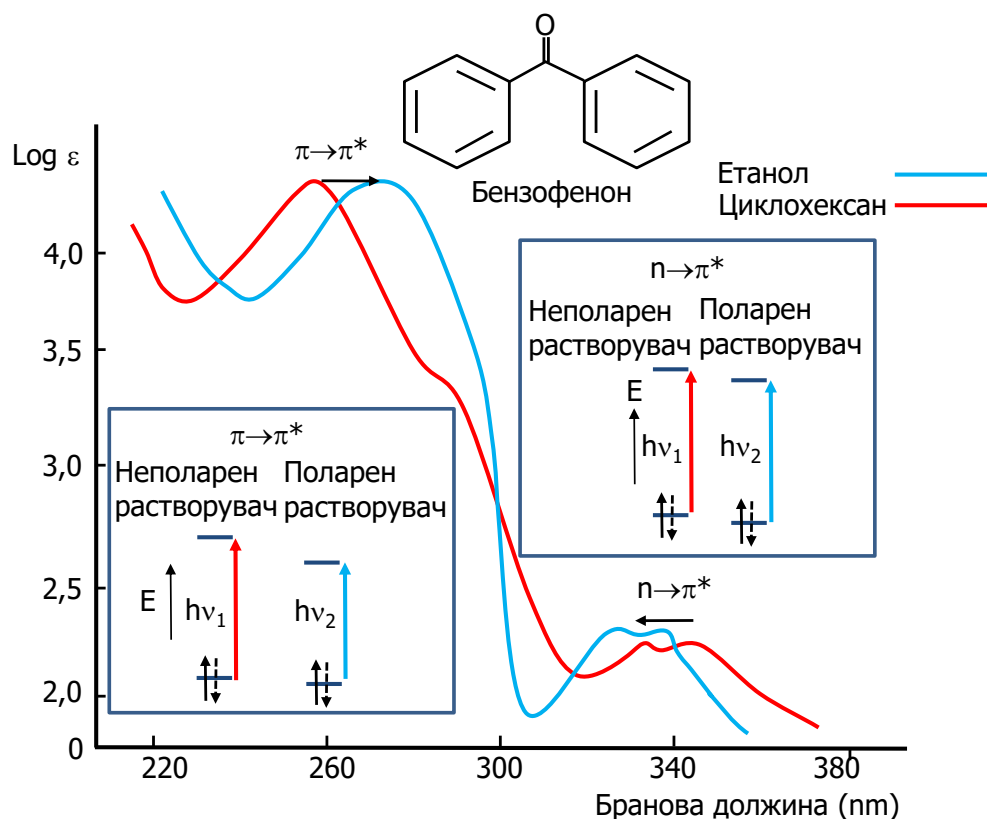
 $n \rightarrow \pi^*$ и $\pi \rightarrow \pi^*$ премини

Голем дел од примената на апсорпциската спектроскопија на органските соединенија се заснова на премините на n или π електроните во π^* побудената молекулска орбитала, бидејќи апсорпциските максимуми на овие премини лежат во спектралното подрачје од 200 до 700 nm. За двата премина е потребно присуство на незаситени функционални групи (што содржат π орбитали).

Поларноста на растворувачот влијае на поместувањето на апсорпциските максимуми на $n \rightarrow \pi^*$ и $\pi \rightarrow \pi^*$ премините. Максимумите што потекнуваат од $n \rightarrow \pi^*$ премини, општо, се поместуваат кон пократки бранови должини (*хипсохромно поместување*) со зголемување на поларноста на растворувачот. Обично, но не и секогаш, обратна појава на поместување на апсорпциските максимуми кон подолги бранови должини (*батохромно поместување*) се јавува кај $\pi \rightarrow \pi^*$ премините. Хипсохромното поместување очигледно настанува поради зголемената солватација на неврзаниот електронски пар, што ја намалува енергијата на n орбиталата. Најизразен ефект на вакво поместување (хипсохромно поместување за 30 nm или повеќе) е забележан со употреба на поларни протонски растворувачи (на пр., вода или алкохоли), како резултат на формирањето на водородни врски меѓу протонот на растворувачот и неврзаниот електронски пар. Притоа, енергијата на n орбиталите се снижува за вредност што е приближно еднаква на енергијата на водородната врска. Кога настанува $n \rightarrow \pi^*$ премин, преостанатиот n електрон (во

n орбиталата) не може да ја одржи водородната врска, така што оваа интеракција со растворувачот не влијае на енергијата на ($n \rightarrow \pi^*$) побудената состојба.

Вториот ефект на растворувачот што несомнено влијае и на $\pi \rightarrow \pi^*$ и на $n \rightarrow \pi^*$ премините, предизвикува батохромно поместување на апсорпциските максимуми со зголемување на поларноста на растворувачот. Овој ефект е мал (обично помал од 5 nm) и кај $n \rightarrow \pi^*$ премините целосно е маскиран од веќе познатиот хипсохромен ефект. При батохромното поместување, привлечните поларизациски сили меѓу растворувачот и растворената (органиска) супстанција тежнеат да ја намалат енергијата на непобудените и побудените состојби. Овој ефект е поизразен кај побудената состојба, така што разликата меѓу енергиите на непобудената и побудената состојба станува сè помала со зголемување на поларноста на растворувачот (што резултира со батохромно поместување) (Слика 4.4).



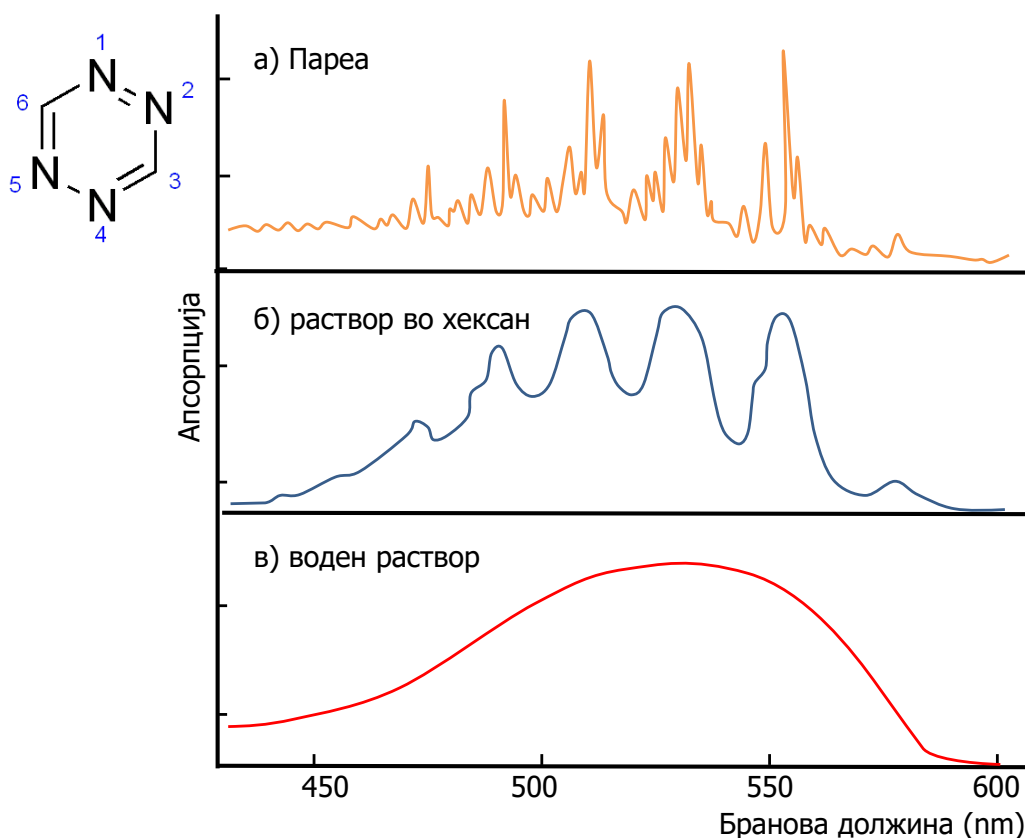
Слика 4.4 Апсорпциски спектар на бензофенон во неполарен (циклохексан) и поларен (етанол) растворувач

Апсорпциски ленти во UV/Vis спектрометрија

Познато е дека секое електронско ниво во молекулите содржи повеќе вибрациски и ротациски поднивоа. При апсорпција на зрачење во ултравioletовиот и видливиот дел од спектарот, истовремено со електронските премини, се побудуваат вибрациските и ротациските премини. За нивно побудување е потребна значително помала енергија во споредба со енергијата потребна за еден електронски премин. При побудување на молекулите, преминот од основното електронско ниво може да се реализира до различни вибрациски и ротациски нивоа во рамките на побуденото електронско ниво. Сите овие посебни електронски премини апсорбираат зрачење со различни бранови должини. Поради многуте постојни вибрациски и ротациски состојби и поради незначителните

меѓусебни разлики на нивните енергии, бројот на линии што ги опфаќа лентата е многу голем, а нивното меѓусебно растојание е минимално. Тоа значи дека секој молекулски премин од основната електронска состојба (ниво) до некоја побудена состојба се карактеризира со многу линии (апсорбирани бранови должини на зрачење) што се преклопуваат едни со други и даваат **континуирана** апсорпциска лента.

Во видливиот апсорпциски спектар на 1,2,4,5-тетразинска пареа, прикажана е фина структура што е резултат на многуте ротациски и вибрациски нивоа поврзани со побудената електронска состојба на оваа ароматска молекула (Слика 4.5). Меѓутоа, во кондензирана состојба или во раствор значително се намалува слободната ротација, поради што се губат линиите добиени заради разликите во ротациските енергетски нивоа. Во присуство, пак, на молекули на растворувачот неправилно се менуваат енергиите на различните вибрациски нивоа. Во молекулско опкружување енергијата на дадена состојба поприма Гаусова (Gauss) распределба, што предизвикува ширење на линијата. Овој ефект е посилено изразен во поларен растворувач, како што е водата, отколку во неполарен. Растворените молекули во поларни растворувачи не даваат апсорпциски спектри со вибрациска „фина структура“, поради дипол интеракциите и водородните врски меѓу растворените молекули и растворувачот.



Слика 4.5 Апсорпциски спектар на 1,2,4,5-тетразин во: а) гасна фаза, б) растворен во хексан, в) воден раствор.

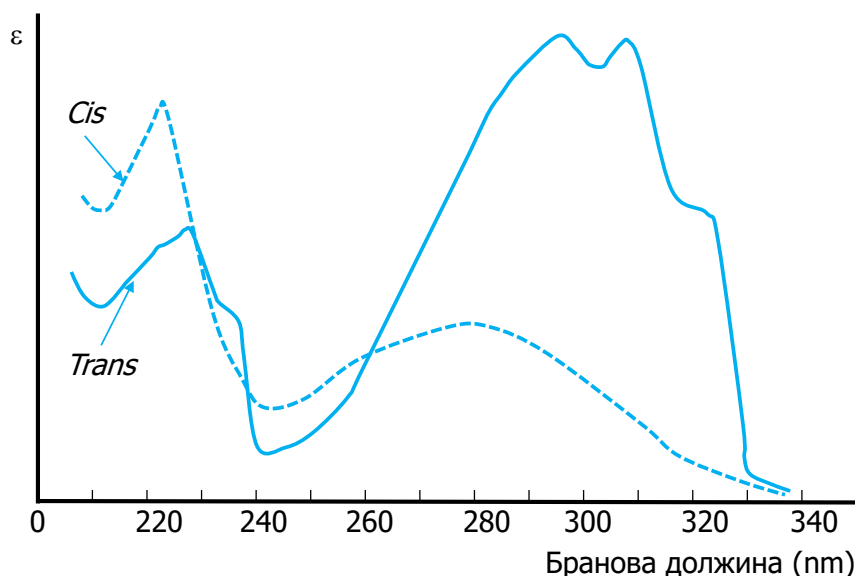
Секоја апсорпциска лента се карактеризира со свој облик (изглед/ширина), положба и интензитет. **Обликот** на апсорпциската лента е определен, пред сè, од енергетската разлика меѓу соседните вибрациски поднивоа и од количеството енергија (интензитет) потребно за секој вибрациски премин. Дистрибуцијата на интензитетите на вибрациските премини зависи од веројатноста за премин на определено вибрациско подниво. Веројатностите за вибрациските премини може

формалдехидот се наоѓа на 305 nm. Ако извршиме супституција на еден од водородните атоми со метил група (-CH₃), апсорпцискиот максимум на метил-супституираниот формалдехид (или ацеталдехидот) ќе се појави на 290 nm. Во случај кога и двата водороди во формалдехидот се супституирани со метил-група, мезомерниот ефект е уште поизразен и максимумот на апсорпција се јавува на 275 nm.

Од друга страна, со продолжување на алифатичната низа се зголемува електронегативноста на кислородниот атом и енергијата на основното енергетско ниво на n електроните, додека енергијата на π електроните во основната состојба значајно не се менува. Поради тоа, потребна е пониска енергија за $n \rightarrow \pi^*$ премините, па апсорпцискиот максимум ќе се помести батохромно. Оттаму, апсорпцискиот максимум на пропанонот (ацетон) е на 275 nm, на бутанонот на 278 nm, а на 2-метил пентанонот на 283 nm.

Општо, влијанието на супституентите на апсорпциските спектри често е условен од **промена** на поларизабилноста што настанува под влијание на **индуктивните** и на **мезомерните** ефекти. Така, алкил-супституентите ги поместуваат апсорпциските максимуми кон поголеми бранови должини (за околу 3 - 10 nm по алкил група). Исто така, супституција на бензеновиот прстен со -OH и -NH₂, поради интеракцијата на слободните n електрони на кислородот, односно на азотот со делокализираните електрони на бензеновиот прстен, предизвикува батохромно поместување на апсорпцискиот максимум.

б) *Влијание на стерните ефекти.* Стерните ефекти може да ги зголемат или намалат интеракциите меѓу електроните и на тој начин да влијаат врз промена на положбата на апсорпцискиот максимум. Тоа е, пред сè, изразено при појава на изомерија. Ако *trans* обликот на некое соединение премине во *cis* облик, каде што стерните ефекти се повеќе изразени, максимумите на апсорпциските ленти се поместуваат хипсохромно, со истовремено намалување на нивниот интензитет (Слика 4.6).



Слика 4.6 UV спектри на *cis* и *trans*-стилбен

Ако одредени групи во молекулата го попречуваат копланарниот распоред на атомите, што е услов за конјугација на π електроните, може да дојде до поместување на максимумот на апсорпција кон помали бранови должини. Овие модификации се особено изразени кај цикличните соединенија.

Оптичката изомерија, главно, нема влијание на апсорпциските спектри во оваа спектрална област. Оптички активните форми (*d* и *l*), како и рацемските смеси и неактивните форми покажуваат многу слични апсорпциски спектри. Меѓутоа, ако соединението содржи повеќе хирални центри може да се јават разлики во спектралната распределба на различните изомери.

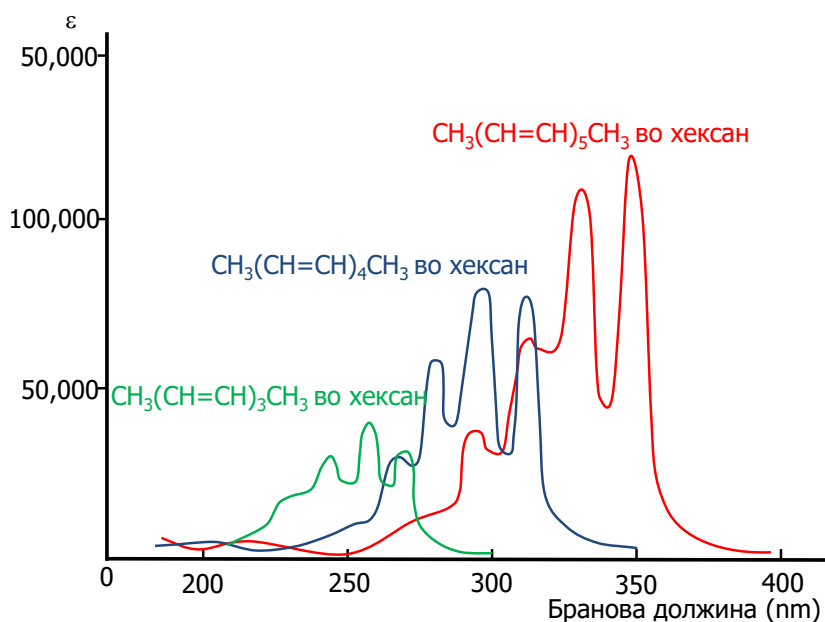
в) *Влијание на хемиските врски.* Од положбата на апсорпциските ленти може да се одреди карактерот на некои соединенија. Алифатичните и алицикличните соединенија и нивните деривати (хлориди, алкохоли, карбонски киселини итн.) не апсорбираат во подрачјето од 200 - 800 nm, бидејќи за $\sigma \rightarrow \sigma^*$ премините потребна е апсорпција на зрачење со повисока енергија. Ако соединението има доволно интензивна лента во подрачјето од 220 до 270 nm, се претпоставува дека во неговиот состав постојат две незаситени врски, што се конјугирани (и дека најверојатно се работи за дериват на бензенот). Во случај на конјугација, ефектот на делокализација на π електроните води до намалување на енергетското ниво на π^* орбиталата, и како резултат на тоа доаѓа до поместување на апсорпцискиот максимум кон поголеми бранови должини. Односно со зголемување на бројот на двојните врски апсорпциските ленти батохромно се поместуваат, така што лентите може да се јават и во видливото, па дури и во инфрацрвеното подрачје од спектарот (Слика 4.7).

Врз основа на многубројните спектрални анализи можно е кај диените и кај полиените т.е. кај соединенијата со конјугирани двојни врски да се одреди и бројот на тие врски. Според Куновата (*Kuhn*) равенка положбата на апсорпцискиот максимум што се јавува на најголемата бранова должина во спектарот (λ_{max}) е еднаков на квадратниот корен од бројот на двојни врски:

$$\lambda_{max} = 134 \cdot \sqrt{n} + 31 \quad (4.1)$$

каде што n , бројот на двојни врски е:

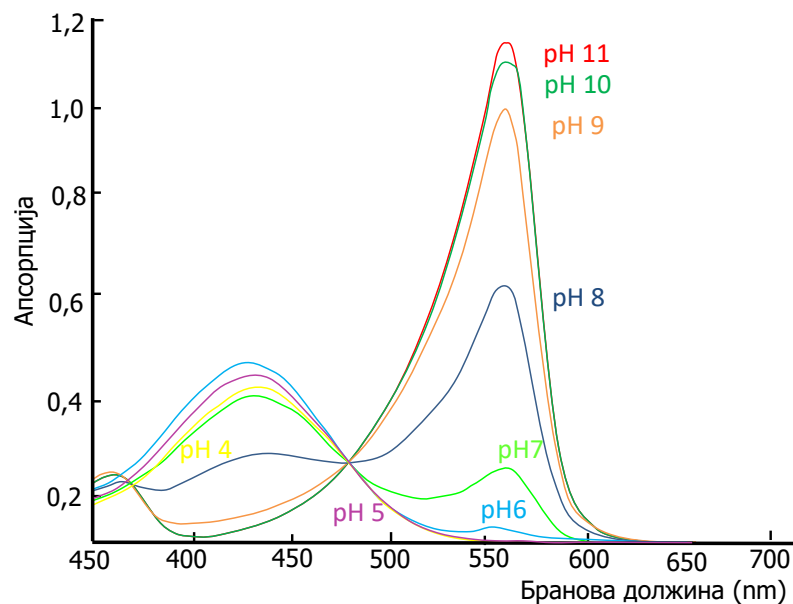
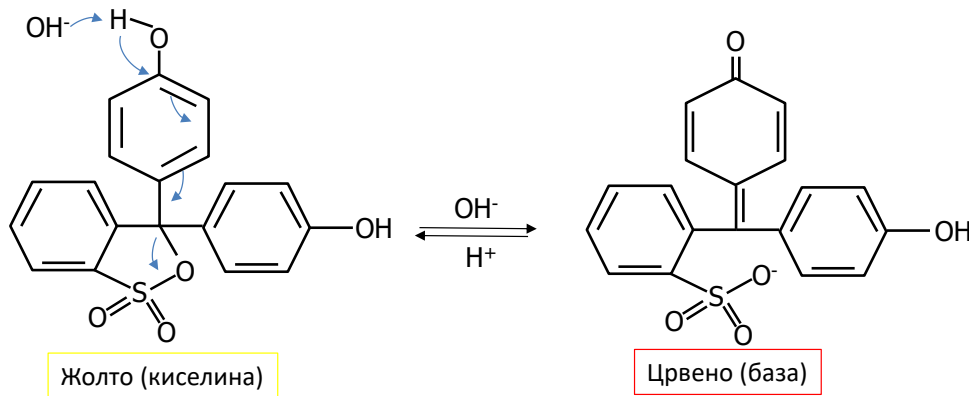
$$n = \left(\frac{\lambda_{max} - 31}{134} \right)^2 \quad (4.2)$$



Слика 4.7 UV/Vis спектри на полиени. Батохромно поместување на апсорпциските максимуми со зголемување на бројот на двојни врски

г) *Влијание на рН на средината.* Влијанието на рН на средината кај базните и киселите супстанции зависи од нивната рКа вредност, бидејќи овие супстанции може да се јават во облик на недисоцирани молекули или јони, што имаат различна електронска структура. Поради тоа и спектрите на недисоцираните и дисоцираните облици ќе бидат различни. Обично, молекулскиот облик апсорбира на пократки бранови должини од јонскиот, а и апсорпциот коефициент на овој облик е помал (во однос на јонскиот).

Брановата должина на точката во која се сечат спектрите на различните облици на едно соединение, кои се рН зависни, се вика **изобестична точка**. Особено е важна за определување на структурата на комплексните соединенија што ја менуваат структурата во различни подрачја на рН (Слика 4.8).



Слика 4.8 Апсорпциски спектри на фенол црвено при различни рН вредности

д) *Влијание на растворувачот.* Влијанието на растворувачот врз апсорпциската лента е поголемо доколку интеракцијата помеѓу растворената супстанција и растворувачот е поголема. Оваа интеракција при која доаѓа до солватација предизвикува промени на енергетските нивоа и во основната и во побудената состојба, а со тоа предизвикува и промена на положбата на лентата. Во неполарен растворувач спектарот на хексан е идентичен со спектарот на оваа супстанција во гасовита состојба. Ако се употреби поларен растворувач, главно, доаѓа до израз ефектот што се јавува како резултат на интеракцијата дипол-дипол. Интеракцијата е поголема доколку поларноста на растворувачот и неговата

диелектрична константа е поголема. Претходно во текстот (во делот за $n \rightarrow \pi^*$ и $\pi \rightarrow \pi^*$ премините) е објаснето влијанието на растворувачите врз положбата и интензитетот на апсорпциските ленти.

Растворувачите што се употребуваат при мерење во ултравиолетовото и видливото спектрално подрачје треба да биде транспарентни во целото подрачје на мерењето. Секој растворувач има некоја функционална група што предизвикува појава на карактеристичен апсорпциски спектар. Оттука апсорпцискиот спектар на растворот е заедничка резултанта од апсорпциските спектри на растворувачот и на растворената супстанција, поради што апсорпцискиот спектар на растворувачот мора да се отстрани со соодветни операции на спектрофотометарот. Од овие причини, растворувачот не треба да се употребува под некоја бранова должина каде неговата апсорпција е голема. Оваа граница многу зависи од чистотата на растворувачот. Вообичаени растворувачи за UV спектрофотометрија се водата, етанолот, циклохексанот и 1,4-диоксанот, а за видливото подрачје може да се употреби кој било безбоен растворувач. Во Табела 4.1 се дадени неколку примери на растворувачи што се употребуваат во ултравиолетовото и видливото подрачје, како и приближните вредности на граничните најниски применливи бранови должини.

Табела 4.1 Растворувачи за ултравиолетово и видливо подрачје

Растворувач	Долна граница на бранова должина, nm
Вода	190
Етанол	210
n-Хексан	195
Циклохексан	210
Бензен	280
Диетил етер	210
Ацетон	330
1,4-Диоксан	220

Хромофори

Под терминот **хромофор** некогаш се подразбирала атомска група што доведува до обојување на некое соединение (од грчкиот збор *chromophorus* = носител на боја). Така, на пример, во азо-боите, што претставуваат интензивно обоени соединенија, главен хромофор е Ar-N=N-Ar групата, што апсорбира во видливиот дел од спектарот. Општо кажано, хромофор или хромофорен систем претставува дел од молекулата (атомска група) што ја условува апсорпцијата на зрачење од ултравиолетовото и видливото спектрално подрачје. Хромофорите поседуваат π , односно n електрони, коишто по апсорпција на зрачење преминуваат на повисоко енергетско ниво.

Кога два или повеќе хромофори се поврзани со проста (единечна) врска (односно кога се конјугирани), ја губат својата индивидуалност и настанува нов (продолжен) хромофор. Овој хромофор апсорбира на поголеми бранови должини (од поединечните хромофори, од кои е составен) со истовремено зголемување на моларната апсорптивност.

Ако хромофорите се директно поврзани за заситени групи што содржат слободни електронски парови ($-\text{OH}$, $-\text{OR}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{Cl}$ и т.н.) доаѓа до поместување на нивните апсорпциски максимуми кон поголеми бранови должини (батохромно), често со зголемување на моларната апсорптивност. Овие групи се викаат **ауксихроми** (од грчките зборови *auxilium* = помош + *chroma* = боја). Тие самите не апсорбираат во UV/Vis спектралното подрачје. Врз основа на модерните теории,

ауксихромите се групи коишто делејќи ги своите неврзувачки (слободни) електрони со хромофорите, доведуваат до продолжување на конјугацијата, односно стануваат дел од новите продолжени хромофори.

Боја и спектар во видливо подрачје

Спектарот на видливата светлина што е составена од белата, односно од дневната светлина, се наоѓа помеѓу 400 - 800 nm. Тоа значи дека брановите должини на апсорбираната светлина се комплементарни со брановите должини на рефлектираната, односно на пропуштената светлина.

Визуелниот ефект на бојата се јавува како последица на селективна апсорпција (апсорпција само на одредена фреквенција) на влезната видлива светлина од страна на обоената супстанција. Сите други фреквенции, рефлектирани или пропуштени, во зависност од природата на супстанцијата (цврста или течна), предизвикуваат во око то чувство за одредена боја. Овие зрачења се комплементарни со апсорбираните зрачења. Боите што со оптичко мешање ја создаваат белата боја се наречени дополнителни или комплементарни бои. На пример, кога бела светлина минува низ раствор и излегува како црвена светлина, велите дека растворот е црвен. Она што, всушност, се случува при минувањето на белата светлина низ растворот е селективното пропуштање на црвената компонента (црвената светлина) од белата светлина, додека истовремено се апсорбирани *комплементарните* компоненти (бои) од белата светлина, зелена и сина. Колку е поконцентриран испитуваниот раствор, толку повеќе зелена и сина светлина ќе биде апсорбирана и толку поинтензивно црвено обоен ќе биде растворот за човековото око. Во Табела 4.2 се наведени боите на материите што ги гледаме (комплементарните бои), што со мешање со апсорбираната светлина би дале бела сончева светлина.

Табела 4.2 Апсорбирани бранови должини на зрачење и боја на материјата

Бранова должина (nm)	Апсорбирана светлина	Боја на материјата
400-435	виолетова	жолто-зелена
435-480	сина	жолта
480-490	зелено-сина	портокалова
490-500	сина-зелена	црвена
500-560	зелена	пурпурна
560-580	жолто-зелена	виолетова
580-593	жолта	сина
593-610	портокалова	зелено-сина
610-750	црвена	сино-зелена

Комплементарните бои се дијаметрално спротивни; апсорпција на светлина во подрачје од 420 - 430 nm ја прави супстанцијата жолта; од 500 - 520 nm црвена. Зелената боја е единствена и може да се добие со апсорпција на светлина блиска до 400 nm и до 800 nm. Бранова должина (λ) на апсорбираната светлина е комплементарна (се дополнува) со λ на рефлектираната/пропуштената светлина. Ако некоја супстанција може да апсорбира фотони на видливата светлина станува обоена за нашето око, а ако некој предмет изгледа црн значи дека сите фреквенции на видливата светлина се апсорбирани. Различните можности на врзување на атомите во молекулата и можноста за поларизација на електронската обвивка создаваат цела низа на многу блиски енергетски нивоа, и како резултат на тоа

супстанцијата апсорбира поголем интервал на бранови должини на видливата светлина. Така, на пример, бојата на јоните на преодните метали се објаснува со тоа што разликата помеѓу 3d и 4s енергетските нивоа е мала и до побудување на електроните доаѓа со апсорпција на видливата светлина. Слободните електрони што се наоѓаат во кристалните решетки на металите апсорбираат фотони на видливата светлина, па оттука металите се обоени.

Според „хромофорната“ теорија, за да дојде до апсорпција во видливото спектрално подрачје, молекулите мора да имаат повеќе хромофорни системи што се конјугирани. Во една таква молекула во којшто π -електроните се многу подвижни и предизвикуваат појава на мезомерни состојби, уште повеќе се смалува енергијата на преминот и доаѓа до апсорпција на видливата светлина.

Ако некоја молекула има само една изолирана хромофорна група, ова соединение не е обоено. Со вклучување на некоја ауксохромна група, што има улога на донор на електрони во хромофорниот систем, ова соединение може да стане обоено. Покрај оваа група, треба да постои некоја група примател (акцептор) на електроните, што со донорската група е врзана или со мост претставен од групи со незаситени врски или, пак, целиот комплекс треба да биде во можност да го прифати негативното наелектризирање. Сите атоми што содржат слободен електронски пар во орбитали со поголема енергија може да бидат донори на електрони, како, на пример, хетероатомите O, N и S.

Бојата зависи од повеќе фактори: хемиската конституција, природата на растворувачот, рН на средината, концентрацијата, дебелината на слојот, фреквенцијата на влезната светлина и др.

Во зависност од рН на средината бојата се менува ако слободниот електронски пар на ауксохромната група гради сол. Батохромното поместување на апсорпцискиот максимум се јавува во базна средина ако молекулата содржи $-OH$ група, додека, пак, ист ефект ќе се јави во кисела средина ако молекулата содржи $-NH_2$ група. Оттука, ваквите соединенија можат да се употребуваат како индикатори (метил црвено, фенолфталеин, р-хидроксиазобензен и др.).

Бојата зависи и од природата на растворувачот. Поларните и неполарните растворувачи влијаат на промената на положбата на апсорпцискиот спектар (јодот во неполарен растворувач е црвен, а растворен во поларен растворувач е со кафеава боја).

Апсорпција на неоргански анјони

Одреден број неоргански анјони покажува ултравioletови апсорпциски пикови како резултат на $n \rightarrow \pi^*$ премини, како, на пример, нитратните (313 nm), карбонатните (217 nm), нитритните (360 и 280 nm), азидните (217 nm) и тритиокарбонатните јони (500 nm).

Апсорпција при пренос на полнеж

Апсорпцијата што се јавува при пренос на полнеж е значајна за квантитативни цели заради високите вредности на моларната апсорптивност ($\epsilon_{\max} > 10\,000$), што претставува причина за голема осетливост на определувањата.

Многу неоргански и органски комплекси покажуваат апсорпција при пренос на полнеж и се нарекуваат *комплекси со пренос на полнеж*. За комплексите да покажат спектар при пренос на полнежот, неопходно е едната компонента да има електрон-донорски карактеристики, а другата електрон-акцепторски. Апсорпцијата на зрачењето тогаш вклучува премин на електронот од донорската група во орбиталата, главно, поврзана со акцепторската група. Во тој случај побудената состојба е резултат на некој вид внатрешен оксидирачко-редукциски процес. Ова

однесување се разликува од тоа на органските хромофори каде што побудените електрони се наоѓаат во молекулска орбитала формирана помеѓу два или повеќе атоми.

Најпознати примери на комплекси со пренесување полнеж се фенолните и тиоцијанатните комплекси на железо (III), *o*-фенатролински комплекс на железо (II), комплексите на молекулскиот јод со јодиден јон, како и хексацијаноферат (II)/хексацијаноферат (III) комплексот одговорен за бојата пруско (Prussian) сино.

Кај поголем број комплекси со пренос на полнеж што содржат јон на метал, металот игра улога на акцептор на електрони. Исклучок се комплексите на 1,10-фенантролин со железо (III) и бакар (I) каде акцептор е лигандот, а металниот јон донор на електрони.

Квалитативна анализа

Ултравioletовата и видливата спектрофотометрија имаат ограничена примена за квалитативна анализа, бидејќи бројот на апсорпциски максимуми и минимума е релативно мал. Молекулите што содржат слични хромофори апсорбираат во приближно исто спектрално подрачје. Оттука, најчесто е невозможно да се изврши недвосмислена идентификација на органските компоненти. Но и покрај тоа, апсорпцискиот спектар во ултравioletовото и видливото подрачје е корисен за утврдување присуство на одредени функционални групи што имаат улога на хромофори. Поларните растворувачи, како што се: водата, алкохолите, естрите и кетоните може да ја променат фината структура на спектарот што потекнува од вибрациските ефекти (премини), па затоа е потребно да се избегнуваат кога се врши анализа на одредени спектрални поединости. Неполарните растворувачи, како циклохексанот, даваат спектри слични на оние во гасна фаза. Поларноста на растворувачот често влијае и на положбата на апсорпцискиот максимум, поради што при споредување на спектрите со цел за идентификација мора да се употребуваат исти растворувачи.

Интерпретација на UV/Vis спектри

Примената на UV/Vis спектрите најчесто е ограничена на идентификација на групите што апсорбираат (хромофорите). Комплетната структура може да се добие со примена на другите структурни методи (инфрацрвена спектрометрија, нуклеарно-магнетно резонантна спектроскопија и масена спектрометрија).

При интерпретација на спектрите, најпрво, треба да се обрне внимание на следното:

а) Изгледот, сложеноста („фина структура“) и положбата на спектарот. Спектарот што содржи многу апсорпциски ленти што се протегаат и во видливото подрачје е доказ за постоење долги конјугирани или полициклични ароматични хромофори. Ако спектарот на некое соединение содржи една или мал број ленти со бранови должини на максимум апсорпција помали од 300 nm, тогаш станува збор за соединение со најмногу два до три конјугирани системи (хромофори).

б) Интензитет на апсорпциските ленти (ϵ) претставува важна карактеристика во идентификацијата на хромофорите. Едноставните конјугирани хромофори како што се 1,3-диените и α,β -незаситените кетони имаат вредности за моларната апсорптивност помеѓу 10 000 и 20 000. Во спектрите на подолгите линеарни конјугирани системи, главните максимуми, особено оние што се наоѓаат на поголеми бранови должини, имаат значајно поголема вредност за ϵ . Од друга страна, апсорпциските ленти со слаб интензитет во подрачјето од 270

до 350 nm, чиј интензитет се движи во опсегот на ϵ од 10 до 100, потекнуваат од $n \rightarrow \pi^*$ премините во карбонилната група. Присуство на апсорпциски ленти со среден интензитет во блиското UV подрачје ($\epsilon = 1\ 000 - 10\ 000$) укажува на ароматичен систем. Многу несупституирани ароматични соединенија даваат апсорпциски ленти со интензитет од тој ред величина, затоа што потекнуваат од *забранетите* електронски премини. Кога во ароматичното соединение се супституирани групи што го продолжуваат хромофорниот систем, се појавуваат силни ленти со вредности за ϵ поголеми од 10 000.

По овие почетни претпоставки за природата на хромофорите, потребно е да се побара модел-соединение што ги содржи овие или слични хромофори. Тоа денес е олеснето со користење спектрални бази на голем број соединенија.

Квантитативна анализа

Апсорпциската спектрометрија што се темели на ултравioletовото и видливото зрачење е еден од најупотребуваните достапни методи за квантитативна анализа. Значајни карактеристики на спектрофотометриските методи се:

- *Широката применливост.* Многу голем број органски и неоргански соединенија апсорбираат или во ултравioletовото или во видливото подрачје. Со овој метод квантитативно може да се определат и соединенија што не содржат хромофор, со претходна дериватизација со молекула што содржи хромофор. Јасно е дека ваквата реакција на дериватизација треба да биде квантитативна за да се трансформира целото количество од соединението. На овој начин може да се определат: амини (по реакција со пикрати), шеќери (по трансформација во озазони) и алдехиди или кетони (по реакција со 2,4-динитрофенилхидразон). Покрај органски, квантитативно може да се определат и неоргански соединенија, како, на пример комплекси на метали што апсорбираат во видливиот дел од спектарот.

Утврдено е дека повеќе од 90% од квантитативните анализи во клиничките лаборатории се темелат на апсорпција на ултравioletовото и на видливото зрачење.

- *Висока осетливост.* Карактеристичните граници на детекција се движат во границите од 10^{-4} до 10^{-5} M (ова подрачје може да се прошири со примена на одредени модификации и до 10^{-6} па и до 10^{-7} M).

- *Умерена до висока селективност.* Често може да се најде бранова должина на која апсорбира само аналитот, поради што не е потребно претходно разделување.

- *Прифатлива точност.* Вообичаено релативната грешка се движи во граници од 1-3 %, но ако се преземат посебни мерки, грешката може да се намали на неколку десетини од процентот.

- *Едноставност и соодветност за автоматизација.* Спектрофотометриските мерења се едноставни и се изведуваат брзо. Исто така, овие методи се соодветни за автоматизација што овозможува брзо и соодветно собирање на податоците.

Високата осетливост, репродуцибилност и прецизност, како и можноста за анализа на водени раствори, овозможуваат UV/Vis спектрометријата да биде особено погодна за примена во квантитативната анализа на соединенија што содржат хромофори. Квантитативната анализа се заснова на Ламберт-Беровиот закон, односно на линеарната зависност меѓу апсорбанцијата и концентрацијата на супстанцијата што апсорбира. Откако ќе се утврдат условите за анализа, се подготвува **баждарен дијаграм** од серија на стандардни раствори со кои е опфатено концентрациското подрачје соодветно за примерокот. Речиси никогаш не треба да се претпостави покорувањето на Беровиот закон, како и употребата на

само еден стандарден раствор за определување на моларната апсорптивност. Исто така, резултатите од анализата не треба да се темелат на вредностите на моларната апсорптивност дадени во литературата, бидејќи истата се менува во зависност од мерењата на различни инструменти.

Методот на стандардни додатоци се употребува во случај кога се јавуваат потешкотии при подготовката на стандардни раствори со состав близок на оној на примерокот (сложени матрикси). Со примена на овој метод се овозможува отстранување на ефектите предизвикани од матриксот.

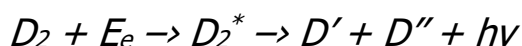
Ултравioletовата/видливата спектрометрија се применува и за следење на динамичките процеси, на пример, одредување на концентрацијата на продуктите (приносот) и реактантите во текот на хемиската реакција. На тој начин може да се определат различни кинетички и термодинамички величини, како што се: константите на дисоцијација на киселините и базите, константите на рамнотежа и на брзина на хемиските реакции и константите на стабилност на комплексите.

UV/Vis спектрофотометри

UV/Vis спектрофотометрите се состојат од четири компоненти: (1) извор на зрачење, (2) селектор на бранова должина (дисперзивни системи), (3) оддел за примерок (кивета) и (4) детектор. Одделот за примерок може да биде поставен пред или по дисперзивниот систем.

1) Извор на зрачење

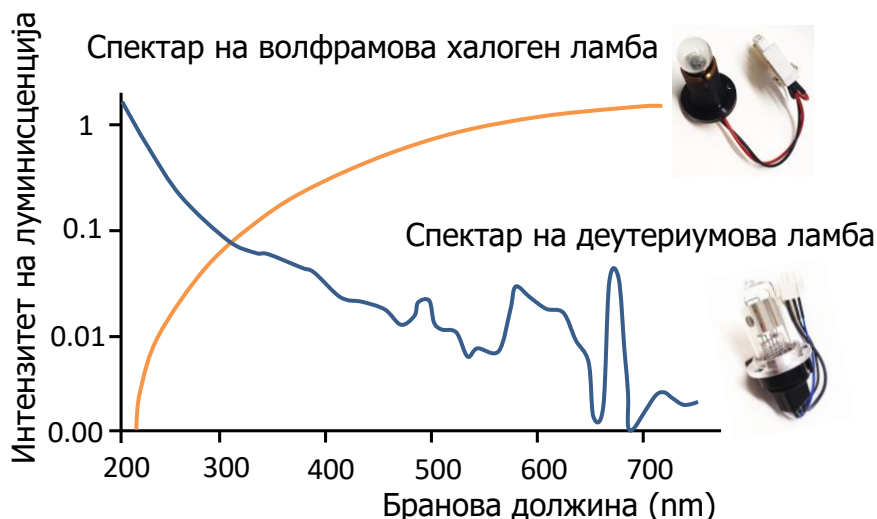
Деутериумова ламба. Континуиран спектар во UV регионот се добива со електронско побудување на молекули на деутериум или водород при ниски притисоци. Механизмот на добивање на континуиран спектар вклучува формирање побудени молекули на деутериум. Потоа овие побудени молекули дисоцираат во атоми и се ослободува фотон од ултравioletовиот регион:



при што E_e е електрична енергија што е апсорбирана од страна на молекулата на деутериум и D_2^* е побудена молекула на деутериум.

Деутериумовата ламба се состои од две електроди во атмосфера на деутериум, помеѓу кои е поставен метален филм со отвор од 1 mm во дијаметар. Напонот овозможува над отворот на металот да се формира лак, што е блиску до анодата. Анодата е во облик на чинија, додека катодата има облик на филамент. Напонот што е потребен за работа на оваа ламба е од 3 до 400 V. Под дејство на електронското бомбардирање, молекулите на деутериумот дисоцираат, при што континуирано емитуваат фотони во опсег од 160 до 375 nm (Слика 4.9).

Волфрамска ламба (Слика 4.9). Оваа ламба е најчесто користен извор за добивање на зрачење во видливиот или блискиот IR регион. Дистрибуцијата на енергија на овој извор е слична со црно тело и температурно е зависна. Кај поголемиот дел инструменти, работната температура на филаментот изнесува 2870 K. Волфрамската филаментна ламба емитува зрачење од 350 до 2500 nm. Волфрамската халоген ламба содржи мали количини на јод што се наоѓа во кварцна обвивка и филмент. Кварцната обвивка е потребна поради високите работни температури на ламбата. Волфрамската халоген ламба има подолг животен век во однос на волфрамската филаментна ламба и проширен опсег во ултравioletовиот дел од спектарот. Од овие причини, оваа ламба се вградува во современите спектроскопски инструменти.

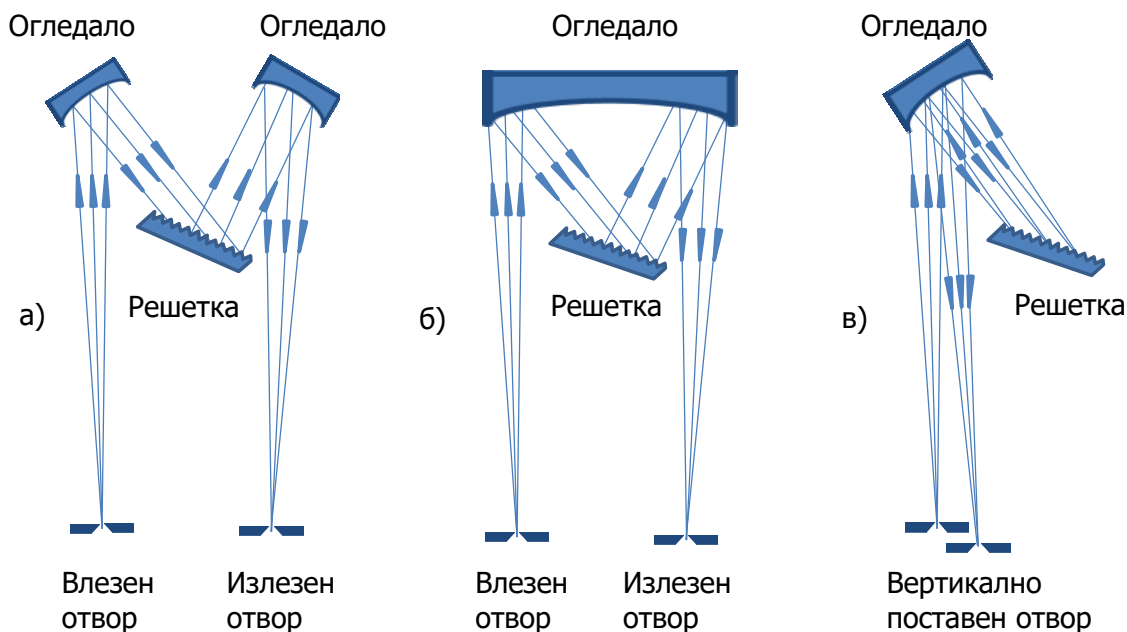


Слика 4.9 Емисиски спектар на деутериумова ламба и на волфрамова халоген-ламба

Ксенон ламба. Континуиран спектар на зрачење во опсег од 200 до 1000 nm се добива со пропуштање напон низ атмосфера со ксенон.

2) Дисперзивни системи и монохроматори

Зрачењето што се емитира од изворот се дисперзира со помош на планарна или конкавна дисперзивна решетка што има околу 1200 линии/ mm. Кај скенирачките спектрофотометри решетката е составен дел на монохроматорот што овозможува селектирање на зрачење со точно определена бранова должина. Брановата должина кај овие инструменти се селектира со ротирање на решетката (Слика 4.10).



Слика 4.10 Монохроматори со дисперзивна решетка: а) Черни-Тарнеров (Czerny-Turner) модел - сличен со *Ebert* моделот, вклучува две сферични огледала, б) Ебертов (Ebert) модел - се состои од едно конкавно сферично огледало што ги компензира отстапувањата, со што се обезбедува одличен квалитет на сликата, в) Модел со конкавна решетка - овозможува едновремено фокусирање и дисперзија на зрачењето.

3) Оддел за примерок

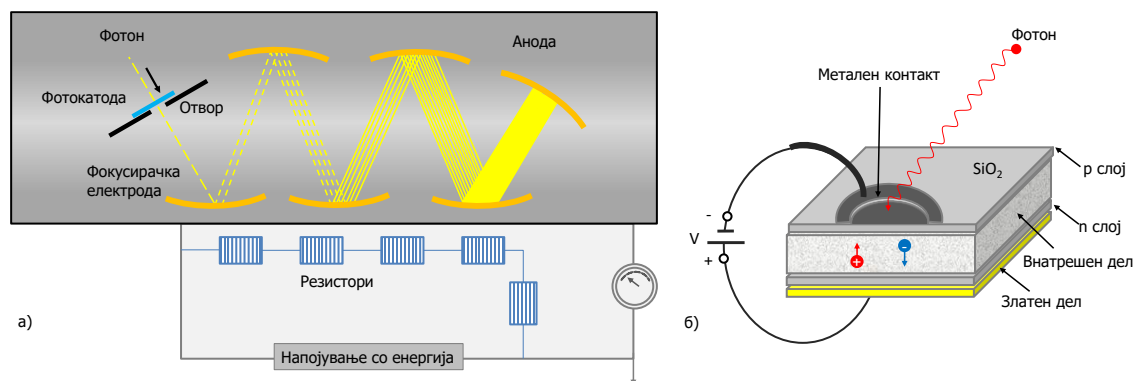
Одделот за примерок (кивета) треба да биде изработен од материјал што не апсорбира зрачење во спектралниот регион од интерес. Кивети изработени од кварц или фузирана силика се користат за работа во UV регионот (под 350 nm); овие супстанции се, исто така, транспарентни и за видливиот и инфрацрвениот регион. Кивети изработени од силикатно стакло можат да се користат за мерења од 350 до 2000 nm. Пластични кивети се користат за мерења во видливиот регион од спектарот. Најчесто користени кивети за мерења во UV/Vis регионот имаат должина на оптичкиот пат (ширина) од 1 cm. Во зависност од потребите на испитувањето, постојат кивети со различна должина на оптичкиот пат од 0,1 cm до 10 cm.

4) Детектор

Детекторот го мери интензитетот на зрачењето со определена бранова должина и го претвора во електричен сигнал. Постојат два типа на детектори: фотомултипликатори и семикондуктори (силиконски фотодиоди и детектор базиран на трансфер на полнеж - CCD/CID).

Фотомултипликаторот често се користи како детектор во спектрофотометрите. Тој е многу осетлив и неговата ефикасност зависи од продуктивноста на фотокатодата, како и од засилувањето на сигналот што настанува со каскадата со електрони. Вообичаено ударот на 10 000 фотони /s создава напон од 0,1 nA (Слика 4.11 а).

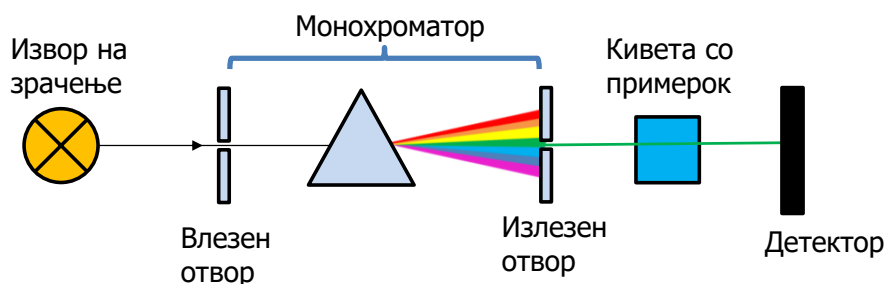
Кај спектрофотометрите што се користат во рутински анализи, фотомултипликаторот е заменет со фотодиоди (Слика 4.11 б). Фотодиодите имаат голема осетливост, линеарност и динамички опсег. Кај системите со диодна низа (*diode array*), секоја правоаголна диода (15 μm x 2,5 μm) е поврзана со кондензатор. Електричното коло последователно го обработува напонот на секој кондензатор.



Слика 4.11 а) Фотомултипликаторска туба, б) Фотодиода.

Едноканални спектрофотометри со еден зрак

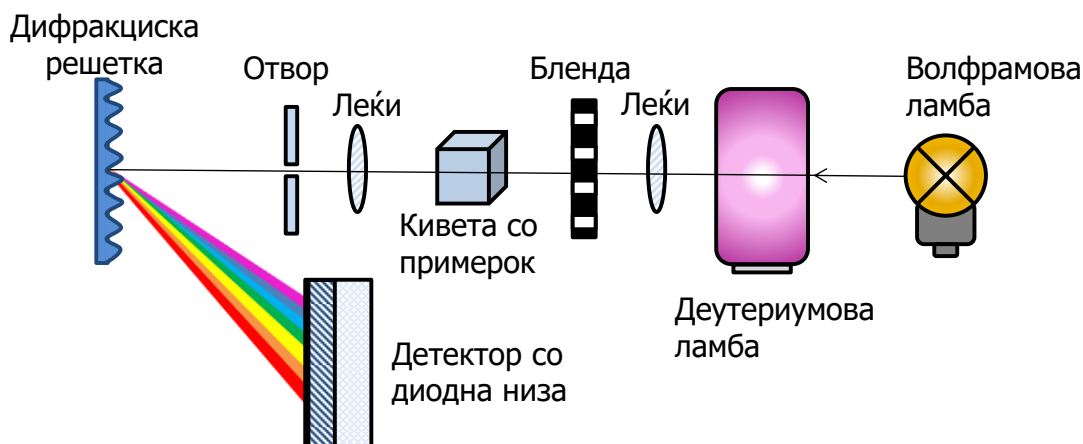
Овие инструменти имаат деутериумова или водородна и волфрамова ламба. Повеќето користат решетки за дисперзија на светлината и фотомултипликатор како детектор (Слика 4.12). Кај овој тип инструменти најпрво се врши мерење на слепа проба (содржи само растворувач и реагенси, но не содржи примерок за испитување), а потоа се мери раствор на примерокот за испитување.



Слика 4.12 Шематски приказ на спектрофотометар со еден зрак

Повеќеканални спектрофотометри со еден зрак

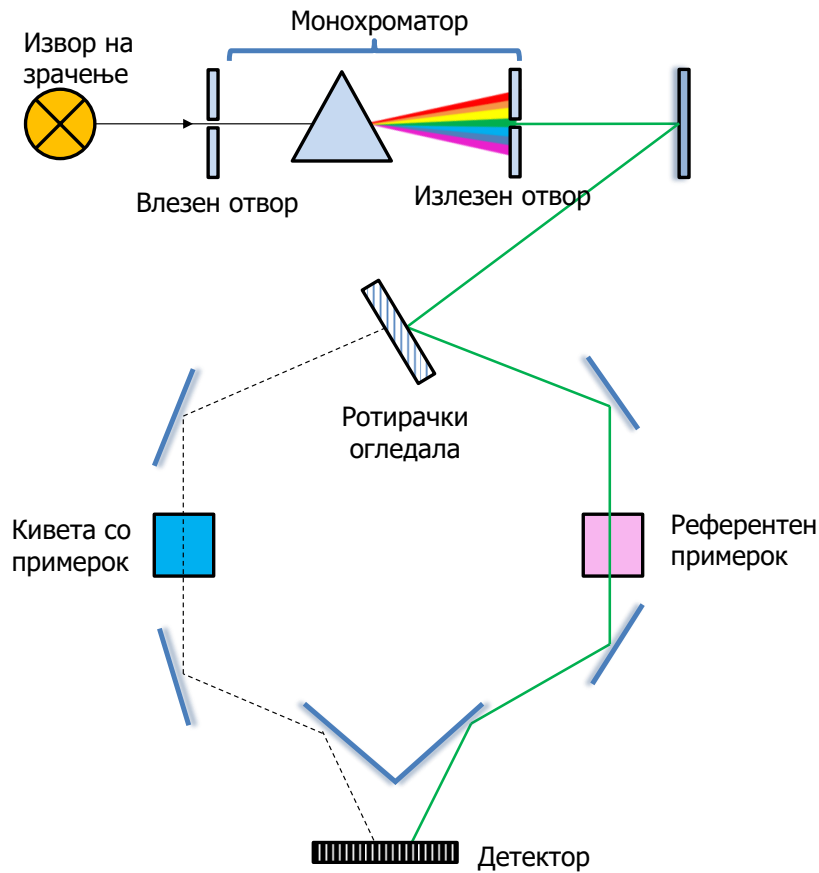
Овој тип инструменти наликуваат на спектрографи бидејќи овозможуваат истовремено мерење на сите бранови должини. Користат диодни низи како детектор (*diode array detector, DAD*) со околу 2000 мали фотодиоди (Слика 4.13). Спектрофотометрите со DAD можат да го снимат целиот спектар за само неколку милисекунди, при што секоја диода го мери интензитетот на зрачење на мал интервал на бранови должини. Моќта на резолуција на спектрометрите со диодна низа зависи од големината на диодите (најчесто се движи од 1 nm до 2 nm). Светлосниот зрак, кај овој тип инструменти, од изворот поминува прво низ одделот за примерок, па оди во монохроматорот. Ваков тип дизајн евозможен бидејќи брзината на скенирање е голема (неколку милисекунди) со што не постои можноста од фотолитичка деградација на примерокот. Овој тип инструменти се најчесто користени детектори во течната хроматографија.



Слика 4.13 Шематски приказ на спектрофотометар со диодна низа

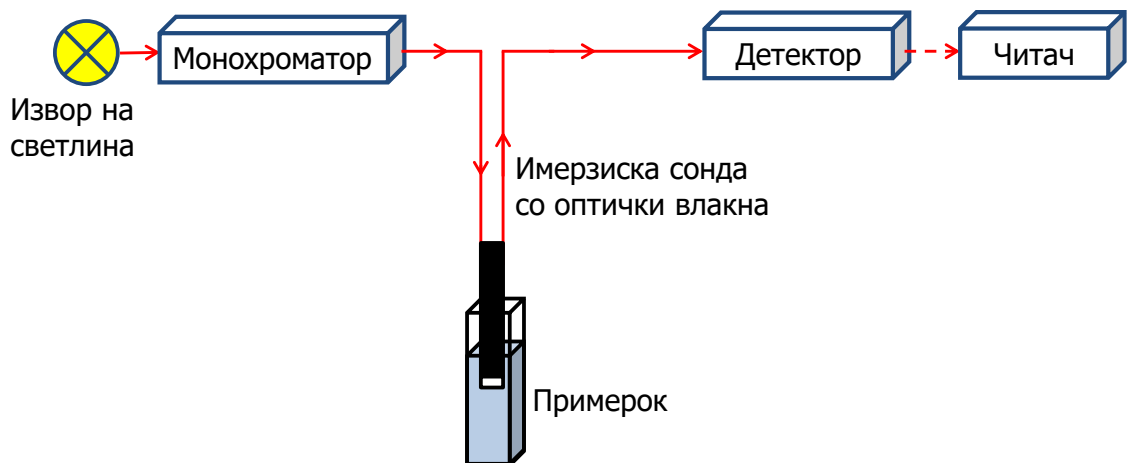
Спектрофотометри со два зрака (скенирачки)

Инструментите со два зрака се дизајнирани така што едниот зрак поминува низ примерокот за анализа, а другиот зрак поминува низ референтен примерок. Со помош на две огледала што ротираат (*choppers*) се овозможува во детекторот да се направи споредба на интензитетот на пропуштената светлина од двата зрака со иста бранова должина (од референтниот примерок и од анализата) (Слика 4.14). Овие инструменти се карактеризираат со голема брзина на скенирање (30 nm/s) и голем линеарен опсег.



Слика 4.14 Шематски приказ на спектрофотометар со два зрака

Рутински мерења на далечина на цели производни серии, без потреба од узорцирање, како и следење на концентрацијата на производ на самата производна линија е овозможено со примена на имерзиски сонди (Слика 4.15). Овие направи се составени од две оптички влакна што го спроведуваат зрачењето до примерокот и од примерокот, по апсорпцијата на зрачење, назад кон инструментот. Монохроматската светлина од спектрофотометарот се спроведува до имерзиската ќелија и потоа назад до детекторот. Дополнително, низ оптичките влакна се спроведува и референтен зрак.



Слика 4.15 Шематски приказ на спектрофотометар со имерзиска сонда

Деривативна спектрофотометрија

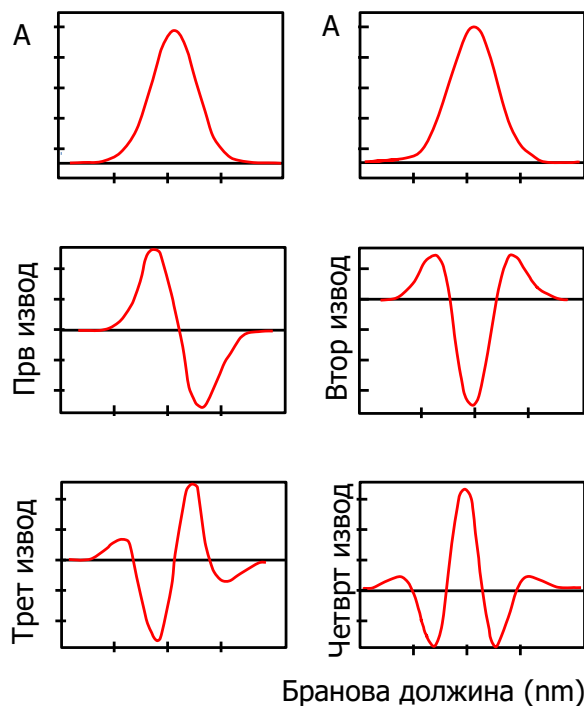
Деривативната спектрофотометрија вклучува деривирање на апсорпцискиот спектар (нулти-ред) во прв, во втор или во повисок ред на деривативен спектар.

Првиот деривативен спектар се добива кога апсорбанцијата на супстанцијата (што е функција од брановата должина, $\Delta A/\Delta \lambda$) се деривира во однос на брановата должина, при што се добива график што претставува прв извод од снимениот спектар.

Ако се продолжи со деривирањето се добива график на втор извод ($\Delta^2 A/\Delta \lambda^2$) или график што е резултат на извод од повисок ред.

Деривативните спектри претставуваат карактеристични биполарни криви. Кривата што е резултат на прв извод од апсорпцискиот спектар има екстреми при инфлексните точки на апсорпцискиот спектар, а првиот извод е нула при λ_{\max} .

Кривата што е резултат на извод од втор ред е биполарна функција чиј централен пик има негативен предзнак и бранова должина што се совпаѓа со λ_{\max} на спектарот од нулти-ред. Централниот пик е проследен со странични пикови од послаб интензитет што укажуваат на степенот и комплексноста на деривативната операција (Слика 4.16).



Слика 4.16 Деривативни спектри

Важна карактеристика на деривативните процеси е тоа што со деривирањето пошироките пикови претрпуваат поголеми промени отколку потесните пикови. Овој ефект расте со растење на степенот на деривирање, така што амплитудата на пикот при n -тата деривација (nD) е обратно пропорционален на n -тата степен од широчината (W) на оригиналниот пик (${}^nD = W^{-n}$).

Вториот извод, на секоја бранова должина (λ), е поврзан со концентрацијата преку равенката:

$$\frac{dA^2}{d\lambda^2} = \frac{dA_{1cm}^{1\%}}{d\lambda^2} \cdot \frac{c' \cdot b}{10} = \frac{d^2 A \cdot \epsilon}{d\lambda^2} \cdot \frac{c \cdot b}{10} \quad (4.3)$$

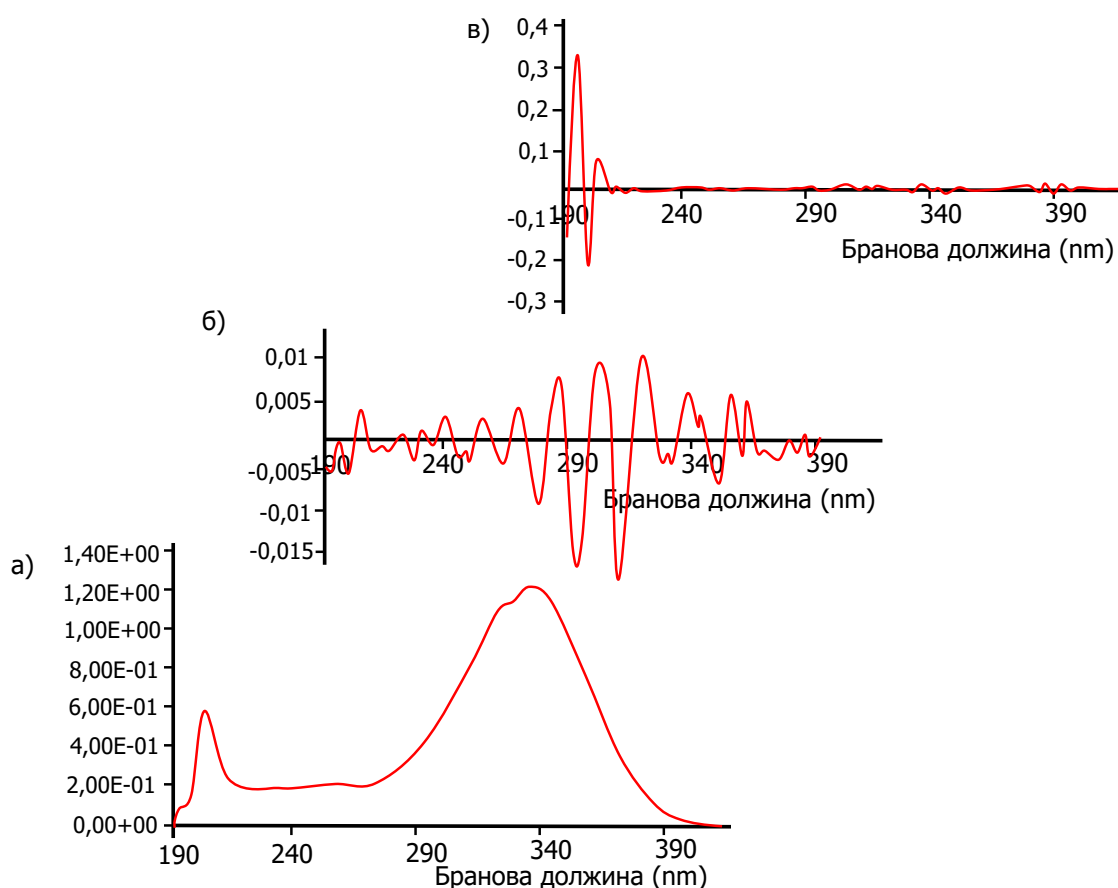
каде што c' е концентрација на растворот, во g/L.

Деривативните спектри овозможуваат отстранување интерференции од матриксот и зголемување на резолуцијата на пиковите од интерес, со што се обезбедува поголема точност при определувањата.

Една од најзначајните примени на деривативната спектрометрија во ултравioletовото и видливото подрачје е за идентификација и определување на компоненти во смеси, бидејќи деривативните спектри имаат многу повеќе спектрални поединости во однос на спектрите од нулти-ред. На овој начин се овозможува разделување на компонентите кај кои се јавува препоклопување на спектрите. Исто така, постапката на деривирање е значајна при определување супстанции што содржат повеќе хромофори чии апсорпциски пикови се препоклопуваат и даваат широка апсорпциска лента во спектарот.

На Слика 4.17 е прикажан начинот на кој деривирањето може да ги разоткрие спектралните поединости на спектар составен од три апсорпциски пикови кои меѓусебно се препоклопуваат.

За добивање на деривативни спектри најчесто се користат спектрофотометри со микропроцесори што овозможуваат дигитална обработка на спектрите или со употреба на аналогни инструменти.



Слика 4.17. Апсорпциски спектар на етанолен раствор на ретинол ацетат: а) спектар од нулти-ред, б) петти извод на деривативен спектар добиен со последователно деривирање на спектар од нулти-ред, в) петти извод на деривативен спектар добиен директно од спектар од нулти-ред.

МОЛЕКУЛСКА ЛУМИНИСЦЕНТНА СПЕКТРОМЕТРИЈА

Молекулската луминисценција опфаќа три слични оптички методи: молекулска флуоресценција, фосфоресценција и хемилуминисценција. Во секој од овие методи, побудените молекули на анализот емитуваат електромагнетно зрачење што може да се искористи за квалитативна и за квантитативна анализа.

При флуоресценцијата и фосфоресценцијата побудувањето на молекулите настанува со апсорпција на фотони на електромагнетно зрачење. Поради тоа, овие два феномена се познати како посебни типови на **фотолуминисценција**. Во **хемилуминисценцијата**, продуктот на хемиската реакција се наоѓа во електронски побудена состојба, односно побудувањето на молекулата и, следствено, емисијата на зрачење настанува како резултат на апсорпција на хемиска енергија што се ослободува при одредена хемиска реакција.

Со мерење на интензитетот на фотолуминисценцијата и хемилуминисценцијата се овозможува квантитативно определување на значајни органски и неоргански соединенија во многу мала количина (траги). Една од многуте значајни карактеристики на луминисцентните методи е токму нивната осетливост, чиј лимит на детекција (од редот на ppb) многу често е еден до три реда величини помал од оној во апсорпциската спектрометрија.

Друга предност на фотолуминисцентните методи е големото концентрациско подрачје на линеарност, во споредба со апсорпциските методи.

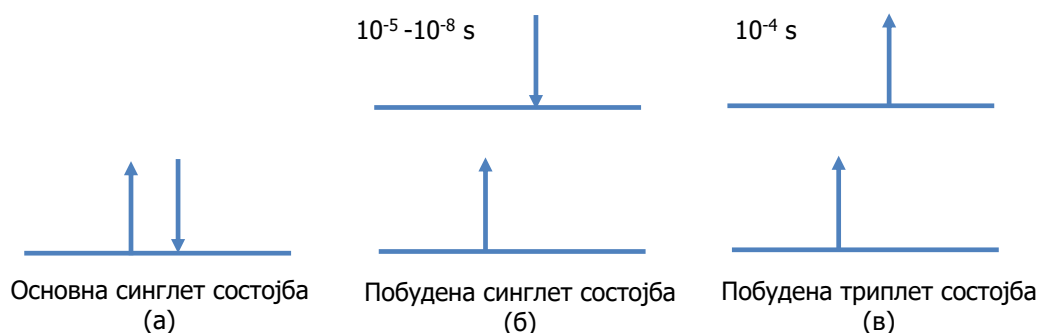
Заради нивната висока осетливост, квантитативните фотолуминисцентни методи често пати се проследени со ефекти на интерференција од матрицот. Од тие причини, фотолуминисцентните методи често се комбинираат со хроматографски техники, како, на пример, течната хроматографија и капиларната електрофореза и наоѓаат широка примена за квантитативна анализа во биолошки материјал.

Општо, луминисцентните методи поретко се употребуваат за квантитативна анализа од апсорпциските методи, бидејќи најголем број супстанции апсорбираат во ултравиолетовото и видливото подрачје, а помал дел од нив флуоресцираат со апсорпција на зрачење од ова подрачје на спектарот.

Теорија на флуоресценција и фосфоресценција

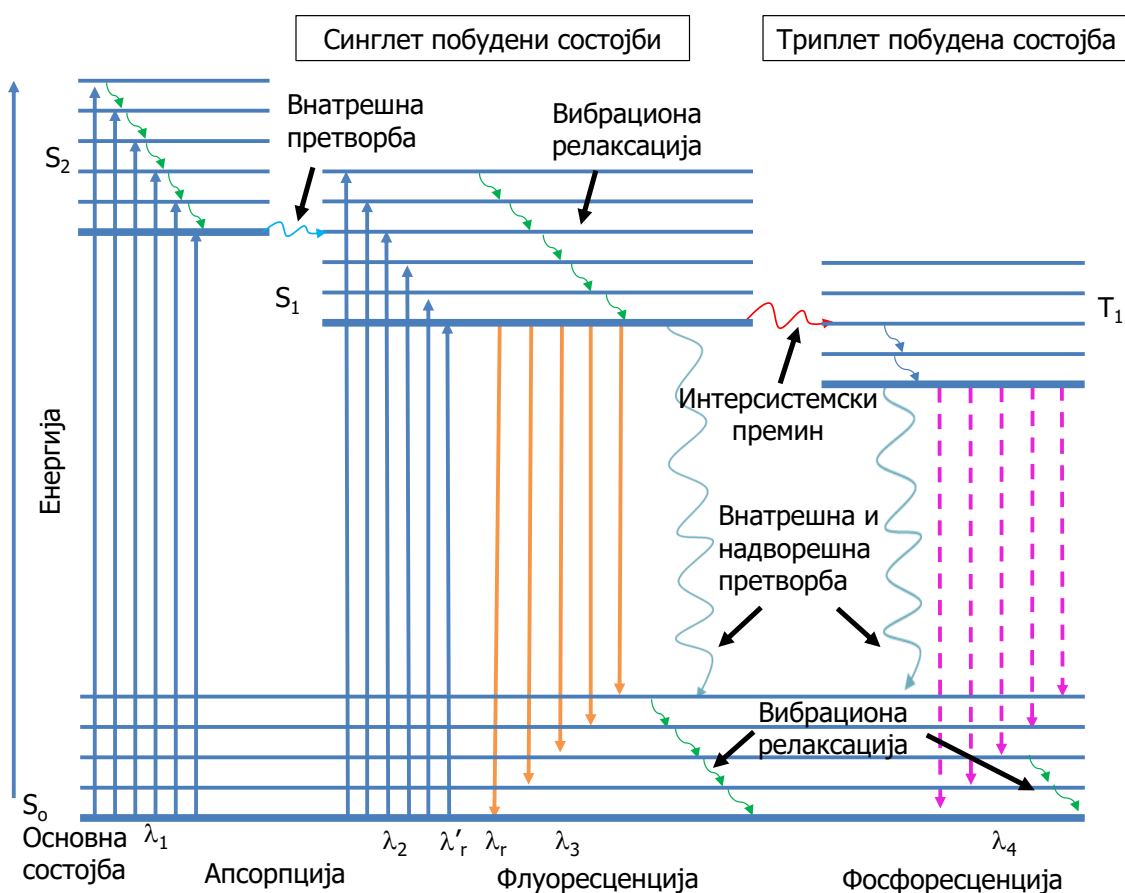
За да настане појава на флуоресценција молекулата на анализот мора да апсорбира фотон, при што електронот од основната состојба преминува на едно од вибрациските нивоа во рамките на побудената електронска состојба. Притоа постојат два можни *електронски* премини: без и со промена на насоката на спинот.

Електроните имаат способност да ротираат околу својата замислена оска (т.е. имаат спин), што може да го замислиме како движење во насоката и обратно од насоката на движење на стрелките од часовникот. За два електрона да пополнат иста орбитала, нивните спиновите мора да бидат спротивни - антипаралелни (т.е. тие треба да ротираат во спротивни насоки). Тогаш велиме дека спиновите на електроните се *спарени*. Ако едниот електрон биде побуден на повисоко електронско ниво без да му се промени насоката на спинот, тој сè уште има спин со спротивна насока во однос на спинот на електронот што останал во основното електронско ниво, во истата орбитала. Оваа побудена состојба во молекулата во која спиновите на електроните се со спротивна насока се нарекува состојба на *синглет*. Ако спиновите на електроните се паралелни (двата ротираат во иста насока, како резултат на промена на спинот на побудениот електрон), побудената состојба е позната како состојба на *триплет* (Слика 5.1).



Слика 5.1 Електронски спин состојби на молекули. Во (а) е прикажана основната електронска состојба. При најмала енергија, во основната состојба, спиновите се спарени секогаш, а за состојбата се вели дека е основна состојба. Во (б) и во (в) прикажани се побудени електронски состојби. Ако спиновите останат спарени во побудена состојба, молекулата е во побудена синглет состојба (б). Ако спиновите станат неспарени, молекулата е во побудена триплет состојба (в).

Молекулската електронска состојба во која спиновите на електроните се спарени е означена како основна синглет состојба, S_0 . На собна температура оваа состојба ја претставува основната енергија на сите молекули во растворот. Секоја побудена состојба има синглет, S_1 и соодветна триплет состојба T_1 . Енергетските нивоа на состојбата на синглет се повисоки од соодветните енергетски нивоа на состојбата на триплет (Слика 5.2).



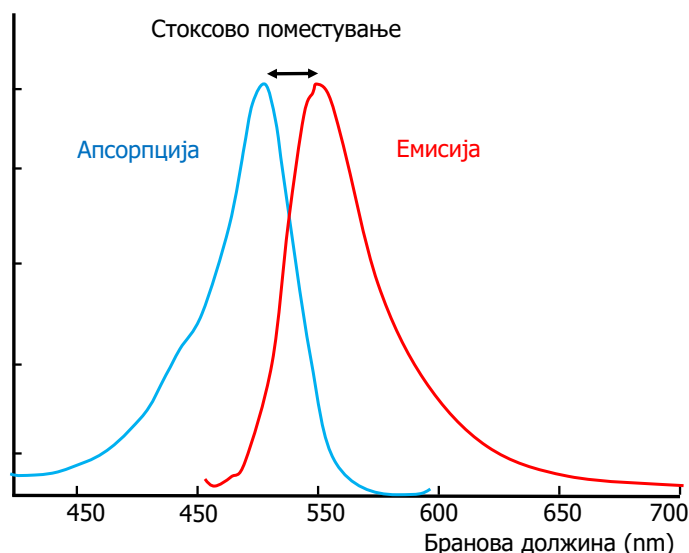
Слика 5.2 Дијаграм на енергетски нивоа на фотолуминисцентен систем

Време потребно за апсорпција и за емисија на светлината

Фотолуминисценцијата опфаќа два процеса: апсорпција и емисија на светлината, при што секој од овие процеси трае одредено време. Времето потребно за апсорпција на фотон на електромагнетното зрачење (побудување на молекулата) е многу кратко и изнесува од 10^{-14} до 10^{-15} s. Во зависност од времетраењето на побудената состојба, односно времетраењето од побудувањето до емисијата на светлината, разликуваме две појави: флуоресценција и фосфоресценција. Флуоресцентната емисија се одвива за значително подолго време во однос на апсорпцијата. Времетраењето на побудената состојба има обратнопропорционална зависност со моларната апсорптивност на пикот добиен при процесот на апсорпција. Така, за моларна апсорптивност во подрачје од 10^3 до 10^5 , времетраењето на побудената состојба изнесува 10^{-7} до 10^{-9} s. За систем со помала апсорптивност, каде што веројатноста за одигрување на процесите на премин е помала, времетраењето на побудената состојба е 10^{-6} s до 10^{-5} s.

Триплет/синглет премините т.е. премините во молекулата од побудената триплет состојба во основната синглет состојба се помалку веројатни од соодветните синглет/синглет премини (т.е. премините во молекулата од побудената синглет во основната синглет состојба). Како резултат на тоа, просечното време на задржување на електронот во побудената триплет состојба, односно фосфоресцентната емисија трае од 10^{-4} до 10 s и повеќе, споредено со просечното време на задржување на електронот од 10^{-5} до 10^{-8} s во побудената синглет состојба. Исто така, постои мала веројатност да настане побудување со апсорпција на зрачење од основната синглет на побудената триплет состојба, така што апсорпциските пикови што се јавуваат како резултат на овој процес имаат помал интензитет (и тоа од неколку редови на величина) во однос на апсорпциските пикови на соодветните синглет/синглет премини.

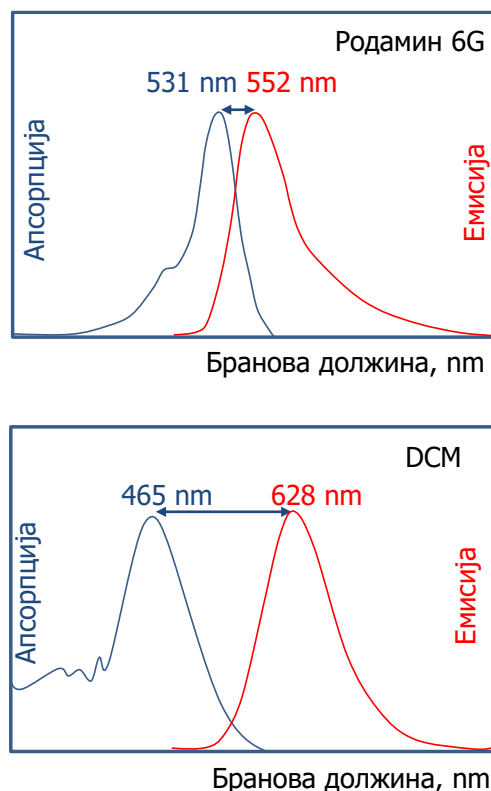
По апсорпција на електромагнетно зрачење, електронот се побудува на повисоко вибрациско ниво во рамките на побудената синглет состојба. Оваа состојба е позната како вибрациско побудена електронска состојба. Вибрациско побудената молекула брзо се релаксира до најниското вибрациско ниво на побудената електронска состојба, спуштајќи се низ „скалите“ на вибрациската енергија (Слика 5.2). Сега молекулата може да се врати во основната електронска состојба преку емисија на фотони со енергија еднаква на енергетската разлика меѓу двете електронски состојби. Овој процес, при кој настанува побудување на електронот (со апсорпција на фотони) на вибрациско побудена состојба, следено со брз премин меѓу две состојби со иста насока на спинот (синглет во синглет) при што доаѓа до емисија на фотони се нарекува **флуоресценција**. Ако енергијата на зрачењето што предизвикала електронски синглет/синглет премин е еднаква со енергијата на емитираните фотони, станува збор за т.н. **резонантна флуоресценција**. Од друга страна пак, емисијата на зрачење со помала енергија од апсорбираното зрачење (односно со поголема бранова должина од апсорбираната), како резултат на релаксацијата без емисија на зрачење меѓу вибрациските нивоа на побудената синглет електронска состојба е позната како **Стоксова (Stokes) флуоресценција** (Слика 5.3).



Слика 5.3 Стоксова флуоресценција

Кај фотолуминисцентните појави побудувачката светлина речиси секогаш е со помала бранова должина од фотолуминисцентната светлина. Најчесто фотолуминисцентната светлина е во видливиот, а побудувачката во ултравиолетовиот дел од спектарот.

Степенот на Стоксовото поместување зависи од видот на флуорофорот, како и од поларноста на растворувачот. Вообичаено, растворувачите со поголема поларност даваат поголемо Стоксово поместување. На Слика 5.4 се прикажани апсорпциските и емисиските спектри на два флуорофора со мало и со големо Стоксово поместување.



Слика 5.4 Апсорпциски и емисиски спектри на родамин 6G во етанол и 4-(дицианометил)-2-метил-6-(4-диметиламиностирил)-4H-пиран во 0,1 M сулфурна киселина

Процеси на релаксација

Побудената молекула може да се врати во основната состојба со комбинација од неколку процеси на релаксација. Два од овие процеси при коишто доаѓа до емисија на зрачење се флуоресценцијата и фосфоресценцијата. Другите се процеси на релаксација без емисија на зрачење. Најповолниот пат до основната состојба е оној што го скратува времето на задржување на електронот во побудена состојба. Така, ако флуоресцентната релаксација е побрза во однос на нерадијациските процеси (процеси на релаксација без емисија на зрачење, каде што енергијата на побудување се губи како топлина што молекулите ја предаваат на околината), тогаш при релаксацијата доаѓа до емисија на зрачење. Од друга страна, ако нерадијациските процеси се поповолни, тогаш или флуоресценцијата отсуствува или е со послаб интензитет.

Вибрациска релаксација

При апсорпција на зрачење молекулата може да биде побудена на кое било од вибрациските нивоа на побудената електронска состојба. Меѓутоа, во раствор, вишокот вибрациска енергија веднаш се губи при судирите на побудените молекули со молекулите на растворувачот. Зголемената вибрациска енергија на растворувачот доведува до незначително зголемување на температурата на средината. Вибрациската релаксација е толку ефикасен процес што просечното време на живот на *вибрациско побудената* молекула изнесува 10^{-12} s или помалку (период значително пократок од просечното време на задржување во побудената електронска состојба). Како резултат на тоа, се емитува флуоресцентно зрачење со премин од најниското вибрациско ниво на побудената електронска состојба. Притоа се добиваат неколку блиску поставени емисиски пикови, бидејќи електронот може да премине на кое било од вибрациските нивоа на основната состојба. Во основната состојба, молекулата може да го изгуби вишокот вибрациска енергија со дополнителна (вибрациска) релаксација до основното вибрациско ниво (Слика 5.2).

Поради вибрациската релаксација, флуоресцентната лента на даден електронски премин се поместува кон поголеми бранови должини (помали фреквенции) во однос на апсорпциската лента (Слика 5.3).

Внатрешна претворба

Внатрешната претворба ги опишува интермолекуларните процеси во кои молекулата преминува на пониски електронски состојби без емисија на зрачење. Релаксација може да настане меѓу најниското вибрациско ниво на некоја побудена електронска состојба и горните вибрациски нивоа на пониската електронска состојба (Слика 5.2). Внатрешната претворба е многу помалку ефикасна од вибрациската релаксација.

Внатрешната претворба може да се реализира и преку феноменот на **предисоцијација**. Тука електронот од повисоката електронска состојба на повисокото вибрациско ниво преминува во пониската електронска состојба во којашто вибрациската енергија е доволно голема да предизвика кинење на врската. Предисоцијацијата треба да се разграничи од процесот на **дисоцијација**, при која апсорбираното зрачење го побудува електронот на хромофорот директно на вибрациско ниво со доволно висока енергија да предизвика кинење на хромофорската врска. Затоа дисоцијацијата не е процес на внатрешна претворба.

Механизмите на внатрешната претворба не се потполно објаснети, но крајниот ефект од овој тип релаксација е незначителното зголемување на температурата на средината.

Надворешна претворба

Релаксација од побудените електронски состојби може да настане и при интеракција и пренос на енергија меѓу побудените молекули и молекулите на растворувачот или на другите растворени супстанции. Овие процеси се познати како *надворешна претворба* или *гасење со судири* (collisional quenching). Пример за надворешна претворба е влијанието на растворувачот врз интензитетот на флуоресценцијата. Условите на средината кои се стремат да го намалат бројот на судирите меѓу молекулите, како што се намалената температура или високата вискозност, обично ја засилуваат флуоресценцијата. Нерадијациските премини на основната состојба од најниската побудена синглет или триплет состојба најверојатно се одвиваат според механизмите на надворешната и на внатрешната претворба (Слика 5.2).

Интерсистемски премин

Интерсистемски премин е процес при кој се менува насоката на спинот на побудениот електрон. Како и кај внатрешната претворба, веројатноста за ваков премин е поголема ако се преклопуваат вибрациските нивоа на две соседни побудени состојби. При синглет/триплет премин најниското вибрациско ниво на побудената синглет состојба се преклопува со едно од повисоките вибрациски нивоа на побудената триплет состојба. На тој начин и промената на насоката на спинот на побудениот електрон во вакви услови е многу поверојатна (Слика 5.2).

Интерсистемскиот премин е најчест во молекулите што содржат тешки атоми, како јод или бром (се нарекува уште и *ефект на тешки атоми*).

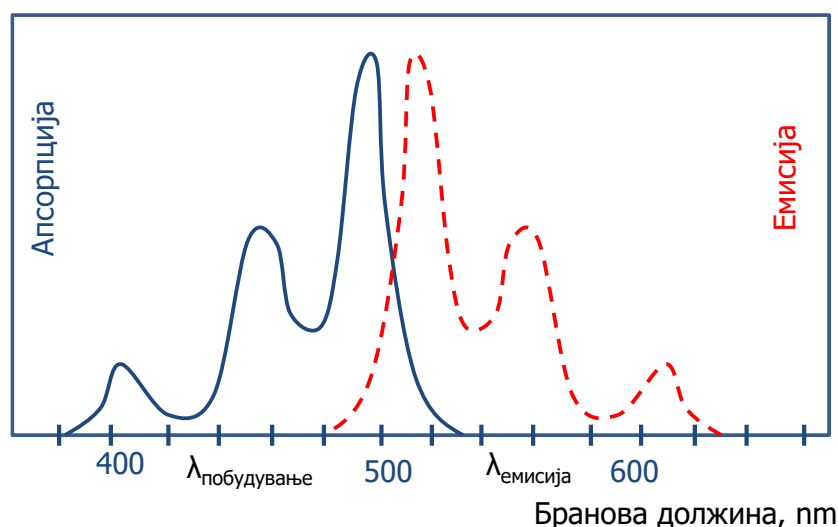
Фосфоресценција

Релаксацијата од побудените електронски состојби може да настане и преку процесот на фосфоресценција. По интерсистемскиот премин во побудената триплет состојба, релаксацијата до основната состојба може да настане по пат на внатрешна или на надворешна претворба или на фосфоресценција. Триплет/синглет преминот е помалку веројатен од синглет/синглет преминот. Поради тоа, просечното време на побудената триплет состојба се движи од 10^{-4} s до десетина секунди или повеќе. Така, емисијата на зрачење од триплет/синглет преминот може да трае одредено време по отстранување на екситирачкото зрачење. Емитираните фотони при фосфоресценцијата имаат помала енергија (т.е. поголеми бранови должини) од емитираните фотони при флуоресценцијата.

Надворешните и внатрешните претворби толку успешно се натпреваруваат со фосфоресценцијата што овој процес на емисија на зрачење се набљудува само на ниски температури, во вискозни средини или од молекули што се атсорбирани на цврсти површини.

Меѓусебен однос помеѓу апсорпциските и флуоресцентните спектри

Поаѓајќи од фактот дека енергетските разлики помеѓу вибрациските состојби се еднакви, како во основната така и во побудената состојба, апсорпцискиот или побудувачкиот спектар и флуоресцентниот спектар на соединението често се прикажуваат како предмет и лик во огледалото, со препоклопување на резонантната линија (Слика 5.5).



Слика 5.5 Побудувачкиот спектар и флуоресцентниот спектар на хипотетичко соединение

Фактори што влијаат на флуоресценцијата и фосфоресценцијата

Структурата на молекулите и хемиската околина влијаат врз појавата, односно отсуството на луминисценција. Од овие фактори зависи и интензитетот на емисијата при процесите на луминисценција.

Молекули што флуоресцираат

Секоја молекула што апсорбира зрачење од UV/Vis подрачјето има можност да флуоресцира. Меѓутоа, најголем број од нив не флуоресцираат, бидејќи нивната структура овозможува релаксација без појава на зрачење, што е побрза од флуоресцентната емисија.

Квантното искористување или *квантната ефикасност* на молекулската флуоресценција претставува однос меѓу бројот на молекулите кои флуоресцираат и вкупниот број на побудени молекули. Високофлуоресцентните молекули, како што е флуоресцеинот, во некои услови имаат вредност за квантната ефикасност што се приближува до единица. Ефикасноста на нефлуоресцентните молекули, главно, е еднаква на нула.

Типови на премини во флуоресценцијата

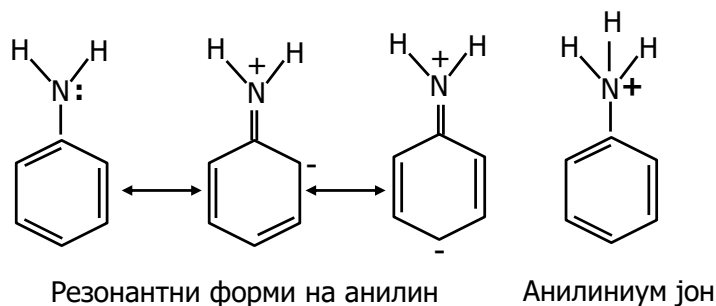
Флуоресценцијата ретко се јавува по апсорпција на ултравиолетово зрачење со бранови должини помали од 250 nm, бидејќи тие имаат доволна енергија да предизвикаат релаксација од побудените состојби преку процеси на предисоцијација или дисоцијација. Како што е веќе претходно кажано, флуоресценцијата најчесто настанува при премин од најниското вибрациско ниво на првата побудена електронска состојба на едно од вибрациските нивоа од основната електронска состојба. Кај најголем дел од флуоресцентните соединенија зрачењето настанува поради $n \rightarrow \pi^*$ или $\pi \rightarrow \pi^*$ премин, зависно од тоа за кој од нив е потребна пониска енергија. Главно, флуоресценцијата многу почесто е поврзана со $\pi \rightarrow \pi^*$ премините, бидејќи просечните времиња на полуживот во побудена состојба кај $\pi \rightarrow \pi^*$ премините се пократки во однос на оние кај $n \rightarrow \pi^*$ премините и поради тоа што поретко се јавуваат процеси на релаксација што се натпреваруваат со флуоресценцијата.

Влијание на температурата и на растворувачот

Квантната ефикасност на флуоресценцијата се намалува со зголемување на температурата кај најголемиот број молекули, бидејќи е зголемена фреквенцијата на судири помеѓу молекулите со што се зголемува и веројатноста за релаксација преку надворешна претворба. Намалувањето на вискозитетот на растворувачот има исто влијание врз флуоресценцијата, како и зголемувањето на темепатурата.

Влијание на рН врз флуоресценцијата

Флуоресцентната емисија на ароматично соединение со кисели или базни групи, супституирани на ароматичното јадро, е рН зависна. Постојат разлики во брановата должина и интензитетот на флуоресцентното зрачење меѓу јонизираните и нејонизираните форми на некое соединение. Промената во емисијата кај овие соединенија потекнува од различниот број резонантни форми во кои може да се јават киселите и базните форми на соединението. На пример, базната форма на анилинот има неколку резонантни форми, додека киселата на анилиниум јонот има само една (Слика 5.8).



Слика 5.8 Резонантни форми на анилинот

Резонантниот ефект обезбедува поголема стабилност на првата побудена состојба, поради што флуоресцентната емисија се јавува во UV подрачјето.

Влијанието на рН врз флуоресцентната емисија на одредени соединенија се користи за определување на завршната точка кај киселинско-базните титрации. На пример, флуоресценцијата на фенолниот облик на 1-нафтол-4-сулфонска киселина не може да се детектира со око, бидејќи се случува во UV подрачјето. Кога соединението ќе премине во фенолатен јон со додавање база, емисијата се поместува батохромно, кон бранови должини во видливиот дел од спектарот, така што флуоресцентната емисија може визуелно да се детектира.

Влијание на концентрацијата врз интензитетот на флуоресценцијата

Интензитетот на флуоресценцијата F е пропорционален со количината на апсорбираното зрачење од молекулите на аналитот:

$$F = K' \cdot (I_0 - I) \quad (5.1)$$

каде што I_0 е интензитетот на влезното зрачење, а I е неговиот интензитет по минувањето низ медиумот со должина на оптичкиот пат b . Константата K' зависи од вредноста на квантната ефикасност на процесот на флуоресценција. Интензитетот на флуоресцентното зрачење е во релација со концентрацијата c на супстанцијата што флуоресцира преку Ламберт-Беровиот закон:

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon \cdot b \cdot c} \quad (5.2)$$

каде што ε е моларната апсорптивност на флуоресцентната супстанција, а $\varepsilon \cdot b \cdot c$ е апсорбанцијата A . Со одземање на секоја страна од претходната равенка од 1 (единица) се добива:

$$1 - \frac{I}{I_0} = 1 - 10^{-\varepsilon \cdot b \cdot c} \quad (5.3)$$

односно

$$\frac{I_0 - I}{I_0} = 1 - 10^{-\varepsilon \cdot b \cdot c} \quad (5.4)$$

Понатаму се множи секоја страна со I_0 :

$$I_0 - I = I_0 \cdot (1 - 10^{-\varepsilon \cdot b \cdot c}) \quad (5.5)$$

а со замена на последнава равенка во првата се добива:

$$F = K' \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-\varepsilon \cdot b \cdot c}) \quad (5.6)$$

Со проширување на експоненцијалниот израз во последната равенка се добива:

$$F = K' \cdot I_0 \cdot \left(2,3 \cdot \varepsilon \cdot b \cdot c - \frac{(-2,3 \cdot \varepsilon \cdot b \cdot c)^2}{2!} - \frac{(-2,3 \cdot \varepsilon \cdot b \cdot c)^3}{3!} - \dots \right) \quad (5.7)$$

Под услов $\varepsilon \cdot b \cdot c = A < 0,05$ сите други изрази во заградата се мали во споредба со првиот, па може да се напише:

$$F = 2,3 \cdot K' \cdot \varepsilon \cdot b \cdot c \cdot I_0 \quad (5.8)$$

или при константна вредност за I_0 :

$$F = K \cdot c \quad (5.9)$$

Притоа K е нова константа што е еднаква на $2,3 \cdot K' \cdot \varepsilon \cdot b \cdot c \cdot I_0$. Па според тоа, зависноста меѓу интензитетот на флуоресценција на растворот и концентрацијата на флуоресцентната супстанција е линеарна при ниски концентрации.

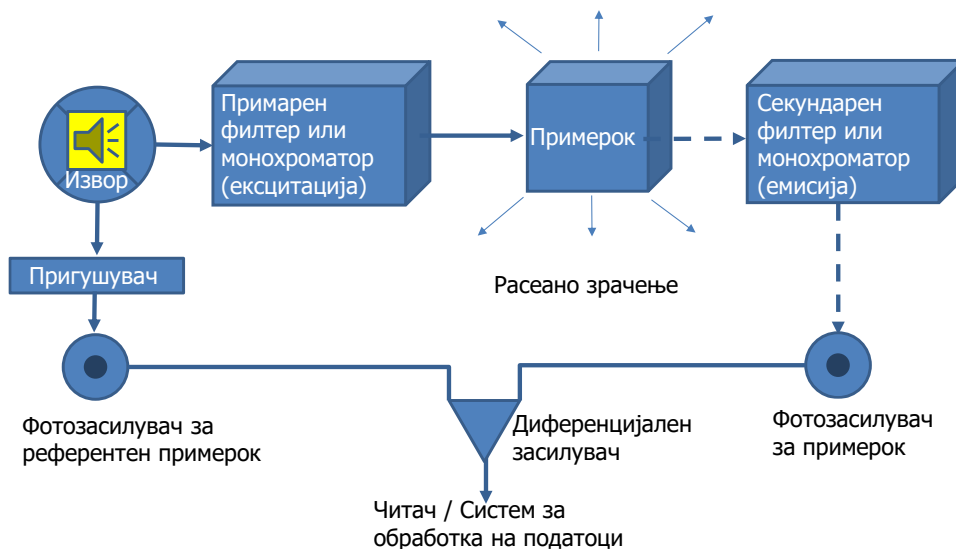
При доволно големи концентрации кога апсорбанцијата станува поголема од 0,05 се губи линеарноста. Причина за тоа е појавата на самопридушување и самоапсорпција. Самопридушувањето е појава при која молекулите на анализот го апсорбираат флуоресцентното зрачење што потекнува од други молекули на истиот анализ. И навистина, при многу високи концентрации вредноста за F постигнува максимум по кој почнува да се намалува со зголемување на концентрацијата.

Инструменти за мерење на флуоресценцијата и на фосфоресценцијата

На Слика 5.9 се прикажани основните составни делови на флуориметарот и на спектрофлуориметарот. Деловите на инструментите се идентични со деловите на UV/Vis спектрофотометрите. Флуориметарот, како и фотометарот, користи филтри за селектирање на брановите должини. Наспроти тоа, повеќето спектрофлуориметри користат филтер за ограничување на ексцитирачкото зрачење и монохроматорска решетка за дисперзија на емитираното флуоресцентно зрачење од примерокот. Некои спектрофлуориметри имаат два монохроматора, еден за ексцитирачкото зрачење, а друг за емитираното.

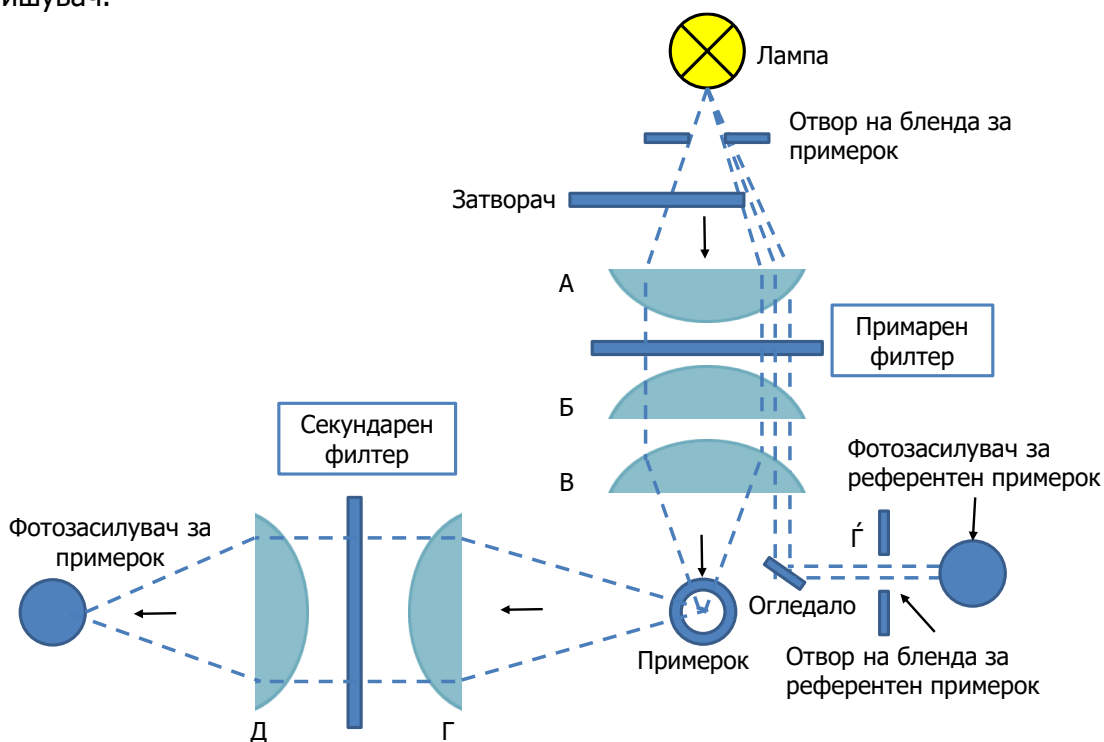
Инструментите за мерење на флуоресцентното зрачење најчесто се со два снопа, заради компензација при варирање на интензитетот на изворот на зрачење. Снопот зрачење од изворот најпрво минува низ примарниот филтер или низ примарниот монохроматор, при што се пропушта зрачењето што предизвикува ексцитација (побудување) на примерокот, а зрачењето што одговара на брановите должини на емитираното флуоресцентно зрачење се ограничува и се отстранува. Флуоресцентното зрачење од примерокот се шири во сите правци, но најпогодно е да се набљудува под прав агол во однос на влезното ексцитирачко зрачење. Ако

се набљудува под други агли, расејувањето на зрачењето во растворот и од сидовите на киветата може да предизвика големи грешки при мерењето на интензитетот. Емитираното зрачење по минувањето низ секундарниот филтер или низ монохроматор, со коишто се изолираат брановите должини на флуоресцентниот максимум, доаѓа до фотоелектричниот детектор.



Слика 5.9 Шематски приказ на составни делови на флуориметар или на спектрофлуориметар

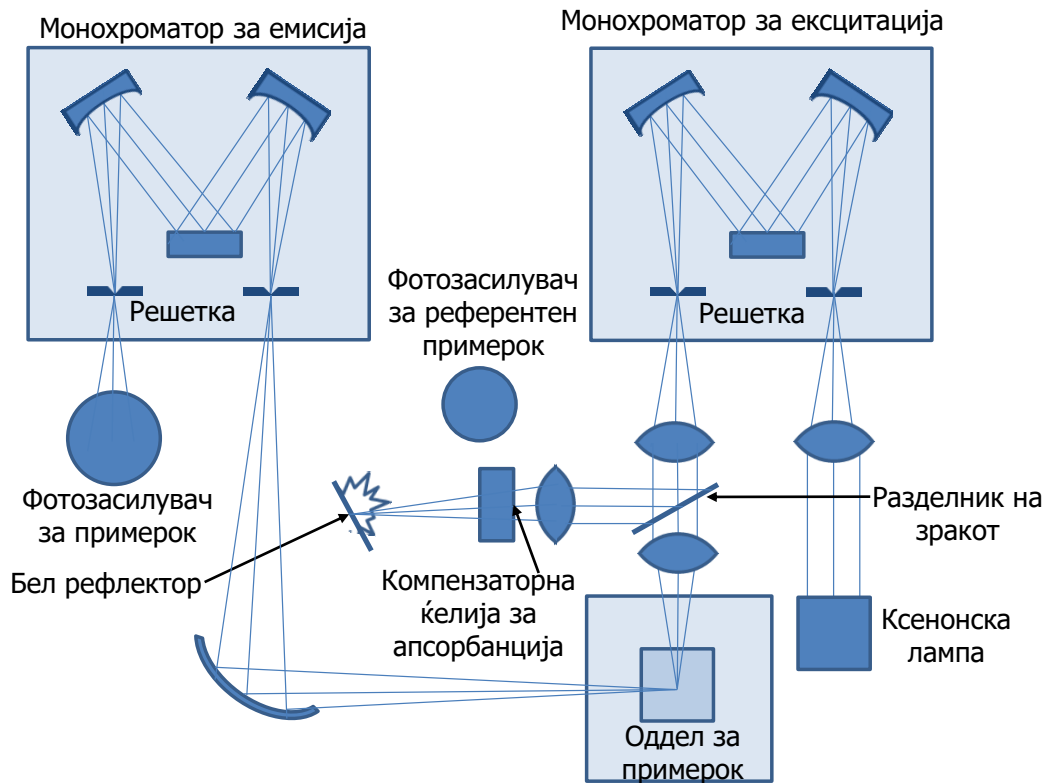
Референтниот сноп минува низ придушувач, со што се намалува неговиот интензитет приближно на онаа вредност што ја има и флуоресцентното зрачење. Сигналите од референтниот детектор и детекторот за примерок се процесираат со диференцијален засилувач, чиј излезен сигнал се отчитува на мерна скала или на пишувач.



Слика 5.10 Составни делови на флуориметар

Инструментите со филтри (флуориметрите, Слика 5.10) се по погодни за квантитативна анализа од оние со монохроматори (спектрофлуориметрите, Слика 5.11).

Општо, флуориметрите се поосетливи од спектрофлуориметрите, бидејќи филтрите имаат поголема пропустливост за зрачењето од монохроматорите. Исто така, во поедноставните инструменти, изворот и детекторот може да се постават поблиску до примерокот, со што се постигнува поголема осетливост.



Слика 5.11 Составни делови на спектрофлуориметар

Примена на флуоресцентните методи

Флуоресцентните методи се 10 до 1000 пати поосетливи од методите засновани на апсорпција, бидејќи нивната осетливост може да се зголеми со зголемување на интензитетот на ексцитирачкото зрачење или со засилување на детекторскиот сигнал. Ниедна од овие можности за зголемување на осетливоста не може да ја зголемат осетливоста на методите засновани на апсорпција на зрачење, затоа што концентрацијата е поврзана со односот од интензитетот на влезното и пропуштеното зрачење (според Ламберт-Беровиот закон):

$$c = \frac{\log \frac{I_0}{I}}{\epsilon \cdot b} \quad (5.10)$$

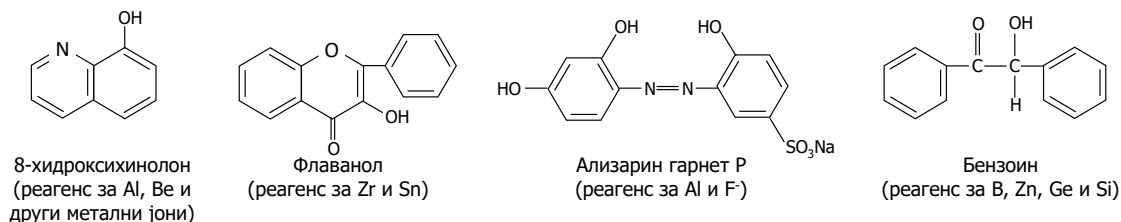
Така, со зголемување на I_0 пропорционално се зголемува и I , при што не настанува промена во осетливоста на методот. Слично на тоа, засилувањето на детекторскиот сигнал влијае на ист начин на двете мерни величини, така што не придонесува во подобрувањето на осетливоста.

Со флуоресцентните методи може да се определат како неоргански така и органски супстанции.

Постојат два основни типа флуориметриски методи за определување на неоргански соединенија. Директните методи се темелат на реакција на

неорганските супстанции со определени хелатни реагенси, при што се добиваат комплекси што флуоресцираат и може да се искористат за нивно квантитативно определување. Индиректните методи се темелат на смалување или на гаснење на флуоресценцијата со реагенс, како резултат на неговата реакција со анализот.

Најуспешните флуориметриски реагенси за определување катјони содржат ароматска структура со две или со повеќе донорски функционални групи, со чијашто помош се формираат хелати со металните јони (Слика 5.12).



Слика 5.12 Структура на најчесто употребувани реагенси

Голем е и бројот на органски и на биохемиски супстанции што може да се определат со овие методи (ензими, коензими, алкалоиди, флавоноиди, ферменти, витамини, стероиди, хормони, пеницилини, канцерогени). Поради високата осетливост, флуориметриските методи широко се применуваат во анализа на фармацевтски препарати, прехранбени производи, природни производи и клинички примероци од биолошко потекло.

ИНФРАЦРВЕНА СПЕКТРОСКОПИЈА

Вовед

Инфрацрвеното (IR) зрачење е откриено во 1800 година од сер Вилијам Хершел (*William Herschel*). Тој искористил стаклена призма и затемнет термометар, како детектор, за да го измери топлинскиот ефект на сончевата светлина надвор од границите на видливиот спектар. Кобленц (*Coblentz*) ги поставил основите на инфрацрвената спектроскопија со систематско проучување на апсорпциските спектри на органските и на неорганските супстанции. Како резултат на ова проучување, произлегло и сознанието дека секоја супстанција има единствен IR апсорпциски спектар при што одредени функционални групи апсорбираат на исти бранови должини дури и во различни молекули. Поради тоа, инфрацрвената спектрофотометрија е еден од најмоќните методи за идентификација на чисти органски и неоргански супстанции. IR апсорпциските спектри претставуваат „отисоци на прсти“ за молекулите со ковалентни врски. Исто така, IR спектарот овозможува брза проверка на присуство на определена функционална група во молекулата (на пример, карбонилна група). Понатаму, освен хиралните молекули во кристална состојба, сите молекулски видови имаат единствен инфрацрвен апсорпциски спектар. Оттука, примерокот може недвосмислено да се идентификува ако неговиот спектар точно се сложува со спектарот на примерокот со позната структура. IR спектрометријата примарно е *апсорпциска* техника. Апсорпцијата на IR зрачењето може да се искористи и за квантитативни мерења на супстанциите.

Инфрацрвеното подрачје во електромагнетниот спектар опфаќа зрачење со бранови броеви од околу $12\ 800$ до $10\ \text{cm}^{-1}$ ($0,78$ до $1000\ \mu\text{m}$). Овие бранови должини се поголеми од брановите должини на црвената област од видливиот спектар, за кој обично се смета дека завршува околу $750\ \text{nm}$ ($0,75\ \mu\text{m}$). Според тоа, IR зрачењето има помала енергија од видливото зрачење, а повисока од радиобрановите.

Опсегот на фреквенции на IR зрачењето може да се пресмета од опсегот на бранови должини во IR областа, според равенката:

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (6.1)$$

каде што ν е фреквенцијата на зрачењето, c е брзината на светлината, а λ е брановата должина на зрачењето. Од равенката $\Delta E = h \cdot \nu$ јасно е дека колку е поголема фреквенцијата толку е помала брановата должина на зрачењето, а неговата енергијата е повисока.

Вообичаено, при опишување и толкување на IR спектрите се користи величината *бранов број* (ν), со единица – реципрочна вредност на центиметар (cm^{-1}). Брановиот број изразен во реципрочни центиметри претставува број на бранови на зрачење на должина од еден центиметар (или математички $\nu = 1/\lambda$). Бидејќи брановата должина во IR спектроскопијата се изразува во μm , брановата должина и брановиот број (изразен во cm^{-1}) се поврзани преку равенката:

$$\begin{aligned} \text{бранова должина } (\mu\text{m}) \times \text{бранов број } (\text{cm}^{-1}) &= 10\ 000 = 1 \times 10^4 \\ \text{бранов број } (\text{cm}^{-1}) &= 1 \times 10^4 / \text{бранова должина } (\mu\text{m}) \end{aligned}$$

Инфрацрвеното спектрално подрачје се базира на апсорпција на електромагнетното зрачење во област на бранови должини од $0,78$ – $1000\ \mu\text{m}$. Врз основа на различни видови на енергетски премини што се побудуваат со апсорпцијата на зрачење, IR спектралното подрачје е поделено на три области, како што е прикажано во Табела 6.1.

Табела 6.1 Инфрацрвени спектрални области

Област	Бранова должина (μm)	Бранов број, (cm^{-1})	Фреквенција, Hz
Блиска	0,78 - 2,5	12800 - 4000	$3,8 \times 10^{14}$ - $1,2 \times 10^{14}$
Средна	2,5 - 50	4000 - 200	$1,2 \times 10^{14}$ - $6,0 \times 10^{12}$
Далечна	50 - 1000	200 - 10	$6,0 \times 10^{12}$ - $3,0 \times 10^{11}$
Најчесто користена	2,5 - 15	4000 - 650	$1,2 \times 10^{14}$ - $2,0 \times 10^{13}$

Во средната (основна) IR област од 2,5-50 μm ($4000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$), којашто е најинтересна и широко употребувана воопшто во аналитички цели, апсорбираат најголем број функционални групи и хемиски врски во органските молекули. Распонот на фреквенциите на зрачења во овој дел на спектарот одговара на фреквенциите на вибрации на хемиските врски во непобудени молекули.

Техниките и примената на методите во трите IR области значително се разликуваат. Мерењата во блиската IR област се вршат со спектрофотометри што се мошне слични, според конфигурацијата на инструментите што се користат во ултравиолетовата/видливата спектрометрија. Најголема примена оваа област има во индустријата и во земјоделството во квантитативна анализа на примероци, за контрола на процеси и др.

Во дисперзивните инструменти, што генерално се користеле во аналитички цели до почетокот на 80-те години, мерењето во средната IR област е засновано на употребата на дифракциски решетки. Оттогаш наваму воведени се многу динамични промени и најголем дел од новите инструменти функционираат на принцип на Фуриеровата трансформација (*Fourier transform*), со што покрај квалитативната органска анализа и структурните определувања е овозможена и квантитативна анализа на комплексни примероци во ова подрачје.

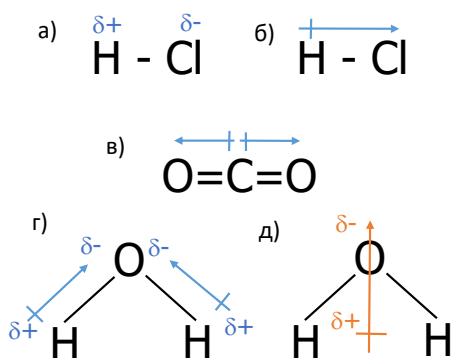
На овој начин спектрометрите што работат на принцип на Фуриевата трансформација овозможија денес и подрачјето на далечната IR област да стане многу подостапно за примена. Во минатото примената на далечната IR област била ограничена како резултат на експериментални потешкотии поради многу слабите извори на овој тип зрачење.

Апсорпција на IR зрачење од молекулите

Само молекулите со ковалентни врски може да апсорбираат зрачење од IR спектралното подрачје. Процесот на апсорпција е квантизиран, што значи дека само определени фреквенции од IR зрачењето ќе бидат апсорбирани. При апсорпција на зрачење, молекулата/дел од молекулата преминува на повисока енергетска состојба. IR зрачењето има енергија што е доволна да предизвика ротирање или вибрирање во молекулите. Енергијата потребна да предизвика премин на повисоко ротациско ниво е помала во однос на енергијата потребна да предизвика промена во вибрациската состојба на молекулата. Затоа секоја вибрациска состојба има повеќе ротациски состојби.

Молекулата ќе апсорбира зрачење од IR подрачјето само ако врската што апсорбира вибрира со фреквенција еднаква на фреквенцијата на влезното зрачење. Фреквенцијата на апсорбираното зрачење зависи од масата на атомите кои ја градат врската, од геометријата на молекулата, јачината на врската и од неколку други фактори. Меѓутоа, сите молекули не апсорбираат инфрацрвено зрачење. За една молекула да апсорбира IR зрачење мора да дојде до нето промена на неговиот диполен момент, како резултат на вибрациското и ротациското движење. Само под вакви услови електричното поле на зрачењето може да предизвика промени во амплитудата на едно од движењата. На пример, распоредот на полнежот околу молекулата на хлороводородот не е симетричен,

бидејќи атомот на хлор има поголема електронска густина од водородниот атом. Распределбата на полнежите во молекулата на HCl може да се прикаже како на Слика 6.1.a), каде што δ означува парцијален полнеж. Поради тоа, ковалентната врска меѓу атомите на водород и хлор има својство на електричен дипол, а молекулата на HCl има диполен момент што е поларен. Електричниот дипол на некоја ковалентна врска може шематски да се означи со вкрстена стрелка насочена со врвот кон делумно негативниот дел од врската (Слика 6.1 б).



Слика 6.1 Дипол на врските во молекулите на: хлороводород [(a) распределбата на полнежите, (б) шематска ознака на електричниот дипол на ковалентната врска]; јаглерод диоксид (в); вода [(г) диполи на врските во вода, (д) нето дипол на вода]

Диполниот момент μ е определен од големината на разликата меѓу полнежите и растојанието меѓу двата центри на полнежот.

$$\mu = Q \times r \quad (6.2)$$

каде што Q е полнежот, а r - растојанието меѓу центрите на полнежот. При вибрирањето на молекулата на хлороводородот доаѓа до промени на диполниот момент, така што електричното поле на врската заемнодејствува со електричното поле на IR зрачењето. Ако фреквенцијата на зрачењето се совпаѓа со природната вибрациска фреквенција на молекулата, доаѓа до апсорпција на енергијата на зрачењето, што доведува до промена во амплитудата на молекулската вибрација. Слично, при ротирање на асиметричните молекули околу нивниот центар на маса доаѓа до периодична промена на диполниот момент, што може да заемнодејствува со IR зрачењето.

Молекулите што содржат повеќе од два атоми може, но не мора да имаат **постојан** диполен момент, што зависи од нивната геометрија. Молекулата на јаглерод диоксид има два еднакви C=O диполи, но поради линеарноста на молекулата диполите се поништуваат еден со друг, така што молекулата CO₂ нема нето постојан диполен момент (Слика 6.1 в)

Молекулата на водата има два еднакви H-O диполи (Слика 6.1 г). Поради нелинеарноста на молекулата на водата, тој има постојан нето диполен момент (Слика 6.1 д)

Фреквенцијата на вибрација на хемиската врска и диполниот момент се карактеристични параметри во IR спектарот на одредено соединение. Од фреквенцијата на вибрација на хемиската врска зависи положбата на нејзиниот апсорпциски максимум, а од големината на промената на диполниот момент зависи интензитетот на апсорпцискиот максимум. Брановиот број или фреквенцијата на апсорпцискиот максимум на лентите во IR спектарот е соодветна на вибрацискиот премин. Најинтензивни максимуми потекнуваат од апсорпција на поларните врски, како што се C=O, C-O и H=O, додека симетрично супституирани врски, кај кои не постои промена на диполниот момент (C=C и C≡C) даваат многу слаби ленти.

Ротациски премини

Зрачењето со бранови должини поголеми од 100 μm (односно бранови броеви помали од 100 cm^{-1}) има доволна енергија да предизвика промени во ротациската состојба на молекулите. Бидејќи ротациските енергетски нивоа се квантизирани, апсорпцијата на зрачењето на гасовите во далечната IR област, се карактеризира со одделени, добро дефинирани ленти. Кај течностите и кај цврстите тела, меѓумолекулските судири и интеракции предизвикуваат проширување на апсорпциските ленти и поврзување во спектарот.

Вибрациско/ротациски премини

Вибрациските енергетски нивоа се, исто така, квантизирани. За најголемиот број молекули енергетските разлики меѓу квантизираните состојби одговараат на средната IR област. Инфрацрвениот спектар на гас, за молекули со постојан дипол, се состои обично од серии на блиско поставени ленти, бидејќи за секоја вибрациска состојба постојат повеќе ротациски енергетски состојби. Од друга страна, ротациската на молекулите е ограничена во течностите и цврстите тела, така што исчезнуваат одделните вибрациско/ротациски ленти, а се појавуваат проширени вибрациски ленти.

Видови молекулски вибрации

Положбата на атомите во молекулата не е статична, туку постојано се менува како резултат на многубројните видови вибрации и ротации околу врските во молекулата. За едноставните, двоатомни и триатомни молекули мошне лесно е да се определи бројот и природата на овие вибрации. Оваа задача станува сè потешка со зголемување на бројот на атомите во молекулата. Не само што овие молекули имаат голем број вибрациски центри, туку постојат и бројни интеракции меѓу центрите, што мора да се земат предвид при определувањето на бројот и природата на вибрациите.

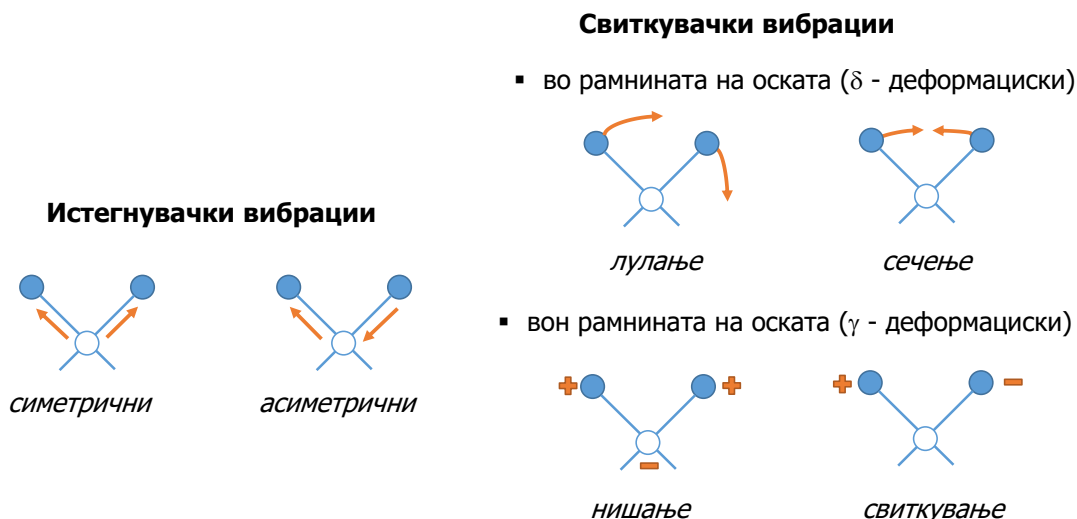
Во општ случај, вибрациите се делат на *истегнувачки* и на *свиткувачки*¹ вибрации. Тие се нарекуваат уште и *начини*² или *модови* на вибрирање. Истегнувачки се оние вибрации кај кои доаѓа до промена на должината на врските меѓу атомите, а свиткувачки, пак, оние кај кои доаѓа до промена на аглиите меѓу врските или до промена на положбата на група атоми во однос на остатокот од молекулот. Ако сите врски истовремено се издолжуваат, а потоа се скусуваат, се работи за *симетрични* истегнувачки вибрации. Ако, пак, истовремено едни врски се издолжуваат, а други се скусуваат, тогаш станува збор за *асиметрични* истегнувачки вибрации. Свиткувачките вибрации се поделени на:

а) *свиткувачки вибрации во рамнина*, кај кои промената на аглиите меѓу врските се одвива во рамнината во која лежат атомите што вибрираат. Тука спаѓаат вибрациите: *сечење* и *лулање* и

б) *свиткувачки вибрации надвор од рамнината*, кај кои промената на аглиите меѓу врските се случува во рамнина што е нормална на рамнината во која лежат атомите што вибрираат. Такви вибрации се: *нишање* и *свиткување*.

¹ Термините **истегнувачки** и **свиткувачки** вибрации се аналогни на термините **валентни** и **деформациски** вибрации што се користеа порано.

² Вибрациите на молекулите кај кои атомите вибрираат со иста фреквенција и во фаза се наречени *нормални начини* или *нормални модови на вибрирање*.



Слика 6.2 Типови молекулски вибрации (забелешка: + означува движење од страната кон читачот, додека – означува движење од читачот кон страната)

Сите видови вибрации прикажани на Слика 6.2 се можни во молекули што содржат повеќе од два атома. Исто така, може да настане и интеракција или *спрега* меѓу вибрациите, ако при вибрирањето се вклучени повеќе врски на еден централен атом во молекулата. Резултат од интеракцијата е промена на својствата на вибрациите вклучени во спрегата.

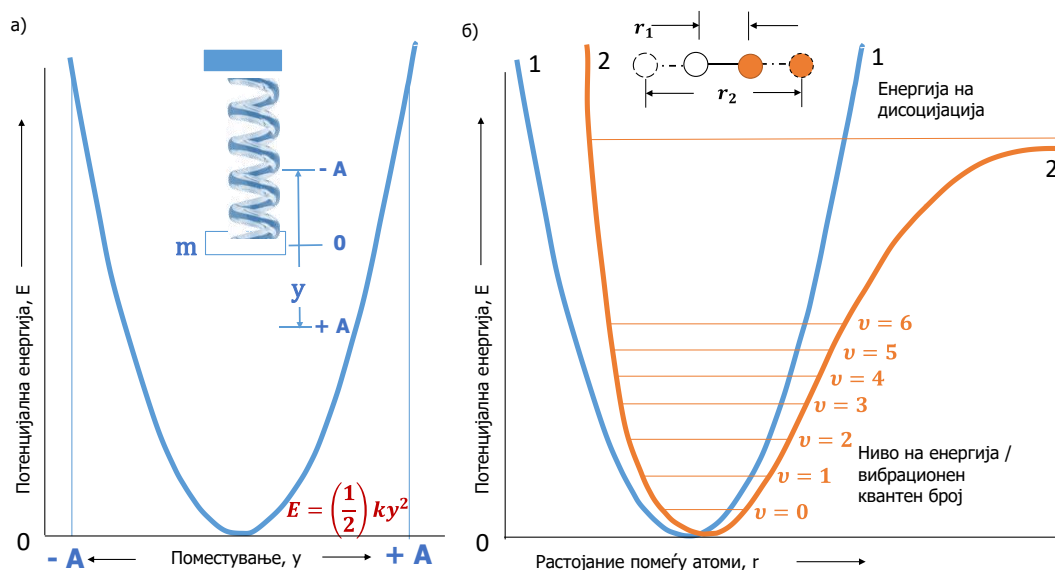
Механички модел на истегнувачки вибрации во двоатомска молекула

Карактеристиките на атомските истегнувачки вибрации може да се прикажат со механички модел што се состои од две топки (со различни маси) поврзани со пружина. Нарушувањето на рамнотежната состојба меѓу топките по должината на оската на пружината ќе доведе до вибрирање познато како проста хармониска осцилација. Овој механички модел, поради тоа, е познат како *двоатомски хармониски осцилатор*.

Да разгледаме вибрација на едно тело (со маса, m) поврзано со пружина за неподвижна основа (Слика 6.3 а). Ако на телото се примени надворешна сила што ќе го помести за растојание y од неговата рамнотежна состојба, тогаш ќе се јави повратна сила F (што ќе настојува да го врати телото во првобитната положба) што е пропорционална со поместувањето y , според *Хуковиот закон (Hooke's law)*:

$$F = -k \cdot y \quad (6.3)$$

каде што k е силовата константа на пружината, што зависи од крутоста на пружината. Негативниот предзнак укажува дека F е повратна сила што дејствува спротивно на надворешната. Тоа значи дека правецот на дејството на силата е спротивен од правецот на поместувањето. Поради тоа, силата F настојува да го врати телото во неговата првобитна (рамнотежна) состојба.



Слика 6.3 Дијаграм на потенцијална енергија на (а) хармониски осцилатор и (б) нехармониски осцилатор (крива 1 – хармониско движење, крива 2 – нехармониско движење).

Потенцијална енергија на хармониски осцилатор

Може да се земе дека потенцијалната енергија E на телото и на пружината, по договор, се еднакви на нула³ кога телото се наоѓа во рамнотежна состојба. Колку што пружината се собира или се истегнува, толку потенцијалната енергија на системот (тело-пружина) се зголемува за вредност еднаква на работата потребна да го помести телото. Ако, на пример, телото се помести од некоја положба y до положба $y = dy$, работата, па според тоа и промената на потенцијалната енергија dE ќе биде еднаква на производот на силата и на поместувањето dy :

$$dE = -F \cdot dy \quad (6.4)$$

Со замена на равенката (6.3) во равенката (6.4) се добива:

$$dE = k \cdot y \cdot dy \quad (6.5)$$

Со интегрирање на равенката (6.5) меѓу рамнотежната положба ($y = 0$) и y се добива:

$$\int_0^E E = k \cdot \int_0^y y \cdot dy \quad (6.6)$$

$$E = \frac{1}{2} k \cdot y^2 \quad (6.7)$$

Кривата на потенцијалната енергија на едноставниот хармониски осцилатор, добиена од равенката (6.7) претставува парабола (Слика 6.3.а.). Потенцијалната енергија е најголема кога пружината е издолжена или собрана (компресирана) до нејзината максимална амплитуда A , а се намалува до нула во рамнотежната положба.

³ Реално потенцијалната енергија на телото и напружината во рамнотежната состојба никогаш не се еднакви на нула. Апроксимацијата за вредноста на потенцијалните енергии во рамнотежна состојба служи само за подобро да се разберат енергетските промени при осцилирањето.

Вибрациска фреквенција

Природната фреквенција на една осцилација може да се претстави со равенката (за начинот на кој е изведена равенката види го врамениот текст подолу):

$$v_m = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (6.8)$$

каде што v_m е природната фреквенција на механичкиот осцилатор. Таа зависи само од силовата константа на пружината и масата на телото, а не зависи од енергијата пренесена на системот. Промената во енергијата резултира само во промена на амплитудата A на вибрацијата.

Оваа равенка може да се приспособи и за двоатомниот хармониски осцилатор (систем составен од две маси m_1 и m_2 поврзани со пружина). За таа цел потребно е во равенката (6.8) само да се замени масата m со редуцираната маса μ , каде што:

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (6.9)$$

Така, вибрациската фреквенција за системот на двоатомниот хармониски осцилатор ќе биде:

$$v_m = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}} = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k \cdot (m_1 + m_2)}{m_1 \cdot m_2}} \quad (6.10)$$

Механичкиот модел на едноставниот хармониски осцилатор (што беше опишан погоре) може да се искористи за опишување на вибрациите во молекулите. Па така, фреквенцијата на некоја молекулска вибрација може да се пресмета од последната равенка, заменувајќи ги масите на двата атома (што вибрираат) за m_1 и m_2 . Величината k е силовата константа на хемиската врска меѓу двата атома (со маси m_1 и m_2) и претставува мерка за крутоста на врската (Табела 6.2).

Табела 6.2 Просечни вредности на силовата константа k

Тип хемиска врска	Средна вредност на силовата константа k (N/m)
Проста врска	500
Двојна врска	1000
Тројна врска	1500

Движењето на тело со маса m како функција од времето t може да се изведе од законите на класичната механика. Според вториот Њутнов закон:

$$F = m \cdot a \quad (i)$$

каде m е масата на телото, а a е неговото забрзување. Забрзувањето, пак, е втор извод на изминатиот пат по време. Така,

$$a = \frac{d^2y}{dt^2} \quad (ii)$$

Заменувајќи ја последнава равенка во равенката (3) се добива:

$$m \cdot \left(\frac{d^2y}{dt^2}\right) = -k \cdot y \quad (iii)$$

Решение на оваа равенка мора да е периодична функција така што нејзиниот втор извод е еднаков на оригиналната функција помножена со $-(k/m)$. Ова барање го исполнува соодветна косинусна зависност. Така, мало помесување на масата m во време t може да се запише како:

$$y = A \cos 2\pi v_m t \quad (iv)$$

каде ν_m е природната вибрациска фреквенција и A е максималната амплитуда на движењето. Вториот извод од равенката (iv) е:

$$\frac{d^2y}{dt^2} = -4\pi^2\nu_m^2 A \cos 2\pi\nu_m t \quad (\text{v})$$

Со замена на равенките (iv) и (v) во равенката (iii) се добива:

$$A \cos 2\pi\nu_m t = \frac{4\pi^2\nu_m^2 m}{k} \cdot A \cos 2\pi\nu_m t \quad (\text{vi})$$

Па така, природната фреквенција на вибрацијата ќе биде:

$$\nu_m = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (\text{vii})$$

Квантно-механички модел на вибрациите

Равенките на класичниот механички модел не го опишуваат целосно однесувањето на честичките со атомски димензии. Меѓутоа, концептот на едноставниот хармониски осцилатор е искористен за добивање на равенките на бранови во квантната механика. Со решавање на овие равенки е добиена равенката за потенцијалната енергија на хармонискиот осцилатор:

$$E = \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \cdot \frac{h}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (6.11)$$

каде што h е Планковата константа, а ν претставува *вибрациски квантен број*, што може да биде само позитивен цел број (вклучително и нула). Според тоа, наспроти класичната механика каде што осцилаторот можеше да поприими која било вредност за потенцијалната енергија, во квантната механика тој може да има само определени посебни вредности.

Факторот $1/2\pi \cdot \sqrt{k/\mu}$ се јавува и во класичните и во квантните равенки. Со замена на равенката (6.10) во равенката (6.11) се добива:

$$E = \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \cdot h \cdot \nu_m \quad (6.12)$$

каде што ν_m е вибрационата фреквенција од класичниот модел.

Според законите на квантната механика, еден двоатомен молекулски систем што осцилира хармониски има точно определени вибрациски енергетски состојби. Оттука следува дека овој систем може да апсорбира само дефинирани кванти енергија еднакви на разликите меѓу енергиите на вибрациските квантни состојби (нивоа). Меѓутоа, за да дојде до вибрациски квантен премин покрај претходниот услов мора истовремено да биде исполнет и условот за промена на диполниот момент на хемиската врска при вибрирањето на двоатомскиот молекулски систем. Разликата меѓу вибрациските енергетски состојби (кај хармониските осцилации) се еднакви меѓу кој било пар соседни состојби (нивоа), бидејќи вибрацискиот квантен број ν во равенките (6.11) и (6.12) може да прими само позитивни цели броеви и нула, т.е.:

$$\Delta E = h \cdot \nu_m = \frac{h}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (6.13)$$

На собна температура најголемиот дел од молекулите (т.е. врските во молекулите) се наоѓаат во основната вибрациска состојба ($\nu = 0$). Од равенката (6.12) следува:

$$E_0 = \frac{1}{2} h \cdot \nu_m \quad (6.14)$$

Првата вибрациска состојба ($\nu = 1$) има енергија:

$$E_1 = \frac{3}{2} h \cdot \nu_m \quad (6.15)$$

така што за побудување на молекулата на првата вибрациска состојба потребна е енергија:

$$\frac{3}{2}h \cdot \nu_m - \frac{1}{2}h \cdot \nu_m = h \cdot \nu_m \quad (6.16)$$

Фреквенцијата на зрачењето што би го предизвикало овој премин е *еднаква со вибрациската фреквенција на врската* ν_m (од класичниот модел). Така,

$$E_{\text{зрачење}} = h \cdot \nu = \Delta E = h \cdot \nu_m = \frac{h}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (6.17)$$

или

$$\nu = \nu_m = \frac{h}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (6.18)$$

Ако фреквенцијата ν ја поделиме со брзината на светлината c , тогаш зрачењето може да го изразиме и преку брановиот број $\bar{\nu}$:

$$\bar{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{2\pi c} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (6.19)$$

каде што $\bar{\nu}$ е брановиот број изразен во cm^{-1} , k е силова константа на врската во њутни на метар (N/m), c е брзината на светлината во cm/s и μ е редуцираната маса изразена во kg .

Правило на избор

Според равенките (6.12) и (6.13) енергијата потребна за премин од првото на второто вибрациско енергетско ниво или од второто на третото ниво треба да е еднаква на енергијата потребна за преминот од нултото на првото енергетско ниво. Освен тоа, според квантната теорија дозволени се само оние премини каде што вибрацискиот квантен број се менува за единица. Тоа е т.н. *правило на избор* што важи само за хармониските вибрации:

$$\Delta \nu = \pm 1$$

Притоа знакот (+) се однесува за премин од пониско на повисоко енергетско ниво, а знакот (-) за премин од повисоко на пониско ниво. Премините што се остваруваат помеѓу кои било две соседни вибрациски нивоа се нарекуваат *основни вибрациски премини*. Вибрациските нивоа, кај хармониските вибрации, се енергетски подеднакво оддалечени, така што во вибрацискиот спектар на молекулата би требало да се забележи само еден апсорпциски пик за дадена молекулска вибрација.

Нехармониски осцилатор

Реалните молекули не се покоруваат строго на законите на едноставниот хармониски осцилатор. На пример, како што два атома, при вибрирање се приближуваат еден кон друг, електростатското одбивање меѓу двете јадра создава сила што дејствува во ист правец како и повратната сила на врската. Така, би се очекувало потенцијалната енергија да се зголемува многу побрзо (при приближувањето на јадрата) отколку што предвидува моделот на хармониските вибрации. Спротивно, при истегнување на врската, со приближување на меѓуатомското растојание до вредност при која настанува дисоцијација на врската, доаѓа до намалување на повратната сила, а со тоа и на потенцијалната енергија.

Теоретски, равенките на брановите на квантната механика овозможуваат конструирање речиси точни криви на потенцијална енергија за молекулските вибрации. Сепак, математичката комплексност на овие равенки ја намалува

нивната квантитативна примена, освен на наједноставните системи. Затоа за реалните системи, кривите на потенцијалната енергија за молекулските вибрации имаат несиметричен (нехармониски) изглед во споредба на симетричниот изглед на кривите за едноставниот хармониски осцилатор (Слика 6.3 б). Таквите нехармониски криви отстапуваат за различни степени од хармониското однесување, што зависи од природата на врската и од атомите. Нехармониските и хармониските криви се најслични за ниски вредности на потенцијалната енергија.

Од сликата (Слика 6.3 б) се гледа дека кај нехармониските вибрации енергетските нивоа не се подеднакво оддалечени, туку со растење на вибрацискиот квантен број нивоата сè повеќе се доближуваат (т.е. ΔE станува сè помало како што расте ν). Притоа правилото на избор $\Delta \nu = \pm 1$ престанува да важи, така што во вибрацискиот спектар може да се јават ленти (пикови) што се должат на премини што, според ова правило, се забранети (пр. $\Delta \nu = \pm 2$ или $\Delta \nu = \pm 3$). Ваквите премини се нарекуваат **наттонови** (*overtones*) или **повисоки тонови** што се јавуваат на фреквенции приближно два ($\Delta \nu = \pm 2$) или три пати ($\Delta \nu = \pm 3$) поголеми од фреквенцијата на основниот вибрациски премин ($\Delta \nu = \pm 1$), а во спектарот даваат ленти што се десетина или неколку десетици пати со послаб интензитет во однос на лентата што потекнува од основниот премин.

Вибрациските спектри се дополнително усложнети од фактот што две различни вибрации во молекулата може да *заемнодејствуваат* и да дадат апсорпциски пикови со фреквенции што се збир или разлика од фреквенциите на нивните основни вибрации. Но, исто така, како и кај повисоките тонови, интензитетот на лентите вообичено е мал.

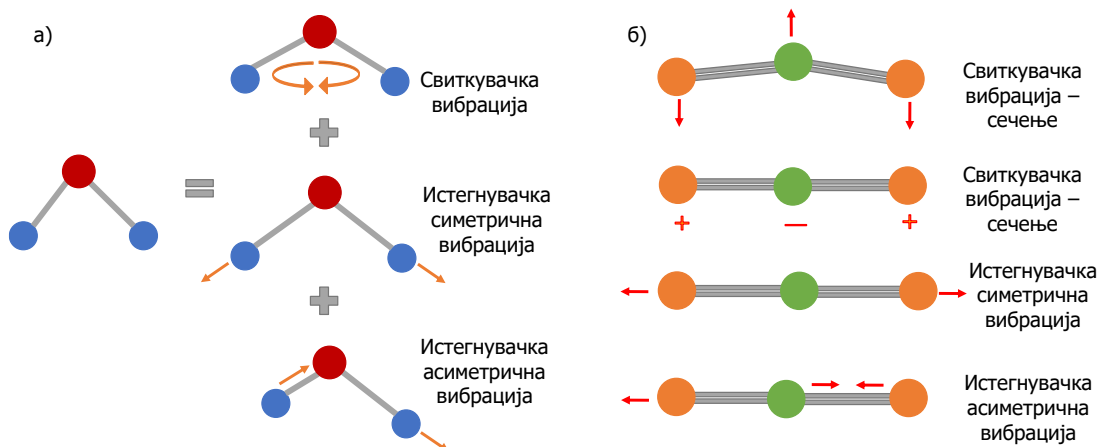
Вибрациски модови

За двоатомните и за триатомните молекули можно е да се предвидат бројот и видот на вибрациите. Меѓутоа сложените молекули може да содржат различни видови атоми и врски, со што се зголемува бројот и видот на можните вибрации што ја даваат комплексноста на инфрацрвените (вибрациски) спектри на овие молекули.

Бројот на можните вибрации во една полиатомна молекула може да се пресмета на следниот начин. Движењето на една молекула што содржи N атоми во просторот може да се опише со промената на три независни координати x , y и z). Бидејќи движењето на секој атом во N -атомната молекула може да се опише со овие три координати, следува дека *нормалните начини (модови) на движење* на молекулата ќе може да се опишат со $3N$ координати. Секоја координата соодветствува на еден **степен на слобода**, па така молекула со N -атоми ќе има $3N$ степени на слобода. При дефинирање на движењето на молекулата, мора да ги земеме предвид: (1) движењето на целата молекула во просторот (што всушност го претставува транслаторното движење на нејзиниот центар на маса); (2) ротациското движење на целата молекула околу неговиот центар на маса и (3) релативното движење (или вибрации) на секој од нејзините атоми во однос на другите атоми.

За определување на положбата на тежиштето (центарот на масата) на една молекула се потребни три координати, а промената на тие координати ги опишува транслациските движења на молекулата во целост. Така, бројот на *нетранслациските* начини на движење изнесува $3N - 3$. За одредување на ориентацијата на нелинеарна молекула во просторот се потребни три агли (а само два, ако молекулата е линеарна). Изменувањето на тие агли ги опишува ротациските движења на молекулата во целост. Преостанатите степени на слобода ($3N - 6$ за нелинеарна и $3N - 5$ за линеарна молекула) се во врска со **вибрациските** движења на молекулата и затоа се викаат **вибрациски степени на слобода**.

Секоја од $3N - 6$ или $3N - 5$ вибрации е наречена **нормален мод на вибрирање**. На пример, молекулата на водата има три атома, па според тоа $3 \times 3 = 9$ степени на слобода и $(3 \times 3) - 6 = 3$ нормални модови на вибрирање. За молекулата на водата овие нормални модови на вибрирање се: симетрична истегнувачка, асиметрична истегнувачка и свиткувачката вибрација - сечење.



Слика 6.4 Вибрациски модови на молекула на: а) вода и б) јаглерод диоксид

Сите три вибрациски модови на молекулата на водата доведуваат до промена на диполниот момент, па затоа може да апсорбираат зрачење од инфрацрвениот дел од спектарот и за таквите вибрации велите дека се **активни** во инфрацрвената област (IR-активни вибрации). Инфрацрвено активните вибрации даваат апсорпциска лента во инфрацрвениот спектар. Така, симетричната истегнувачка вибрација во молекулата на водата, во IR спектарот, дава апсорпциска лента на 3650 cm^{-1} , додека асиметричната истегнувачка и свиткувачката вибрација даваат ленти на 3760 и 1595 cm^{-1} соодветно.

Линеарните молекули не можат да ротираат околу оската на врските и затоа тие имаат два ротациски степени на слобода, односно $3N - 5$ нормални модови на вибрирање. Молекулата на јаглерод диоксид е линеарна и има четири нормални модови на вибрирање ($3 \times 3 - 5 = 4$). Два од четирите модови на вибрирање се истегнувачки вибрации (симетрична и асиметрична), а другите два мода се свиткувачки вибрации - сечење.

Двете свиткувачки вибрации се одвиваат во рамнини што се меѓусебно нормални (поставени под агол од 90°) во однос на оската на врските $\text{O}=\text{C}=\text{O}$. Двете вибрации се идентични во однос на енергијата, односно имаат исти квантни состојби. За нив велите дека се **дегенерирани**. За два или за три вибрациски мода се вели дека се дегенерирани, ако за нивно побудување е потребна еднаква енергија. Ако се дегенерирани два мода, се зборува за *двапати дегенерирани*, а ако се дегенерирани три мода - за *трипати дегенерирани* вибрации. Значи, молекулата на CO_2 има две дегенерирани вибрации што се инфрацрвено активни со појава на една лента на 667 cm^{-1} . Симетричната истегнувачка вибрација во CO_2 не доведува до нето промена на диполниот момент на молекулата, бидејќи двата атома на кислород истовремено се оддалечуваат и се приближуваат во однос на централниот атом на јаглерод. Затоа таа не може да апсорбира инфрацрвено зрачење, т.е. велите дека е **неактивна** во инфрацрвена област (IR-неактивна вибрација). Инфрацрвено неактивните вибрации не даваат апсорпциски ленти во IR спектарот. Асиметричната истегнувачка вибрација доведува до промена на диполниот момент на молекулата на CO_2 , со појава на лента во IR спектарот на 2330 cm^{-1} .

За разлика од молекулата на CO_2 , хомонуклеарните молекули на азот (N_2), кислород (O_2), хлор (Cl_2), што имаат симетрични врски и немаат диполен момент, не го апсорбираат IR зрачењето емитирано од површината на Земјата. Поради тоа, овие гасови не го зголемуваат ефектот на „стаклена“ градина, што е карактеристичен за јаглерод диоксид.

Постојењето голем број различни енергетски нивоа во молекулата овозможува голем број промени во енергијата на вибрирање и ротирање што доведува и до појава на голем број спектрални ленти во вибрациско-ротацискиот (IR) спектар. Меѓутоа според правилото на избор, можни се само премини при коишто настанува промена на квантните броеви. Секоја вибрација се карактеризира со своја фреквенција и кога енергијата на електромагнетното зрачење од IR подрачјето има иста фреквенција како и една од можните вибрации во молекулата, се создава можност за енергетска промена, поради што молекулата ќе го апсорбира зрачењето. Меѓутоа во IR спектарот не мора да се појават сите фреквенции. Степенот на апсорпција на зрачењето е функција од промената на диполниот момент што се создава за време на вибрирањето и затоа ако не се појави диполниот момент, вибрациите ќе бидат неактивни и нема да се појават во IR спектарот.

Вкупниот број апсорпциски максимуми во IR спектарот е обично помал од вкупниот број можни вибрации најчесто поради некоја од следните причини:

- IR зрачењето го апсорбираат само оние вибрации што доведуваат до промена на диполниот момент (активни);
- појавата на „дегенерирани“ вибрации во некои случаи (оние што апсорбираат на иста фреквенција);
- фреквенцијата на вибрации во кои учествуваат тешки атоми, како резултат на голема редуцирана маса (μ), е многу ниска (излегуваат надвор од опсегот на спектарот) и
- слабиот интензитет, отсуство на детекција.

На положбата на апсорпцискиот максимум најголемо влијание имаат електронските ефекти (индуктивни и резонантни, ефекти на полето и хибридизација), водородната врска, како и аголот на врските (големина на прстенот) и др.

За да можат молекулите да апсорбираат енергија на зрачење од инфрацрвеното подрачје на електромагнетниот спектар, мора да бидат исполнети неколку критериуми:

1. природната фреквенција на вибрацијата во молекулата мора да е еднаква со фреквенцијата на влезното зрачење;
2. фреквенцијата на зрачење мора да го задоволи условот $\Delta E = h \cdot \nu$, каде ΔE е разлика меѓу енергиите на вибрациските состојби вклучени во вибрацијата;
3. вибрацијата мора да доведува до промена на диполниот момент на молекулата;
4. количеството на апсорбираното зрачење е пропорционално со квадратот од степенот на промена на диполот при вибрирањето;
5. енергетската разлика меѓу вибрациските енергетски нивоа е зависна од заемнодејството со ротациските енергетски нивоа и заемнодејството меѓу вибрациите.

Инструменти за инфрацрвена спектроскопија

Инструментите што се користат за мерење на апсорпција на инфрацрвено зрачење имаат исти основни компоненти како и инструментите за мерење апсорпција во ултравиолетно/видливо спектрално подрачје. Компонентите што особено се разликуваат од UV/Vis спектрометрите се светлосниот извор на континуирано инфрацрвено зрачење и инфрацрвен детектор (трансдуктор). Исто така, и материјалите што се користат во изработката на оптичките делови во IR спектрометарот мора да бидат транспарентни за инфрацрвеното зрачење. Ова барање ја оневозможува употребата на оптичко стакло или на кварцно стакло во инструментите за мерење во средната IR област, бидејќи тие не се пропустливи за инфрацрвеното зрачење со бранови должини поголеми од $3,5 \mu\text{m}$ ($< 2857 \text{ cm}^{-1}$).

Материјалите што се применуваат при изработката на одредени оптички елементи и кивети, треба да бидат доволно цврсти за да може да се обработуваат, да се обликуваат и да се полираат. Обично се користат јонски соли, како што се калиум бромид (KBr), калциум флуорид (CaF_2), натриум хлорид (NaCl) и цинк селенид (Zn_2Se) што се транспарентни во различни IR области. На пример, NaCl е транспарентен за зрачење со бранова должина од 2,5-15 μm , KBr и CsBr (цезиум бромид) може да се користат во области од 2,1-26 μm , а CaF_2 во област од 2,4-7,7 μm .

Најголем проблем при употребата на NaCl, KBr и на другите слични јонски соли е нивната голема растворливост во вода. Присуство на влага, па дури и влагата од атмосферата, може да ја раствори површината на полираниот кристал, предизвикувајќи материјалот да стане непроѕирен и да ја расејува светлината. Затоа сите оптичките елементи и киветите изработени од соли се чуваат во присуство на десикатори и зголемена температура. Ова ограничување е една од причините што призмите изработени од јонски соли веќе не се употребуваат во дисперзивните IR спектрометри.

Извори на зрачење

Изворите на зрачење во IR спектроскопијата треба да ги исполнат барањата за идеален извор на зрачење. Имено, интензитетот на зрачењето треба: (1) да е континуирано во подрачјето на употребливи бранови должини, (2) да покрие широко подрачје на бранови должини и (3) да е константно во тек на подолг временски период.

Спектарот на бранови должини емитиран од изворите на зрачење што се користат во IR спектроскопијата е многу сличен со спектарот на зрачење на црно тело. Овие извори се изградени од инертни цврсти материјали што се загреваат по електричен пат на температура меѓу 1500 и 2200 K. Во ова подрачје на температурата интензитетот на зрачењето е најголем меѓу 5000 и 5900 cm^{-1} (2–1,7 μm). Како се оди кон пократки или подолги бранови должини, така интензитетот на зрачењето опаѓа.

Нернстов извор

Нернстовиот (*Nernst*) извор претставува мала цилиндрична цевка (составена од циркониум оксид, цериум оксид и ториум оксид, долга околу 20 mm и 2 mm во дијаметар), што се загрева по електричен пат на температура меѓу 1500 и 2000 K. Овој материјал составен од ретки оксиди (еден вид керамика) претставува електричен отпорник. Кога струјата тече низ цевката предизвикува нејзино загревање и усвитување, поради што емитира континуирано инфрацрвено зрачење. Нернстовиот извор има надворешен грејач поради негативниот коефициент на електричен отпор (изворот спроведува електричество само на

повисока температура). Тој може лесно да се прегрее и да се уништи бидејќи неговиот отпор се намалува со зголемување на температурата. Затоа електричната струја што минува низ изворот мора точно да се контролира. Сличен извор е т.н. Оперманов извор, керамички цилиндер, што се состои од ретки оксиди со коаксијално поставена платинска жица во центарот на цилиндарот. Електричната струја што минува низ жицата предизвикува нејзино загревање, по што се загрева и керамичкиот цилиндар, давајќи притоа континуирано инфрацрвено зрачење слично на Нернстовиот извор. Спектралната распределба на Нернстовиот извор е дадена на Слика 6.5. Добиената крива е слична на онаа добиена од црно тело.



Слика 6.5 Спектрална дистрибуција на енергијата добиена од Нернстов извор при температура од околу 2200K

Глобаров извор

Глобаровиот (*Global*) извор претставува цилиндрична прачка (изработена од силициум карбид, околу 50 mm во должина и 5 mm во дијаметар) што се загрева по електричен пат на температура од 1300 до 1500 K. Се користи водено ладење на електричните контактни места за да се спречи појава на искри. Интензитетот на зрачењето е сличен со оној на Нернстовиот извор, освен во областа под 5 μm каде што Глобаровиот извор дава значително поинтензивно зрачење.

Извор со вжарена жица

Овој извор емитува зрачење со послаб интензитет, но има подолг работен век од Нернстовиот и од Глобаровиот извор. Претставува густо спирално извиткана никел-хромна жица што се загрева на температура од околу 1100 K со електрична струја. Се користат и жици изработени од други метали, како, на пример, од родиумот. Најголемиот проблем кај овие извори е губење на цврстината и округување како резултат на постојаното жарење и стареење што доведува до кинење на жицата, на истиот начина на којшто „прегорува“ обичната светилка. Во некои извори жицата е спирално намотана околу керамичка прачка како поддршка и емитува поеднолична светлина за време на употребата, за разлика од слободно извитканата никел-хромна жица.

Другите извори на зрачење што се применуваат во изработката на IR спектрометрите се: *извор на живин лак* (емитува бранови должини од далечната IR област, $\lambda > 50 \mu\text{m}$), *волфрамова ламба* (емитува зрачење од блиската IR област) и *ласерски извори* (на пример, јаглород диоксиден ласер).

Инфрацрвени детектори (трансдуктори)

Инфрацрвените детектори се поделени во три основни групи: (1) термички детектори; (2) пироелектрични детектори (пософистициран тип на термички детектори) и (3) фотоспроводливи детектори.

Првите две групи детектори вообичаено се користат кај фотометри и дисперзивни спектрофотометри, додека фотоспроводливи детектори се користат кај посложени инструменти што функционираат на принцип на Фуриевата трансформација.

Термички детектори

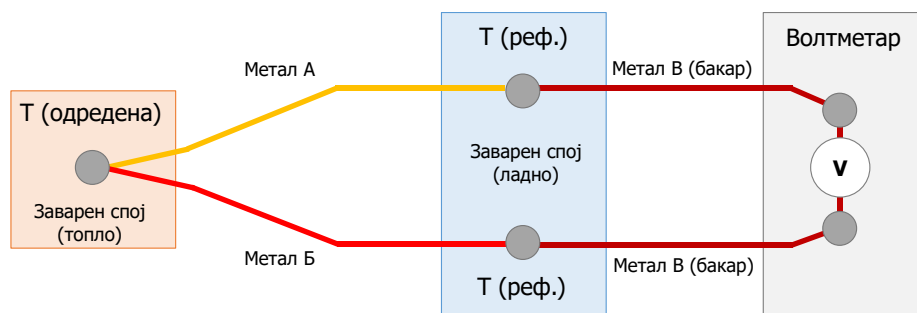
Термичките детектори се користат за детекција на сите бранови должини во инфрацрвено подрачје, со исклучок на најкратките бранови должини. Сигналот што се создава зависи од топлинскиот ефект на зрачењето. Зрачењето се апсорбира од мало црно тело, при што се мери зголемувањето на неговата температура. Моќноста на спектрофотометрскиот сноп на зрачење е мала (10^{-7} до 10^{-9} W), па така топлинскиот капацитет на елементот што го апсорбира мора да биде што е можно помал за да се создадат разлики во температурата што може да се детектираат. За таа цел, се изработуваат апсорбирачки елементи со мали димензии и дебелина, а инфрацрвениот сноп на зрачење мора целосно да се насочи на нивната површина. Во најдобар случај, промените во температурата на елементот при апсорпција на снопот на IR зрачење се ограничени на неколку илјадити делови од Келвин.

Проблемот при мерење на интензитетот на инфрацрвеното зрачење на овој начин е поврзан со појавата на термички шум поради температурната разлика со околината. Поради тоа, термичките детектори се изолирани во средина на вакуум и заштитени од топлинското зрачење од околината. Дополнително, за да се намали ефектот на надворешните извори на топлина, снопот на зрачење од изворот се дели со помош на разделувач т.н. „сечкач“ (*chopper*). На овој начин аналитичкиот сигнал е во резонанца со фреквенцијата на сечкачот и затоа може електронски да се одвои од надворешните термички сигнали (сигналите на шумот) што мошне бавно се менуваат во текот на времето.

Болометри. Болометрите претставуваат електрични отпорници што функционираат како многу чувствителни термометри. Постарите видови се изработени од тенок метален проводник (жица од платина или никел). Влезното IR зрачење го загрева проводникот, што предизвикува промена на неговиот електричен отпор. Степенот на промена на отпорот на проводникот е мерка за количеството енергија на зрачење што упаднало на детекторот. Промената на температурата во детекторот зависи од интензитетот на упадното зрачење и од топлинскиот капацитет на детекторот. Затоа обично се користат мали детектори (болометри) на кои се фокусира зрачењето. *Степенот* со кој детекторот се загрева или се лади ја одредува неговата брзина на одговор при промена на интензитетот на зрачењето. Тој го дава т.н. *време на одговор* на детекторот. За постарите видови болометри, времето на одговор е долго (ред величина на секунди). Модерните болометри се изработени од силициум и се долги неколку микрометри. Овој вид болометар е поставен како гранка во Винстонов мост. Имаат кратко време на одговор и особено се користат за детекција на зрачење од далечната IR област ($600\text{-}20\text{ cm}^{-1}$).

Термопар. Во наједноставен облик, термопарот (Слика 6.6) претставува спој меѓу две метални парчиња, како, на пример, парче на бизмут споено на двата краја со парче од различен метал, како антимоноот. Ако едната заварена спојка стане

потопла (т.н. топол спој) од другата (т.н. студен спој), се јавува мал електричен потенцијал меѓу спојките.



Слика 6.6 Шематски дијаграм на термопар

Топлиот спој обично е потемнет (за да се зголеми капацитетот на апсорпција) и е затворен во вакуум комора со прозорец транспарентен за инфрацрвеното зрачење. Студениот спој (референтниот спој) обично е сместен во истата комора како и топлиот спој, но внимателно е заштитен од какво било надворешно зрачење. Конструиран е така да има релативно голем топлински капацитет. Потенцијалната разлика што се создава во термопарот е функција од разликата меѓу температурите на топлиот и на студениот спој. За да се зголеми детекторската чувствителност, неколку термопарови може да бидат поврзани во серија. Времето на одговор на термопарот на IR зрачењето е долго, па затоа тој не може да се искористи како детектор во инструментите што работат на принцип на Фуриеровата трансформација (*Fourier - transform Infrared, FTIR*).

Термистори. Претставуваат полупроводници изградени од смеса на метални оксиди. Со зголемување на температурата нивниот електричен отпор се намалува (спротивно од болометрите). Оваа зависност меѓу температурата и електричниот отпор овозможува термисторите да бидат употребени како IR детектори на ист начин како и болометрите. Времето на одговор на овие детектори е, исто така, долго.

Пироелектрични детектори

Пироелектричните детектори се изградени од пироелектрични материјали што ја менуваат својата електрична поларизација како функција од температурата. Овие материјали може да бидат изолатори (диелектрици), фериелектрични материјали или полупроводници. Триглицин сулфатот $(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_3 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ е најважниот пироелектричен материјал што се користи за изработка на инфрацрвени детектори. Вообичаено триглицин сулфатот е деутериран, но еден дел од глицинските молекули може да бидат заменети со аланин.

Кога ќе се постави диелектричен материјал во електрично поле, тој се поларизира со вредност на индуцирана поларизација што зависи од диелектричната константа на материјалот. За најголемиот број диелектрици, индуцираната поларизација обично исчезнува кога ќе се отстрани надворешното електрично поле. Меѓутоа, пироелектричните материјали остануваат поларизирани, а нивната поларизација е температурно зависна. Така, со поставување пироелектричен материјал меѓу две електроди, од кои едната е транспарентна за IR зрачење, се добива температурно зависен кондензатор. Со промена на неговата температура преку озрачување со IR зрачење, се менува распределбата на полнежот по должината на кристалот, што може да се детектира како струја во надворешното електрично коло поврзано за двете страни на

кондензаторот. Големината на оваа струја е право пропорционална на површината на кристалот и степенот на промена на поларизацијата со температурата. Над температура означена како Кириева (*Curie*) точка, пироелектричниот кристал ја губи постојаната поларизација. За триглицин сулфат, вредноста на Кириевата точка е 47°C.

Пироелектричните детектори имаат кратко време на одговор, па затоа се користат во FTIR инструментите.

Фотоспроводливи детектори

Инфрацрвените фотоспроводливи детектори содржат тенок филм од полупроводлив материјал, како олово сулфид, жива/кадмиум телурид или индиум антимионид обложен на неспроводлива стаклена површина и затворен во вакуум атмосфера, заштитен од надворешните услови. При апсорпција на зрачење (од овие материјали) доаѓа до побудување на валентните електрони (кои не учествуваат во спроведување на електричество) на повисока енергетска спроводлива состојба. На тој начин се намалува електричниот отпор на полупроводникот. Нормално за да дојде до намалување на отпорот на полупроводникот при апсорпција на зрачење, влезните фотони мора да имаат доволно енергија за да ги побудат електроните од полупроводникот. Обично, фотопроводникот е поврзан сериски со изворот на напон на електричниот отпорник, при што падот на напонот долж отпорникот служи како мерка за интензитетот на снопот на зрачење.

Олово сулфидниот детектор е широко употребуван детектор за блиската IR област. За средната и далечната IR област се користат фотоспроводливи детектори од жива/кадмиум телурид. Тие мора да се ладат со течен азот за да се намали термичкиот шум. Поради подобрите карактеристики од пироелектричните детектори, фотоспроводливите детектори од жива/кадмиум телурид широко се користат во изработката на FTIR спектрофотометрите, особено на оние што се во спрега со гасен хроматограф (GC-FTIR).

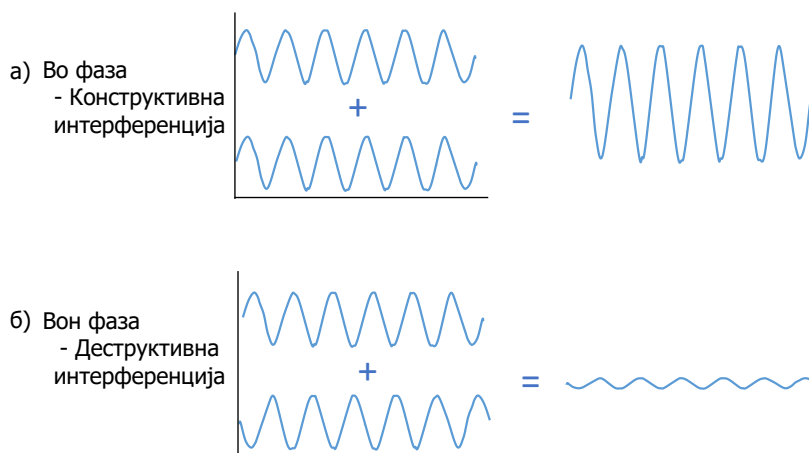
Видови инструменти за инфрацрвена спектроскопија

Постојат три вида инструменти за инфрацрвена спектроскопија: (1) дисперзивни инструменти, постар тип, што се користат првенствено за квалитативна анализа; (2) сложени инструменти што работат на принцип на Фуриевата трансформација (FTIR), што се користат за квалитативна анализа и квантитативни мерења; и (3) недисперзивни фотометри за квантитативно определување различни органски молекули во атмосферата со примена на апсорпција, емисија или рефелективна спектроскопија.

Инструменти што работат на принцип на Фуриеровата трансформација (FTIR)

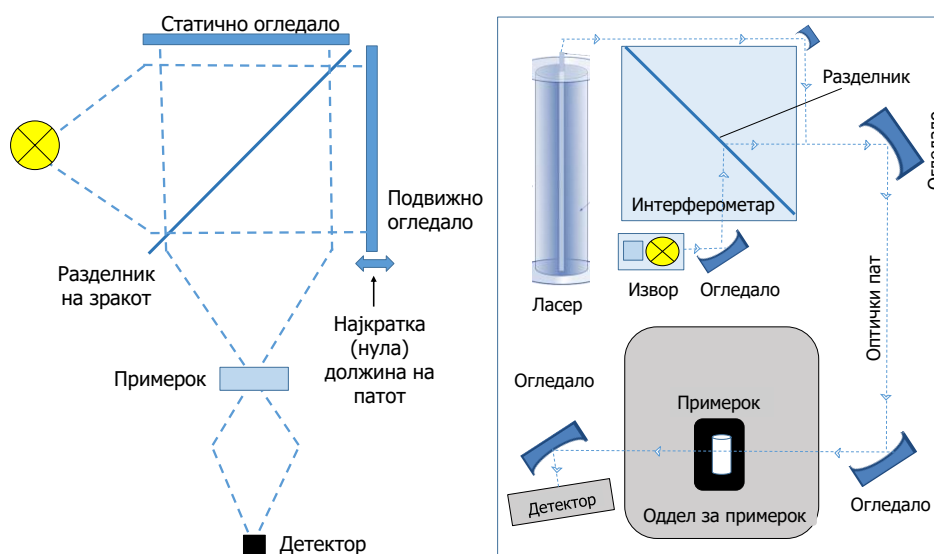
Теоретски основи: ако два снопа светлина со иста бранова должина се доведат во фаза, тогаш сноповите се засилуваат еден со друг и продолжуваат како засилен резултантен сноп. Меѓутоа, ако двата снопа не се во фаза, тогаш настанува деструктивна интерференција, при што резултантниот сноп има послаб интензитет од појдовните два интерферирачки снопа (Слика 6.7). Интерференцијата меѓу сноповите е максимална кога тие се за 180° надвор од фаза (најголема деструктивна интерференција).

Интеракции на зраци (интерференца)



Слика 6.7 Интеракции помеѓу зраци: а) конструктивна интерференца се јавува кога зраците се во фаза, б) деструктивна интерференца се јавува кога зраците се надвор од фаза

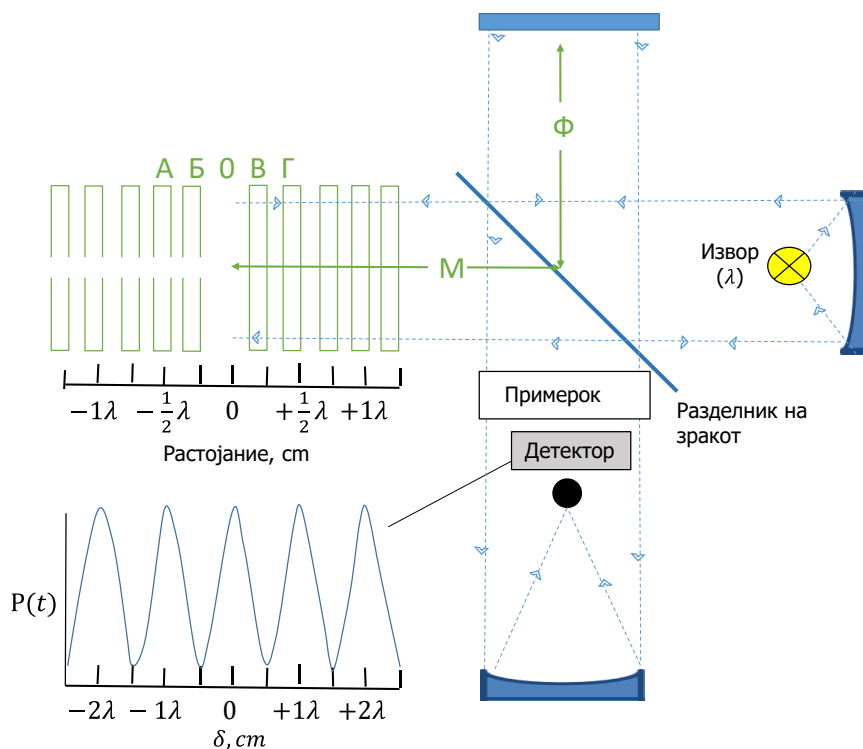
Предноста на позитивната интерференција меѓу два снопа е искористена кај FTIR инструментите. Тие се засноваат на примената на т.н. Михелсонов (*Michelson*) интерферометар (Слика 6.8).



Слика 6.8 Шематски приказ на Микелсонов интерферометар (слика лево). Најкратката (нула) должина на патот се однесува на еднаква оддалеченост на статичното и на подвижното огледало од разделувачот на зракот. Наједноставен приказ на составни делови на FTIR инструмент е прикажан на сликата десно: ласер (He-Ne), оптички пат, изворот на IR зрачење, интерферометар, примерок и детектор.

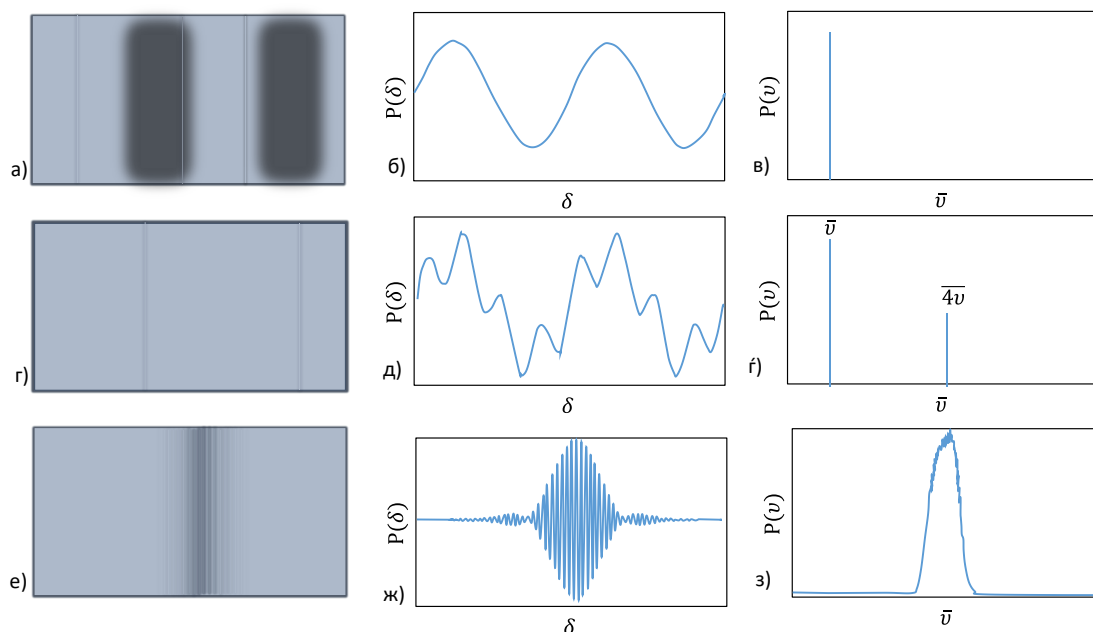
Интерферометарот претставува инструмент што го дели снопот на зрачење од изворот на два снопа со приближно ист интензитет, а потоа ги соединува така што варирањето на интензитетот на комбинираниот сноп може да се мери како функција од разликите во должините на оптичките патишта на двата снопа. Како што може да се види од Слика 6.9, снопот на зрачење од изворот се насочува и паѓа на разделувачот (*splitter*), што пропушта половина од зрачењето, а другата половина ја рефлектира. Добиените снопови на зрачење се одбиваат од огледала од кои едното е неподвижно, а другото подвижно и може да се поместува кон и во спротивна насока на разделувачот. Двата снопа повторно се среќаваат на

разделувачот на снопот, при што половина од секој сноп се насочува кон примерокот и детекторот, а другите две половини назад кон изворот. Со хоризонталното движење на подвижното огледало се менува интензитетот на зрачењето што паѓа на детекторот на предвидлив начин. Кога двете огледала се на еднакво растојание од разделувачот (позиција 0, на Слика 6.9), двата дела од рекомбинираниот сноп се целосно во фаза и снопот има максимален интензитет. За монохроматски извор, со придвижување на подвижното огледало во кој било правец за растојание еднакво на една четвртина од брановата должина (положби Б и В на сликата) се менува патот на соодветниот рефлектиран сноп зрачење за половина бранова должина (по една четвртина бранова должина во секој правец). При вакви услови настанува деструктивна интерференција со што се намалува интензитетот на рекомбинираниот сноп на зрачење до нула. Поместувањето на подвижното огледало до позиција А или Г ги доведува двете половини од снопот во фаза, така што повторно настанува позитивна (конструктивна) интерференција.



Слика 6.9 Шематски приказ на Микелсонов интерферометар осветлен од извор на монохроматско зрачење

Разликата во должините на патиштата на двата снопа $2(M - \Phi)$ на сликата, се нарекува задршка δ . Графичкиот приказ на интензитетот на рекомбинираниот сноп на зрачење (што паѓа на детекторот) наспроти задршката δ се нарекува *интерферограм*. За монохроматско зрачење интерферограмот има облик на косинусна функција (крива), бидејќи косинусната функција за разлика од синусната има максимална вредност (амплитуда) кога δ е нула (кога патиштата на двата снопа се еднакви) (Слика 6.9 и 6.10).



Слика 6.10 Создавање интерферограми на излез од Микелсонов интерферометар: (а) интерференца на излез од интерферометар како резултат на монохроматско зрачење; (б) синусоиден променлив сигнал добиен во детекторот кога сигналот опишан под (а) ќе помине преку детекторот; (в) фреквенциски спектар од монохроматски извор на зрачење што резултира од Фуриева трансформација на сигналот опишан под (б); (г) интерференца на излез од интерферометар како резултат на зрачење со две фреквенции; (д) комплексен сигнал добиен кога сигналот опишан под (г) ќе помине преку детекторот; (е) фреквенциски спектар од извор на зрачење со две фреквенции; (ж) интерференца на излез од интерферометар како резултат на широко спектрално зрачење; (з) интерферограм од изворот опишан под (е); (s) фреквенциски спектар од широк спектар на зрачење.

Зрачењето што минувајќи низ Михелсоновиот интерферометар стигнува до детекторот, вообичаено има пониска фреквенција од фреквенцијата на изворот. Зависноста меѓу овие две фреквенции може да се пресмета користејќи го интерферограмот. Еден полн бран настанува кога подвижното огледало во интерферометарот ќе се помести за растојание еднакво на половина од брановата должина (на изворот) $\lambda/2$. Ако огледалото се движи со постојана брзина v_m и ако го дефинираме τ како време потребно за огледалото да се помести за $\lambda/2$ cm, тогаш може да се напише:

$$v_m \cdot \tau = \frac{\lambda}{2} \quad (6.20)$$

Фреквенцијата f на сигналот што пристига на детекторот е реципрочна вредност од времето τ или

$$f = \frac{1}{\tau} = \frac{v_m}{\frac{\lambda}{2}} = \frac{2v_m}{\lambda} \quad (6.21)$$

Фреквенцијата f може да ја изразиме и преку брановиот број $\bar{\nu}$. Така,

$$f = 2v_m \cdot \bar{\nu} \quad (6.22)$$

зависноста меѓу фреквенцијата на зрачењето (*оптичка фреквенција*) и фреквенцијата на брановата функција во интерферограмот се добива со замена за $\lambda = c/v$. Така,

$$f = \frac{2v_m}{c} \cdot \nu \quad (6.23)$$

каде што ν е фреквенцијата на зрачењето, а c е брзината на светлината. Кога ν_m е константна, јасно е дека фреквенцијата на интерферограмот f ќе биде право пропорционална со оптичката фреквенција ν .

Фуриерова трансформација на интерферограмот

Конвенционалната спектроскопија може да се нарече како *фреквенциски домен - спектроскопија*, бидејќи податоците за интензитетот на зрачењето се снимаат и се прикажуваат како функција од фреквенцијата или од брановата должина. Наспроти тоа, во *временски домен - спектроскопијата*, што може да се добие по Фуриевата трансформација, промената на интензитетот на зрачењето е функција од времето. Важно е да се знае дека сигналот во временскиот домен ги содржи истите информации како и спектарот во фреквенцискиот домен и трансформацијата од еден во друг сигнал може да се постигне преку нумерички пресметки на Фуриевата трансформација.

Косинусната бранова функција во интерферограмот даден на сликите (Слика 6.9. и 6.10.а.) теоретски може да се прикаже со равенката:

$$I(\delta) = \frac{1}{2} I(\bar{\nu}) \cos 2\pi f t \quad (6.24)$$

каде што $I(\bar{\nu})$ е интензитетот на снопот што паѓа на интерферометарот и $I(\delta)$ е амплитудата или интензитетот на сигналот во интерферограмот. Симболите во заградите укажуваат на тоа дека едниот интензитет е во фреквенциски домен, а другиот во временски домен. Во пракса горната равенка е модифицирана со цел да се земе предвид фактот дека интерферометарот не го дели подеднакво снопот зрачење од изворот и дека одговорот од детекторот е зависен од фреквенцијата на зрачењето. Затоа место $I(\bar{\nu})$ во горната равенка е воведена нова варијабла $B(\bar{\nu})$ што зависи од $I(\bar{\nu})$, но истовремено ги зема предвид и овие фактори. Па така, равенката може да ја запишеме и како:

$$I(\delta) = B(\bar{\nu}) \cos 2\pi f t \quad (6.25)$$

со замена на равенката (6.22) во (6.25) се добива:

$$I(\delta) = B(\bar{\nu}) \cos 4\pi \nu_m \nu t \quad (6.26)$$

Брзината со којашто се движи подвижното огледало во интерферометарот изразена преку задршката е дадена со равенката:

$$\nu_m = \frac{\delta}{2t} \quad (6.27)$$

Со замена на ν_m во равенката (6.26) се добива равенката:

$$I(\delta) = B(\bar{\nu}) \cos 2\pi \delta \bar{\nu} \quad (6.28)$$

што го дава интензитетот на интерферограмскиот сигнал како функција од задршката δ и брановиот број на зрачењето од изворот.

Интерферограмот прикажан на Слика 6.10.б. може да се опише со по еден израз за секоја бранова должина.

$$I(\delta) = B(\bar{\nu}_1) \cos 2\pi \delta \bar{\nu}_1 + B(\bar{\nu}_2) \cos 2\pi \delta \bar{\nu}_2 \quad (6.29)$$

Во пракса, изворите на инфрацрвено зрачење се полихроматски. Зрачење од сите бранови должини емитувани од изворот минуваат низ интерферометарот. Секоја бранова должина ќе создаде свој косинусен бран во интерферограмот, па затоа сигналот што стигнува до детекторот е резултат на збирот од сите овие косинусни бранови (Слика 6.10 в)

$$I(\delta) = B(\bar{\nu}_1) \cos 2\pi\delta\bar{\nu}_1 + B(\bar{\nu}_2) \cos 2\pi\delta\bar{\nu}_2 + \dots \quad (6.30)$$

Тие може да бидат екстрахирани од интерферограмот, со цел да се добие спектарот во фреквенциски домен за дадена бранова должина (истиот спектар што се добива со дисперзивните спектрометри за дадена бранова должина), што е овозможено со Фуриевата трансформација.

Компоненти на интерферометарот

Огледалата во FTIR спектрометрите се обично метални. Тие се полирани од предната страна, а може да бидат и обложени со злато за да се заштитат од корозија. Овие инструменти користат различни рамни и сферични огледала за да го фокусираат зрачењето од изворот на разделувачот на снопот и од примерокот на детекторот.

Разделувачот е изработен од силициум или од германиум нанесени во тенок филм на IR транспарентен материјал (како, на пример, калиум бромид за средната IR област).

За да се намали заднинската апсорпција на зрачење од CO₂ и H₂O во воздухот и да се зголеми интензитетот на зрачењето во IR областите каде што овие гасови апсорбираат, оптичките системи во голема мера во спектрометрите се добро изолирани од надворешната околина. Во некои од нив оптичките патишта се „прочистуваат“ од присуство на CO₂ и H₂O со проток на сув азот или некој друг сув гас што не апсорбира во инфрацрвеното спектрално подрачје.

Предности на FTIR спектрометрите

Во најголемиот дел од средната IR област, односот меѓу сигналот и шумот кај FTIR инструментите е многукратно подобар во однос на оној кај квалитетните дисперзивни инструменти. Подобрениот однос меѓу сигналот и шумот овозможува брзо скенирање и добивање квалитетни спектри за само неколку секунди. Интерферометриските инструменти имаат висока резолуција (<0,1cm⁻¹) и можност за точно и репродуцибилно определување на фреквенциите. Репродуцибилноста е особено важна при одземање на спектарот на позадинската апсорпција од снимениот спектар.

Предност на FTIR инструментите во однос на дисперзивните е тоа што нивните оптички системи овозможуваат многу поголем проток на енергија на зрачење. Протокот на енергија на зрачење во дисперзивните инструменти е ограничен поради потребата од тесни отвори низ кои минува зрачењето. На крај, интерферометарот нема проблеми со расејување на снопот на зрачење за разлика од оптичките системи на дисперзивните инструменти.

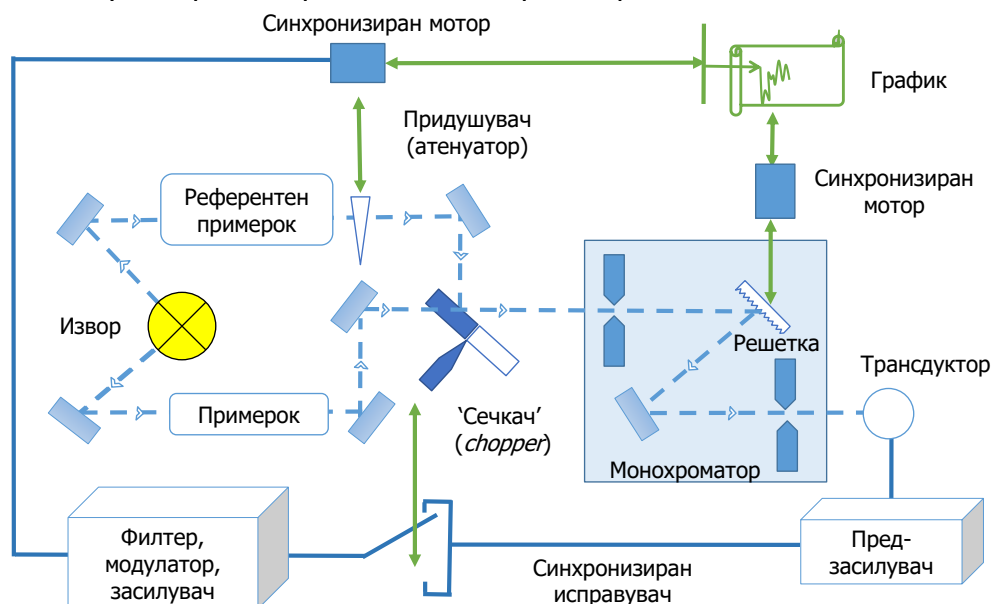
Дисперзивни инструменти

Дисперзивните инфрацрвени спектрофотометри се најчесто двозрачни и имаат рефлектирачки решетки за дисперзија на зрачењето. Изворот на зрачење и детекторот во двозрачниот систем немаат високи перформанси. Тоа е важна карактеристика на овие инструменти што користат извори на зрачење со релативно низок интензитет и детектори со мала чувствителност, па затоа е потребно дополнително засилување на сигналот.

Друга причина поради која се користат двозрачните спектрофотометри во IR областа е можното присуство на CO₂ и влага во воздухот што апсорбираат во ова подрачје и можат да предизвикаат сериозни проблеми и појава на интерференција. Промени во влажноста и температурата на воздухот предизвикуваат промени во интензитетот на изворот на зрачење ако се користи

еднозрачен инструмент, што би предизвикало грешки при снимањето на IR спектарот. Двозрачниот систем автоматски ја одзема апсорпцијата на CO₂ и на H₂O од воздухот, а, исто така, може да ја одземе и апсорпцијата од растворувачот, ако примерокот за анализа е растворен во одреден растворувач.

Оптичките системи на овие инструменти (Слика 6.11) не се разликуваат од оние на двозрачните UV/Vis спектрофотометри. Разликата е единствено во тоа што кај дисперзивните инструменти одделот за примерок и референтен материјал се наоѓа помеѓу изворот на зрачење и монохроматорот.



Слика 6.11 Шематски дијаграм на двозрачен, дисперзивен IR спектрометар. Дебелите линии прикажуваат механичко поврзување меѓу елементите, тенките линии прикажуваат електрични поврзувања меѓу елементите, а патот на зрачењето е прикажан со испрекинати линии.

Поставувањето на примерокот и референтниот материјал меѓу изворот и монохроматорот е возможно бидејќи IR зрачењето, во споредба со UV/Vis, нема доволно енергија за да предизвика фотохемиско разградување на примерокот. Ваквото поставување има и своја предност. Монохроматорот целосно го отстранува расеаното зрачење, создадено во одделот за примерокот, и тоа не стигнува до детекторот.

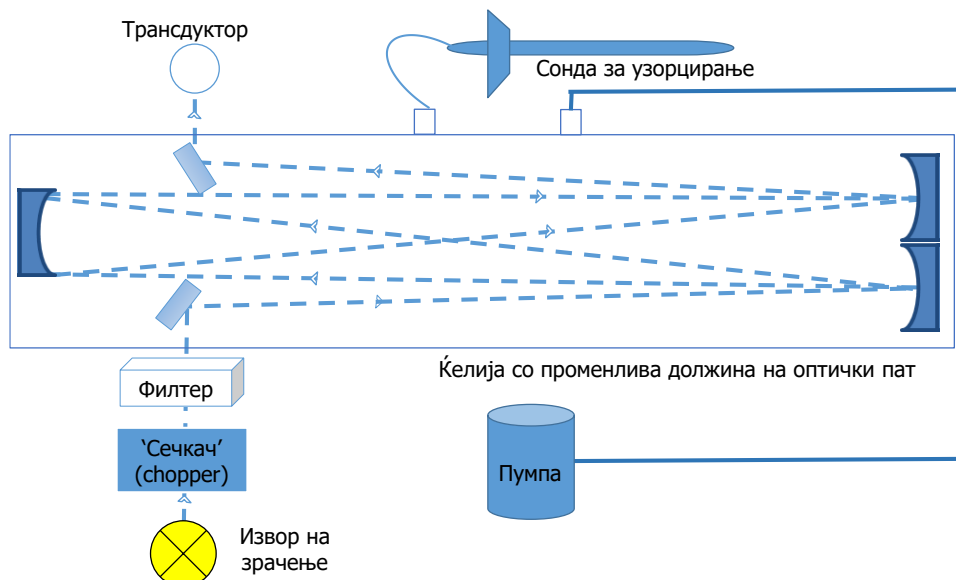
Дисперзивните инструменти го снимаат IR спектарот во фреквенциски домен. Тој претставува графички приказ на интензитетот на пропуштеното зрачење, најчесто изразено како процент на трансмисија наспроти фреквенцијата на зрачење.

Примена на инфрацрвена спектрометрија

Инфрацрвената спектрометрија е една од малкуте аналитички техники што може да се искористат за анализа на цврсти, на течни и на гасовити примероци. Изборот на техниките за подготовка на примерокот зависи од целта на анализата (квалитативно или квантитативно определување на молекулските видови), како и од големината и од составот на примерокот. Содржината на вода во примероците е главен проблем бидејќи најголемиот број инфрацрвено-транспарентни материјали се растворливи во вода. Исто така, не постојат растворувачи што се транспарентни во целото IR подрачје. Затоа техниките за подготовка на примерокот за IR анализа не се едноставни и бараат подолго време на подготовка, за разлика од UV/Vis спектрометријата каде што молекулските спектри, главно, се добиваат од разредени раствори на аналитот.

Подготовка на гасовити примероци за анализа

Инфрацрвениот спектар на лесно испарлива течност (со ниска температура на вриење) или гас може да се добие со експандирање на супстанцијата во цилиндрична вакуум ќелија со IR транспарентни прозорци. Овие ќелии може да бидат со различни димензии (со различни должини на оптичкиот пат во ќелијата). За да се зголеми апсорпцијата на зрачење од примерокот што во ќелијата е во гасовита состојба, ќелиите се изработуваат со долги оптички патишта и тоа од неколку сантиметри до 10 метри, па и повеќе. Постојат гасни ќелии низ кои зрачењето минува по еден пат, но најчесто тие се изработуваат со рефлектирачки внатрешни ѕидови, со што се овозможува снопот зрачење да мине подолг пат во ќелијата одбивајќи се од внатрешните површини на ќелијата, пред да излезе од неа (Слика 6.12). Температурата и притисокот во ќелијата може да се контролираат за да се обезбедат оптимални услови за снимање на спектарот на примерокот. Бидејќи ќелиите имаат транспарентни прозорци изработени од KBr, гасовитите примероци чишто спектри треба да се снимат, не смеат да реагираат со него или со внатрешните површини на ќелијата.



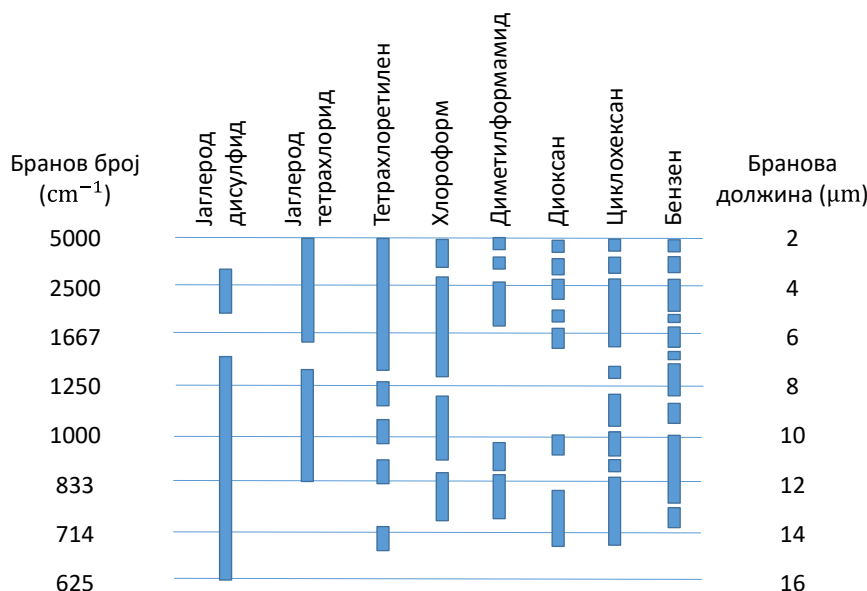
Слика 6.12 Шематски приказ на IR спектрометар наменет за анализа на гасови. Примерокот се внесува со помош на пумпа. Должината на оптичкиот пат може да се менува со промена на бројот на огледални рефлексии.

Подготовка на течни примероци за анализа

Од сите примероци за анализа наједностави за подготовка се течните примероци. Многу течности може да бидат анализирани во чиста состојба, без нивна посебна подготовка. Чистите течности коишто не се испарливи може да се нанесат и да се притиснат меѓу две рамни плочки (изработени од соли, како NaCl, KBr или AgCl), притоа формирајќи тенок филм со дебелина од 0,01 mm или помалку. Притоа двете плочки се слепени благодарение на капиларните сили и така се поставуваат на патот на снопот зрачење. Оваа техника за анализа на течните примероци не дава секогаш репродуцибилни резултати, но добиените спектри се обично добри за квалитативна анализа.

Чистите испарливи течности може да се анализираат користејќи пар на рамни плочки одвоени со тесен простор и сместени во затворена ќелија. Должината на оптичкиот пат на овие ќелии зависи од ширината на просторот меѓу рамните плочки (изработени од наведените соли). Кога се анализираат чисти течности мора да се користат кратки оптички патишта (помали од 0,05 mm) за да се овозможи оптимална апсорпција од примерокот, а да се избегне целосна апсорпција на инфрацрвениот сноп зрачење. Чистите течности може да содржат определено количество вода што може да ги оштети и да ги замагли површините на плочките. За да се зачува репродуцибилноста на мерењата и да се намали расејувањето на IR зрачењето од ѕидовите на ќелиите, неопходно е повремено чистење и полирање на нивните површини.

Употребата на разредени раствори на течности за инфрацрвена спектроскопска анализа е подобар избор од повеќе причини. Растворите даваат порепродуцибилни спектри, а растворањето во IR транспарентен растворувач го намалува проблемот на целосна апсорпција на зрачењето од чистите примероци. Растворувачи кои обично се користат во IR спектроскопијата се јаглерод тетрахлорид, јаглерод дисулфид, метилен хлорид и некои алкани, како што е хексанот.



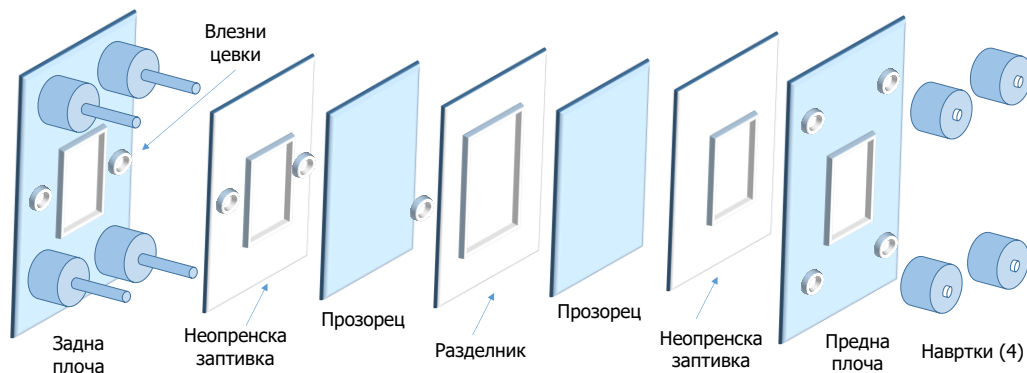
Слика 6.13 Растворувачи што се користат при IR спектрометрија. Хоризонталните линии ги прикажуваат регионите на можна примена.

Ниту еден од растворувачите не е транспарентен во целата (најупотребувана) средна IR област, така што аналитичарот мора да избере таков растворувач што е транспарентен во регионот од интерес (Слика 6.13). Водата и алкохолите многу ретко се користат, не само заради нивната апсорпција во оваа

IR област, туку и поради множноста за растворање на прозорците на ќелиите изработени од алкални халиди.

Кивети за течни примероци

Киветите за течни примероци се затворени и обично со должина на оптичкиот пат од 0,01 до 1 mm. Оптичкиот пат е одреден од ширината на празниот простор меѓу двата прозорци изработени од некоја IR транспарентна сол (најчесто NaCl). Ширината на празниот простор во киветите може да биде со фиксна вредност или со можност да се менува. За добивање оптимални резултати, најчесто концентрацијата на растворите за анализа се движи од 0,1 до 10% и е директно зависна од должината на оптичкиот пат (Слика 6.14).



Слика 6.14 Расчленет приказ на составните делови на IR ќелија за течни примероци. Дебелината на разделникот се движи од 0,015 до 1 mm.

Табела 6.2 Вообичаени материјали за изработка на плочките (прозорец) од ќелиите за течни примероци

Материјал за изработка на плочките (прозорец)	Подрачје за примена (cm^{-1})	Растворливост во вода, $\text{g}/100\text{g H}_2\text{O}$, 20°C
Натриум хлорид	40000 – 625	36,0
Калиум бромид	40000 – 385	65,2
Калиум хлорид	40000 – 500	34,7
Џезиум јодид	40000 – 200	160,0
Фузирана силика	50000 – 2500	Нерастворлив
Калциум флуорид	50000 – 1100	$1,51 \times 10^{-3}$
Бариум флуорид	50000 – 770	0,12 (25°C)
Талиум бромид јодид (KRS-5)	16600 – 250	< 0,0476
Сребро бромид	20000 – 285	$1,2 \times 10^{-7}$
Цинк сулфид (Irtran-2)	10000 – 715	Нерастворлив
Цинк селенид (Irtran-4)	10000 – 515	Нерастворлив
Полиетилен	625 – 30	Нерастворлив

Најголемиот број кивети за IR анализа мора да бидат заштитени од влага, бидејќи солните прозорци се хигроскопни и лесно се раствораат во вода (Табела 6.2). Органските течни примероци треба да бидат чисти и без присуство на вода, пред да се стават во IR ќелиите. Присуството на вода може да предизвика замаглување на солните прозорци, а со тоа и расејување на влезното зрачење.

Подготовка на цврсти примероци за анализа

Постојат три традиционални техники за подготовка на цврсти примероци за IR анализа: техника на пелетирање, техника на формирање густа суспензија и техника на нанесување во тенок филм.

Една од најчестите техники за подготовка на цврстите примероци е техниката на добивање на KBr пелети (можат да бидат користени и други алкални метални халиди). Техниката на пелетирање вклучува мешање на околу 1 mg фино спрашен цврст примерок (со големина на честички под 2 μm во дијаметар) со околу 100 mg спрашен калиум бромид. Понатаму се врши компресија на смесата под висок притисок ($> 50\,000\text{ psi}^4$) и вакуум во специјален калап (матрица), при што се добива мал просирен диск со дијаметар од околу 1 cm. Особено е важно калиум бромидот да е сув и чист (со степен на чистота за IR анализи). Поради неговата хигроскопност често во снимениот спектар на супстанцијата се јавуваат апсорпциски ленти на 3450 cm^{-1} и 1640 cm^{-1} , што потекнуваат од апсорбираната влага.

Со примена на оваа техника се добиени инфрацрвени спектри на многу супстанции што може да се најдат во спектралните библиотеки. Бидејќи KBr е јонско соединение, тоа е транспарентно во речиси целото IR подрачје до 400 cm^{-1} . Цезиум јодидот апсорбира под 200 cm^{-1} и понекогаш се употребува поради подобрата транспарентност на ниски фреквенции.

Техниката на формирање густа суспензија се применува во случаи кога цврстите примероци не се растворливи во инфрацрвен-транспарентен растворувач или не се погодни за подготовка во форма на KBr пелети. Оваа техника вклучува ситнење на цврстиот примерок за анализа до прашок со дијаметар на честичките помал од 2 μm . Малата големина на честичките е неопходна за да се избегне расејување на IR зрачењето. Мало количество од прашокот, 2 – 4 mg, може да се преведе во густа суспензија, со негово ситнење во присуство на неколку капки густа, вискозна течност, како Nujol (парафинско масло) или хлорофлуоројаглеродни масла. Оваа густа суспензија потоа се пресува меѓу две солни плочи при што се формира тенок филм. Оваа техника за подготовка е погодна за квалитативна, но не и за квантитативна анализа.

Во третата техника цврстиот примерок се нанесува во тенок филм на површината од KBr или NaCl плочка по пат на испарување на растворот на примерокот до суво или со зацврстување на растопен примерок. Инфрацрвеното зрачење минува низ нанесениот тенок филм од примерокот за анализа. Оваа техника се користи, пред сè, за брза квалитативна анализа и не е погодна за квантитативна анализа. Техниката е погодна особено за добивање IR спектри на полимери.

Квалитативна анализа

Квалитативната анализа на непознати примероци претставува значаен дел од работата на аналитичарот. Бидејќи секогаш е подобро да не се даде никаков одговор отколку да се даде погрешен одговор, аналитичарите обично настојуваат квалитативната анализа да ја спроведат користејќи повеќе техники што се преклопуваат и се потврдуваат една со друга. На тој начин доаѓаат до повеќе информации за природата на примерокот за анализа. За квалитативна анализа на непознато органско соединение најупотребувани спектроскопски методи се: **инфрацрвената спектроскопија, IR** (што ни кажува кои функционални групи се присутни во соединението), **нуклеарно-магнетно-резонантната спектроскопија, NMR** (преку која добиваме информации за релативната положба на атомите во молекулата, како и за бројот на овие атоми) и **масената спектрометрија, MS** (што ни ја дава молекулската маса на непознатото соединение и дополнителни структурни информации).

⁴ 1 psi = 6894.757 Pa

Значењето на квалитативната IR анализа не смее да се преувеличува при добивање претходни информации за примерокот, ако се користи кака единствена техника за идентификација. Пред да се почне со интерпретација на IR спектарот на некоја супстанција, важно е да се соберат што е можно повеќе информации за неа. На пример, за да се идентификуваат продуктите на некоја органска реакција, особено е важно да се има информации за реактантите, за супстанциите што се очекува дека ќе настанат во текот на таа реакција, можните распадни (деградациски) продукти што може да настанат по завршувањето на реакцијата итн. „Вооружени“ со што е можно повеќе од овие информации, ние (можеби) би биле во можност тогаш да ги идентификуваме молекулите во примерокот само од нивниот инфрацрвен спектар.

При интерпретација на IR спектрите не се применуваат некои егзактни правила, таа е емпириски метод. Квалитативната анализа во инфрацрвената спектроскопија се изведува со споредување на брановите броеви (или на брановите должини) на апсорпциските ленти во спектарот на примерокот со брановите броеви (или брановите должини) на функционалните групи дадени во соодветна табела. Или со други зборови, идентификацијата на примерокот е олеснета знаејќи го фактот дека апсорпциските ленти во неговиот спектар означуваат определен дел од молекулата што вибрира (чии вибрации се познати како **вибрации на функционална група**, а тие се познати и може да се отчитаат од табела). Значи најпрво се проверуваат апсорпциските ленти во спектарот на непознатата супстанција што припаѓаат во **подрачјето на фреквенции на функционална група** од 3600 cm^{-1} до околу 1200 cm^{-1} . Следен чекор е детална споредба на спектарот на непознатата супстанција со спектарот на чиста позната (референтна) супстанција што ги содржи сите функционални групи најдени во првиот чекор. Споредбата се врши во областа од 1200 до 600 cm^{-1} , позната како **подрачје на отисоци на прсти**. Какви било мали разлики во структурата на супстанцијата што се идентификува ќе се забележат во оваа област (содржи ленти карактеристични за супстанцијата). Според тоа, ако постои совпаѓање на апсорпциските ленти меѓу испитуваната и референтната супстанција, повеќе од сигурни сме дека станува збор за истата супстанција во примерокот за анализа.

Интерпретацијата на IR спектрите е мошне комплексен проблем бидејќи инфрацрвената спектроскопија овозможува целосен увид во структурата на соединенијата. Изгледот на IR спектарот (положба, интензитетот, бројот и обликот на апсорпциските максимуми) е во директна врска со структурата на молекулата.

IR спектарот се состои од низа апсорпциски ленти што меѓу себе се разликуваат по положбата и интензитетот. Местото на лентата во спектарот е определена со положбата на максимумот, а мерка за интензитетот е должината на лентата во правец на ординатата. Во податоците за одделни ленти, покрај брановиот број на максимумот на лентата најчесто со мали букви се обележува дали интензитетот е јак (*s-strong*), среден (*m-medium*) или слаб (*w-weak*).

При интерпретација на инфрацрвен спектар на непозната супстанција не треба да очекуваме дека ќе ги асигнираме (означиме) сите апсорпциски ленти во нејзиниот спектар. Оваа задача е отежната од фактот што спектарот на секоја супстанција е дополнително усложнет од присуството на апсорпциски ленти на овертоновите, комбинираниите, спрегнатите и резонантните вибрации, како и лентите на вибрациско-ротациските премини.

Фреквенции на функционални групи

Фреквенциите на коишто вибрираат функционалните групи во молекулите ретко се непроменливи токму поради интеракцијата со вибрациите на еден или на повеќе атоми што влегуваат во составот на функционалната група. Најчесто овие

интеракции се обично мали, па оттаму е можно да се одредат фреквентните области во кои најверојатно е дека ќе се јави апсорпциската лента на дадената функционална група. Табела 6.3 ги дава фреквенциите на функционалните групи на некои позначајни функционални групи.

Табела 6.3 Скратена листа на фреквенции на органски функционални групи

Врска	Тип на соединение	Фреквенции опсег (cm^{-1})	Интензитет
C-H	Алкани	2850 – 2970	Јак (s)
		1340 – 1470	Јак (s)
C-H	Алкани	3010 – 3095	Среден (m)
		675 – 995	Јак (s)
C-H	Алкини	3300	Јак (s)
C-H	Ароматични прстени	3010 - 3100	Среден (m)
		690 – 900	Јак (s)
O-H	Мономерни алкохоли, феноли	3590 – 3650	Променлив (v)
	Алкохоли со водородни врски, феноли	3200 – 3600	Променлив (v), понекогаш широк
	Мономерни карбоксилни киселини	3500 – 3650	Среден (m)
	Карбоксилни киселини со водородни врски	2500 – 2700	Широк
N-H	Амини, амиди	3300 -3350	Среден (m)
C=C	Алкени	1610 – 1680	Променлив (v)
C=C	Ароматични прстени	1500 – 1600	Променлив (v)
C≡C	Алкини	2100 – 2260	Променлив (v)
C-N	Амини, амиди	1180 – 1360	Јак (s)
C≡N	Нитрили	2210 – 2280	Јак (s)
C-O	Алкохоли, етри, карбоксилни киселини, естри	1050 – 1300	Јак (s)
C=O	Алкохоли, кетони, карбоксилни киселини, естри	1690 – 1760	Јак (s)
NO ₂	Нитросоединенија	1500 – 1570	Јак (s)
		1300 – 1370	

Средна IR област

Средната IR област ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) може да се подели во четири подрачја (на тој начин природата на фреквенцијата на функционалната група општо може да се одреди од подрачјето во кое таа јавува апсорпциска лента):

- Подрачје на истегнувачки вибрации на X-H ($4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$)
- Подрачје на тројна врска ($2500 - 2000 \text{ cm}^{-1}$)
- Подрачје на двојна врска ($2000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$)
- Подрачје на отисоци на прсти ($1500 - 600 \text{ cm}^{-1}$)

Апсорпциските ленти во подрачјето од 4000 до 2500 cm^{-1} потекнуваат обично од истегнувачките вибрации на O-H, C-H и N-H групите. Истегнувачката вибрација на O-H групата дава широка лента што се јавува во опсег од 3700 до 3600 cm^{-1} . Како за споредба, истегнувачката вибрација на N-H групата најчесто се забележува меѓу 3400 и 3300 cm^{-1} , чија лента е поостра од лентата на O-H истегнувачката вибрација, па затоа може и лесно да се означи. Лентите на истегнувачката вибрација на C-H групите кај алифатичните соединенија се јавуваат меѓу 3000 и 2850 cm^{-1} . Ако C-H групата е поврзана до двојна врска или ароматичен прстен, тогаш брановиот број на истегнувачката C-H вибрација се зголемува и апсорбира меѓу 3100 и 3000 cm^{-1} .

Истегнувачките вибрации на тројната врска даваат апсорпциски ленти во подрачјето од 2500 до 2000 cm^{-1} , поради високата вредност на константа на јачина на врската. $\text{C}\equiv\text{C}$ врските апсорбираат меѓу 2300 и 2050 cm^{-1} , додека нитрилната група ($\text{C}\equiv\text{N}$) меѓу 2300 и 2200 cm^{-1} . Овие групи може да се разграничат во спектарот, бидејќи истегнувачката $\text{C}\equiv\text{C}$ вибрација дава обично лента со слаб интензитет, а истегнувачката $\text{C}\equiv\text{N}$ вибрација - лента со среден интензитет. Во ова подрачје покрај апсорпциските ленти на истегнувачките вибрации на тројната врска, може да се јават и лентите на истегнувачките X-H вибрации, каде што X е потешок атом, како на пример фосфор или силициум.

Главните ленти во подрачјето на двојната врска, 2000 - 1500 cm^{-1} , се резултат на истегнувачките $\text{C}=\text{C}$ и $\text{C}=\text{O}$ вибрации. Истегнувачката вибрација на карбонилната група дава карактеристична интензивна лента, којашто зависно од типот на соединението во кое се наоѓа групата (алдехид, кетон, карбоксилна киселина, естер итн), се јавува меѓу 1830 до 1650 cm^{-1} . Истегнувачката $\text{C}=\text{C}$ вибрација дава многу послаба лента на околу 1650 cm^{-1} , но оваа лента често и не се забележува поради тоа што врските кај коишто не доаѓа до промена на диполниот момент при вибрирањето не се IR активни. Во ова подрачје, исто така, се јавува и лентата на истегнувачката $\text{C}=\text{N}$ вибрација, што обично е поинтензивна.

Подрачјето од 1500 до 650 cm^{-1} е познато како **подрачје на „отисоци на прсти“**, бидејќи апсорпциските ленти што се јавуваат во овој дел од спектарот се единствени (уникатни) за одредена супстанција. Овие ленти не е едноставно да се интерпретираат, бидејќи тие потекнуваат од свиткувачките вибрации и од интеракцијата меѓу вибрациите во молекулата. Во ова подрачје (поточно од 1300 до 910 cm^{-1}) може да се јават и некои многу важни апсорпциски ленти, како на пример C-C-O лентата кај алкохолите и C-O-C лентата кај естрите. Овие ленти треба да се потврдат со присуство на соодветните ленти (на OH или C=O групата) во спектарот на супстанцијата. Нискофреквентниот крај од ова подрачје (910 – 650 cm^{-1}) понекогаш се нарекува **подрачје на ароматичен прстен**. Ако во спектарот на испитуваната супстанција нема интензивни апсорпциски ленти во ова подрачје, тогаш нејзината структура најверојатно не е ароматична. Интензивните ленти во овој дел од спектарот се резултат на C-H свиткувачките вибрации надвор од рамнината на ароматичниот прстен. Под 800 cm^{-1} се јавуваат и апсорпциските ленти на C-Cl и C-Br врските.

Блиска IR област

Апсорпциските ленти во блиската IR област (13000 - 4000 cm^{-1}) се резултат на овертонови или на комбинација на фундаментални истегнувачки вибрации (што како посебни вибрации се јавуваат во подрачјето од 3000 до 1700 cm^{-1}). Лентите најчесто потекнуваат од C-H, N-H или O-H истегнувачките вибрации. Тие обично се слаби по интензитет (потекнуваат од наттонови), а нивниот интензитет се намалува за фактор 10 од понизок на повисок натртон. Апсорпциските ленти во блиската IR област често се преклопуваат едни со други, така што се помалку употребливи за квалитативна анализа.

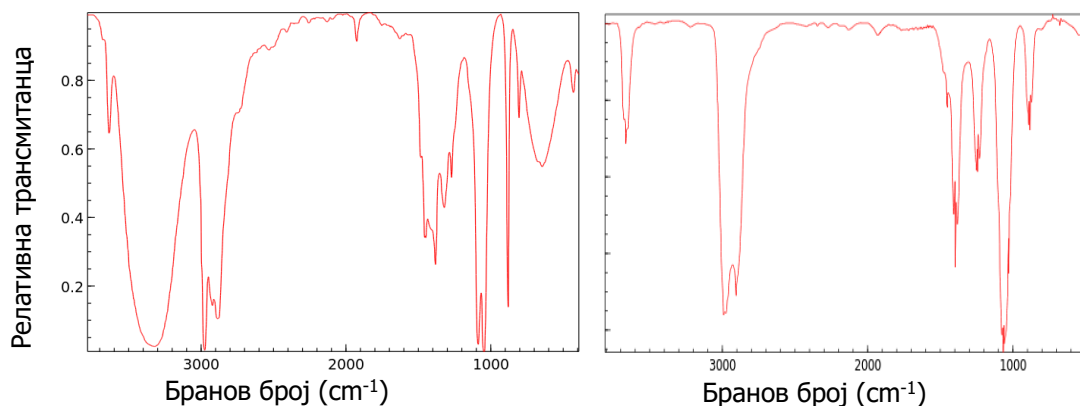
Далечна IR област

Далечната IR област во спектарот се наоѓа меѓу 400 и 100 cm^{-1} . Оваа област е поограничена за структурната идентификација на соединенијата во однос на средната IR област. Меѓутоа дава информации за молекулите што содржат тешки атоми (молекули што содржат халогени атоми, органометални и неоргански соединенија), за молекулските скелетни вибрации и за вибрациите во кристалните решетки.

Интерпретација на инфрацрвени спектри

За успешна интерпретација на инфрацрвените спектри на супстанциите мора секогаш да се има предвид влијанието на бројни фактори врз изгледот на спектрите. Имено, типот на инструмент што се користи за снимање на инфрацрвените спектри, употребениот растворувач за примерокот, начинот на подготовка на примерокот за IR анализа, концентрацијата на супстанцијата во испитуваниот примерок и температурата може значително да влијаат врз изгледот на спектарот на една иста супстанција.

Врз изгледот на спектрите на супстанциите влијае и присуството на водородни врски (интра или интермолекулски) меѓу молекулите на испитуваната супстанција. Овие врски влијаат на крутоста на хемиските врски во кои учествуваат атомите што ги градат водородните врски и на тој начин ја менуваат нивната природна вибрациска фреквенција. На пример, влијанието на водородната врска присутна меѓу молекулите на етанолот (во течна состојба) врз истегнувачката O-H вибрација во спектарот може да се забележи како широка лента во делот од 3100 до 3600 cm^{-1} , центрирана на околу 3350 cm^{-1} . IR спектарот на етанолот во гасна состојба (каде што не е значајно водородното врзување меѓу молекулите) покажува остра апсорпциска лента на 3650 cm^{-1} што потекнува од истегнувачката O-H вибрација (Слика 6.15).



Слика 6.15 Спектар добиен од етанол: а) нанесен како тенок филм помеѓу KBr плочки и б) пари од етанол

Исто така, важно е да се знае дека многу растворувачи што се користат при снимање на IR спектрите може да градат водородни врски со испитуваните супстанции. Растворувачите, како што се: хлороформ (CHCl_3), етерите, алдехидите и терциерните амини може да градат водородни врски во раствор. За разлика од нив, растворувачите, како што се: јаглерод тетрахлоридот (CCl_4) и јаглерод дисулфидот (CS_2) ги немаат овие карактеристики.

Квантитативна анализа

Квантитативните IR апсорпциски методи до некаде се разликуваат од UV/Vis спектроскопските методи поради поголемата сложеност на спектрите, помалата ширина на апсорпциските ленти, како и инструменталните ограничувања на IR спектрометрите. Точноста и прецизноста на мерењата извршени со употреба на инструменти на принцип на Фуриева трансформација се далеку подобри во однос на мерењата извршени со дисперзивните инструменти. Квантитативната инфрацрвена анализа во средната IR област не е толку точна како квантитативната UV/Vis анализа. Киветите за примероци во средната инфрацрвена (*mid-IR*) спектроскопија имаат многу помали должини за оптичкиот пат од оние што се

употребуваат во UV и мора да бидат изработени од IR транспарентни материјали, како NaCl или KBr. Овие материјали се многу меки и лесно може да се оштетат (нагризаат) од траги на вода или механички да се деформираат, така што оптичкиот пат може да варира од едно мерење до друго. Тоа доведува до сериозно отстапување од Ламберт-Беровиот закон, на кој се заснова квантитативната инфрацрвена анализа, и до грешки при мерењето.

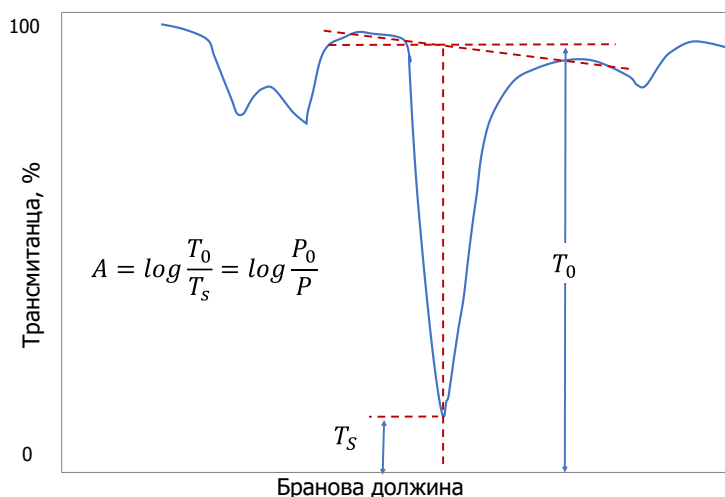
Квантитативната анализа (пред сè во средната инфрацрвена област) се темели врз мерењето на концентрацијата на анализот во примерокот за анализа. За таа цел се користи Ламберт-Беровиот закон кој ја дава математичката зависност меѓу апсорбанцијата A и концентрацијата на анализот c :

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (6.31)$$

каде што ε е моларниот апсорпциски коефициент (моларната апсорптивност), а l должината на оптичкиот пат. Според овој закон, ако во координатен систем се нанесе апсорбанцијата на ординатата, а концентрацијата на апсцисата, зависноста меѓу величините треба да даде линеарна крива (права) што минува низ координатниот почеток и има наклон од εl . Теоретски, ако е потребно да се најде концентрацијата на некој анализ во примерок за анализа, потребно е да се подготват стандардни раствори на анализот со позната концентрација, да се одбере погодна апсорпциска лента од спектарот на анализот (за квантитативните мерења), да се измерат апсорбанциите на стандардните раствори на брановиот број што одговара на максимумот на одбраната апсорпциска лента и да се конструира баждарен дијаграм. На крај, непознатата концентрација на анализот во примерокот за анализа може да се отчита од баждарен дијаграм, познавајќи ја апсорбанцијата на анализот измерена на брановиот број на кој се вршени мерењата.

Неколку фактори треба да се земат предвид кога се користи овој пристап. Прво, концентрацијата на стандардните раствори треба да биде избрана така за апсорбанцијата на избраната лента од спектарот да не биде ниту слаба ниту пак преинтензивна. Квантитативните методи на мерење треба да имаат висока осетливост за да може да се квантифициуваат и ниски концентрации од анализот. Затоа за квантитативна анализа се сугерира да се избере поинтензивна апсорпциска лента во спектарот (со висока моларна апсорптивност). Меѓу другото, инфрацрвените спектри обично содржат многу ленти, од кои голем дел се преклопуваат. Затоа за квантитативни цели мора да се одбере лента што е изолирана од интерференцијата на другите функционални групи што апсорбираат во близина. Така на пример, едноставните квантитативни методи на анализа го користат интензитетот на групите C=O, N-H или O-H. Лентата на истегнувачката C=O вибрација најчесто се користи поради тоа што е интензивна, се наоѓа во спектрален регион во кој апсорбираат мал број функционални групи и не е подложна на промени во обликот поради хемиска промена или водородно врзување (за разлика од N-H и O-H групите).

За утврдување на интензитетот на апсорбираното зрачење, од снимените спектри може да се користат величините: *висина* на апсорпциските пикови (растојнието од основата на пикот - базната линија до неговиот максимум) или нивната *површина* (што се добива со математичка интеграција) (Слика 6.16). Мерењето на површината под пикот е многу погоден начин во ситуации кога апсорпцискиот пик е несиметричен и кога базната линија варира од еден до друг примерок за анализа. Всушност, кога се конструира калибрациски дијаграм величината преку која се изразува апсорпцијата од анализот и се нанесува на ординатата е или висината на апсорпцискиот пик или, пак, неговата површина (зависно што сме одбрале да мериме).



Слика 6.16 Определување висина на апсорпциски пик - метод на базна линија

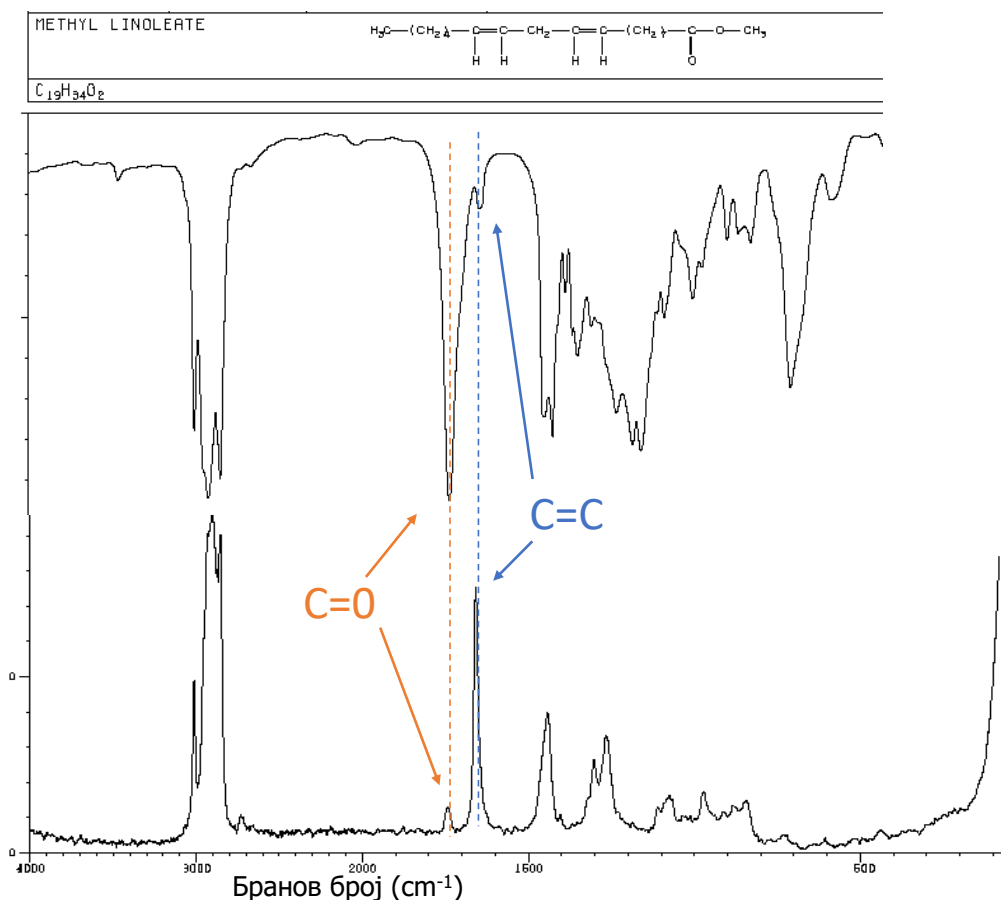
Инфрацрвената спектроскопија може да се искористи и за мерење на бројот на функционални групи во молекулата (на пример, бројот на присутните -ОН или -NH₂ групи). Најдено е дека моларната апсорптивност на апсорпциските ленти на определена група е пропорционална со бројот на присутните групи од ист тип. Според тоа, секоја група од еден ист тип придонесува за интензитетот на апсорпција на зрачење што потекнува од тој тип група и има свој интензитет што не варира многу од еден вид молекула до друг. Затоа овој пристап е искористен за определување на должината на молекулите на јаглеводородите користејќи ја свиткувачката C-H вибрација на метиленската група на 1467 и 1305 cm⁻¹.

Квантитативните мерења најчесто се вршат на примероци во раствор поради помалото расејување на IR зрачењето и следствено помалото отстапување од Ламберт-Беровиот закон. Пелетирањето со KBr исто може да се искористи како начин на подготовка на примерокот за анализа, но поради поголемото расејување на зрачењето (особено ако пелетите не се добро направени) помал е и линерниот опсег на употребениот метод.

РАМАНСКА СПЕКТРОСКОПИЈА

Познат е феноменот дека кога сноп на зрачење минува низ транспарентен медиум, молекулите присутни во него расејуваат дел од влезното зрачење во сите правци. Во 1928 година, индискиот физичар Раман (*C. V. Raman*) открил дека делот расеано зрачење од видливото подрачје се разликува од влезното зрачење, така што поместувањето во брановите должини (меѓу влезното и расеаното зрачење) зависи од хемиската структура на молекулите што го предизвикале расејувањето. За откритието и систематското истражување на овој феномен, во 1931 година му била доделена Нобеловата награда за физика.

Раманската спектроскопија претставува техника за изучување на молекулските вибрации преку расејување на светлината. Рамански спектри се добиваат при озрачување на примерокот со моќен ласерски извор на видливо или инфрацрвено монохроматско зрачење од блиската IR област. При озрачувањето, со соодветен спектрометар под одреден агол (најчесто под 90°) се снима спектарот на расеаното зрачење. Интензитетот на расеаното зрачење е многу помал (околу 0,001%) од интензитетот на влезното, па затоа и неговото детектирање и мерење е потешко споредено со инфрацрвената спектрометрија. Раманската спектроскопија е комплементарна на инфрацрвената апсорпциска спектроскопија бидејќи некои вибрации, како што веќе видовме, не апсорбираат во инфрацрвеното подрачје од спектарот на електромагнетното зрачење. Услов за една вибрација да даде апсорпциска лента во IR спектарот е да дојде до промена на диполниот момент при вибрирањето. За да се види некоја вибрација во Рамански спектар, потребно е само да настане промена во поларизабилноста при вибрирањето.



Слика 6.17 Комплементарност меѓу инфрацрвениот и Рамански спектар на метил естер на линолеинската киселина

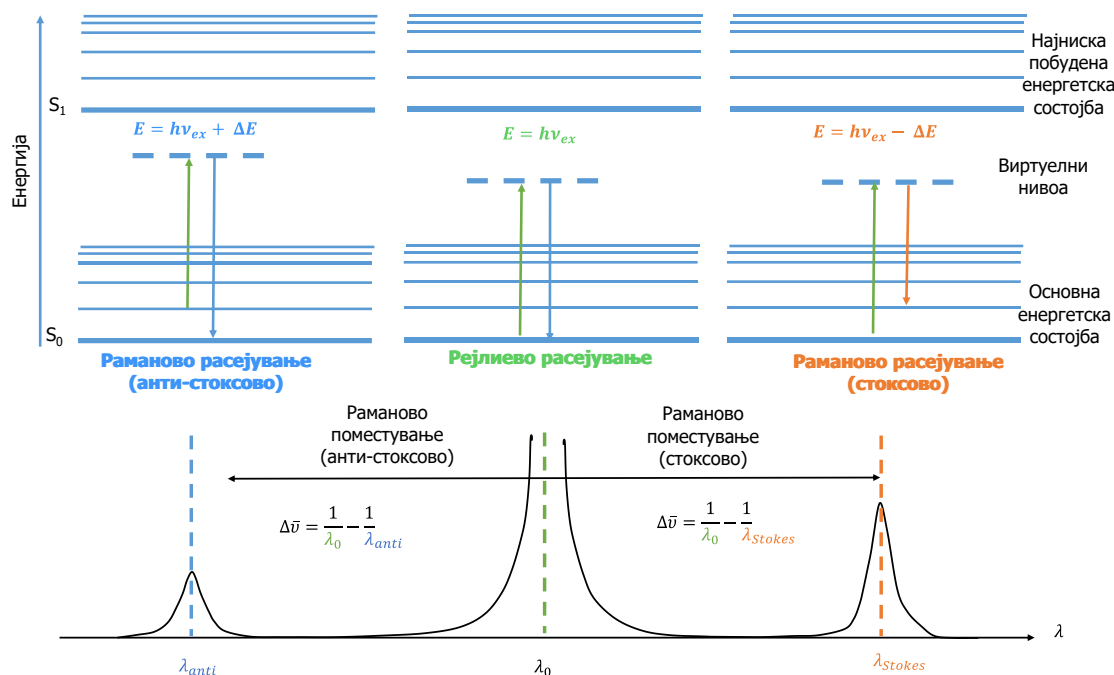
Промена во поларизабилноста настанува како резултат на деформирање на електронскиот облак околу атомите што вибрираат. Деформирањето е полесно кога врската меѓу атомите што вибрираат се издолжува, а е отежнато при нејзиното скусување. Како што е познато, хомонуклеарните двоатомски молекули како CCl_2 не апсорбираат IR зрачење, бидејќи немаат диполен момент. Cl-Cl истегнувачката вибрација е *IR-неактивна*. Бидејќи хомонуклеарните двоатомски молекули ја менуваат поларизабилноста при истегнувачките вибрации, Cl-Cl истегнувачката вибрација може да се детектира со Раманската спектроскопија. Затоа велиме дека овој тип вибрации се *Раман-активни*. Некои молекулски вибрации се активни во IR, а неактивни во Раман, и обратно. Многу вибрациски модови кај повеќето молекули се активни и во IR и во Раман. Токму поради тоа Раманската спектроскопија ја дополнува инфрацрвената апсорпциска спектроскопија (Слика 6.17).

Механизам на Раманско и на Рејлиевото расејување на зрачењето

Во Раманската спектроскопија, спектралното побудување нормално се постигнува со зрачење со бранова должина на која не апсорбира испитуваниот аналит. Најголем дел од влезното зрачење се расејува во околината. Притоа може да настанат три вида расејување на зрачењето: *Рејлиево*, *Стоксово* и *анти-Стоксово* расејување. Најголемиот дел од расеаното зрачење има иста фреквенција (иста бранова должина) со влезното зрачење. Тоа се нарекува уште и Рејлиево расејување, според лорд Рејли (*Lord Rayleigh*) кој со години го изучувал расејувањето на светлината. Рејлиевото расејување настанува како резултат на еластичните судири меѓу фотоните на влезното зрачење и молекулите на аналитот, при што не доаѓа до губиток на енергија. Меѓутоа со подетално проучување на расеаното зрачење утврдено е дека постои слаба интеракција меѓу влезното зрачење и молекулите. Некои од фотоните се расејуваат со помала енергија по интеракцијата со молекулите, а други со поголема. Спектралните линии што ги даваат вака расеаните фотони се викаат **Рамански линии**. Само отприлика еден фотон на милион влезни ќе се расее со променета бранова должина (или фреквенција). *Раман-Стоксовите линии* настануваат од фотоните што се расеани со помала енергија од влезното зрачење, а *Раман-анти-Стоксовите линии*, од фотоните расеани со повисока енергија. Разликата во енергијата, а со тоа и во фреквенцијата на овие фотони во однос на влезните се причинети од нееластичните судири меѓу влезните фотони и молекулите. Разликите во енергиите на расеаните и влезните фотони било најдено дека соодветствуваат на вибрациските премини. Поради тоа може да се каже дека молекулите се побудуваат до повисоки вибрациски состојби, како и во IR спектроскопијата, но според друг механизам. Слика 6.18 претставува шематски дијаграм на појавите на Рејлиевото и на Раманското расејување.

Енергијата на влезните фотони може да се претстави со познатата равенка $E = h\nu$. Ако фотонот се судри со молекула, молекулата ја зголемува енергијата за вредноста $h\nu$. Овој процес *не е квантизиран*, за разлика од процесот на апсорпција на фотон. Може да се замисли дека по интеракцијата со фотонот молекулата постои во некоја имагинарна состојба, наречена *виртуелна состојба*, со енергија помеѓу основната и првата побудена електронска состојба. Енергиите на две вакви виртуелни состојби се означени со испрекинати линии на сликата*. Двете стрелки, најлево на сликата, означуваат зголемување на енергијата за молекула во основното и во првото побудено вибрациско ниво (од основната електронска состојба). Стрелките имаат иста должина, што укажува на фактот дека фотоните што заемнодејствувале имаат иста енергија. Ако молекулата ја ослободи апсорбираната енергија, тогаш расеаните фотони ќе имаат иста енергија како и влезните. Ова се т.н. Рејлиево расеани фотони, прикажани со двете средни стрелки

на Слика 6.18. Така, молекулите се враќаат во истата состојба претходно, еден до основното, а другиот до првото побудено вибрациско ниво. Стрелките се со иста должина, па според тоа и расеаните фотони ќе имаат иста енергија.



Слика 6.18 Дијаграм за потекло на Рејлиево, на Стоксово и на анти-Стоксово Раманско расејување

Ако молекулата почне да вибрира со поголема енергија по интеракцијата со фотонот, таа енергија (за вибрирање) мора да дојде од фотонот. Затоа расеаниот фотон мора да ја намали енергијата за вредност еднаква на здобиената вибрациска енергија од страна на молекулата. Таа појава е покажана со втората стрелка од десно на Сликата 6.18. Наместо молекулата да се врати во основното вибрациско ниво, таа сега се наоѓа во првото побудено вибрациско ниво. Енергијата на расеаниот фотон е $E - \Delta E$, каде што ΔE е енергетската разлика меѓу основното и првото побудено вибрациско ниво. Оваа појава се вика *Раманско расејување*, а расеаниот фотон со пониска енергија дава една т.н. *Стоксова линија* (или Раман-Стоксова линија) во спектарот. Треба да се забележи дека ΔE е пропорционална на фреквенцијата на IR вибрацијата на молекулата. Ако оваа вибрација е IR-активна, тогаш ќе даде пик во инфрацрвениот спектар на соодветната фреквенција. Општо, Раман-Стоксовите линии имаат енергии еднакви на $E - \Delta E$, каде што ΔE ги претставува различните можни промени во вибрациската енергија на молекулата. Овој израз може да се претстави како:

$$E - \Delta E = h(\nu - \nu_1) \quad (6.32)$$

каде што ν е фреквенцијата на влезниот фотон, а ν_1 е промената во фреквенцијата како резултат на промената на енергијата ΔE . При расејувањето на влезниот фотон молекулите може да се релаксираат до различни вибрациски нивоа на основната електронска состојба, давајќи притоа неколку линии со енергија $h(\nu - \nu_1)$, $h(\nu - \nu_2)$, $h(\nu - \nu_3)$ и така натаму. Овие линии имаат фреквенции различни од Рејлиевата фреквенција (се вели дека се поместени во однос на Рејлиевата фреквенција). Поместувањата на Раманските линии се целосно независни од брановата должина на изворот зрачење што врши побудување. За една иста

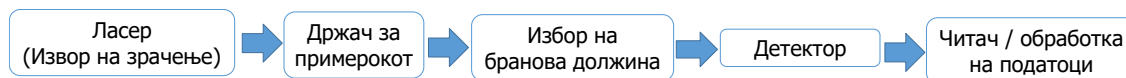
молекула се добиваат исти Рамански спектри, ако се користат, на пример, извори на UV, видливо и блиско IR зрачење.

Помалку вообичаено е молекулата да ја намали вибрациската енергија по интеракцијата со фотонот. Ова може да се случи ако молекулата, пред интеракцијата со фотонот, се наоѓа на побудено, а по релаксирањето се врати на пониско (основно) вибрациско ниво. Во овој случај молекулата му предала дел од својата енергија на расеаниот фотон. Поради тоа, расеаниот фотон ќе има повисока фреквенција (и енергија) од влезниот фотон. Поради слабиот интензитет, линиите со повисока фреквенција, т.н. *Раман-анти-Стоксови* линии се помалку важни од Раман-Стоксовите линии гледано од аналитички аспект. Исклучоци од ова правило се примероци што силно флуоресцираат. Флуоресценцијата интерферира со Раман-Стоксовите линии, но во помал обем со Раман-анти-Стоксовите линии (што во овој случај може да се искористат во аналитички цели).

Раманскиот спектар се добива кога на ординатата ќе се нанесе интензитетот на расеаното зрачење, а на апсцисата фреквенцијата на Раманските поместувања изразена како бранов број (во cm^{-1}).

Инструменти за Раманска спектроскопија

Инструментите за Раманска спектроскопија се составени од: светлосен извор, држач за примерокот или кивета, монохроматор (или интерферометар), детектор и опрема за обработка и приказ на сигналот (Слика 6.19). Зрачењето што се мери во Раманската спектроскопија е или од видливиот или од блиско-инфрацрвениот дел од спектарот. Затоа оптичките делови на спектрофотометарот, прозорците и киветите може да бидат изработени од стакло или од кварц. Особено е важно при мерењето да се отстрани каков било извор на флуоресцентно зрачење, бидејќи тоа дава силни интерференции во снимениот Рамански спектар.



Слика 6.19 Поедноставен дијаграм на Рамански спектрометар

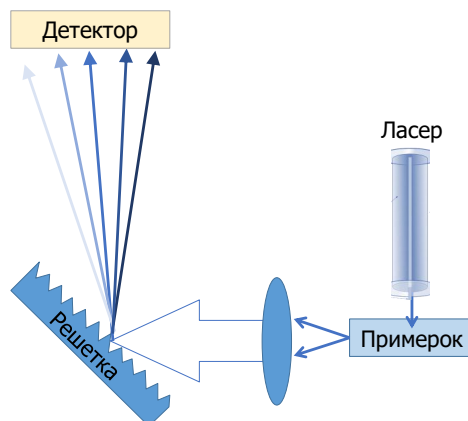
Инструментите за Раманска спектроскопија користат монохроматски светлосни извори со висок интензитет. Денешните инструменти обично користат ласерски светлосни извори, и тоа хелиум/неонски (633 nm) ласери, аргонски (488 nm) и криптонски (531 nm) јонски ласери на видлива светлина. Интензитетот на Раманското расејување е обратно пропорционален од четвртиот степен на побудувачката бранова должина, т.е. $1/\lambda^4$. Во однос на ова, јонските ласери се во предност наспроти хелиум/неонските ласери. Недостаток на јонските ласери е можноста да предизвикаат фотодеградација или флуоресценција при озрачувањето на примерокот за анализа. Ласерите од блиската инфрацрвена област, како неодимиум/итриум алуминиум гарнет (Nd:YAG) со ексцитирачка линија на 1064 nm, се користат за снимање на некои фотоосетливи примероци, бидејќи не предизвикуваат флуоресценција или фотодеградација.

Постојат два типа инструменти за Раманска спектроскопија:

- а) дисперзивни спектрометри
- б) спектрометри на принцип на Фуриева трансформација (FT Raman)

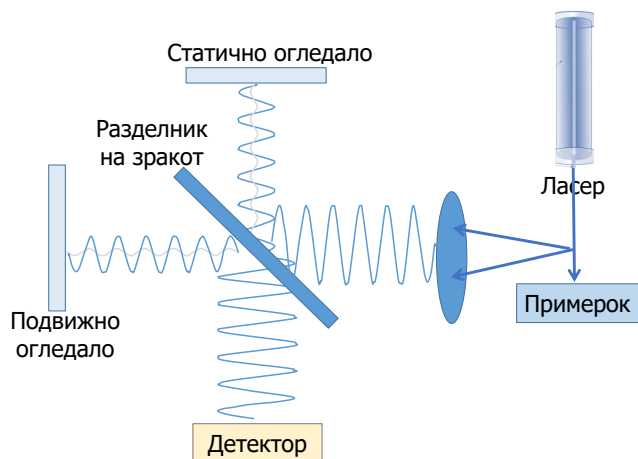
Дисперзивните (традиционални) спектрометри (Слика 6.20) порано користеле монохроматор со две или со три решетки за да го елиминираат интензивното Рејлиево расејување на светлината од примерокот за анализа.

Распоредот на оптичките компоненти во монохроматорот е многу сличен на распоредот во UV/Vis монохроматорите со една решетка. Во поновите инструменти се користат *холографски интерферентни филтри*, наречени Ночови (*Notch*) филтри, што драматично го намалуваат Рејлиевото расејување што стигнува до детекторот. Дисперзивните спектрометри користат ласери од видливиот дел како извори на монохроматска светлина. Како детектори се користат PDA⁵, CID⁶ и CCD⁷ детектори.



Слика 6.20 Шематски приказ на дисперзивен Рамански спектрометар

ФТ Раман-спектрометри (Слика 6.21) обично користат монохроматски ласерски извори од блиската инфрацрвена област, како на пример Nd/YAG ласери. Како и инфрацрвените спектрометри на принцип на Фуриева трансформација (FTIR) и тие содржат Михаелсонов интерферометар. ФТ Раманските спектрометри со извори од блиската IR област користат фотокондуктивни детектори (Ge или InGaAs) што се ладат со течен азот.



Слика 6.21 Шематски приказ на ФТ Рамански спектрометар

ФТ Раманските спектрометри ги имаат предностите на FTIR во однос на дисперзивните спектрометри. Овозможуваат истовремено мерење на повеќе бранови должини, подобрен однос меѓу сигналот и шумот и висока прецизност на брановите должини. Употребата на ласерски извори од блиската IR област им дава дополнителна предност на овие инструменти, поради драстично намалената флуоресценција од примерокот за анализа.

⁵ PDA (photodiode array) - фотоосетлив детектор изграден од серија фотодиоди

⁶ CID (charge injection detector)

⁷ CCD (charge coupled detector)

Примена на Раманската спектроскопија

Раманската спектроскопија се користи за карактеризација на различни материјали, микроскопски анализи, хемиски скрининг на неоргански, органски и органометални соединенија, полимери, биолошки системи, уметнички слики и археолошки предмети. Во однос на инфрацрвените спектри, Раманските спектри содржат помалку ленти, што се и поостри (во нив нема ленти на наттонови или ленти на комбинации на повеќе вибрациски модови). Тоа ѝ овозможува на Раманската спектроскопија да се користи и во квантитативната анализа. Таа се користи за определување на органски загадувачи во вода, неоргански оксианјони и органометални соединенија во раствори, определување на односот на ароматични и на алифатични јаглеводороди во горива, за определување концентрација на активни супстанции и на помошни супстанции (микрористална целулоза) во лекови итн.

Комплементарноста меѓу инфрацрвената и Раманската спектроскопија е искористена за структурна идентификација на различни супстанции. Основното правило што важи во многу ситуации дека вибрација што дава интензивна лента во IR, има слаба лента во Раманскиот спектар и обратно, е искористено за структурно проучување бројни непознати супстанции.

НУКЛЕАРНО-МАГНЕТНА РЕЗОНАНТНА СПЕКТРОСКОПИЈА

Нуклеарно-магнетна резонантна (*Nuclear Magnetic Resonance, NMR*) спектроскопија се заснова на мерењето на апсорпцијата на електромагнетното зрачење во делот на радиофреквенциите од спектарот (4 - 900 MHz). Кај оваа техника, за разлика од *UV/Vis* и *IR* спектроскопијата, во процесот на апсорпција учествуваат јадрата на атомите, а не валентните електрони. За доведување на јадрата во соодветна енергетска состојба, погодна за да настане апсорпција на зрачење, неопходно е молекулата да се постави под дејство на силно магнетно поле.

Теоретските основи на NMR спектроскопијата се поставени од страна на Паули (*W. Pauli*) во 1924 година, кој посочил дека атомското јадро има аголен момент (спин) и магнетен момент. Како последица на постоењето на овие моменти, при нивно воведување во надворешно магнетно поле настанува делење на нивните енергетски нивоа. Две децении подоцна, во 1946 година, два физичара Пурсел (*Purcell*) на Харвард и Блох (*Bloch*) на Стенфорд, работејќи независно еден од друг, експериментално докажале дека атомското јадро може да апсорбира електромагнетно зрачење под дејство на силно магнетно поле што индуцира поделба на енергетските нивоа во атомското јадро. Поголемиот број јадра (вклучително и јадрото на водородот), како и електроните, имаат свое магнетно поле. Ефектот на овие нуклеарни магнетни полиња се премногу слаби за да може да се увидат во услови на силното магнетно поле на Земјата. Меѓутоа, ако се изложат на дејство на дополнително надворешно магнетно поле, јадрата може да заземат специфична ориентација, од која секоја е карактеризирана со соодветна потенцијална енергија. Блох и Пурсел пронашле начин за одредување на многу мала количина на енергија што јадрото ја апсорбира или ја емитува при премин од едно во друго енергетско ниво. За ова откритие, овие два физичари станале добитници на Нобеловата награда за физика во 1952 година.

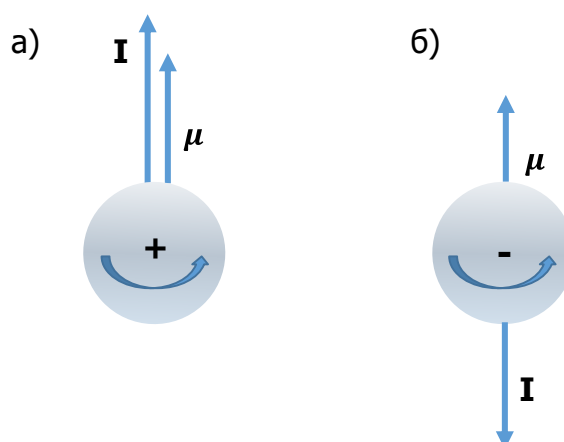
Хемичарите, за кратко време, ја воочиле поврзаноста помеѓу NMR спектрите добиени од јадрото на водородот (^1H NMR) и структурата на соединенијата. Во почетокот на седумдесеттите години од минатиот век ^1H NMR спектроскопијата станала незаменлив метод за структурни определувања. Развојот на електрониката, компјутерските системи и новите магнети со голема хомогеност и стабилност, довело до усовршување на NMR-спектрометрите. Појавата на новата генерација на NMR-спектрометрите т.н. FT-спектрометри (*Fourier* трансформација), како и развојот на силни суперпроводници (криомагнети), овозможило примената на оваа техника да се прошири во повеќе области.

Денес NMR-спектроскопијата е моќна техника што овозможува проучување на структурата и на најкомплексните соединенија. Освен нејзината примена во хемијата и во физиката, NMR-спектроскопијата има големо значење во областа на дијагностичката медицина.

Магнетни особини на јадрото

Магнетните особини на одредено јадро може да се објаснат ако се замисли дека јадрото ротира околу својата замислена оска. Овие јадра имаат аголен момент на ротација P , претставен со *спин квантен број* (spin, I). Кога атомското јадро на некои елементи, како, на пример, водород (^1H), јаглерод (^{13}C) и флуор (^{19}F) ќе се изложи на дејство на надворешно хомогено магнетно поле (B_0) и истовремено ќе се озрачи со електромагнетни бранови од радиофреквентниот (RF) дел на спектарот, доаѓа до т.н. *нуклеарно-магнетна резонанција*. Нуклеарно-магнетна резонанција претставува размена на енергијата помеѓу јадрата и радиофреквентното зрачење, при што еден дел од јадрата апсорбираат, а другиот дел емитуваат зрачење со иста фреквенција. Овој процес се нарекува „магнетна резонанција“ и може да се каже дека јадрата резонираат при соодветна „резонантна фреквенција“. Нуклеарно-магнетната резонанција е ограничена само на јадра што имаат аголен момент (спин). Овие јадра, како и сите наелектризирани честички што се движат, имаат и *магнетен момент* μ (Слика 7.1 а). Слично однесување покажуваат и неспарените електрони кај кои аголниот и магнетниот момент имаат спротивни насоки (Слика 7.1 б). Симболот за магнетно поле во SI системот е B , но во согласност со постарата конвенција сè уште низ литературата може да се стретне и симболот H . Изведена единица за јачина на магнетно поле е tesla (T), што е дефинирана како $1T = 1\text{kg s}^{-2}\text{A}^{-1}$. Друга единица за јачина на магнетно поле што се применувала во минатото е gauss (G). Зависноста помеѓу двете единици е $10^{-4}G = 1T$.

Интеракцијата на неспарениот електрон со радиофреквентното зрачење е позната како електрон спин резонанција (ESR) или електрон парамагнетна резонанција (ERP) и истата претставува посебна област од спектроскопијата.



Слика 7.1 Аголен (I) и магнетен момент (μ) кај: а) атомско јадро, б) неспарен електрон.

Аголниот момент на јадрата е дефиниран со *спин квантен број* (I) што може да има вредности нула, позитивни цели и полуцели вредности ($I = 0, 1/2, 1, 3/2$ итн.). Големината на аголниот момент се добива од следната равенка:

$$I = \frac{h}{2\pi} \cdot \sqrt{I \cdot (I + 1)} \quad (7.1)$$

каде што h претставува Планкова константа ($h = 6,6 \cdot 10^{-34} \text{J} \cdot \text{s}$).

Кај јадрата со спин квантен број $I = 0$ (пример ^{12}C , ^{16}O и ^{32}S), во согласност со дадената равенка, аголниот момент е еднаков на нула и овие јадра немаат магнетен момент ($\mu = 0$). Овие јадра се спин неактивни јадра, не стапуваат во резонанција со радиофреквентното зрачење и не може да бидат детектирани со NMR спектроскопија.

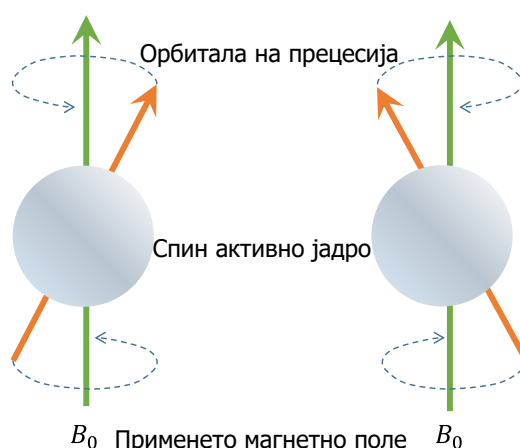
Постоењето аголен, односно магнетен момент е условено од бројот на протони (p) и неутрони (n) во атомското јадро. За одредување на спин квантниот број поставени се следните правила:

1. Ако p и n се парни броеви (пр. за ^{12}C , $p = n = 6$), тогаш $I = 0$ и овие јадра се спин неактивни јадра. Тоа е последица на меѓусебното спарување на спиновите со спротивни насоки на исти видови јадра. На овој начин, со оглед што спротивните спинови меѓусебно се поништуваат, нивната резултанта е еднаква на нула. На сличен начин се поништуваат и векторите на спарените електрони (на пример, кај ковалентна врска, слободен електронски пар и слично).
2. Ако $p + n$ е непарен број, тоа значи еден од овие броеви е парен, а другиот е непарен (пр. за ^{13}C , $p = 6$, $n = 7$), тогаш I има вредности на полуцели броеви ($1/2, 3/2, 5/2, \dots$). Овие јадра се спин активни јадра и стапуваат во резонанција.
3. Ако p и n се непарни броеви (пр. за ^{14}N , $p = n = 7$), тогаш I има вредности на цели броеви ($1, 2, 3, \dots$) и овие јадра, исто така, се спин активни јадра и можат да резонираат.

За објаснување на NMR феноменот најчесто се користи добро проучениот механички модел на жироскоп. Како резултат на постоењето на аголен момент, односно ротација околу сопствената оска и силата на гравитацијата, жироскопот се движи околу правецот на полето на гравитацијата, опишувајќи конусна површина. Ова движење се нарекува **прецесија**. Слични движења можат да се очекуваат и од наелектризираните честички: спин-активни атомски јадра и неспарени електрони изложени на дејство на надворешно хомогено магнетно поле (B_0) (Слика 7.2). Брзината на прецесиското движење, односно нејзината аголна фреквенција (ω) зависи од внатрешните особини на јадрото (I и μ) и од јачината на надворешното магнетно поле B_0 . Ова се изразува со равенката на Лармор (*Larmor*):

$$\omega = \gamma B_0 \quad (7.2)$$

каде што ω е аголната прецесиска фреквенција ($\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$). Аголната фреквенција е поврзана со фреквенцијата ν (s^{-1}) преку изразот $\omega = 2 \cdot \pi \cdot \nu$.



Слика 7.2 Прецесиско движење на спин-активно јадро под дејство на магнетно поле B_0

Константата на пропорционалност γ во равенката се нарекува **жиромагнетен фактор** ($\text{radT}^{-1}\text{s}^{-1}$) и претставува количник од магнетниот и од аголниот момент на разгледуваното јадро (μ/I). Жироманетниот фактор е физичка величина што е карактеристична за секое јадро. Така на пример, за протон (^1H)

жиромагнетниот фактор изнесува $2,675 \times 10^8 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Под дејство на надворешно магнетно поле $B_0 = 2,35 \text{ T}$, на основа на Ларморовата равенка, фреквенцијата на прецесијата на протонот (ν_H) изнесува 100 MHz [$1 \text{ MHz} = 10^6 \text{ Hz (s}^{-1})$]. При исти услови ($B_0 = 2,35 \text{ T}$), за јадрото на ^{13}C чијшто жиромагнетен фактор е четири пати помал од γ на ^1H , фреквенцијата на прецесијата е, исто така, четири пати помала ($\nu_C = 25,1 \text{ MHz}$). Прецесиската фреквенција на спин-активните јадра се наоѓа во областа на радиофреквентните бранови.

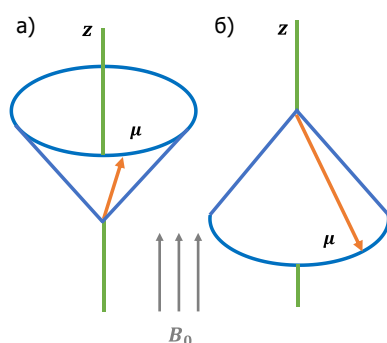
Дозволените ориентации на спиновите на атомските јадра во магнетно поле и нивна интеракција со радиофреквентното зрачење

Векторите на магнетниот момент μ (на електрон или на јадро) надвор од магнетно поле се ориентирани во сите правци на произволен начин.

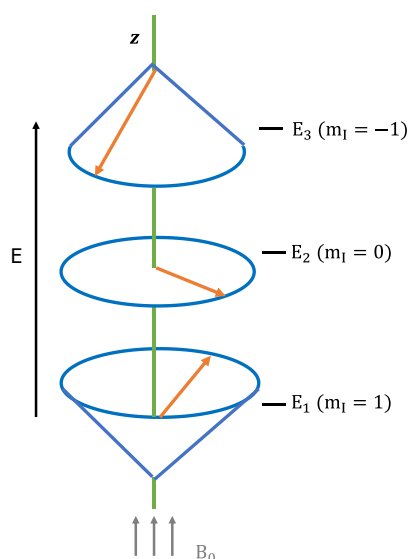
Примената на надворешно статично магнетно поле B_0 ги принудува дотогаш хаотично ориентираните магнетни моменти на јадрото, на кои постојно им се менува ориентацијата, да заземат една од дозволените ориентации спрема векторот B_0 . Според квантно-механичките правила, бројот на дозволените ориентации (n) е одреден со спин-квантниот број (I):

$$n = 2I + 1 \quad (7.3)$$

Така, на пример, за јадра кај кои $I = 1/2$; (^1H , ^{13}C , ^{19}F и ^{31}P) постојат две дозволените спински состојби ($n = 2$) (Слика 7.3), а кај јадра кај кои $I = 1$ (^{14}N), дозволените се три спински состојби (Слика 7.4).



Слика 7.3 Магнетниот момент на јадрото со $I = 1/2$, под дејство на B_0 , може да заземе две ориентации: а) паралелна ($m_I = 1/2$) и б) антипаралелна ориентација ($m_I = -1/2$).

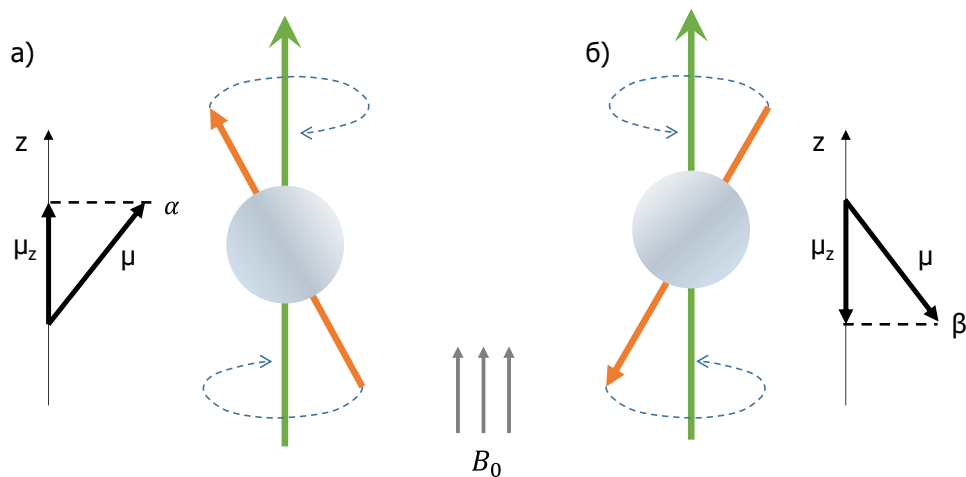


Слика 7.4 Дозволените ориентации на магнетните моменти на јадро со $I = 1$ (пример ^2H и ^{14}N) и распоред на соодветните енергетски нивоа (во услови $B_0 \neq 0$)

Секоја дозволена спинска состојба е карактеризирана со магнетен квантен број m_I , што може да ги има следниве вредности: $I, I-1, I-2, \dots, 0, 2-I, 1-I, -I$ (за цели броеви на I) и $I, I-1, I-2, \dots, 1/2, -1/2, \dots, 2-I, 1-I, -I$ (за полуцели вредности на I).

Во согласност со ова, прецесијата на магнетниот момент на јадрото (предвидена врз основа на аналогијата со механичкиот модел на жирокопот) може да се одвива само на ограничен број начини што ги допушта квантната теорија. Во наједноставниот случај, кога $I = 1/2$, постојат само две можности за прецесија (Слика 7.3).

Во т.н. паралелна (или α) ориентација ($m_I = 1/2$), z -компонентата на векторот на магнетниот момент (μ_z) има иста насока како и B_0 , а во антипаралелната (или β) ориентација, векторот μ_z е спротивно ориентиран во однос на векторот B_0 . Паралелната ориентација го претставува пониското енергетско ниво, додека антипаралелната ориентација го претставува повисокото ниво (Слика 7.5).



Слика 7.5 Приказ на ориентација на магнетен момент на јадро: а) паралелна ориентација (пониско енергетско ниво), б) антипаралелна ориентација (повисоко енергетско ниво)

Според правилата на квантната механика, премини помеѓу α и β енергетските нивоа можат да се индуцираат под влијание на електромагнетно зрачење со фреквенција ν , под следните услови:

$$\Delta E = E_i^\alpha - E_i^\beta = h\nu \quad (7.4)$$

каде што E_i^α и E_i^β претставуваат соодветни енергии на интеракција на јадрото (со $I = 1/2$) со применетото поле B_0 , односно отстапување од просечната енергија (E) што е еднаква за сите јадра кога $B_0 = 0$ (Слика 7.7). Енергијата на интеракција е одредена од величините за μ_z и B_0 , на следниот начин:

$$E_i = -\mu_z B_0 \quad (7.5)$$

Вредноста на μ_z зависи од спинската состојба, односно од соодветниот магнетен квантен број m_I :

$$\mu_z = -\gamma m_I \frac{h}{2\pi} \quad (7.6)$$

За јадра со $I = 1/2$, магнетниот број може да има вредности $m_I = 1/2$ (α) и $m_I = -1/2$ (β). На основа на равенките 7.5 и 7.6, се добиваат следните вредности за енергија на интеракција на α и β - состојбата:

$$E_i^\alpha = -\frac{1}{2} \gamma \frac{h}{2\pi} B_0 \quad (7.7)$$

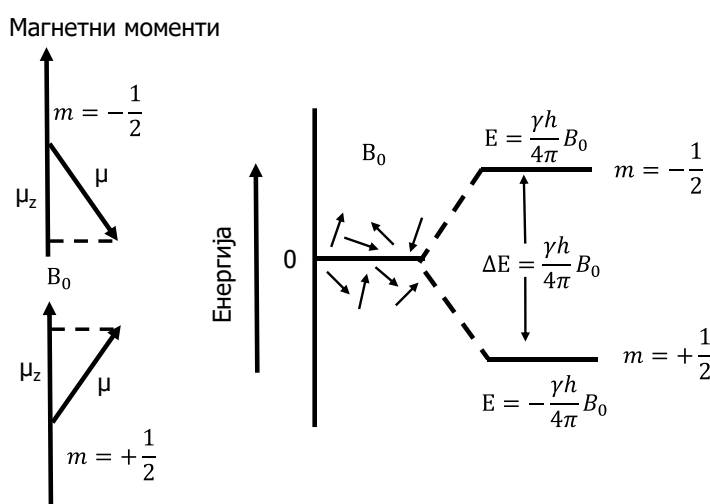
$$E_i^\beta = \frac{1}{2} \gamma \frac{h}{2\pi} B_0 \quad (7.8)$$

Нивната разлика, што претставува растојание помеѓу α и β - енергетското ниво, изнесува:

$$\Delta E = E_i^\beta - E_i^\alpha = \gamma \frac{h}{2\pi} B_0 \quad (7.9)$$

Оваа енергетска разлика, со ред величина од неколку миликалории, е многу мала во однос на термалната енергија на молекулата на собна температура ($RT \approx 600 \text{ cal/mol}$). Од тие причини NMR-спектроскопијата е недеструктивен метод.

Графичкиот приказ на зависноста опишана со претходните три равенки е претставен на Слика 7.6. Во отсуство на магнетно поле ($B_0 = 0$), магнетните моменти на сите јадра, како резултат на термално движење, постојано го менуваат својот правец и во секој момент се хаотично насочени и имаат иста просечна енергија (E). Примената на магнетно поле B_0 доведува до поларизација на магнетните моменти на јадрата и тие се распоредуваат помеѓу дозволените спински состојби. Кога $I = 1/2$, приближно една половина зазема паралелна ориентација ($m_I = 1/2$), додека другата половина зазема антипаралелна ориентација ($m_I = -1/2$). Со зголемување на јачината на магнетното поле B_0 , пропорционално се зголемуваат и енергиите на двете нивоа (E_i^α и E_i^β), како и нивната разлика (ΔE).



Слика 7.6 Магнетни моменти и енергетски нивоа на јадро со спин-квантен број $\pm 1/2$

Ако во равенката 7.9 ΔE се замени со изразот $h\nu$, се добива израз за фреквенцијата на електромагнетното зрачење што може да индуцира премин помеѓу α и β - енергетската состојба:

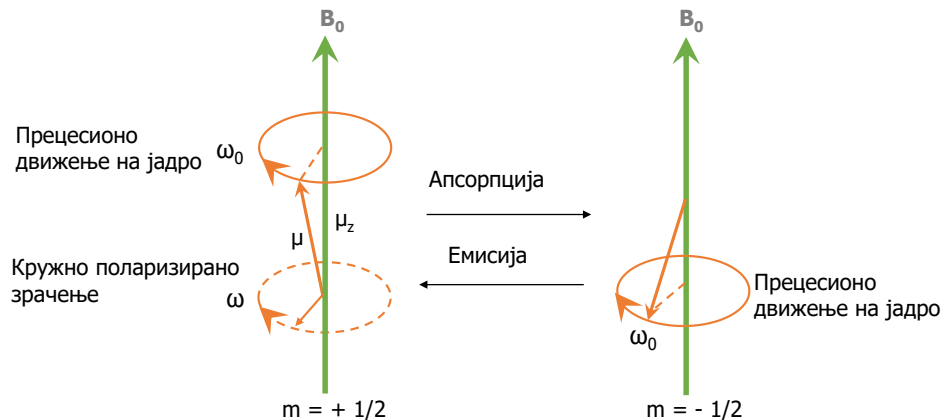
$$\nu = \gamma \frac{h}{2\pi} B_0 \quad (7.10)$$

Ако во оваа равенка, фреквенцијата се замени со изразот за аголна фреквенција $\omega = 2\pi\nu$, се добива равенка идентична на равенката на Лармор (7.2).

Потенцијалната енергија на јадрото што опишува прецесиско движење може да се претстави со равенката:

$$E = -\mu_z B_0 = -\mu_z B_0 \cos\theta \quad (7.11)$$

каде што θ е аголот помеѓу векторот на магнетното поле и оската на прецесијата на јадрото. μ е магнетниот момент на јадрото, а μ_z е компонентна на μ во насока на магнетното поле. Апсорпцијата на енергија од радиофреквентно зрачење доведува до промена на аголот на прецесија θ на јадрото. Така, на пример, кај јадро со спин-квантен број $1/2$, апсорпцијата на зрачење доведува до промена на ориентацијата на магнетниот момент на јадрото, од насока во правец на магнетното поле (пред апсорпција на зрачење) во насока спротивна на насоката на полето (по апсорпција) (Слика 7.7). За да настане промена на ориентацијата на магнетниот момент на јадрото, мора да постои магнетно поле што ќе дејствува под одреден агол во однос на статичното магнетно поле B_0 и што ќе осцилира во фаза со прецесиското движење на јадрото.



Слика 7.7 Модел на апсорпција на зрачење од страна на јадро што прецесира

Магнетниот момент на кружно поларизирано зрачење (ротирачко магнетно поле) со соодветна фреквенција, односно магнетната компонента од ова зрачење ги има потребните наведени својства. Треба да се нагласи дека за разлика од оптичката спектроскопија каде што електричното поле на електромагнетното зрачење стапува во интеракција со честичките што апсорбираат (валентните електрони); во NMR-спектроскопијата магнетното поле на зрачењето доведува до побудување на јадрата. Ако фреквенцијата на ротација на магнетниот вектор на зрачењето е иста со фреквенцијата на прецесија на јадрата, настанува апсорпција на зрачење и промена на ориентацијата на магнетниот момент на јадрото. Поинаку кажано, резонанција настанува кога фреквенцијата на прецесија на магнетниот момент на јадрото ($\omega = \gamma B_0$) е еднаква на фреквенцијата на ротирачкото магнетно поле B_1 , под услов ротацијата да се одвива во рамнина нормална на правецот на статичното магнетно поле B_0 и во иста насока како и прецесијата.

Кружно поларизирано зрачење (ротирачко магнетно поле, B_1) со соодветна фреквенција може да се создаде со примена на радиофреквентен (RF) осцилатор. Во NMR инструментите, како извор на зрачење, се користи намотка на радиофреквентен осцилатор што продуцира кружно поларизирано зрачење. Електромагнетното зрачење на RF осцилаторот се насочува под агол од 90° во однос на статичното магнетно поле B_0 . Вообичаено B_0 се насочува во правец на z-оската на координатниот систем, а B_1 се насочува во xy-рамнината. Апсорпција настанува само на магнетната компонента на побудувачкото зрачење што ротира во насока на прецесиското движење на јадрото.

Пренос на енергијата со резонанција може да се одвива во две насоки, со иста веројатност. Едната е апсорпција на енергија од страна на јадрото, а другата е емисија. И апсорпцијата и емисијата на енергија доведуваат до промена на ориентацијата на магнетниот момент на јадрото во однос на магнетното поле B_0 .

Постои директна поврзаност помеѓу спин-активното јадро (преку γ) и фреквенцијата ν на радиофреквентното зрачење кое стапува во резонанција со јадрото. Така, на пример, (при $B_0 = const.$) односот на фреквенцијата на прецесија (резонанција) на протонот и јаглеродот-13 изнесува: $\nu(^1\text{H}); \nu(^{13}\text{C}) = \gamma(^1\text{H}); \gamma(^{13}\text{C}) = 4:1$. Во Табела 7.1 се прикажани жиромагнетните фактори и фреквенциите на резонанција на некои поважни спин-активни јадра.

Табела 7.1 Карактеристики на одредени значајни спин-активни јадра (вредностите за ν се однесуваат за $B_0 = 2,35T$)

Јадро	Спин-квантен број	Застапеност (%)	$\gamma \times 10^{-7}$ ($radT^{-1}s^{-1}$)	ν (MHz)	Осетливост на детекцијата во однос на протон (1,00)
^1H	1/2	99,98	26,75	100	1,00
^{13}C	1/2	1,1	6,73	25,1	$1,76 \times 10^{-4}$
^{14}N	1	99,6	1,9	7,2	$1,01 \times 10^{-4}$
^{19}F	1/2	100	25,2	94,1	0,83
^{31}P	1/2	100	10,8	40,5	$6,63 \times 10^{-2}$
^{59}Co	7/2	100	6,3	23,6	0,28

Кај јадра со спин квантен број поголем од 1/2, ситуацијата е посложена бидејќи постојат повеќе дозволени спин-ориентации (Табела 7.2). Така, на пример, кај јадрата со $I = 1$ (^2H и ^{14}N) се дозволени три ориентации, што се карактеризирани со следните магнетни квантни броеви: 1, 0 и -1 (Слика 7.5). Во Табела 7.2 даден е преглед на спин-квантните броеви (I) и на магнетните броеви (m_I) на некои поважни атомски јадра.

Табела 7.2 Спин-квантните броеви (I) и магнетните квантни броеви (m_I) на некои поважни атомски јадра ($B_0 = 2,35T$)

Спин-квантен број (I)	Атомско јадро	Број на дозволени ориентации на спинот ($2I + 1$)	Магнетен квантен број (m_I)
0	$^4\text{He}, ^{12}\text{C}, ^{16}\text{O}$	0	0
1/2	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$	2	1/2, - 1/2
1	$^2\text{H}, ^{14}\text{N}$	3	1, 0, -1
3/2	$^{11}\text{B}, ^{23}\text{Na}, ^{35}\text{Cl}, ^{37}\text{Cl}$	4	3/2, 1/2, - 1/2, - 3/2
2	$^8\text{Li}^{\text{R}}, ^{20}\text{F}^{\text{R}}$	5	2, 1, 0, -1, -2
5/2	$^{17}\text{O}, ^{27}\text{Al}$	6	5/2, 3/2, 1/2, - 1/2, - 3/2, -5/2

^R - радиоактивен изотоп

Термална распределба на спиновите во енергетските нивоа

Под дејство на надворешно магнетно поле спиновите се приближно еднакво распоредени низ енергетските нивоа. Меѓутоа постои мало отстапување од оваа статистичка распределба. Отстапувањето настанува како последица на различната содржина на енергија и се покорува на Болцмановиот (*Boltzmann*) закон. Според овој закон, најголема застапеност (популација) има во најниското енергетско ниво, па одејќи кон повисоките нивоа, популацијата се намалува. Кај наједноставниот случај ($I = 1/2$) односот помеѓу бројот на јадра со паралелен (N_α) и антипаралелен (N_β) спин (во услови на термална рамнотежа) е одреден од разликата на енергетските нивоа (ΔE):

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{-\Delta E/kT} \approx 1 + \frac{\Delta E}{kT} \quad (7.12)$$

$$\Delta E = E_i^\beta - E_i^\alpha = \gamma \frac{h}{2\pi} B_0 \quad (7.13)$$

каде што k е Болцмановата константа ($1,38 \times 10^{-23} \text{JK}^{-1}$), T е температура изразена во $^\circ\text{K}$. Така на пример, за протон што се наоѓа под дејство во магнетно поле $B_0 = 2,35T$, $\Delta E = 6,7 \times 10^{-26} \text{J}^{-1}$. Кога наведените вредности на константите ќе се внесат во горната равенка (за $T = 290^\circ\text{K}$), се добива следната вредност:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = 1 + \frac{6,7 \cdot 10^{-26} \text{J}^{-1}}{(1,38 \cdot 10^{-23} \text{JK}^{-1}) \cdot 290 \text{K}} = 1,000017$$

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = \frac{1000017}{1000000} \quad (7.14)$$

Добиената вредност покажува дека бројот на јадра со паралелни спинови што е во вишок е многу мал. На секој милион протони со антипаралелни спинови, постојат 1000017 протони со паралелни спинови, односно само 17 протони со паралелен спин се во вишок. Со оглед што веројатноста за апсорпција и емисија на RF-зрачење е еднаква, како резултат на овој мал вишок на јадра во ниското енергетско ниво (α) при услови на резонанција преовладува апсорпцијата на зрачење.

Сигналот што се детектира во NMR-спектроскопијата потекнува од овој мал вишок на јадра што се наоѓаат во ниското енергетско ниво. Тоа доведува до многу мала осетливост на техниката. Очигледно е дека, врз основа на Болцмановата равенка, со зголемување на вредноста за ΔE , се зголемува и вишокот на јадра што се наоѓаат во ниското енергетско ниво, со што се зголемува и осетливоста на техниката. Во експериментални услови, тоа се постигнува со примена на појако магнетно поле. Со зголемување на B_0 , се зголемува и разликата во енергетските нивоа (Слика 7.6). Ограничувачки фактор е што стабилно и хомогено магнетно поле тешко се одржува, особено при високи вредности за B_0 . Од тие причини, најголемата јачина на магнетното поле кај комерцијално достапните инструменти изнесува $14,1T$ (што соодветствува на фреквенција од 600MHz за ^1H). Кај ^{13}C , вредноста за ΔE е приближно четири пати пониска од соодветната вредност на протоните, па и вредноста на вишокот на јадра што се наоѓаат во ниското енергетско ниво е помала за приближно ист фактор.

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = 1 + \frac{1,7 \cdot 10^{-26} \text{J}^{-1}}{(1,38 \cdot 10^{-23} \text{JK}^{-1}) \cdot 290 \text{K}} = 1,000004$$

Нуклеарна релаксација

Малиот број јадра во вишок во ниското енергетско ниво може да апсорбираат одредено радиофреквентно зрачење, при што се подигнуваат на повисоко енергетско ниво. Ако се регистрира оваа апсорпција на зрачење, се добива NMR спектар. Се наметнува прашањето: На кој начин овие јадра можат да се вратат во ниското енергетско ниво? Кога јадрата не би имале можност да се вратат во ниското енергетско ниво, тогаш апсорпцијата на зрачење би престанала во оној момент кога сите јадра би преминале во повисокото енергетско ниво. Во тој случај NMR сигналот би бил многу краток и не би можел да се регистрира. Ова прашање води кон поимот нуклеарна релаксација, односно начинот преку кој побудените јадра може да се релаксираат и да се спуштат во пониското енергетско ниво.

Јадрото што апсорбирало одредено радиофреквентно зрачење се наоѓа во побудена состојба и може да се врати во првобитната состојба преку емисија на зрачење. Оваа емисија на зрачење може да биде спонтана или стимулирана под

дејство на електромагнетно поле. Спонтаната емисија на зрачење во радио-фреквентната област практично не се случува, односно веројатноста за нејзиното одвивање е исклучително мала.

Стимулираната емисија е возможна. Меѓутоа веројатноста да настане емисија на енергија, под дејство на електромагнетно зрачење, е идентична со веројатноста да дојде до апсорпција на енергија од истото електромагнетно поле. Со други зборови, ако популацијата во ниското и повисокото енергетско ниво е иста, апсорпцијата од страна на јадрата што се наоѓаат во ниското ниво е во рамнотежа со индуцираната емисија од страна на јадрата што се наоѓаат во повисокото енергетско ниво. Овој спински систем каде што бројот на јадра во двете состојби е идентичен се нарекува **заситен (сатуриран)** и доведува до намалување на NMR сигналот до нула. Доколку не би постоел механизам што ќе одржува поголема популација во ниското енергетско ниво, NMR сигналот веднаш би паднал на нула. За да се избегне состојба на сатурација на системот, брзината на релаксација на ексцитираните јадра треба да биде поголема од брзината со која овие јадра апсорбираат радиофреквентно зрачење. За да се намали сатурацијата и за да се обезбеди NMR сигнал што може да се детектира, процесот на релаксација треба да се одвива многу брзо, односно времетраењето на ексцитираната состојба треба да биде многу кратко. Друг фактор е обратно пропорционалната зависност помеѓу времетраењето на ексцитираната состојба и ширината на спектралниот (апсорпциски) пик. Имено, кога брзината на релаксација е голема, односно времетраењето на ексцитираната состојба е кратко, настанува ширење на апсорпциските пикови. Ширењето на сигналот ја намалува можноста од мерења со висока резолуција. Овие два фактора со спротивно дејство доведуваат оптималното полувреме на ексцитираните јадра да се движи во опсег од 0,1s до 10s.

Стимулираната емисија се одвива преку два механизма: *спин-решетка релаксација* (или *лонгитудинална релаксација*, T_1) и *спин-спин релаксација* (или *трансверзална релаксација*, T_2).

Спин-решетка (лонгитудинална) релаксација е механизам со кој побудените јадра ја предаваат својата енергија на непосредната околина. Под околина се подразбира сè она што го опкружува разгледуваното јадро (други спин-активни јадра и електрони од иста или од некоја друга молекула, на пример, растворувач или кристална решетка). Оваа енергија се задржува во системот, но се појавува како вишок на вибрациска или на ротациска енергија што е распоредена низ целата решетка. Овој вид релаксација е карактеризиран со време T_1 што се дефинира како време што е потребно системот да се врати од побудена во првобитна состојба. Оттука, времето T_1 е мерка за ефикасноста на процесот на релаксација, односно мерка за просечното време што јадрата го поминуваат во побудена состојба. Кај ефикасните процеси на релаксација, времето T_1 е кратко и тоа во NMR спектарот се манифестира како проширување на апсорпцискиот пик.

Лонгитудиналната релаксација е кинетички процес од прв ред. Релаксациското време T_1 , зависи од жиромагнетниот фактор на јадрата, како и од подвижноста во кристалната решетка. Кај кристалните цврсти материји и вискозни течности, подвижноста е мала и T_1 е големо. Со зголемување на подвижноста (на пример, при покачена температура), вибрациските и ротациските фреквенции се зголемуваат, а T_1 станува пократко.

Спин-спин (трансверзална) релаксација е процес со кој едно побудено јадро ја разменува енергијата со друго побудено јадро. Оваа размена не ја менува вкупната енергија на спинскиот систем бидејќи опфаќа размена на енергија помеѓу јадра од ист вид што се наоѓаат во различни спински состојби. Така, на пример, (за $I = 1/2$), α -спиновите преземаат квант на енергија од β -спиновите и преминуваат

во β - состојба, додека β - овите преминуваат во пониската α - состојба. Оваа размена доведува до фазно поместување на прецесиското движење на спиновите, со што се губи фазната усогласеност (кохеренција) на нивните прецесиски движења што е воспоставена со RF-пулс. Тоа доведува до губење на трансферзалната магнетизација. Спин-спин размената нема влијание врз односот на популацијата на поединечните енергетски нивоа, но го ограничува просечното време што одредено јадро го поминува во одредено енергетско ниво. Спин-спин времето на релаксација се означува со T_2 и има влијание на ширината на NMR-апсорпцискиот пик. Вредностите за времето T_2 се генерално мали, особено за кристални цврсти супстанции и вискозни течности ($10^{-4}s$). Времето T_2 е пократко од времето T_1 , и само во мал број случаи можат да бидат еднакви ($T_1 \geq T_2$).

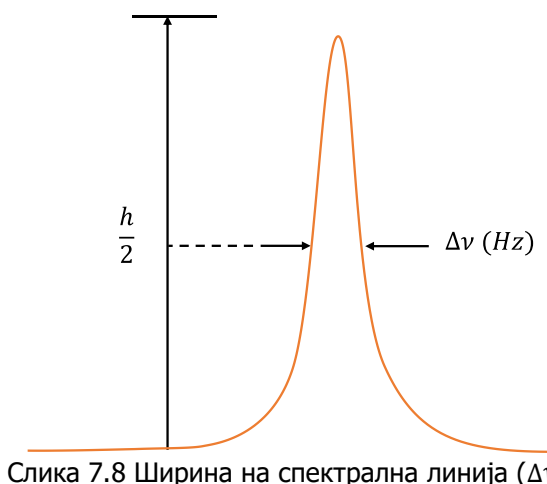
Ширина на спектрална линија

Една од најважните особини на спектралната линија е ширината на спектралниот пик (сигнал) ($\Delta\nu$) што се мери на полувисина на пикот (Слика 7.8). Ширината зависи од моќта на разложување на NMR-спектрометарот и пожелно е да биде што помала. Ширината на пикот не може да биде помала од т.н. *природна ширина*, што произлегува од Хајзенберговиот принцип на неодреденост:

$$\Delta E \cdot \tau \approx \frac{h}{2\pi} = 10^{-34} J \quad (7.15)$$

каде што E претставува неодреденост во размена на енергијата, τ е просечното време на престој на јадрата во дозволените спински состојби.

Според Хајзенберговиот принцип на неодреденост, постои обратно пропорционална зависност помеѓу ширината на спектралната линија и времето што системот го поминува во побудена состојба. Од горната равенка се гледа дека со зголемување на τ , се намалува ΔE . Со оглед што $\Delta E = h\Delta\nu$, со зголемување на τ , ширината на спектралната линија се намалува (се намалува $\Delta\nu$).



Слика 7.8 Ширина на спектрална линија ($\Delta\nu$)

Во NMR-спектроскопијата процесите на релаксација (спин-решетка и спин-спин релаксација), преку нивното влијанието врз τ , имаат влијание на ширината на спектралната линија. Кога времињата на релаксација (T_1 и T_2) се пократки, тогаш ширината на спектралната линија е поголема. Кај јадра со $I = 1/2$ што се наоѓаат во невискозни раствори, релаксациските времиња T_1 и T_2 се приближно еднакви и релативно долги и при овие услови ширината на спектралната линија е мала. Кај протони, растворени во невискозни растворувачи, природната ширина на спектралната линија е помала од 0,1 Hz.

Кај цврсти супстанции и вискозни течности времето T_1 е многу долго (ред на величина од неколку минути или часа), додека времето T_2 е многу кратко ($\approx 10^{-5} s$). Причина за краткото T_2 време е што спин-активните јадра што се наоѓаат блиску во просторот и меѓу коишто настанува размена на енергија (спин-спин релаксација), релативно бавно ја менуваат меѓусебната положба. Во вакви случаи, ширината на пикот што е одредена само од краткото време T_2 , е многу голема. Ова е основната причина што NMR спектрите добиени од цврсти супстанции и вискозни течности се практично неупотребливи. Кај невискозни течности и разблажени раствори времињата на релаксација се релативно долги, па пиковите се релативно тесни.

Постојат и други причини, освен спин-спин релаксацијата, што доведуваат до проширување на NMR-спектралните линии. Така, на пример, нехомогеноста на магнетното поле доведува до губење на трансферзалната магнетизација, што резултира со ширење на спектралните линии. Јадрата во различни делови на примерокот чувствуваат различни магнетни полиња, што доведува до разлики во нивните прецесиски фреквенции и до побрзо губење на фазната усогласеност. Во стандардните NMR-спектри, спектралните линии се секогаш пошироки од природната ширина на линијата, што настанува како резултат на нехомогеноста на магнетното поле на примерокот. Од тие причини, во реални случаи, наместо T_2 , важи константата T_2^* ($< T_2$) во која е вклучено и влијанието на нехомогеното магнетно поле. Имајќи го ова предвид, како и Хајзенберговиот принцип на неодреденост, ширината на спектралната линија на полувисина може да се пресмета според следната равенка:

$$\Delta\nu = 1/\pi T_2^* \quad (7.16)$$

За атомски јадра со $I = 1$ ($^2H, ^{14}N, ^{35}Cl$ итн.) ширината на NMR линијата е одредена од нивниот *квадриполен електричен момент*, што значително го скратува времето на лонгитудинална реласација T_1 . Од тие причини, спектралните линии на овие јадра се широки.

Хемиско поместување

Примената на NMR спектроскопијата за одредување на структурата се темели на поврзаноста на фреквенцијата на прецесија (резонанција) на разгледуваното јадро (ν) со јачината на ефективното магнетно поле што молекулата го чувствува (B_{ef}). Кај хипотетички „соголено“ јадро (без електронска обвивка и сè друго што ја сочинува неговата околина), ефективното магнетно поле е еднакво на применетото поле ($B_{ef} = B_0$) и за неговата прецесиска фреквенција важи претходно наведената равенка:

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (7.17)$$

Меѓутоа, секое јадро во молекулата е непосредно опкружено со електронски облак, а во негова близина се наоѓаат електронските облаци од иста или од друга молекула. Сите овие електрони, кога ќе се најдат под дејство на полето B_0 , формираат сопствени локални магнетни полиња (B_i). Овие локални полиња стапуваат во интеракција со применетото поле B_0 , при што можат да доведат до зголемување или до намалување на ефективното магнетно поле B_{ef} (Слика 7.9). Овие локални полиња се значително послаби (околу милион пати) во однос на полето B_0 . Нивната јачина е претставена со равенката:

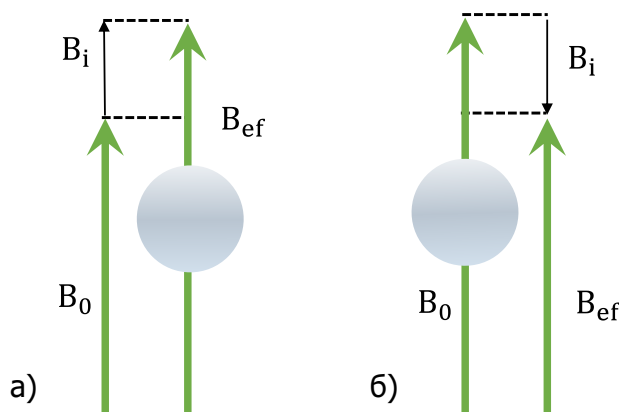
$$B_i = \sigma B_0 \quad (7.18)$$

Константата на пропорционалност σ се нарекува **константа на заштита** (*shielding constant, screening constant*) и зависи од низа структурни и геометриски фактори. Константата на заштита на протонот зависи од електронската густина околу него, како и од стереохемијата на другите групи во молекулата.

Ефективното магнетно поле што го чувствува разгледуваното јадро се добива на следниот начин:

$$B_{ef} = B_0 - B_i = B_0 - \sigma B_0 \quad (7.19)$$

Кога $\sigma > 0$, настанува намалување на ефективното магнетно поле околу јадрото (**дијамагнетен ефект**), а кога $\sigma < 0$, ефективното магнетно поле околу јадрото се зголемува (**парамагнетен ефект**) (Слика 7.9).



Слика 7.9 Ефективното магнетно поле околу разгледуваното јадро под дејство на околината: а) зголемено и б) намалено

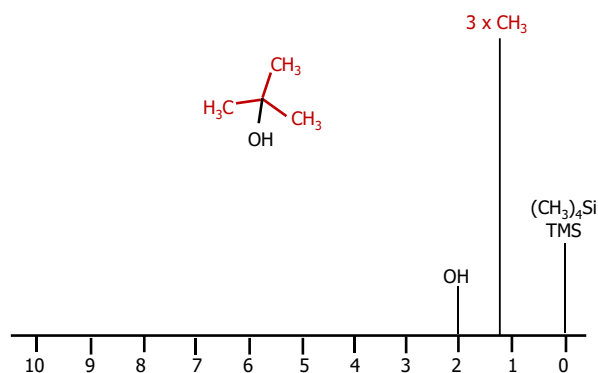
Фреквенцијата на прецесија на јадрата што се наоѓаат во некоја молекула се добива според следната равенка:

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 (1 - \sigma) \quad (7.20)$$

Јадрата со иста електронска обвивка имаат иста вредност за σ , при што јабуваат резонанција на иста фреквенција. Овие јадра се нарекуваат **изохрони јадра**. Јадрата од ист вид (пр. протони), но во различна структурна и стереохемиска околина, имаат различна вредност за константата на заштита и прецесираат со различна фреквенција. Овие јадра се нарекуваат **анизохрони јадра** и во спектарот ќе дадат толку резонантни линии колку што има различни вредности за σ .

Влијанието на околината врз константата на заштита на еден протон, а со тоа и на неговата фреквенција на прецесија, е прикажан преку примерот на ^1H NMR спектар на t-бутанол $[(\text{CH}_3)_3\text{COH}]$ (Слика 7.10). Ова соединение има два вида (групи) на протони и дава два сигнала (пика). Едната група ја сочинуваат девет хемиски еквивалентни (изохрони) протони што потекнуваат од трите CH_3 -групи и имаат иста вредност за σ . Втората група е претставена преку хидроксилниот протон. Атомот на кислородот има поголема електронегативност од атомот на јаглеродот, што доведува до поголема електронската густина кај метил-протонот во споредба со хидроксилниот протон. Со други зборови, хидроксилниот протон е помалку заштитен (има помала вредност за σ) и има поголема прецесиска фреквенција во споредба со метил-протоните. Како што може да се види од ^1H NMR спектарот на t-бутанол, ОН-сигналот (сигналот добиен од хидроксилниот протон) се наоѓа на повисока фреквенција ($\delta = 2,01\text{ppm}$) во споредба со сигналот што го даваат метил-протоните ($\delta = 1,262\text{ppm}$). Оттука произлегува дека за да се доведат различни видови протони во резонанција при константна фреквенција, потребно е

да се примени различна јачина на магнетното поле B_0 . Третиот сигнал, на самиот почеток на спектарот ($\delta = 0 \text{ ppm}$), потекнува од тетраметилсилан (TMS), соединение што се користи како внатрешен стандард.



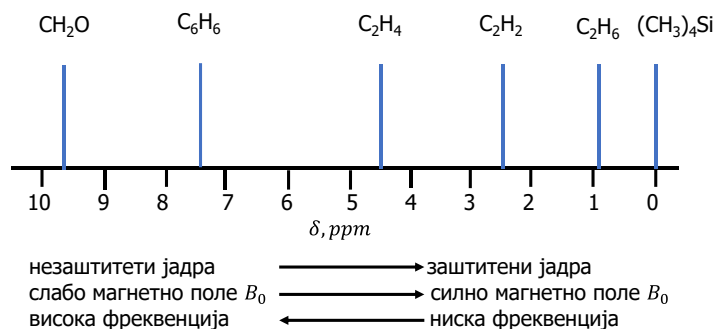
Слика 7.10 ^1H NMR-спектар на t-бутанол

Промената на положбата на резонантниот пик, што настанува како последица на хемиската структура на молекулата (влијание на структурната околина врз константата на заштита, а преку неа и на прецесиската фреквенција) се нарекува **хемиско поместување**. Хемиското поместување е дефинирано како разлика помеѓу положбата на резонантниот пик на дадениот протон и резонантниот пик на стандардно соединение. Најчесто користено стандардно соединение е тетраметилсилан ($(\text{CH}_3)_4\text{Si}$). TMS има симетрична структура, содржи 12 хемиски еквивалентни (изохрони) протони, поради што дава само еден остар сигнал на фреквенција пониска од резонантните фреквенции што се среќаваат во органските соединенија. Сигналот на TMS се јавува при јачина на магнетното поле што е поголема од сите други органски соединенија (односно, протони во нив). Други предности на TMS како внатрешен стандард се: лесна испарливост ($T_b = 27^\circ\text{C}$), хемиска инертност, едноставно се отстранува од NMR растворите и растворлив е во голем број органски растворувачи. Положбата на TMS сигналот се зема како нула на NMR скалата. TMS се додава во секој примерок како внатрешен стандард и неговиот сигнал се јавува во секој спектар на крајната десна страна, односно при максимална вредност на магнетното поле (Слика 7.11). Одејќи од десно кон лево во спектарот, вредностите на магнетното поле се намалуваат. Растојанието на поединечниот резонантен пик во NMR-спектарот до пикот на TMS претставува хемиско поместување за дадениот вид на протон/протони.

Положбата на сигналот во NMR-спектарот најчесто се изразува во бездимензионални единици, т.н. δ -единици (ppm) (Слика 7.11). Оваа единица е изведена бидејќи нејзината вредност не зависи од јачината на применетото магнетно поле B_0 , односно од работната фреквенција ν_0 на инструментот, што не би било случај кога хемиското поместување би се изразуvalo преку единица за фреквенција (Hz). δ -единицата се изведува на следниот начин:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_s}{\nu_0} 10^6 \text{ ppm} \quad (7.21)$$

при што $\nu - \nu_s$ претставува разлика во фреквенцијата на разгледуваниот сигнал и стандардот (Hz), а ν_0 е работната фреквенција на инструментот. Со оглед на тоа што броителот ($\nu - \nu_s$) е приближно милион пати помал од именителот, целиот израз се множи со 10^6 , со што δ -единици се изразени преку ppm. NMR- скалата во овој случај е поделена на 10 δ -единици, со што за TMS сигналот $\delta = 0$.



Слика 7.11 Обележување на NMR скалата и положба на некои карактеристични видови протони

Заштитеноста на протоните од локалните магнетни полиња зависи од електронската густина околу разгледуваниот протон. Според тоа, врз основа на познавањето на електронегативноста на елементите, можно е да се предвиди редот на величина на хемиското поместување δ . Така, на пример, електронската густина околу протонот на TMS е голема (силициумот има мала вредност за електронегативноста) и овие протони се добро заштитени, поради што нивниот резонантен пик се јавува при голема јачина на магнетното поле. Со примена на овој принцип може успешно да се предвиди редоследот на вредностите на хемиското поместување во следните низови на соединенија:

δ	CH ₃ -H	CH ₃ -J	CH ₃ -Br	CH ₃ -Cl	CH ₃ -F
	0,2	2,2	2,7	3,0	4,3
δ	CH ₃ -CH ₃	CH ₃ -N	CH ₃ -O-	CH ₃ -F	
	0,9	2,2	2,5	4,3	

Како што може да се види, за соединението CH₃-H константата на заштита на протонот е голема и тој има мала прецесиска фреквенција, па потребно е магнетно поле со поголема јачина (сигналот се јавува на $\delta = 0,2$). Кај CH₃-F, како резултат на големата електронегативност на флуорот, протонот има поголема прецесиска фреквенција (мала константа на заштита), па резонанцијата се јавува при пониски вредности на магнетното поле (сигналот се јавува на $\delta = 4,3$).

Особено се карактеристични киселинските протони. Електронската густина околу киселинскиот протон е многу мала како резултат на присуството на два кислородни атоми (изразена електронегативност). Овие протони се слабо заштитени и како резултат на тоа тие резонираат при многу мали вредности на магнетното поле, на левиот крај на NMR скалата ($\delta = 10,8$).

Магнетна анизотропија ($\sigma^{\text{аниз}}$)

Испитувањата на NMR спектрите на одредени соединенија што содржат двојна и тројна врска покажале дека локалните магнетни полиња не се доволни за да дадат објаснување за положбата на одредени протонски пикови, односно предвидувањето на хемиското поместување само врз основа на електронегативноста би довело до грешни претпоставки. Така, на пример, промената на δ вредностите за протоните во наведените јаглеводороди, не го следи порастот на електронегативноста на групите што се врзани за протоните: CH₃-CH₃ ($\delta = 0,9$); CH₂=CH₂ ($\delta = 5,8$) и CH \equiv CH ($\delta = 2,9$). Дополнително, алдехидниот протон RCHO ($\delta \approx 10$) и протонот на бензен ($\delta \approx 7,3$) даваат сигнали на многу пониски вредности за δ отколку што се очекува согласно електронегативноста на групите врзани за нив. Овие соединенија содржат двојна

или тројна хемиска врска, што укажува дека π -електроните, покрај електронегативноста, имаат одредено влијание врз хемиското поместување.

Магнетните полиња индуцирани од електрони на σ и π орбиталите што не се сферно симетрични, може да имаат големо влијание врз ефективното магнетно поле што го чувствува протонот. Тоа најмногу доаѓа до израз кај незаситените соединенија, кај кои под влијание на надворешното магнетно поле B_0 , подвижните π -електрони индуцираат магнетни полиња. Нивното дејство на протонот не се пренесува низ хемиската врска, туку директно низ просторот. Јачината на ова индуцирано магнетно поле не е иста во сите правци и со зголемување на растојанието доаѓа до негово брзо опаѓање ($\sim r^3$).

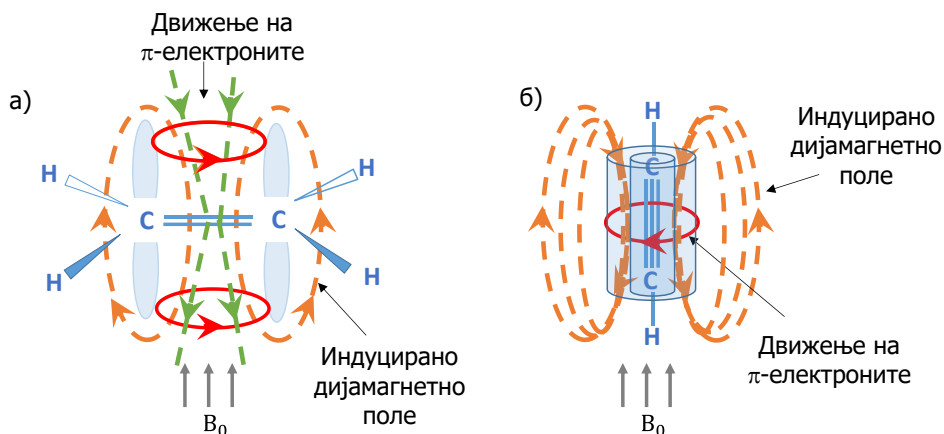
Ефектите чиишто големини зависат не само од растојанието, туку и од правците на магнетното поле се нарекуваат **анизотропни**. Поимот **магнетна анизотропија** означува дека јачината на магнетното поле не е иста во сите правци.

За разлика од нив, ефектите чиј интензитет зависи само од растојанието, а во просторот се простираат подеднакво низ сите правци се нарекуваат **изотропни**. Изотропните магнетни ефекти покажуваат групи со сферична распределба на полнежот.

Каков ќе биде ефектот на магнетната анизотропија зависи од ориентацијата на молекулата во однос на применетото магнетно поле, односно од положбата на протоните во однос на индуцираното магнетно поле.

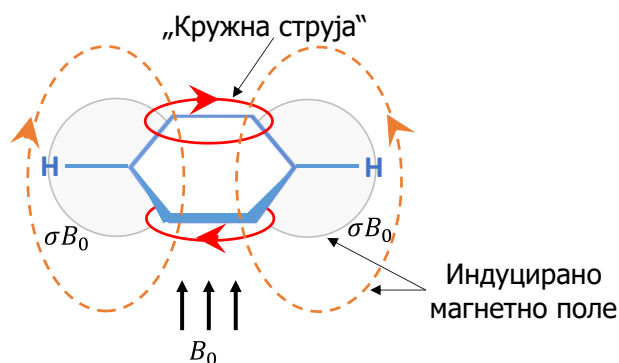
Магнетната анизотропија на тројната врска може да се објасни преку примерот на линеарната молекула на ацетилен. π -електронскиот облак во тројната врска има цилиндричен облик (аксијална симетрија) и електронската густина е симетрично распоредена околу целата молекула. Кога оската на симетрија на тројната врска е поставена паралелно со правецот на надворешното магнетно поле B_0 , π -електроните на хемиската врска кружат во рамнина поставена нормално на правецот на магнетното поле и индуцираат сопствено магнетно поле што се спротивставува на дејството на надворешното магнетно поле. Протоните на ацетиленот лежат долж магнетната оска, па индуцираното магнетно поле од страна на ротирачките електрони дејствува како штит за протоните. Тоа придонесува протоните на ацетиленот да чувствуваат многу послабо ефективно магнетно поле во споредба со применетото и затоа за нивна резонанција потребно е да се примени поголема јачина на надворешното магнетно поле. Нивниот пик во NMR-спектарот се јавува при помала вредност за δ од очекуваното ($\delta = 2,9$) (Слика 7.12 б). Сличен анизотропен ефект покажува и тројната врска кај нитрилните соединенија ($C\equiv N$).

Магнетната анизотропија на двојната врска може да се разгледа преку молекулата на етилен. И во овој случај π -електроните ротираат во рамнина на оската на двојната врска, при што магнетното поле B_0 е поставено нормално на оската на двојната врска (Слика 7.12 а). Повторно се образува индуцирано магнетно поле, но за разлика од протоните во тројната врска, тука олефинскиот протон се наоѓа во незаштитен простор. Индуцираното магнетно поле го засилува дејството на надворешното магнетно поле, поради што протонот ќе резонира при помали вредности на B_0 . Оттука вредноста на хемиското поместување кај етиленот се јавува на поголеми вредности за δ од очекуваната ($\delta = 5,8$). Слично однесување се јавува и кај протоните на алдехидите ($C=O$) и на имините ($C=N$). Така, на пример, кај алдехидите, ефектот на применетото магнетно поле е најголем кога полето B_0 е поставено нормално на правецот на $C=O$ врската. Геометријата на молекулата и распоредот на индуцираното магнетно поле го оставаат алдехидниот протон во незаштитен простор, па затоа тој ќе резонира при невообичаено мали вредности на магнетното поле, односно при големи δ вредности.



Слика 7.12 Магнетна анизотропија кај: а) етилен (протонот е во незаштитен простор), б) ацетилен (протонот е во заштитен простор)

Подвижноста на π -електроните во ароматичните соединенија е значително поголема во споредба со подвижноста на електроните во изолирана двојна врска, бидејќи делокализацијата на електроните го опфаќа целиот ароматичен систем. Од тие причини во ароматичните соединенија, под дејство на надворешно магнетно поле B_0 , се јавува т.н. „кружна струја“ што е многу посилна отколку кај двојната врска. Тоа доведува во ароматичните соединенија да се формираат многу посилни индуцирани магнетни полиња. Јачината на индуцираното магнетно поле B_i , односно магнетниот анизотропен ефект што има влијание врз хемиското поместување на ароматичните протони, тесно е поврзано со степенот на ароматичност на соединенијата. Тоа овозможува NMR спектроскопијата да се применува како експериментален метод за одредување на степенот на ароматичност кај соединенијата. Како и кај изолираната двојна врска, анизотропните ефекти се најизразени кога ароматичниот прстен е поставен нормално (трансферзално) на правецот на надворешното магнетно поле B_0 (Слика 7.13). Индуцираната „кружна струја“ има магнетен ефект што дејствува во ист правец со полето B_0 (парамагнетен ефект) и ги остава ароматичните протони во незаштитен простор. Тоа доведува резонанција на ароматичните протони да се јави на помала јачина на магнетното поле од очекуваното, односно при поголеми вредности за δ . Сите анизотропни ефекти се намалуваат со третиот степен на растојанието.

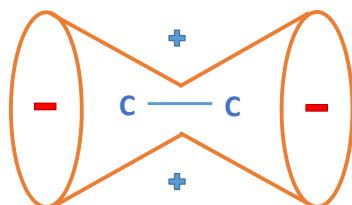


Слика 7.13 Магнетна анизотропија кај ароматично јадро (протоните се надвор од заштитениот простор)

Бензенот има шест (хемиски еквивалентни) протони што се наоѓаат во незаштитениот простор (зона на најсилно парамагнетно дејство), што чувствуваат зголемено ефективно магнетно поле и затоа имаат големо хемиско поместување ($\delta = 7,26$). Кај супституирани ароматични соединенија, хемиското поместување δ

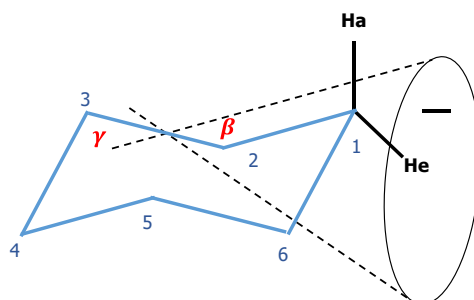
на ароматичниот протон се наоѓа во областа од 6,5 – 9. Степенот на хемиско поместување во таа област зависи од типот на ароматичниот прстен, како и од ефектот на другите супституенти.

σ -електроните од единечната C-C врска, во споредба со големиот магнетен анизотропен ефект на π -електроните, имаат многу слабо изразен анизотропен ефект. Распоредот на парамагнетните и на дијамагнетните зони околу C-C врската е прикажан на Слика 7.14.



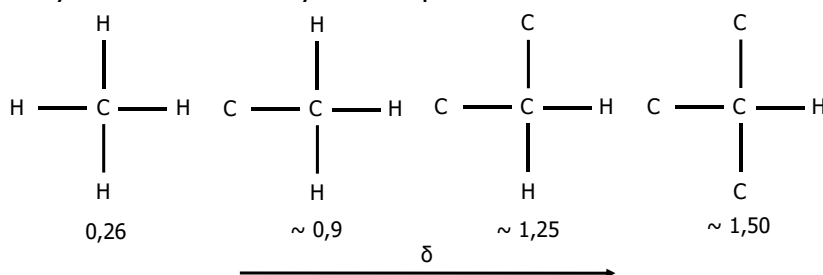
Слика 7.14 Распоред на дијамагнетни (+) и на парамагнетни (-) дејства околу единечна C-C врска

Магнетната анизотропија доаѓа до израз кај крутите циклични структури, како, на пример, прстенот на циклохексан во конформација столица. Во овој случај секој екваторијален протон е под влијание на парамагнетно дејство од две C-C врски на прстенот, додека секој аксијален протон е во област на дијамагнетно дејство. Така, на пример, протон на C(1) чувствува анизотропно влијание од C(2)-C(3) и C(5)-C(6) врска (Слика 7.15). Тоа доведува до поголемо хемиско поместување на екваторијалните протони во споредба со аксијалните. Иако оваа разлика е мала ($\delta_a - \delta_e = 0,1 - 0,7 ppm$), сепак е многу значајна за одредување на геометријата на цикличните молекули. Покрај разликата во хемиското поместување, постои разлика и во сигналите добиени од екваторијалните и аксијалните протони, што овозможува NMR спектроскопијата да се користи за одредување на релативната конфигурација и конформација на цикличните системи.



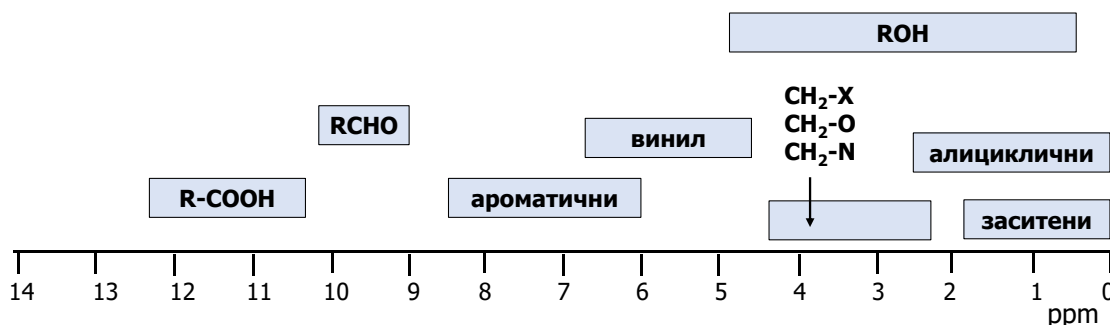
Слика 7.15 Циклохексан во конформација столица

Влијанието на магнетната анизотропија на соседните C-C врски се објаснува преку намалување на заштитата на алифатичните протони со зголемување на алкил супституентите. Како што може да се види од Слика 7.16, со зголемување на алкил супституентите се зголемува и δ вредноста.



Слика 7.16. Влијание на алкил супституенти врз δ вредноста

На шематскиот приказ даден на Слика 7.17 прикажани се областите на хемиско поместување за некои класи соединенија. Дадениот шематски приказ на дистрибуцијата на хемиското поместување на протонот поврзан со различните функционални групи е приближен и може да отстапува за некои соединенија од одредена класа.



Слика 7.17 Области на хемиско поместување на одредени класи на органски соединенија

Влијание на растворувачот на константата на заштита

Вредноста на хемиското поместување за секој вид протон, во една сложена молекула, зависи од голем број ефекти што може да имаат комбинирано дејство. На вредноста на хемиското поместување, покрај веќе споменатите ефекти на дијамагнетна заштита и магнетна анизотропија, влијание има концентрацијата на примерокот и природата на растворувачот. Влијанието на овие два фактора вообичаено е мало, освен во случаи кога постои можност од размена на протони помеѓу примерокот и растворувачот или формирање водородна врска (на пример, кај алкохоли или амини).

Промени во хемиското поместување може да настанат како резултат на влијанието на диполниот момент на растворувачот, магнетните анизотропни ефекти на растворувачот или градење комплекси (асоцијација) на растворувачот со примерокот.

Влијанието на диполниот момент на растворувачот доаѓа до израз кога се користат поларни растворувачи од типот на тешка вода D_2O , деутериран диметилсулфоксид $(CD_3)_2SO$, деутериран ацетон $(CD_3)_2CO$ и деутериран ацетонитрил CD_3CN . Диполните растворувачи влијаат на електронскиот распоред во примерокот преку дипол-дипол и дипол-индуциран дипол-интеракции, со што влијаат и на константата на заштита на протонот во примерокот. Промената во хемиското поместување што се јавува како резултат на ова влијание е поголема од 1 ppm.

Ефектите на магнетната анизотропија најчесто се чувствуваат кога се користат ароматични растворувачи (деутериран бензен C_6D_6 и деутериран пиридин C_5D_5N). Кај овие растворувачи, дури и сферно симетричните изотропни молекули (пр. TMS) се повеќе изложени на дијамагнетната отколку на парамагнетната заштита што потекнува од кружната струја на ароматичниот прстен. Тоа доведува до зголемување на константата на заштита на сите протони во растворот. Но, со огледна тоа што хемиското поместување се мери во однос на TMS, што, исто така, го чувствува ова дејство, промени во хемиското поместување настануваат само кај протоните што чувствуваат дејство поразлично од дејството на TMS.

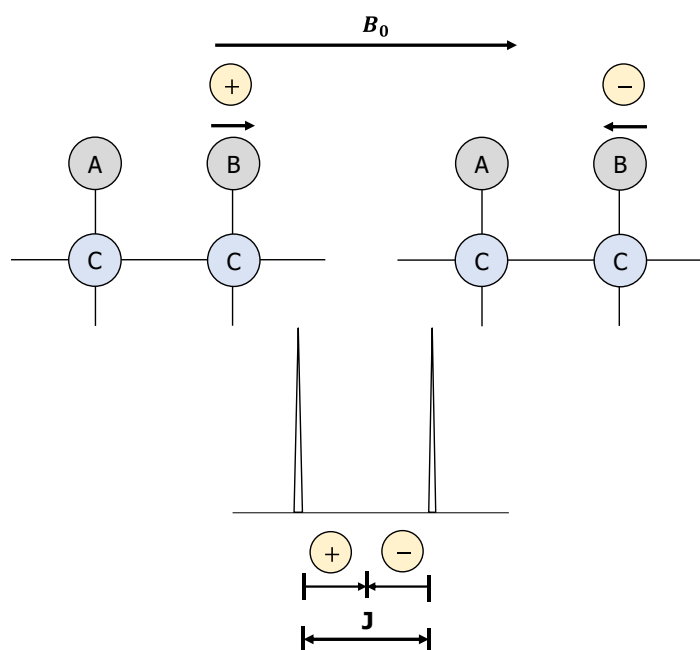
Доколку дојде до асоцијација растворувач-примерок, настанува промена на хемиското поместување на протонот на примерокот. Во овој случај константата на заштита се менува како резултат на комбинираното дејство на електричните полиња и/или анизотропното дејство на растворувачот. Овој тип влијание најчесто

се забележува кај протони врзани за хетероатом што гради водородни врски со поларни растворувачи.

Покрај наведените влијанија, можно е формирање Вандервалсови (*Van der Waals*) врски помеѓу растворувачот и примерокот, што повторно доведува до промена на константата на заштита на примерокот. Меѓутоа, овие интеракции дејствуваат подеднакво и на примерокот и на стандардот, па ако при мерењата се користи внатрешен стандард нивното дејство нема да има влијание врз хемиското поместување.

Спин-спин спрегнување

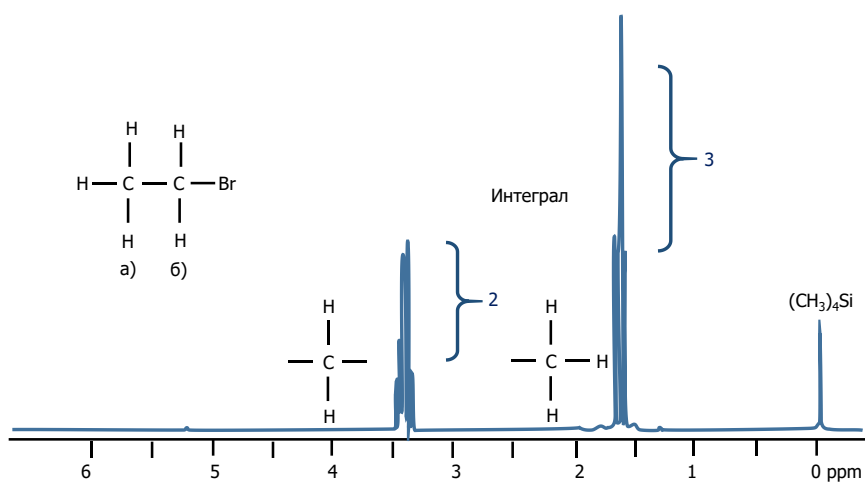
За интерпретација на NMR-спектарот, покрај хемиското поместување и релативната површина (интегралот) на NMR-сигналот, од големо значење е и неговиот облик (мултиплицитет). Често и наједноставните соединенија во својот ^1H NMR спектар даваат сигнал што се состои од повеќе линии т.н. **мултиплицитети**. NMR пиковите, во зависност од електронската густина околу разгледуваните протони, можат да се поместат кон пониски или кон повисоки вредности на магнетното поле. Појавата на мултиплицитетите може да се објасни ако се земе предвид влијанието на соседните протони на секој разгледуван протон. Магнетното поле на протонот под дејство на надворешно магнетно поле може да се постави паралелно или антипаралелно во однос на полето, односно може да има позитивен или негативен спин. Какво е влијанието на спинот на соседниот протон врз резонантната положба на разгледуваниот протон?



Слика 7.18 Спин-спин спрегнување на протоните А и В

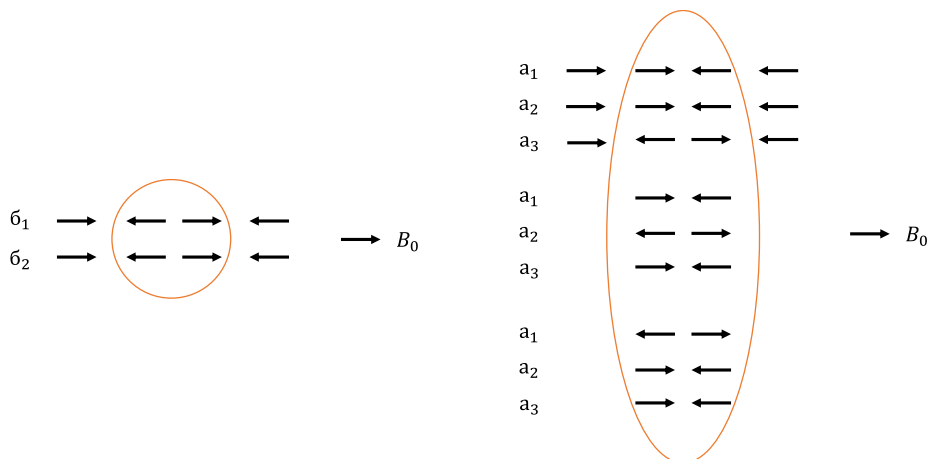
Да претпоставиме дека два протона А и В се наоѓаат на соседни два јаглеродни атоми (Слика 7.18). Вистинската јачина на полето што ја чувствува протонот А, под влијание на локалното магнетно поле на протонот В, може да биде намалена или зголемена. Ако спинот на протонот В е паралелен на применетото магнетно поле B_0 (случај означен со +), вистинското (ефективното) поле што го чувствува протонот А ќе биде зголемено и неговата резонантна положба ќе биде поместена на лево, односно кон пониските вредности на магнетното поле. Кога протонот В е со антипаралелна ориентација во однос на применетото магнетно поле B_0 (означен како -), доаѓа до поместување на резонантниот пик на протонот

А на десно, односно кон повисоката вредности на магнетното поле. Во примерокот постојат голем број протони А и В, па веројатноста за која било од овие можни ориентации е идентична. Од тие причини резонантниот пик на протонот А ќе се состои од два пика со приближно еднаков интензитет. Сигналот (мултиплицитетот) што се состои од две приближно еднакви линии се нарекува **дублет**. Растојанието помеѓу соседните линии на мултиплицитетот, изразено во единица на фреквенција (Hz), се нарекува **константа на спрегнување** (*coupling constant*) и се означува со J . Константата на спрегнување е карактеристична величина за дадениот вид протон. Причината за настанување на оваа појава, како што кажува самото име, се објаснува преку интеракцијата на спиновите на соседните спин-активни јадра. Ова се нарекува **спин-спин спрегнување или скаларно спрегнување** (*spin-spin coupling, scalar coupling*). Оваа појава, во литературата, може да се стретне и под името **спин-спин разложување** (*spin-spin splitting*). Може да се заклучи дека разложување на NMR сигналот настанува како резултат на спин-спин спрегнувањето на протоните на соседните јаглеродни атоми.



Слика 7.19 NMR-спектар на етилбромид

Спин-спин спрегнувањето може да се објасни преку примерот на NMR спектарот на етилбромид, каде што метил протоните се означени со (а), а метиленските протони се означени со (б) (Слика 7.19). Секој од двата метиленски протони може да заземе една од двете ориентации во однос на применетото поле B_0 : паралелна или антипаралелна. Како резултат на тоа, можни се следните комбинации од коишто секоја комбинација има иста статистичка веројатност да се случи:

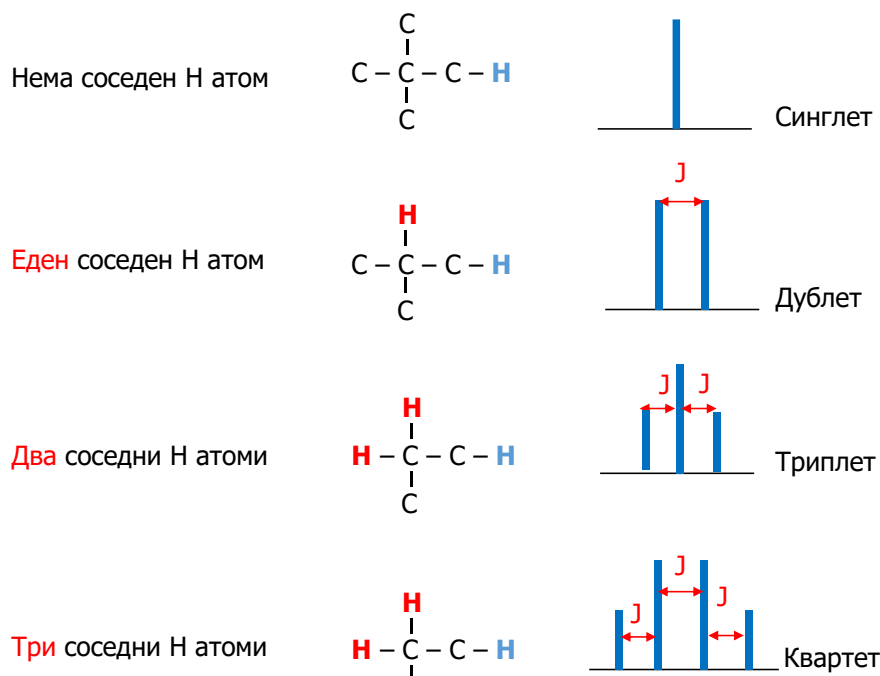


каде што со b_1 и b_2 се означени двата метиленски протони.

Двете комбинации во средината (означени со кружница) се еквивалентни, па затоа се разгледуваат како една комбинација. Но веројатноста за појава на оваа комбинација е двојно поголема во однос на другите две комбинации со паралелни спинови. Поинаку прикажано, веројатноста протоните b_1 и b_2 да се најдат во три меѓусебно различни комбинации е изразена како 1:2:1. Секоја од овие три комбинации има различен ефект врз резонанцијата на протонот (а), поради што протонот (а) ќе се разложи на три пика (триплет), со интензитет на NMR-сигналот 1:2:1.

Со аналогна постапка, можат да се наведат сите можни комбинации на меѓусебно различни ориентации на трите метил-протони (а), прикажани на десно. Сите осум комбинации имаат подеднаква статистичка веројатност. Трите комбинации во втората колона и трите комбинации во третата колона се меѓусебно еквивалентни. Од тие причини постојат само четири различни комбинации на ориентација на протонот (а) и секоја од нив ќе даде различен ефект врз резонантниот сигнал на протонот (б). Како последица од ова, спин-спин спрегнување, NMR сигналот за протонот (б) се јавува како кuartет, со интензитет на пиковите 1:3:3:1. Вкупниот интензитет на овој сигнал (што претставува интегрална површина од сите четири члена на кuartетот), во однос на вкупниот интензитет на триплетот, се јавува во однос 2:3. Оттука произлегува дека во NMR-спектарот на етилбромд, едниот сигнал е последица од резонанцијата на два протона (CH_2 група), а другиот сигнал е последица на резонанцијата на три протона (CH_3 група).

Може да се заклучи дека разложувањето на резонантните пикови во мултиплицитети (дублет, триплет....) настанува како резултат на дејството на магнетното поле на соседните протони (што не се хемиски еквивалентни) врз протонот од кој потекнува пикот.



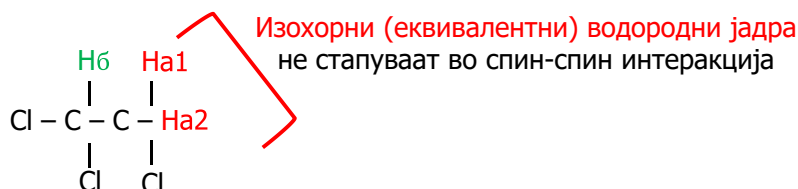
Слика 7.20 Разложување на резонантниот пик во мултиплицитети согласно правилото $n + 1$ (n – број на соседни водородни атоми)

Генерално, под дејство на n -соседни протони доаѓа до кинење на NMR сигналот на протонот на $(n + 1)$ пик (мултиплицитет), при што n го претставува бројот на протони во јадрото што предизвикува разложување (кинење) на пикот (Слика 7.20). Така, во разгледуваниот пример на етилбромид (Слика 7.19), CH_2

групата го разложува сигналот на CH_3 групата во триплет, додека пак CH_2 групата го разложува сигналот на CH_2 групата во кuartет. Овој податок има голема примена во определување на структурата на непознат молекула: доколку во NMR спектарот има сигнал триплет тоа укажува дека разгледуваниот протон има два соседни водородни атоми.

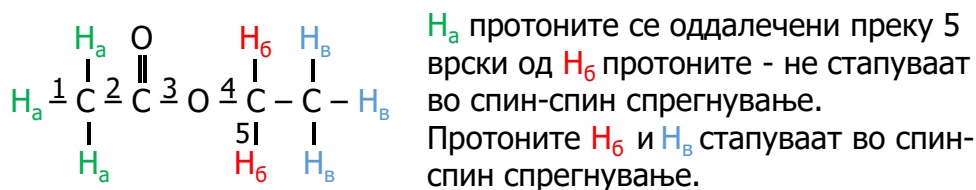
Потребно е да се истакнат три правила:

1. За да настане разложување на сигналот не е доволно да бидат задоволени одредени структурни и стереохемиски односи помеѓу јадрата, туку неопходно е јадрата да имаат различно хемиско поместување. Хемиски еквивалентни јадра, како резултат на идентичната електронска околина имаат исто хемиско поместување, па при меѓусебното спрегнување не даваат мултиплицитет. Овие (хемиски еквивалентни) протони со исто хемиско поместување, бидејќи во исто време стапуваат во резонанција се нарекуваат **изохрони јадра** (од грчки *izohronos* – истовремен). Јадрата со различна електронска околина имаат различно хемиско поместување и се нарекуваат **анизохрони јадра**. Со други зборови изохроните јадра не ги разложуваат сигналите едни на други, не даваат мултиплицитети и не стапуваат во спин-спин спрегнување едни со други. Така, на пример, H_{a1} во 1,1,2-трихлороетан не е разложен од страна на H_{a2} , и обратно (Слика 7.21).



Слика 7.21 1,1,2-трихлороетан (еквивалентните протони не стапуваат во спин-спин спрегнување едни со други, односно не даваат мултиплицитети)

2. Разложувањето може да настане само помеѓу протони што се оддалечени најмногу со три врски. На пример, H_a протоните кај етил ацетат даваат единечен сигнал бидејќи соседните водородни протони се оддалечени преку пет врски, што е премногу далеку за да настане спрегнување (Слика 7.22).

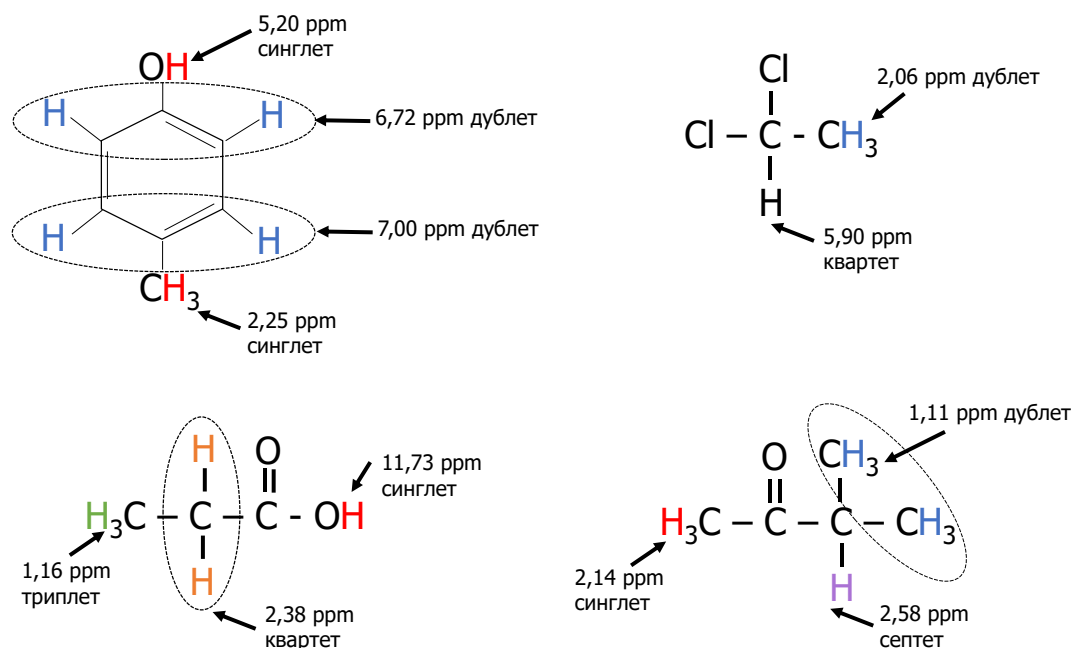


Слика 7.22 Етил ацетат (спин-спин спрегнување настанува помеѓу H_b и H_b протоните)

3. Разложувањето е најизразено кај протоните (водородни атоми) врзани за јаглероден атом. Водородни атоми врзани за хетероатоми (пр. алкохолни или аминоксидни протони) се спрегнуваат многу малку или воопшто не се спрегнуваат со соседните протони.

Со примена на едноставни правила можно е со помош на мултиплицитетот на сигналот да се доведат во врска одделни групи на протонот и на тој начин да се состават поголеми структурни фрагменти, што придонесува за одредување на структурните формули на соединенијата. На Слика 7.23 прикажани се неколку

примери на хемиско поместување и спин-спин разложување на некои едноставни органски молекули.



Слика 7.23 Хемиско поместување и спин-спин спрегнување кај едноставни органски молекули

Системите што даваат едноставни спектри составени од симетрични мултиплицитети (дублет, триплет, квартет, итн.) се нарекуваат **спектри од прв ред** и се јавуваат само кога односот меѓу разликата на хемиското поместување на спрегнатите јадра ($\Delta\nu, Hz$) и константата на спрегнување (J, Hz) е голема ($\Delta\nu/J > 10$). Кај овие спектри ретко може да настане забуна дали некој пик претставува член на некој мултиплицитет или, пак, претставува посебен сигнал што потекнува од друг вид протон. Спектрите од прв ред се наједноставни за интерпретација. **Спектрите од повисок ред** се состојат од многу сложени мултиплицитети што не можат да се објаснат со моделите објаснети погоре во текстот. За анализа на овие спектри неопходно е да се примени квантната механика за одредување на енергијата на спин-спин интеракциите.

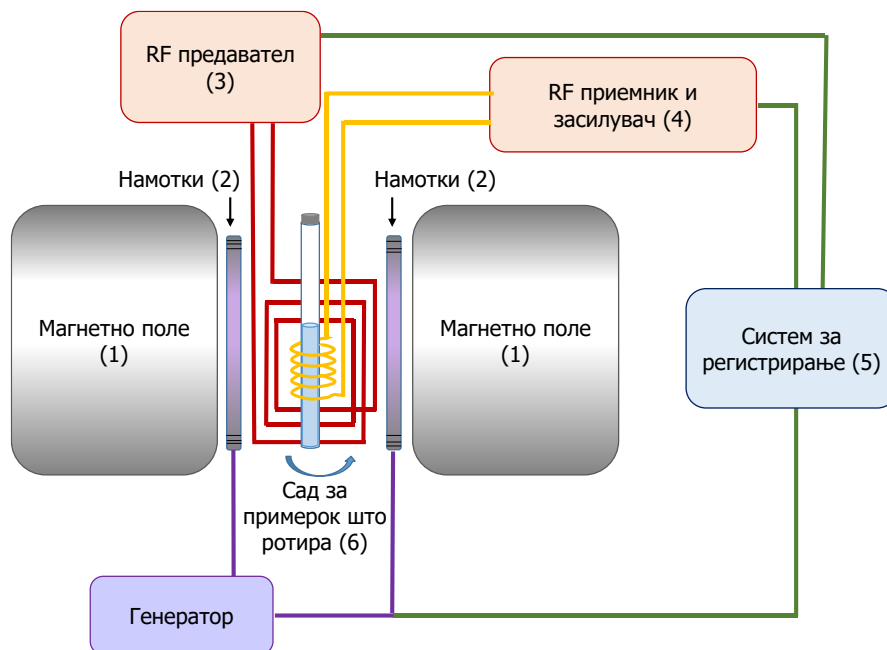
NMR спектрометар и добивање NMR спектри

NMR спектрометарот е исклучително сложен инструмент. За работа на NMR спектрометарот е потребно силно магнетно поле што ја наметнува потребата од постоење прецизно контролиран извор на електрична енергија. Ова доведува NMR инструментите да имаат многу висока цена.

На пазарот постојат два типа на NMR-инструменти: NMR спектрометри што даваат широка спектрална линија (*wide-line*) и NMR спектрометри со висока резолуција. NMR спектрометрите што даваат широка спектрална линија користат магнети со јачина помала од 1 T и имаат пониска цена на чинење во однос на спектрометрите со висока резолуција. NMR-спектрометрите со висока резолуција користат магнети со јачина од 1,4 T до 14 T, што соодветствува на фреквенција на протон од 60 до 1000 MHz.

Составните делови на NMR спектрометар (Слика 7.24) се:

1. Електромагнет со силно, стабилно и хомогено поле. Вредноста на полето мора да биде константна во сите правци, за целото времетраење на експериментот.
2. Покрај главниот магнет, чијашто вредност се одржува константна за времетраењето на експериментот, постои и дополнителен електромагнет. Јачината на полето на овој дополнителен магнет континуирано се менува во еден тесен опсег на вредности.
3. Радиофреквентен осцилатор, предавател поврзан преку намотки што емитуваат радиофреквентно зрачење со соодветна енергија на примерокот во правец нормален на магнетното поле B_0 .
4. Радиофреквентен приемник, поврзан преку намотки што го опкружуваат примерокот. Овие намотки се поставени нормално, како во однос на магнетното поле, така и во однос на намотките на предавателот.
5. Систем за регистрирање на спектар: засилувач, интегратор и пишувач. Овој електронски систем овозможува снимање на NMR спектарот.
6. Сад за примерок: тесна стаклена епрувета со димензија од 5 mm, поставена во шуплината на магнетот што ротира за цело време на испитувањето. Ротацијата овозможува примерокот воедначено да го чувствува магнетно поле во сите делови од примерокот.



Слика 7.24 Шематскиот приказ на главните делови на NMR спектрометар

Основен работен параметар што треба да се избере при снимање на NMR спектар е јачината на магнетното поле и фреквенцијата на електромагнетното зрачење. Изборот на овие параметри зависи од видот на јадрата што се испитуваат. NMR спектарот може да се добие со варирање на јачината на магнетното поле во мал опсег на вредности, при што се следи RF сигнал од примерокот. Друга можност е да се варира фреквенцијата на радиофреквентното зрачење, а надворешното магнетно поле да се одржува константно.

Примерокот за анализа се внесува во статично магнетно поле B_0 (хомогено и ориентирано во насока на z-оската на координатниот систем), што овозможува добивање две или повеќе енергетски нивоа. Енергијата потребна да предизвика резонанција се донесува од варијабилно магнетно поле B_1 што е поставено нормално на B_0 . Оваа енергија се донесува во облик на синусоидални

радиобранови, со одредена фреквенција. При одредена вредност на магнетното поле се постигнуваат резонантни услови (фреквенцијата на ова променливо поле одговара на енергетскиот премин помеѓу две соседни нивоа) и во тој момент настанува апсорпција на радиофреквентната енергија што предавателот континуирано ја емитува за целото времетраење на експериментот. Оваа апсорпција се регистрира од страна на радиофреквентен приемник како намалување на интензитетот на сигналот во однос на сигналот на предавателот, што пишувачот го бележи како апсорпциски пик, односно како сигнал на NMR-спектарот. Серија на вакви пикови го сочинува NMR-спектарот. Секој пик се одликува со своја положба на NMR-скалата (апциса) и со свој интензитет (се мери преку површината што пикот ја опишува). Секој NMR спектрометар има во својот состав софтвер што на едноставен начин ја мери површината на пикот, преку мерење на интегралот.

Течностите може да се анализираат чисти (концентрирани, ако имаат мала вискозност) или разредени, додека пак цврстите супстанции се раствораат во погодни растворувачи. Гасовитите супстанции даваат слаби сигнали. Вообичаена концентрација на растворите за анализа изнесува 2-15%. Со оглед што се проучуваат присутните протони во примерокот, идеалните растворувачи не треба да содржат протони (водородни атоми) и не треба да реагираат со испитуваната супстанција. Најчесто користени растворувачи се деутериран тетрачлорометан CCl_4 , деутериран хлороформ CDCl_3 , тешка вода D_2O и деутериран бензен C_6D_6 .

При снимање на стандардни NMR-спектри секогаш се набљудува само еден вид јадра (^1H , ^{13}C итн.). Спинскиот систем што се наоѓа во хомогено магнетно поле B_0 , се побудува со електромагнетно зрачење од областа на радиофреквенцијата (RF). Врз основа на начинот на побудување, постојат две основни техники: **континуирано озрачување** (*continuous wave*, **CW**) и пулсен или **FT метод** (Фуриерова трансформација).

Основната разлика меѓу техниката на континуирано озрачување и пулсната техника е во начинот на побудување на спиновите. Кај CW методот, енергетските премини се побудуваат сукцесивно со промена на магнетното поле или на фреквенцијата. Кај овој тип инструменти, за создавање магнетно поле се користи перманентен магнет или електромагнет. Кај FT техниката, се користи силен и краток радиофреквентен пулс со што истовремено се побудуваат сите енергетски премини во спинскиот систем. Времето на побудување е неспоредливо пократко од времето што е потребно тоа да се стори со CW методот. Кај FT NMR инструментите за образување на магнетното поле се користат соленоиди со голема спроводливост. Задолжителен составен дел на FT спектрометрите е софтверски систем што служи за собирање и обработка на податоците, врши Фуриерова трансформација и ја контролира работата на инструментот. Принципот на работа на FT NMR спектрометрите овозможува тие да имаат поголема осетливост во однос на CW инструментите, но и значително повисока цена на чинење.

За разлика од CW-инструментите што се применуваат за снимање на NMR спектри на еден вид јадра, најчесто на протон ^1H и ^{19}F , денешните FT спектрофотометри овозможуваат едноставна промена на спектралното подрачје и детекција на сите спин-активни јадра. Со нивно усовршување овозможена е детекција на јадра, како на пример, ^2H , ^{15}N , ^{13}C и ^{17}O , коишто поради ниската застапеност во природата и слабите магнетни моменти, не можат да бидат детектирани со класичниот CW метод. Особено треба да се истакне дека FT-спектрофотометрите овозможуваат снимањето на ^{13}C NMR спектрите, со што се овозможува ^{13}C NMR спектроскопијата, паралелно со ^1H NMR спектрите, да се користи за структурни одредувања.

Примената на јаки, стабилни супер спроводници (крио) магнети со јачина до 14 Т, како и воведувањето моќни софтверски решенија, значително ги подобриле карактеристиките (моќта на разделување и осетливоста) на новите FT NMR-спектрометри. Со FT техниката, во последниве неколку години развиени се потполно нови NMR методи што го означува новиот период во NMR спектроскопијата. Во прв ред се работи за повеќе импулсни димензионални (2D) NMR техники, што се неспоредливо поефикасни од традиционалните (1D) техники.

Интерпретација на NMR спектрите

Најмногу проучувана нуклеарно-магнетната резонанција е на протонот на јадрото на водород (^1H) - елемент што, покрај јаглеродот, е најзастапен во органските соединенија. Релативно едноставната интерпретација на спектрите кај ^1H NMR спектроскопијата е од особено значење за добивање податоци за структурата и геометријата на молекулите. Дополнителна причина за брзиот развој на ^1H NMR спектроскопијата во однос на NMR спектроскопијата на други спин-активни јадра (пр. ^{13}C , ^{31}P и ^{15}N) е нејзината добра осетливост.

Идентификација и структурна анализа

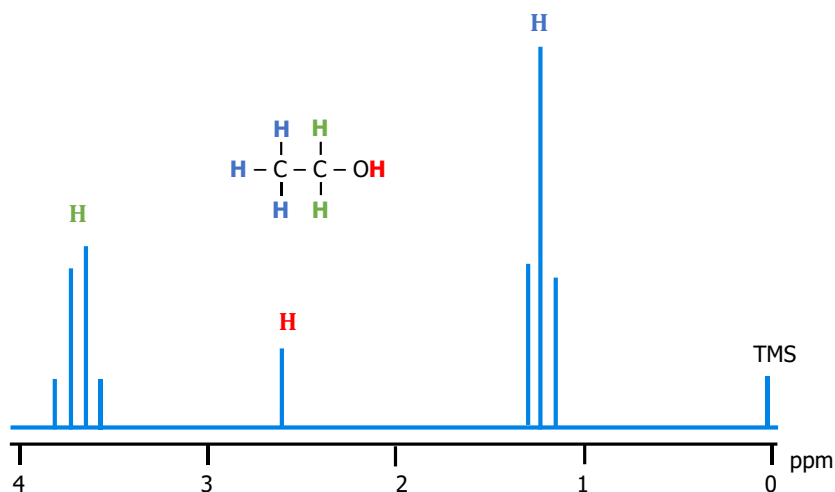
При интерпретација на ^1H NMR спектрите, како и на спектрите добиени од други спин-активни јадра, предвид треба да се земат следните три информации (правила):

1. Положбата на резонантните пикови, односно положбата на сигналот во спектарот (т.н. хемиско поместување, δ), овозможува да се идентификува видот на протонот во однос на неговата електронска густина (озможува утврдување на функционалните групи што ги содржи молекулата). Присуството на кислород, на азот и на халогени атоми се претпоставува врз основа на δ вредноста.
2. Обликот на сигналот (мултиплицитет, спин-спин спрегнување) - бројот на пикови во мултиплицитетот овозможуваат да се донесе заклучок за бројот на протони во непосредна близина, а константата на спрегнување зборува за меѓусебната положба на два разгледувани протони (податок значаен за откривање на структурата на молекулата).
3. Интензитетот на пиковите, односно релативната површина на сигналот (интегралот) е пропорционална со бројот на протоните што го даваат сигналот (што резонираат при дадени услови), со што се олеснува идентификацијата на одделни сигнали и дополнително овозможува проверка на предложената структура.

NMR спектрите на релативно едноставни органски соединенија (етанол и ацеталдехид) можат да послужат како пример за примената на горенаведените правила.

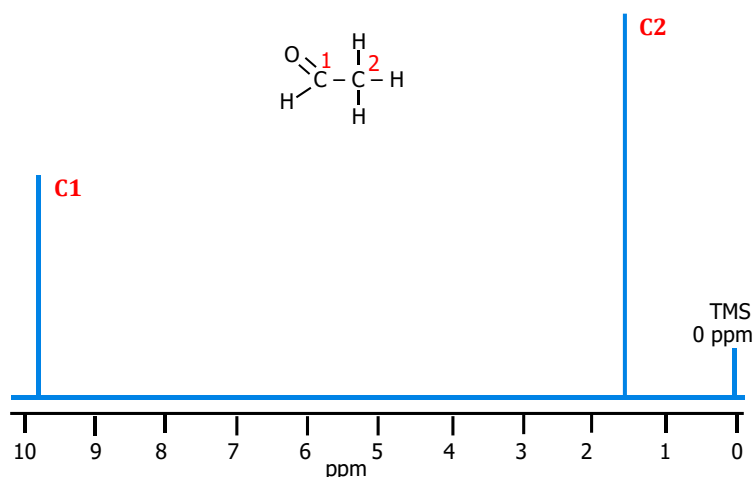
На Слика 7.25 прикажан е NMR спектарот на етанол растворен во деутериран хлороформ (CDCl_3). Карактеристично за разредените раствори на алкохоли е интермолекуларното поврзување со водородни врски. Оваа врска овозможува размена на хидроксилниот протон помеѓу молекулите на алкохолот. Оваа размена се случува многу брзо, па хидроксилниот протон на етанолот не е во можност да стапи во спин-спин спрегнување со соседните протони на молекулата и затоа неговиот резонантен пик претставува синглет (наместо очекуваниот триплет). Положбата на ОН резонанцијата зависи од степенот на разредување и

во овој случај сигналот се јавува на 2,61 ppm. Метиленските протони го разложуваат метил-протонот во карактеристичен триплет центриран на 1,226 ppm. Како што е претходно објаснето, брзото разменување на ОН протонот не дозволува разложување на соседниот метиленски протон. Но, метил протонот доведува до разложување на сигналот на метиленскиот протон во квартет што се јавува на $\delta = 3,687 \text{ ppm}$. Кај етанолот, ОН групата има поголема електронегативност во споредба со јаглеродот, па електронската густина е поместена кон кислородниот атом и метиленската група останува без дијамагнетна заштита. Од овие причини CH_2 протоните резонираат при пониски вредности на магнетното поле отколку што се очекува од протони на заситени јаглеродороди ($\delta \approx 1,20 - 1,35 \text{ ppm}$). Одејќи од десно кон лево, односот на површините на мултиплицитетите во NMR спектарот на етанол е 3:1:2.



Слика 7.25 NMR спектар на етанол

NMR- спектарот на ацеталдехид е прикажан на Слика 7.26. Оваа молекула содржи два вида протони, метил протони (а) и алдехиден протон (б). Сигналот на трите метил протони се разложува под дејство на алдехидниот протон и се јавува како дублет; а сигналот на алдехидниот протон под дејство на спрегнувањето со трите метил протона се јавува како квартет. Центарот на дублетот се наоѓа на $\delta = 2,206 \text{ ppm}$, а центарот на квартетот се наоѓа на $\delta = 9,789 \text{ ppm}$. Кај заситените јаглеродороди, резонанцијата на CH_3 протоните се јавува во областа од 0,7 – 1,3 ppm. Кај ацеталдехидот, карбонилната група ја привлекува електронската густина и го остава метил-протонот во незаштитен простор. π -електроните на карбонилната врска покажуваат анизотропен ефект што дополнително го „соголува“ CH_3 протонот. Овие два ефекта дејствуваат во иста насока, што доведува до поместување на резонанцијата на метил-протонот кон пониски вредности на магнетното поле (повисоки вредности за δ) во споредба со заситените јаглеродороди. Резонантната линија на $\delta = 9,80 \text{ ppm}$ е карактеристична за алифатичните алдехиди. Односот на интегрираните површини на дублетот и квартетот е 3:1, што соодветствува на бројот на протони што резонираат во секоја од групите.



Слика 7.26 NMR спектар на ацеталдехид

Квантитативна анализа

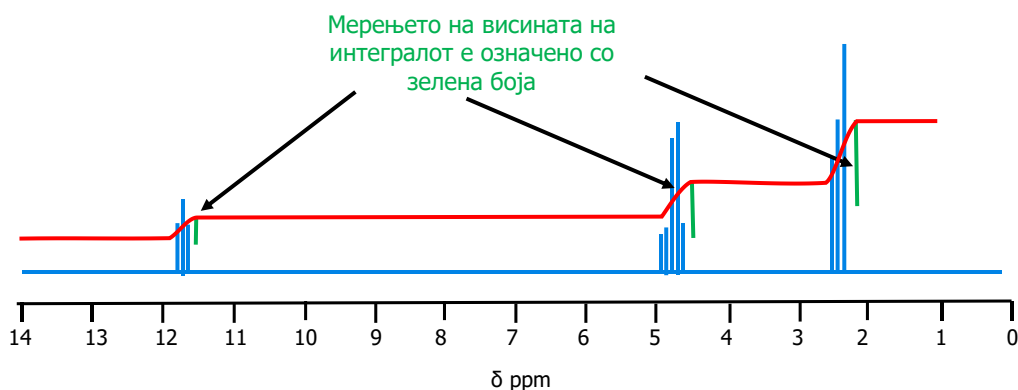
Примена на ^1H NMR спектроскопијата за квантитативна анализа се заснова на пропорционалната зависност помеѓу површината под NMR сигналот (интеграл, I) и моларната концентрација на протонот (C_H) од којшто потекнува сигналот:

$$I = K \cdot C_H \quad (7.22)$$

За секоја група на протони (C_{Hn}) од некое соединение со моларна концентрација C_M , постои едноставна врска помеѓу C_H и C_M :

$$C_H = n \cdot C_M \quad (7.23)$$

Интегралот всушност претставува компјутерски генерирана линија што се наоѓа над протонскиот NMR спектар (Слика 7.27). Интегралот ги мери релативните површини на различните пикови во спектарот. Кога линијата на интегралот ќе помине над некој пик или група на пикови, се подигнува нагоре (се зголемува нејзината висина). Зголемувањето на висината на интегралот е пропорционално со површината под пикот или групата на пикови. Висината на пикот се мери преку мерење на растојанието пред и по зголемувањето на висината на интегралот (Слика 7.28). Така, на пример, ако измерените висини се 0,7 cm; 1,4 cm и 2,1 cm, тогаш односот на површините на пиковите е 1:2:3. Тоа покажува дека односот на водородните атоми во три различни околини е 1:2:3. Овој вид информација се добива кај ^1H NMR спектроскопијата, за разлика од ^{13}C NMR спектроскопијата што не дава ваков вид информација.



Слика 7.27 NMR спектар на пропанска киселина (CH3CH2COOH). (Линијата на интегралот е обоена црвено, растојанието пред и по зголемувањето на висината на интегралот е означено со зелено)

Примена на NMR спектроскопија

NMR спектроскопијата се применува за идентификација и структурно одредување на органски соединенија. Ова пред сè се однесува на спектрите од прв ред, додека комплексните спектри се многу тешки за интерпретација. Сепак таа комплексност претставува извор на најсуптилни податоци што се од големо значење при анализа на сложени органски молекули.

NMR спектроскопијата како техника овозможува идентификација на структурни изомери, што со другите техники не е можно да се постигне. NMR спектроскопијата е погодна за следење динамични процеси, како што се промени во конформацијата на соединенијата. Оваа техника, како благ и недеструктивен метод, се користи во биолошките и во медицинските испитувања, како и за *in vivo* следење на метаболичните процеси.

NMR спектроскопијата има помала примена за квантитативна анализа поради ниската осетливост во споредба со другите спектрометриски методи, како и малата прецизност на мерењата на интегралите.

Примена на протонска (^1H) NMR спектроскопија

Најзначајна примена на протонската (^1H) NMR спектроскопија е идентификација и откривање на структурата на органски, металооргански и биохемиски молекули.

➤ Идентификација на компоненти

NMR протонскиот спектар, како и IR спектарот, овозможува идентификација на органските соединенија. Треба да се нагласи дека поретки се случаите кога е возможно само преку толкување на NMR спектарот недовосмислено да се одреди структурата на испитуваното соединение. Тоа е возможно само кај едноставни молекули што даваат NMR спектри од прв ред. Кај комплексни структури, NMR спектарот дава информации чија вредност доаѓа до израз кога ќе се комбинира со информациите добиени од други спектроскопски методи, како што се MS спектарот и IR спектарот. Во комбинација со овие техники, NMR спектроскопијата е моќна и незаменлива алатка за карактеризација на чисти супстанции.

➤ Квантитативна анализа

Исклучителен аспект на NMR спектроскопијата е постоењето на пропорционалната зависност помеѓу површината на пикот и бројот на јадра одговорни за појавата на тој пик. Оттука произлегува и можноста NMR спектроскопијата да се користи за квантитативна анализа. Меѓутоа високата цена на чинење и можноста од појавата на преклопување на резонантните пикови при зголемување на комплексноста на примерокот, ја ограничуваат нејзината примена во таа насока.

➤ Анализа на смеси со повеќе компоненти

Во литературата се достапни методи за определување поголем број компоненти во смеса. Така, на пример, развиен е метод за определување на аспирин, фенацетин и кофеин, присутни во фармацевтски дозирани форми. Исто така, достапен е метод за брзо определување бензен, хептан, етилен гликол и вода во смеса.

➤ Квантитативна анализа на органски функционални групи

^1H NMR спектроскопијата се применува и за определување функционални групи, како, на пример, хидроксилна група во алкохоли и феноли, алдехиди, карбоксилни киселини, незаситени јаглеродороди, амини и амиди.

➤ Анализа на елементи

NMR спектроскопијата се применува за определување на вкупната концентрација на NMR активни јадра во примерокот (елементарна анализа). Низ литературата постојат истражувања што укажуваат дека е возможно преку интегрираниот NMR интензитет на протонските пикови, квантитативно да се одреди вкупниот водород во органски смеси.

Примена на јаглерод (^{13}C) NMR спектроскопија

^{13}C NMR спектроскопијата за прв пат била проучена во 1957 година, но нејзината широка примена започнала во раните 1970-ти години. Причината за одложување на примена на оваа техника е слабиот NMR сигнал од јадрото на ^{13}C . Потребно било време да се развијат доволно осетливи инструменти што може да го детектираат NMR сигналот од јадрото на ^{13}C . NMR сигналот што го продуцира ^{13}C е слаб бидејќи овој изотоп има мала застапеност во природата (1,1%) и има мал жиромагнетен фактор (γ на ^{13}C е четири пати помал од γ на ^1H). Ова придонесува ^{13}C NMR спектроскопијата да има 6000 пати помала осетливост во споредба со протонската NMR спектроскопија. Постарите NMR спектрометри овозможувале ^{13}C NMR спектроскопијата да се применува само за проучување на многу растворливи цврсти супстанции со мала молекулска маса, чисти течности и изотопски збогатени компоненти. Развојот на FT NMR инструменти и примената на магнети со посилено магнетно поле овозможиле да се надминат овие недостатоци.

Современите NMR спектрометри овозможуваат ^{13}C NMR спектроскопијата да има поголема моќ за разоткривање на структурата на органски молекули во споредба со протонската NMR спектроскопија. ^{13}C NMR дава повеќе информации за скелетот на молекулата, отколку за периферијата. Хемиското поместување кај ^{13}C за поголемиот број на органски супстанции се движи околу 200 ppm, во споредба со хемиското поместување од 10 до 15 ppm кај ^1H NMR. Оттука преклопувањето на пиковите во ^{13}C спектрите, во споредба со ^1H спектрите, е помало. Дополнително, спин-спин спрегнување помеѓу јаглеродни атоми не се јавува бидејќи веројатноста да се јават два соседни ^{13}C атоми е многу мала. Исто така, не се јавува спин-спин спрегнувањето помеѓу ^{13}C и ^{12}C бидејќи спин квантниот број на ^{12}C е нула.

^{13}C NMR спектроскопијата, како и протонската NMR, најчесто се применува за одредување на структурата на органски молекули. Генерално, овие определувања се засноваат на хемиското поместување, додека спин-спин спрегнувањето има значително помала улога што не е случај кај ^1H NMR. Како и кај протонските спектри, овие поместувања се во однос на TMS и δ вредностите се движат во опсег од 0 до 200 ppm. Влијанието на околината е слично како и кај протонската NMR, со исклучок на влијанието на супституентите. Имено, за разлика од ^1H NMR, влијанието на супституентите не е ограничено само на најблискиот атом. Така, на пример, супституцијата со хлор на C_1 атом во n-пентан доведува до хемиско поместување на јаглеродот од 31 ppm. Кога супституцијата со хлор е на C_2 атомот, поместувањето изнесува 10 ppm; слично супституцијата на C_3 , C_4 и C_5 доведува до поместувања од 5,3 ppm, 0,5 ppm и 0,1 ppm, соодветно.

Примена на NMR спектроскопија на други јадра

Постојат повеќе од 200 изотопи што имаат магнетен момент и теоретски можат да се проучуваат со примена на NMR техниката. Најчесто проучувани се јадрата на ^{31}P , ^{15}N , ^{19}F , ^2D , ^{11}B , ^{23}Na , ^{29}Si , ^{109}Ag , ^{113}Cd и ^{207}Pb . Сепак првите три јадра (^{31}P , ^{15}N и ^{19}F) имаат најголемо значење во полето на органската хемија, на биохемијата и на биологијата.

➤ Фосфор-31 (^{31}P)

Фосфор-31, со спин-квантен број $1/2$, дава остар NMR пик со хемиско поместување од 700 ppm. Резонантната фреквенција на ^{31}P при јачина на магнетно поле од 4,7 T е 81 MHz. ^{31}P NMR спектроскопијата се применува за проучување коензими што содржат фосфор (на пример, аденозин трифосфат).

➤ Флуор-19 (^{19}F)

Флуор-19 има спин-квантен број $1/2$, а жиромагнетниот фактор има вредност блиска со вредноста за ^1H . Оттука резонантната фреквенција на флуорот на 188 MHz е незначително пониска од таа на протонот на 200 MHz, при јачина на магнетно поле од 4,69 T. Хемиското поместување на флуорот е, исто така, чувствително на влијанието на околината и се протега до 300 ppm. Дополнително, растворувачот има значително поголема улога при одредувањето на положбата на пикот на флуор во споредба со положбата на протонските пикови. ^{19}F NMR спектроскопијата се применува за проучување на структурата на органски флуорирани соединенија.

Дводимензионална FT NMR-спектроскопија

Дводимензионална NMR или 2D NMR се состои од релативно нов сет на повеќе импулсни техники што овозможува проучување на сложени спектри.

Новите повеќеимпулсни NMR методи што се применуваат во последните неколку години даваат исти информации како и конвенционалните 1D техники, но на многу поефикасен начин. Една од најчесто користените 2D NMR методи е H,H-COSY со која се поврзуваат сигналите на сите скаларно спрегнати протони во молекулата. Со стандардните 1D техники се озрачува само еден вид изохрони јадра, додека со наведената 2D техника истовремено се озрачуваат и се разгледуваат сите енергетски премини во испитуваното спектрално подрачје. Слична е ситуацијата и за ^{13}C , ^1H - хетеронуклеарно корелирана NMR-спектроскопија (позната како HETCOR или C,H-COSY) со која директно се поврзуваат сигналите на јаглерод-13 со сигналите на протоните со кои се скаларно спрегнати. Покрај наведените 2D техники, во истата група на т.н. 2D корелирани спектроскопии спаѓа и 2D NOE (или NOESY) спектроскопијата. NOESY спектарот изгледа слично на COSY спектарот, со таа разлика што ги поврзува диполарно спрегнатите протони, обезбедувајќи на тој начин информации за стереохемијата на молекулата, што со примена на конвенционалните техники би се добила само со голем број мерења.

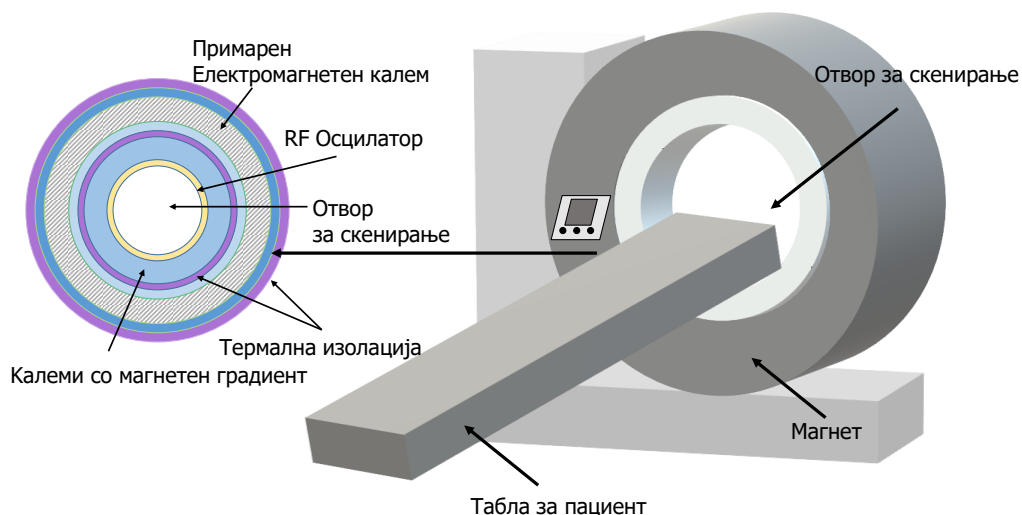
Покрај наведените најчесто користени 2D NMR методи, постојат уште повеќе од десетина 2D техники што се развиле во последните години. Бројот на овие техники постојано се зголемува, а веќе постојните се усовршуваат.

Томографија со нуклеарно магнетна резонанција

Современата радиолошка дијагностика не може да се замисли без постоењето томографија со нуклеарно-магнетна резонанција (*Nuclear magnetic resonance imaging*, NMRI или *Magnetic resonance imaging*, MRI). MRI е широко

применувана неинвазивна техника што се користи за да се добие визуелизација – детаљна слика на внатрешните органи и ткива. За разлика од другите медицински отсликувачки методи, како што се компјутерската томографија или рентгент снимањата, оваа техника користи нејонизирачко зрачење. Тоа означува дека овој метод овозможува да се добие слика на пресек на ткиво без да постои ризик од оштетување на ткивото под дејство на зрачењето.

Кај оваа техника применети се основните принципи на NMR спектроскопијата. Во човековото тело, водородите атоми (протони) од молекулата на водата и мастите, сочинуваат 63% од масата на возрасен човек. Нуклеарна магнетизација на водородните атоми во човековото тело се постигнува со примена на силно статично магнетно поле. Примената на ротирачко (променливо) магнетно поле овозможува јадрата со различни положби во телото да прецесираат со различна брзина, односно да имаат различни резонантни фреквенции. Шематски приказ на NMR томограф е даден на Слика 7.28. Во состав на апаратот има компјутер што ги прима, ги обработува и визуелно ги прикажува сигналите. Компјутерот ги препознава разликите во емитираната енергија и врз основа на тоа создава слика. На снимките или на екранот погустите ткива се прикажуваат како посветли, а оние со помала густина се потемни.



Слика 7.28 Шематски приказ на NMR-томограф (MRI скенер)

Со оваа техника со примена на пулсна RF ексцитација на цврсти или на полуцврсти примероци може да се добијат 2D слики или 3D волумени во која било ориентација (Слика 7.29). Овие слики се од особено значење за дијагностиката бидејќи постојат разлики помеѓу сликите добиени од нормални (здрави) и туморски ткива.



Слика 7.29 NMR томографска слика на мозок

МАСЕНА СПЕКТРОМЕТРИЈА

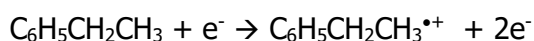
Основата на оваа инструментална техника е создавање брзодвижечки јони (во гасна состојба) од молекулите или од атомите во примерокот за анализа, разделување на јоните според нивниот однос маса/полнеж (m/z) и детекција според видот и количината. Масената спектрометрија е релативно нова, но и една од најразвиените техники во инструменталните анализи. На почетокот била користена (за што и била создадена) за да се докаже дека голем број елементи постојат како изотопи со различни маси, а денес се применува како основна техника за разоткривање на структурата на биомолекулите, особено на протеините со големи молекулски маси. Покрај тоа што масената спектрометрија дава информации за квалитативниот состав на аналитите во комплексни смеси, како и информации за структурата на неорганички, органички и биолошки молекули и за изотопските односи на атомите во примероците, таа се користи и за квантитативно определување на елементи и на молекули во многу ниски концентрации (од редот на ppb) во испитуваните примероци.

Принцип на масената спектрометрија

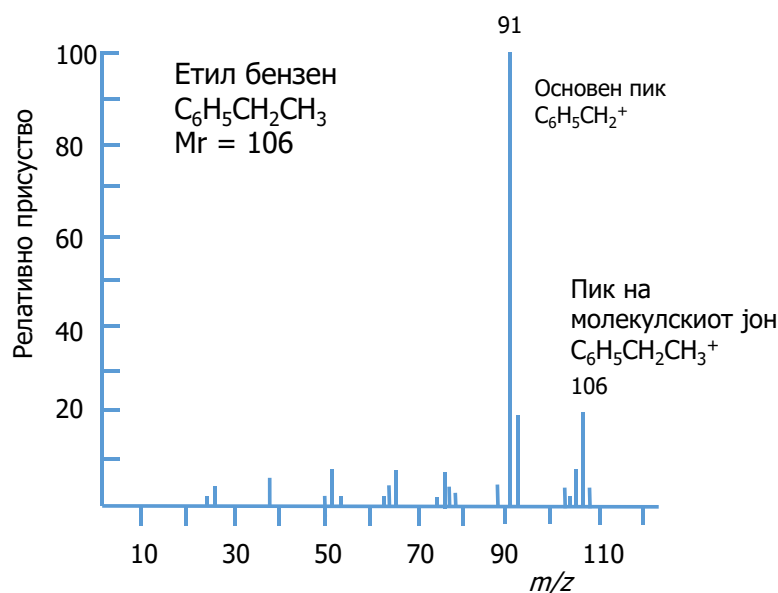
Масениот спектрометар е инструмент што ги разделува јонизираните атоми, молекули или молекулски фрагменти во гасовита состојба според разликите во нивниот однос маса/полнеж. Односот маса/полнеж се означува со m/z , каде масата m е изразена во унифицирани атомски масени единици (u), а z е полнежот на јонот. Една унифицирана атомска масена единица е еднаква на $1/12$ од масата на атомот на најстабилниот и најраспространетиот во природата - изотопот на јаглеродот (^{12}C). Според тоа, масата на атомот на ^{12}C е еднаква на 12 u. Синоним за унифицираната масена единица е единицата далтон (Da): 1 u = 1 Da. Во интернационалниот систем на единици (SI), единицата за маса се изразува како 1 u = $1,665402 \times 10^{-27}$ kg. Ознаката z го претставува бројот на полнежи на јонот и може да биде позитивен или негативен цел број, како, на пример, -1, +1, +2, +3 итн. Бројот на полнежи не е еднаков со вкупниот полнеж на јонот (q) изразен во кулони (C). Вкупниот полнеж на јонот се пресметува според равенката: $q = z \cdot e$, каде што e е количеството електричество на еден електрон ($1,6 \times 10^{-19}$ C). Бидејќи најголем број од јоните во масената спектрометрија се единечно наелектризирани, изразот маса/полнеж најчесто се скратува во изразот маса. Иако оваа кратенка е широко употребувана во литературата за масената спектрометрија, таа не е секогаш исправна.

Молекулски масени спектри

На Слика 8.1 е даден масениот спектар на етил бензенот (со молекулска маса од 106 Da), како приказ за начинот на кој најчесто се прикажуваат податоците на масените спектри. За да се добие масениот спектар на соединението, етил бензенот се преведува во гасовита состојба, а неговата пара се бомбардира со млаз од електрони. При судир меѓу молекулите на етил бензенот (аналитот) и електроните доаѓа до избивање на електрон од молекулата на анализот и формирање молекулски јон M^+ , според реакцијата:



Јонизираната молекула $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_3^{*+}$ е молекулскиот јон на етил бензенот. Точката десно горе во формулата на молекулскиот јон означува дека молекулскиот јон е катјон на радикалот, што има иста молекулска маса со молекулот од кој настанал.



Слика 8.1 Масен спектар на етил бензен

Молекулите на анализот ја зголемуваат својата енергија по сударот со електроните, што е причина за нивно побудување. Релаксацијата на молекулскиот јон што притоа може да настане доведува до фрагментација на дел од него и создавање јони со помала маса. На пример, главен продукт од фрагментацијата на молекулскиот јон на етил бензенот е бензилиум јонот $C_6H_5CH_2^+$ што настанува со откинување на CH_3 групата. Исто така, и други помали фрагменти се формираат во помали количества при фрагментацијата на молекулскиот јон.

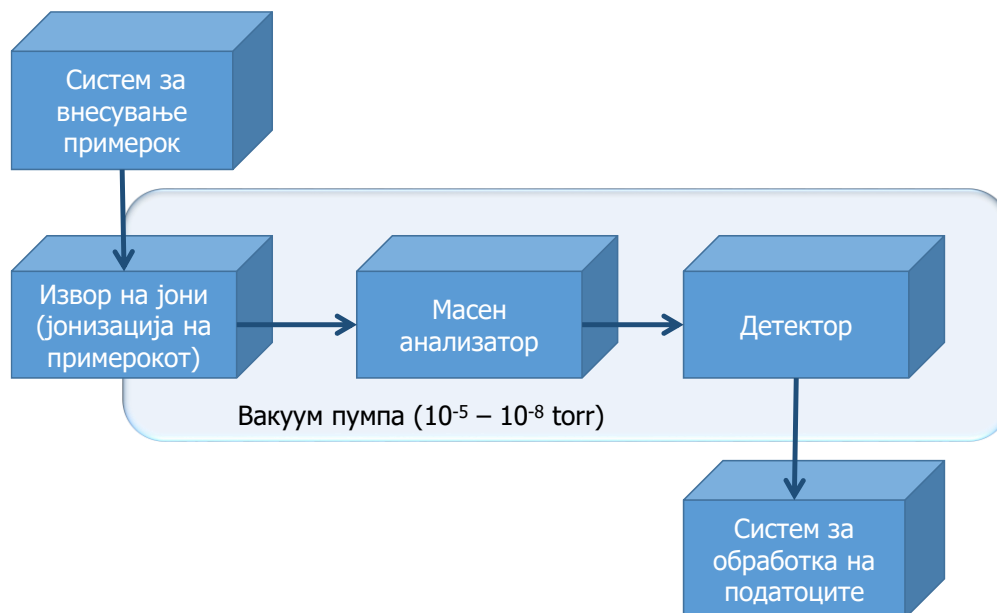
Позитивните јони добиени со електронско бомбардирање се разделуваат во масениот спектрометар врз основа на разликите меѓу нивниот однос маса/полнеж. Јоните со еден позитивен полнеж ($z = 1$) имаат однос m/z , еднаков на масата на јонот (изразена во унифицирани атомски единици). Поради тоа, молекулскиот јон на етил бензенот (кој има еден позитивен полнеж) има m/z однос еднаков на молекулската маса на соединението. Од Слика 8.1. се гледа дека масениот спектар графички претставува графички приказ во кој на апсцисата се нанесува односот маса/полнеж, а на ординатата – релативниот интензитет (релативно присуство) на јоните добиени од анализот. Во секој масен спектар, најголемиот пик се нарекува основен пик, чија вредност за релативниот интензитет, по договор, е 100. Висините на другите пикови во спектарот се пресметуваат како процент од висината на основниот пик (што на ординатата се отчитува како релативен интензитет во однос на интензитетот на основниот пик). Модерните масени спектрометри се програмирани да го препознаат основниот пик, а сите други пикови да ги изразат во релативни единици (интензитет) во однос на основниот пик.

Инструменти за масена спектрометрија

Инструментот за масена спектроскопија, масениот спектрометар (Слика 8.2), е составен од: (1) систем за внесување на примерокот, (2) јонски извор, (3) масен анализатор и (4) детектор. Сите компоненти на инструментот, со исклучок на системот за внесување на примерокот и јонскиот извор, се под вакуум услови и тоа: 10^{-6} - 10^{-8} torr¹ во деловите каде што јоните се разделуваат според m/z односот, т.е. во масениот анализатор, и 10^{-4} - 10^{-5} torr во некои јонски извори, каде што се создаваат јоните. За одржување на вакуумот во масениот спектрометар се

¹ 1 torr = 1 mmHg = 133,322368 Pa

користат вакуум пумпи. Потребата за висок вакуум се јавува бидејќи во услови на висок притисок (атмосферски притисок) доаѓа до појава на поништување на електроните и на полнежот/-ите на јонизираните молекули или на молекулските фрагменти при судир со молекулите на гасот присутни во системот. Во таков случај, ќе се намали бројот на јонизираните молекули/молекулски фрагменти кои преку масениот анализатор ќе стигнат до детекторот. Со тоа значително ќе се намали и осетливоста на спектрометарот да детектира аналити во ниски концентрации.



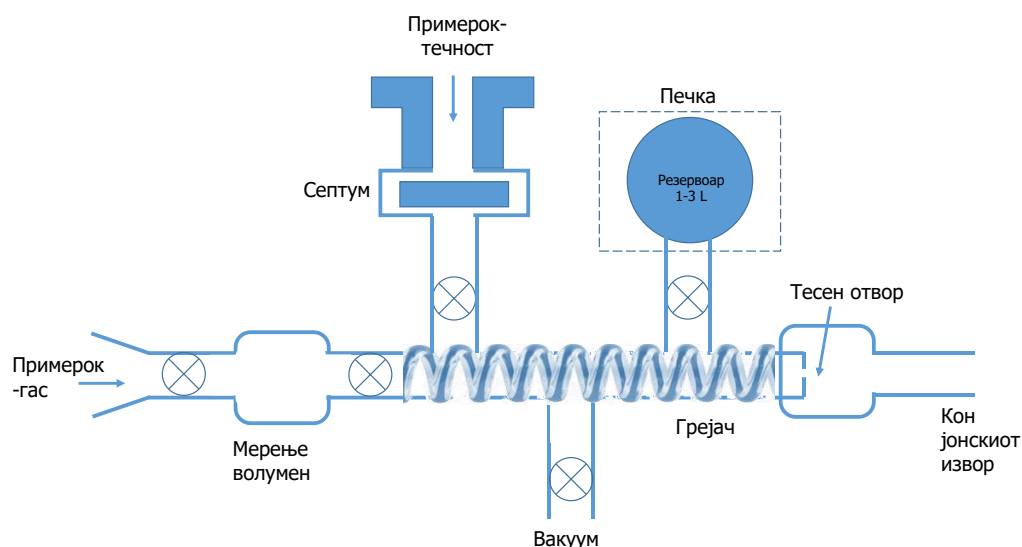
Слика 8.2 Шематски приказ на деловите на масен спектрометар

Системи за внесување примерок

Целта на системот за внесување примерок е да обезбеди внесување на репрезентативен примерок во јонскиот извор со минимален губиток на вакуумот од спектрометарот. За да може да се анализираат различни примероци, модерните масени спектрометри обично се опремени со неколку видови системи за внесување примерок, и тоа: системи за гасна експанзија, системи за директно внесување, хроматографски и електрофоретски системи за внесување примерок.

Системи за гасна експанзија

Системите за гасна експанзија претставуваат класични и наједноставни системи за внесување примерок. Примерокот се преведува во гасна состојба пред да се внесе во јонизацискиот регион што е под вакуум. На Слика 8.3. шематски е прикажан типичен систем што се користи за внесување гасовити и течни примероци што имаат температури на вриење до околу 500°C. За гасовити примероци, мал точно одмерен волумен на гас се внесува во издолжен одмерен простор затворен меѓу два вентила. Потоа гасот се пушта да се експандира во резервоар. За течни примероци, мало количество примерок се внесува во резервоарот, обично со микролитарски шприц. Во двата случаи, примерокот се наоѓа под вакуум од 10^{-4} до 10^{-5} torr. За примероци што имаат температури на вриење поголеми од 150°C, потребно е резервоарот и цевките низ кои се спроведува примерокот да се одржуваат на покачена температура. Примерокот во гасна состојба потоа протекува во јонизацискиот регион на спектрометарот низ метална или стаклена дијафрагма што содржи еден или повеќе тесни отвори. Системот е најчесто обложен со стакло за да се избегне губитокот на поларни аналити заради можни процеси на адсорпција.



Слика 8.3 Шематски приказ на систем за внесување примерок

Системи за директно внесување примерок

Цврстите примероци и неиспарливите течности може да се внесат во јонизацискиот регион преку посебен држач или сонда. Сондата се внесува во јонизацискиот извор преку вакуум бртва. Системот на вакуум бртва го ограничува волуменот на воздух што мора да биде испумпан од системот по внесување на сондата во јонизацискиот регион. Сондите се користат и за внесување мали количества примероци за анализа, бидејќи ваквиот начин на внесување на примерокот во спектрометарот е поефикасен отколку внесувањето преку системот за гасна експанзија.

Примерокот за анализа се сместува на површината на стаклена или на алуминиумска капилара, на жица или мал вдлабнат сад, кои се наоѓаат на врвот на сондата. Сондата се внесува неколку милиметри во јонизацискиот извор, каде се загрева по електричен пат. Во услови на вакуум и покачена температура, доаѓа до испарување и јонизирање на примерокот во јонизацискиот извор.

Нискиот притисок во јонизацискиот регион и близината на примерокот до јонизацискиот извор овозможува добивање спектри на термички нестабилни супстанции. Исто така, нискиот притисок го зголемува испарувањето на релативно неиспарливите супстанции во јонизацискиот регион. На овој начин е овозможено да се анализираат неиспарливи супстанции, како што се: јаглехидрати, стероиди, органометални соединенија, како и полимерни материјали со мала молекулска маса.

Хроматографски и електрофоретски системи за внесување примерок

Хроматографските инструменти имаат можност да разделат смеси од гасовити или од течни супстанции, а разделените супстанции потоа да се детектираат со внесување во масен спектрометар. Спрегата хроматографски систем–масен спектрометар претставува моќна аналитичка алатка, помоќна дури и од двата типа инструменти поединечно. Најголемиот проблем што треба да се надмине при поврзувањето на овие два типа инструменти е фактот што хроматографските системи работат при атмосферски притисок со голема количина на носечки гас (мобилна фаза кај системите за гасна хроматографија) или течна мобилна фаза (кај системи за течна хроматографија). Од друга страна, масените спектрометри работат под низок притисок (вакуум). Поради тоа, носечкиот гас или

течната мобилна фаза мора да се „отстранат“ без да се изгуби анализот пред да биде внесен во евакуираниот јонизациски извор или во масениот анализатор. Или алтернативно, јонизацијата на анализите може да се изврши во услови на атмосферски притисок во присуство на молекулите од мобилната фаза (гасна или течна), а потоа селективно да се одвојат нивните јони во регион со низок притисок. Истовремено, најголемиот дел од молекулите на мобилната фаза мора да се пренасочат или да се исфрлат по друг пат.

Јонски извори

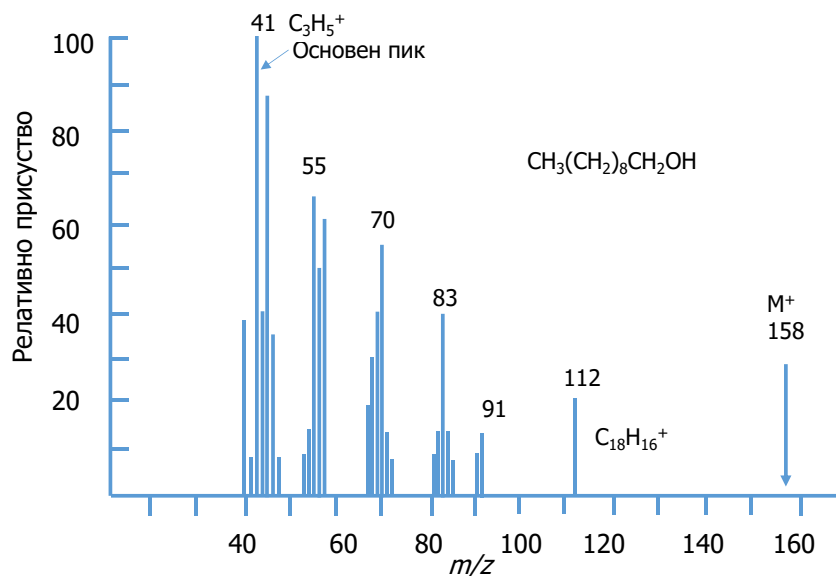
Првиот чекор во масената спектрометриска анализа е создавање јони од анализите во гасовита состојба. Обемот и примената на масената спектрометрија се определени од процесот на јонизација. Изгледот на масениот спектар за дадена молекула зависи од употребениот метод за создавање јони. Во Табела 8.1 се дадени јонските извори што се користат во молекулската масена спектрометрија. Јонските извори се делат на две големи групи: *гасно-фазни извори* и *десорпциски извори*. Кај првите три извори во табелата, примерокот прво се испарува, а потоа се јонизира. Кај втората група извори, примерокот што е во течна или во цврста состојба директно се преведува во гасовити јони. Предност на десорпциските извори е можноста да се определат неиспарливи и термички нестабилни примероци. Денешните масени спектрометри се опремени со дополнителни прибори што овозможуваат замена и употреба на различни извори.

Табела 8.1 Јонски извори за масена спектрометрија

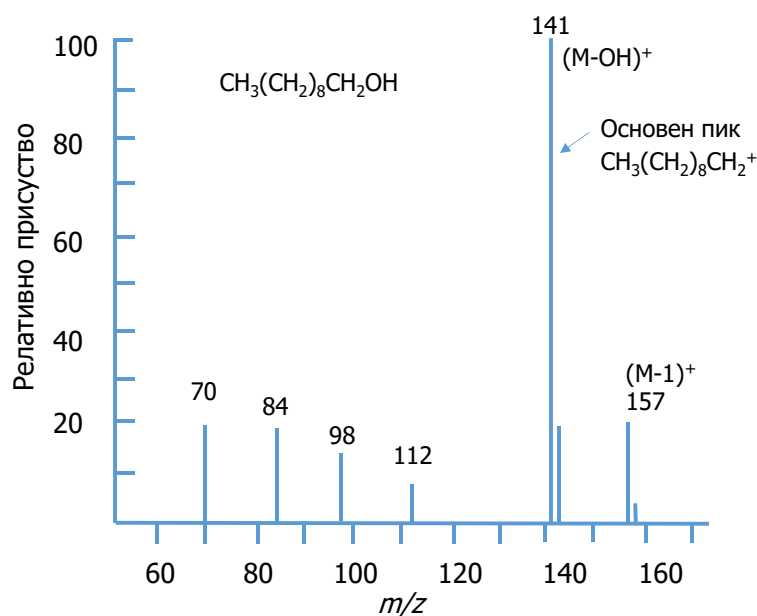
Јонски извор (основен тип)	Име на јонскиот извор	Јонизирачки агенс
Гасно-фазни јонски извори	Електронска јонизација	Електрони со висока енергија
	Хемиска јонизација	Јони од реагенс гас
Јонски извори на принцип на десорпција	Јонизација преку бомбардирање со брзи атоми	Зрак од атоми со висока енергија
	Ласер десорпциска јонизација со помош на матрикс	Зрак од ласер
	Електроспреј јонизација	Високо електрично поле
	Хемиска јонизација под атмосферски притисок	Реагенс јони
	Термоспреј јонизација	Висока температура

Гасно-фазните извори обично се употребуваат за термички стабилни супстанции што имаат температура на вриење помала од 500°C. Тоа ја ограничува употребата на овие извори за анализа на супстанции со молекулска маса помала од околу 10³ Da. Десорпциските извори, пак, може да се употребат за анализа на аналити со поголеми молекулски маси (од околу 10⁵ Da).

Јонските извори може да се класифицираат и како тврди и како меки извори. Тврдите извори им пренесуваат на молекулите доволно енергија што ги побудува на повисоки енергетски нивоа. Релаксацијата на овие молекули резултира со кинење на хемиските врски, создавајќи фрагментни јони што имаат помал однос маса/полнеж во однос на молекулскиот јон. Меките извори предизвикуваат помала фрагментација на молекулите. Поради тоа, добиените масени спектри често содржат само пик на молекулскиот јон и неколку други пикови. Разликата во масените спектри на иста супстанција, добиени со тврд и со мек јонски извор може да се види на Слика 8.4 и на Слика 8.5.



Слика 8.4 Масен спектар на 1-деканол добиен од тврд извор на јонизација



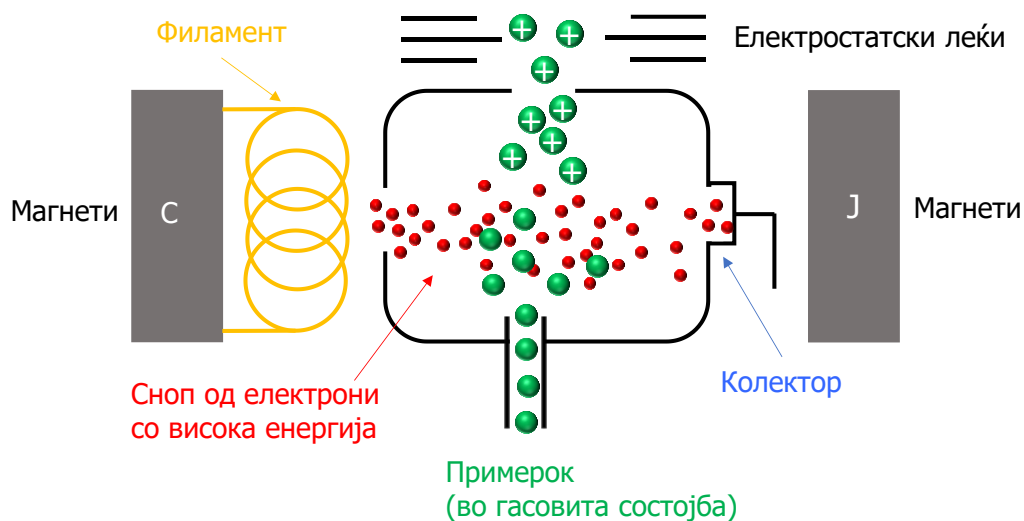
Слика 8.5 Масен спектар на 1-деканол добиен од мек извор на јонизација

Спектрите добиени со тврд и со мек извор се подеднакво важни при масената анализа. Бројните пикови во спектарот добиен од тврд извор даваат корисни информации за структурата на испитуваниот аналит. Спектрите добиени од мек извор, пак, даваат точни податоци за молекулската маса на аналитот.

Извор на електронска јонизација

Изворот на електронска јонизација (*Electron impact, EI*) е најчесто употребуван извор на јони за масената спектрометрија на органски молекули (Слика 8.6). Тука примерокот се загрева на доволно висока температура при што преминува во молекулска пара. Потоа, молекулите на пареата се јонизираат преку бомбардирање со сноп од електрони со висока енергија. Електроните се емитуваат од загреана (усвитена) волфрамова или рениумова жица (филамент). Забрзувањето на електроните (при што тие се здобиваат со голема енергија) се

постигнува со примена на електричен потенцијал меѓу емитирачката жица (филамент) и анодата од околу 70 V (50-100 V).



Слика 8.6 Извор на електронска јонизација

Од сликата се гледа дека патеките на електроните и на молекулите од примерокот се сечат во центарот на изворот под прав агол, каде што и настанува јонизацијата. Енергијата на електроните е 10^3 пати поголема од онаа потребна за раскинување на врската. Примарни продукти на јонизацијата се единечно позитивно наелектризирани јони, што настануваат со електростатско избивање на електрони од молекулите на примерокот под дејство на високоенергетските емитувани електрони во изворот. Електронската јонизација не е многу ефикасен процес, затоа што само околу една молекула на милион е подложна на основната реакција:



каде што M е молекулата на анализот, а M^{*+} е неговиот молекулски јон. Настанатите јони во центарот на изворот, под дејство на висок потенцијал од 10^3 до 10^4 V, се забрзуваат и ја добиваат крајната брзина пред да влезат во масениот анализатор.

Високата енергија пренесена на молекулските јони во изворот резултира со значајна фрагментација на органските молекули, при што се добиваат голем број позитивни јони со различна маса што е помала (понекогаш поголема) од масата на молекулскиот јон. Добиените јони со помала молекулска маса се нарекуваат ќерки јони, а молекулскиот јон од којшто се добиваат родителски јон. Овој високоенергетски јонски извор спаѓа во групата на тврди извори на јонизација.

Изворот на електронска јонизација може да формира и позитивни и негативни јони, па затоа може да се искористи како извор за масена спектрометрија на негативни јони. Негативните јони се формираат од молекули што содржат киселински групи или електронегативни атоми.

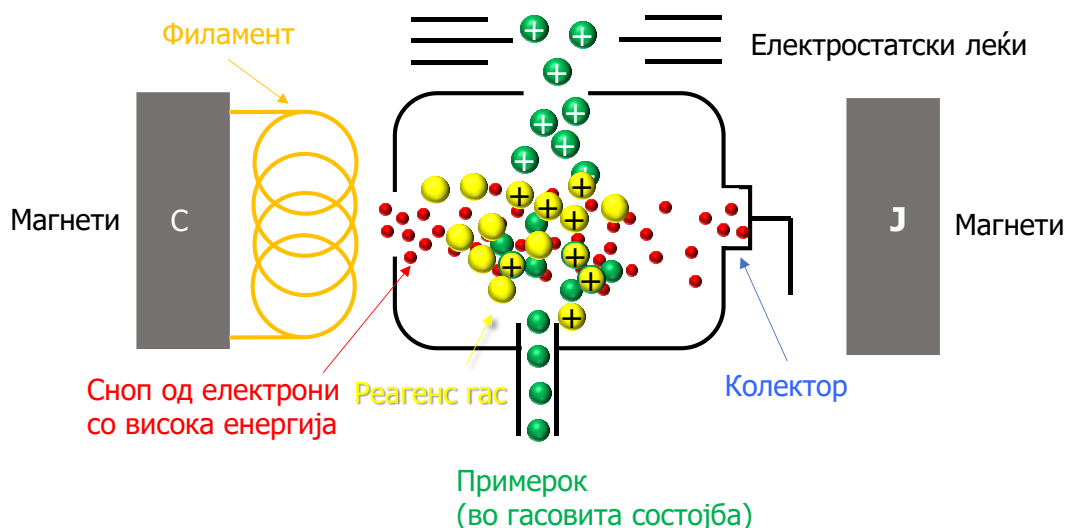
Судирите меѓу молекулите и јоните во јонизацискиот извор може да доведат до формирање јони со поголем однос m/z од молекулскиот јон. Меѓу најчестите јон-молекулски реакции е реакцијата меѓу протон, H^+ , и молекула на анализот, M , при што се добива протонирана молекула (молекулски јон): MH^+ или $(M+H)^+$, со молекулска маса за единица поголема од онаа на молекулата ($M+1$). Една од причините поради која мора да се одржува вакуум во овој јонизациски извор е да се спречат реакциите меѓу јоните и молекулите коишто би ја усложниле интерпретацијата на масените спектри.

Изворот на електронска јонизација е погоден за употреба и дава добра чувствителност при анализа на аналити во трагови. Обемната фрагментација, а со тоа и мноштвото пикови во спектарот се значајна предност на овој извор, при недвосмислената идентификација на аналитите. Фрагментацијата може да биде и недостаток во случаи кога таа доведува до исчезнување на пикот на молекулскиот јон, со што е оневозможено одредувањето на молекулската маса на аналитот. Друго ограничување на изворот е потребата примерокот да биде преведен во гасовита состојба пред јонизацијата. Испарувањето на примерокот (што се одигрува на покачена температура) може да доведе до распаѓање на термолабилните аналити. Ефектите на термичкото распаѓање може да се минимизираат со испарување на примерокот во близина на јонизацискиот регион. Меѓу другото, при услови на низок притисок во јонизацискиот регион, испарувањето се одвива на пониски температури. Овој извор се користи за јонизација на аналити со молекулска маса помала од околу 10^3 Da.

Извор на хемиска јонизација

Хемиската јонизација (*Chemical ionization, CI*) е втората најчесто применувана постапка за добивање јони во масената спектрометрија.

Изворот на хемиска јонизација (Слика 8.7) спаѓа во групата на меки јонски извори, бидејќи предизвикува помала фрагментација на молекулите и дава поедноставни масени спектри во споредба со изворот за електронска јонизација. Важно е тоа што, кога се користи овој извор, молекулскиот јон има поголем релативен интензитет. Тоа овозможува лесно определување на молекулската маса на аналитите. Ако хемиската јонизација е доволно „мека“, масениот спектар може да го содржи само пикот на молекулскиот јон. Малата фрагментација дава помалку информации за структурата на аналитите. Ако спектарот што е добиен со електронска јонизација не го содржи пикот на молекулскиот јон, тогаш со комбинирање на податоците со оние од спектарот добиен со хемиска јонизација може да се интерпретираат спектрите на непознатите супстанции. Овие два типа на јонизација се комплементарни една со друга при идентификацијата и квантификацијата на непознатите супстанции.

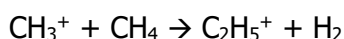
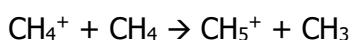


Слика 8.7 Јонски извор на хемиска јонизација

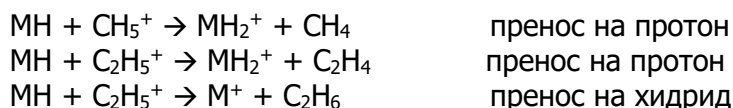
При процесот на хемиска јонизација, во јонизацискиот регион се внесува голем вишок на реагенс гас, како што се: метан, пропан, изобутан или амонијак. Притисокот во јонизацискиот регион на овој извор е неколку реда на големина

повисок (1 torr) од оној во изворот за електронска јонизација (10^{-5} torr). Смеса од гасот реагенс и примерокот се внесува во јонизацискиот регион, каде што подлегнува на електронско бомбардирање. Во смесата, гасот реагенс е присутен со околу 10^3 до 10^4 пати поголемо количество од примерокот. Поради оваа голема концентрациска разлика, електроните реагираат исклучиво со молекулите на гасот реагенс. Обично се користат позитивните јони, за позитивна хемиска јонизација, но за јонизирање на аналити што содржат електронегативни атоми обично се користи негативната хемиска јонизација. Притоа, јонизацијата на молекулите од примерокот настанува индиректно, преку судир со јонизираниите молекули на реагенсот. Овој судир е високореактивен и вклучува пренос на протон или хидрид.

На пример, еден од најупотребуваните гасови реагенси е метанот. При јонизација на неговите молекули под дејство на електроните се создаваат јоните CH_4^+ , CH_3^+ и CH_2^+ . Првите два јона доминираат и претставуваат околу 90% од реакцискиот продукти. Овие јони реагираат со неутралните молекули на метанот и даваат:



При судар на CH_5^+ и C_2H_5^+ јоните со молекулите на аналитот МН, доаѓа до јонизација на молекулите преку пренос на протон од јоните на гасот реагенс, при што се добива MH^+ јон или пак до пренос на хидрид од молекулите на аналитот на јоните на реагенсот, при што се добива јон со маса за една единица помала од маса на аналитот или $(\text{M}-\text{H})^+$ јон:



Пренос на хидрид од М обично настанува во случаите кога аналитот е заситен јаглеродород. Дополнително, јонизираниот гас реагенс може да реагира со аналитот М формирајќи, на пример, $(\text{M}+\text{C}_2\text{H}_5)^+$ јон со $m/z = (\text{M}+29)$, како резултат на пренос на C_2H_5^+ јонот. Присуството на таков *адукт* јон со маса за 29 Da поголема од таа на молекулскиот јон (нормално доколку се користи метан како реагенс гас) во масениот спектар (добиеен со хемиска јонизација на примерокот) е добра потврда за идентитетот на молекулскиот јон.

Бројни комерцијални извори на јонизација се дизајнирани така да може да се користат наизменично и електронската и хемиската јонизација. На тој начин е искористена комплементарноста на овие два типа јонизација во интерпретацијата на масените спектри.

Главната предност на хемиската јонизација е малата фрагментација на молекулите од примерокот, што дава интензивни (добро дефинирани) пикови на $m/z = (\text{M}+1)$ или $(\text{M}-1)$, како резултат на додавање или одземање протон во присуство на јон од гасот реагенс, овозможувајќи на тој начин определување на молекулската маса на аналитите.

Јонски извори базирани на принцип на десорпција

Молекулите со голема молекулска маса, како што се протеините и полимерите, не се термички стабилни за да испарат без да се разградат. Изворите на јонизација на принцип на десорпција овозможуваат директна јонизација на цврсти супстанции, олеснувајќи ја анализата на големите молекули. Постојат неколку извори на јонизација на принцип на десорпција, во коишто на цврстите или течните примероци им се воведува енергија во различни форми, на начин што овозможува директно формирање на гасовити јони. Добиеените спектри се многу

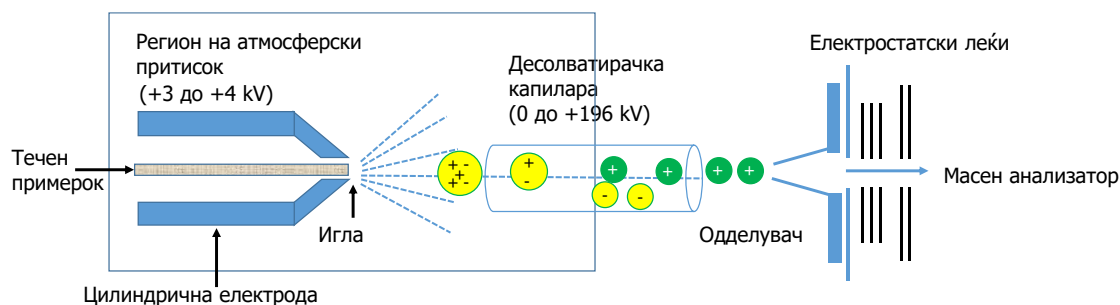
поедноставени и често се состојат само од молекулскиот јон (M^+) или од протонираниот молекулски јон ($[M + H]^+$).

Извори на јонизација во услови на атмосферски притисок

Два главни типови на извори на јонизација што работат во услови на атмосферски притисок се изворот на електроспреј јонизација (*Electron Spray Ionization, ESI*) и изворот на хемиска јонизација во услови на атмосферски притисок (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI*).

Електроспреј јонски извор

Електроспреј јонизацијата настанува при услови на атмосферски притисок и покачени температури (Слика 8.8).



Слика 8.8 Електроспреј јонски извор

Растворот од примерокот се испумпува низ челична капиларна игла со проток од неколку микролитри во минута. Иглата се одржува на потенцијал од неколку киловолти (3-8 kV) во однос на цилиндричната електрода што ја обиколува. Под дејство на високиот потенцијал, растворот на примерокот што излегува од капиларната игла е во вид на фини наелектризирани капки. Високонаелектризираните капки минуваат низ десолваторска капилара, при што доаѓа до испарување на растворувачот, а капките се смалуваат и минуваат низ серија од „експлозии“ како резултат на електростатските интеракции меѓу јонизираниите честички во нив. Секоја „експлозија“ формира сè помали и помали капки. Кога капките ќе станат доволно мали, настанува десорпција на јоните на анализаторот од капките во околниот гас. Тогаш јоните навлегуваат во масениот анализатор. Капките и јоните на патот до масениот анализатор минуваат низ серија од отвори и одделувачи. Тие служат да ги пренасочат и да ги отстранат неиспарените капки и вишокот од испарениот растворувач од регионите со висок вакуум, каде што јоните на анализаторите се забрзуваат и се анализираат според односот маса/полнеж. За десолвација на капките се користи проток на загреан гас од азот или од аргон. Одделувачите играат улога на брзински филтри. Потешките јони имаат помала брзина од лесните и при забрзувањето низ отворите (под дејство на електричен потенцијал) ја задржуваат својата патека на движење до масениот анализатор. За разлика од нив малите јони (како и пареите од растворувачот) се отстрануваат (т.е. се испумпуваат), овозможувајќи намалување на притисокот без да се наруши внесот на јоните во масениот анализатор.

Предноста на електроспреј јонизацијата е во фактот што големите молекули, особено биомолекулите како што се протеините, даваат серија јони со повеќекратни полнежи, M^{n+} или $(M+nH)^{n+}$ со мала или со никаква фрагментација. На пример, некој аналит M може да формира јони од типот M^{9+} , M^{10+} , M^{11+} и така натаму. Ако молекулската маса на аналитот M е 14300 Da, тогаш во неговиот масен спектар ќе се појават пикови на m/z вредности од $(14300/9) = 1588,9$; $(14300/10) = 1430,0$ и $(14300/11) = 1300,0$. Овие јони се наоѓаат на многу пониски вредности

за m/z отколку единечно наелектризираниот молекулски јон M^+ на m/z од 14300. Предноста на создавањето повеќекратно наелектризирани јони со мал однос m/z е можноста да се користат поевтини масени анализатори со ограничен опсег на маса што може да биде разделена/определена. Исто така, јоните со низок однос m/z , но со повеќекратен полнеж полесно се разделуваат во анализаторите.

Во праксата, аналитичарот не знае колкаво е наелектризирањето на јонот што дал пик во спектарот, но знае дека поединечните пикови во спектарот често се разликуваат само за еден полнеж. Со помош на компјутерски алгоритми може да се најде m/z односот на молекулскиот јон M^+ , а со тоа да се определи и молекулската маса на анализаторите.

Денес, електроспреј јонизацијата во комбинација со масената спектрометрија (ESI/MS) претставува една од најзначајните техники за анализа на биомолекули (како, на пример, полипептиди, протеини и олигонуклеотиди), а наоѓа примена и во карактеризација на неоргански супстанции и синтетски полимери.

Важна карактеристика на електроспреј јонскиот извор е можноста да се адаптира за директно внесување на примерокот од колоните на течниот хроматограф (HPLC систем) или системот за капиларна електрофореза. Постои верзија на електроспреј јонски извор што е погоден за брзо внесување на примерокот од колоните на хроматографските системи (од 3-6 mL/min) и се нарекува *јон спреј извор*.

Извор на хемиска јонизација при атмосферски притисок

Како и кај електроспреј јонскиот извор, примерокот се распрскува во спреј од ситни капки, потпомогнато со проток на азот. Капките не се наелектризирани (разлика од ESI изворот). Гасот за десолватација (азот) се загрева од греана керамичка цевка низ која минува растворот на примерокот. На тој начин, на врвот од керамичката цевка, потпомогнато од азотот, се формира спреј од ситни капки во кои растворувачот постепено испарува. На крајот на цевката примерокот е подложен на празнење од електрони, емитувани од остра метална игла наелектризирана на неколку илјади волти. При празнењето се формираат најпрво N_2^+ , O_2^+ , H_2O^+ и NO^+ јони, од воздухот, кои преку сложени реакции на пренос на полнежот создаваат т.н. реагенс јони ($[X + H]^+$ ако јонизацијата дава позитивни јони и $[X - H]^-$ ако при јонизацијата се формираат негативни јони; каде што X е молекула на растворувачот). При судар меѓу реагенс јоните и молекулите на примерокот се создаваат стабилни јони на примерокот. Крајниот чекор на APCI е ист како и во класичниот извор на хемиска јонизација.

Извор на матрикс-олеснета десорпциска јонизација со ласер (MALDI)

Овој извор претставува нов метод за јонизација опишан за прв пат во 1988 година, речиси истовремено, од германски и од јапонски научници. Овој извор на десорпциска јонизација е особено применлив за масено-спектроскопска анализа на молекули со голема молекулска маса, какви што се полимерите и големите биомолекули како: пептидите, протеините и олигосахаридите. Се заснова на употреба на пулсирачки ласер, фокусиран на површината на цврст примерок, што предизвикува аблација (еродирање) на примерокот од површината со истовремена негова јонизација. За таа цел се користат различни ласери, на пример: инфрацрвени (IR) ласери како CO_2 ласерот ($\lambda = 10,6 \mu m$) или ултравиолетови (UV)

ласери како Nd:YAG² ($\lambda = 266 \text{ nm}, 355 \text{ nm}$). Така, со одбирање одредена бранова должина може да се постигне селективна јонизација на посакуваниот аналит.

Ласерот може да се фокусира на мала површина (со дијаметар до неколку микрометри) и на тој начин да му соопшти голема енергија на примерокот за анализа. Оваа енергија мора веднаш да биде расеана (диспергирана) меѓу молекулите, за да не предизвика нивна фрагментација. За таа цел молекулите на аналитот се мешаат во матрикс од мали органски молекули, при што ласерот предизвикува десорпција од површината и јонизација на големите молекули на аналитот (со M_r дури и над 100000 Da), придружена со само мала фрагментација. Значи, функцијата на матриксот е да ја расее големата енергија апсорбирана од ласерот и така да ја намали фрагментацијата на молекулите на аналитот.

Матриксот мора силно да апсорбира на брановата должина на ласерот што се користи за озрачување на примерокот за анализа. Од друга страна пак, аналитот не треба значително да апсорбира на таа бранова должина за да не дојде до фрагментација на неговите големи молекули. Истовремено, матриксот мора да е стабилен во вакуум, хемиски да не реагира и да има доволно мала маса за лесно да сублимира. Супстанции што се користат како матрикс за MALDI се: 2,5-дихидрокси бензоева киселина, 3-хидрокси пиколинска киселина (3-хидроксипиридил-2-карбоксилна киселина) и 5-хлоро салицилна киселина за UV подрачјето од спектарот и карбоксилни киселини, алкохоли и уреа за IR подрачјето од спектарот (Табела 8.2).

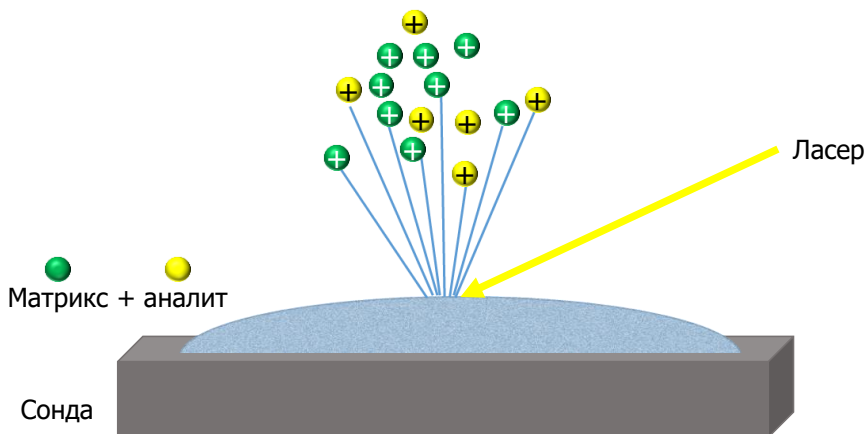
Табела 8.2 Најчесто употребувани матрикси за MALDI со брановите должини на кои се користат

Матрикс	Бранова должина		
Никотинска киселина	266 nm	220-290 nm	2,94 μm , 10,6 μm
2,5-дихидрокси бензоева киселина	266 nm	337 nm	355 nm
Ванилинска киселина	266 nm		
2-амино бензоева киселина	266 nm	337 nm	355 nm
Пиразин карбоксилна киселина	266 nm		
3-аминопиразин-2-карбоксилна киселина	337 nm		
Ферулна киселина	266 nm	377 nm	355 nm
Синапинска киселина	266 nm	337 nm	355 nm
Кафеична киселина	266 nm	337 nm	355 nm
3-нитробензил алкохол	266 nm		
Сукцинска киселина	2,94 μm	10,6 μm	
Глицерол (течен)	2,79 μm	2,94 μm	10,6 μm
Уреа (цврста)	2,79 μm	2,94 μm	10,6 μm

Примерокот за анализа за MALDI обично се подготвува со мешање на 1 - 2 μL од растворот на примерокот со 5 - 10 μL од растворот на матриксот. Капка (<2 μL) од смесата се поставува на т.н MALDI сонда и се остава да се исуши на собна температура. По испарувањето на растворувачот, кристализираниот цврст примерок на сондата се става во масениот спектрометар (т.е. во MALDI). Интензивното пулсирачко ласерско зрачење е насочено на површината на цврстиот примерок за анализа. Молекулите на матриксот го апсорбираат ласерското зрачење што доведува до брзо загревање на матриксот. Загревањето на матриксот предизвикува десорпција на интактните молекули на аналитот заедно

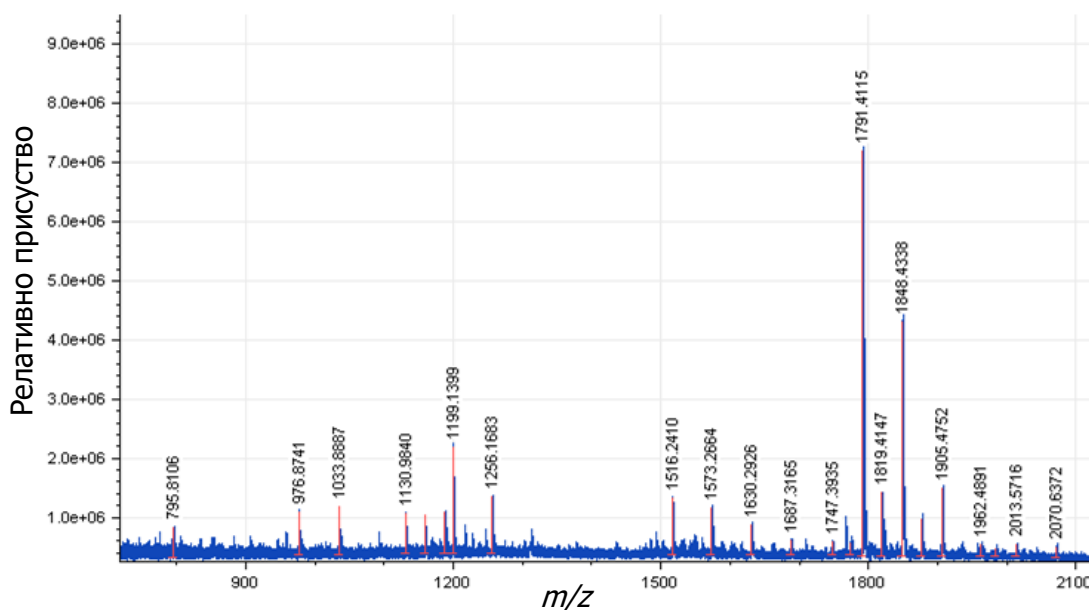
² Скратеницата Nd:YAG означува *neodimium itrium aluminium garnet* (гарнет е просирен темноцрвен скапоцен камен)

со молекулите на матриксот. Потоа настанува десолватација и јонизација на молекулите на анализот (Слика 8.9). Процесот на јонизација при MALDI не е сосема разјаснет.



Слика 8.9 Принцип на MALDI јонизација

MALDI претставува мек извор на јонизација и обично создава единечно наелектризирани молекулски јони дури и од многу големи полимери и биомолекули. Меѓутоа во масениот спектар на овие супстанции добиен по јонизација во MALDI може да се јават и повеќекратно наелектризирани јони, па и фрагментни јони (Слика 8.10).



Слика 8.10 MALDI спектар од матрикс со никотинска киселина, со примена на ласер со $\lambda=266$ nm

Извор на јонизација преку бомбардирање со брзи атоми

Овој извор користи сноп од брзи атоми на инертен гас за јонизација на големи молекули. Примерокот за анализа се раствора во инертен и неиспарлив растворувач (како, на пример, глицерол) и се наносува во тенок слој на метална сонда. Сондата се внесува во масениот спектрометар (т.е. во изворот). Снопот од брзи атоми е насочен кон површината на сондата (каде што е нанесен примерокот за анализа). Најчесто користен инертен гас за создавање брзи атоми е аргонот, иако ксенонот е поефикасен (но и поскап). Снопот од брзи атоми се добива со минување на забрзани јони на аргон или на ксенон низ комора што содржи атоми

на аргон или на ксенон под притисок од околу 10^{-5} torr. Јоните на аргонот, односно на ксенонот се добиваат во јонски извор (што содржи загреан филамент) или од јонски топ. Минувајќи низ облак од неутрални атоми од ист вид, овие јони се забрзуваат под дејство на електричен потенцијал од 3 - 8 kV. Забрзаните јони ги разменуваат полнежите со бавните неутрални атоми, на тој начин што притоа не ја губат здобиената кинетичка енергија. Така се создава сноп од брзи атоми (на аргон или на ксенон) и бавни јони од ист вид (на аргон или на ксенон, соодветно). Бавните јони се одбиваат и се отстрануваат од системот под дејство на негативно наелектризиран дефлектор. Снопот од брзи атоми паѓа на површината на примерокот за анализа ослободувајќи молекулски јони на анализот од матриксот на растворувачот. Ако анализот е површинско активна супстанција тогаш тој ќе се концентрира на површината на течниот матрикс, што го олеснува неговото преминување во гасна состојба. Резултат на јонизацијата преку бомбардирање со брзи атоми е позитивно (M^+) или негативно (M^-) наелектризирани молекулски јони, при што се добиваат, соодветно, јон-позитивни или јон-негативни масени спектри.

Предноста на изворот на јонизација преку бомбардирање со брзи атоми (FAB-извор) е едноставноста на инструментацијата и високата осетливост при квантитативна анализа. Аналити како што се површинско активните супстанции може квантитативно да се определат при концентрации и до 0,1 ppb. Во многу јонизациски извори практично е невозможно да се преведат големите молекули во гасна фаза поради нивната мала испарливост и да се јонизираат без да настане масовна фрагментација на молекулскиот јон. Наспроти тоа, во FAB-изворот јонизацијата настанува на собна температура, не е потребно испарување на анализот, така што лесно може да се определуваат и анализи со големи молекули и термички нестабилни анализи. Фрагментацијата на анализот во FAB-изворот е многу редуцирана, така што јонизацијата дава голем молекулски јон, дури и кај некои нестабилни молекули. Тоа овозможува да се добијат информации за молекулската маса на анализите, што е особено важно при испитувањето на биомолекулите (како, на пример, протеините). Во масените спектри на супстанциите добиени со овој јонизациски извор покрај интензивниот пик на молекулскиот јон може да се забележат и пикови на фрагментите што даваат дополнителни структурни информации за испитуваните супстанции.

Извори на јонизација во неорганската масена спектрометрија

Неорганската (или атомска) масена спектрометрија се користи главно за квалитативна и квантитативна елементарна анализа на примероците. Од друга страна пак, молекулската масена спектрометрија (која денес е позната под основниот термин - *масена спектрометрија*) се користи за квалитативна и квантитативна анализа на соединенија (главно органски) во испитуваните примероци. Изворите на јонизација во инструментите што се наменети само за атомска или за молекулска масена спектрометрија не се исти. За атомската масена спектрометрија потребни се поинакви извори за да ги преведат атомите на елементите во примерокот во јонски облик и како такви да бидат пропуштени во масениот анализатор. Најчесто употребувани извори на јонизација во неорганската масена спектрометрија се извори со електрично празнење (*glow discharge*) и извори на искри (*spark sources*) за анализа на цврсти примероци и извор на индуктивно спрегната плазма (*Inductively coupled plasma, ICP*) за анализа на раствори.

Извори со електрично празнење (glow discharge) и искречки извори (spark sources)³

Овие извори во атомската MS се користат за јонизирање на елементи присутни во метали и во други цврсти примероци. Изворот со електрично празнење на база на еднонасочна струја има катода и анода во атмосфера на аргон под притисок од 0,1 до 10 torr. Испитуваниот примерок ја игра улогата на катода. Кога меѓу електродите ќе се соопшти потенцијал од неколку стотици волти (V) атомите на аргонот се јонизираат и формираат плазма. Електроните и позитивните јони на аргонот се забрзуваат соодветно, кон електродите со спротивен полнеж од нивниот. Така, јоните на аргонот (катјоните) удираат на површината на катодата (негативно наелектризирана електрода) избивајќи атоми од катодниот материјал (т.е. од примерокот за анализа). Избиените атоми од примерокот се јонизираат во аргонската плазма под дејство или на електроните или на катјоните на аргонот, т.н. Пенингова јонизација (*Penning*). Јоните на примерокот се екстрахираат од плазмата во масениот анализатор под дејство на негативно наелектризирана електрода со мал отвор. Изворот со електрично празнење на база на еднонасочна струја се користи за анализа на примероци што спроведуваат електричество, како што се: метали, легури и полупроводници. Значи, примерокот за анализа мора да е проводник за да игра улога на катода. Изворите со електрично празнење на база на радиовреќвенција се користат за анализа на материјали што не спроведуваат електричество, како: керамика и многу изолатори.

Искречките извори се користат за истите цели како и изворите со електрично празнење, но последниве создаваат постабилен јонски сноп со подобар однос меѓу сигналот и шумот. Изворите со електрично празнење овозможуваат поголема осетливост при анализите што е особено важно при анализа на траги на елементи во различни примероци.

Извор на индуктивно спрегната плазма (ICP)⁴

Примерокот се јонизира во плазмата (пр. аргонска плазма) или под дејство на зрачење (од побудените атоми во плазмата). Пламеникот што ја формира плазмата (ICP пламеник) е поставен хоризонтално така што врвот на плазмата се наоѓа на влезот од масениот анализатор. Најголемиот дел од плазмата се насочува под дејство на метален конус со мал отвор во средината. Јонизираниот гас (што содржи јони од примерокот за анализа) што минува низ отворот на конусот, влегува во вакуум простор. Неговиот среден дел минува низ уште еден метален конус, т.н. одделувачки конус и влегува во масениот анализатор што, исто така, е под вакуум.

Во плазмата обично се формираат единечно наелектризирани јони на најголем број елементи, метали и неметали. Изворот на индуктивно спрегната плазма има висока јонизациска ефикасност, што се приближува и до 100% за најголемиот број елементи од периодниот систем. Добиените масени спектри се многу едноставни така што елементите може лесно да се идентификуваат (квалитативна анализа) од односот m/z и од односот меѓу изотопите.

Масени анализатори

Масениот анализатор е основата на масениот спектрометар. Неговата функција се состои во раздвојување на јоните настанати во јонскиот извор врз основа на односот маса/полнеж (m/z). Во идеален случај, масениот анализатор мора да има способност да разграничи јони со мали разлики меѓу нивните односи

³ Овие извори се употребуваат и во инструментите за атомска емисиjsка спектрофотометрија

⁴ Истиот извор се употребува и во инструментите за атомска емисиjsка спектрофотометрија

m/z . Исто така, анализаторот треба да пропушти доволно количество јони за да може тоа да биде регистрирано/измерено. Постојат неколку различни дизајни на масени анализатори што се користат во производството на масени спектрометри. Магнетните анализатори и квадрипол (*quadrupole*) масените анализатори се скенирачки анализатори, а тоа значи дека во дадено време низ анализаторот може да поминат само јони со даден однос m/z . На тој начин, претходно зададениот (од интерес) опсег на m/z вредности се скенира во текот на времето. Масените анализатори: време-на-лет (*time-of-flight*), јонска замка (*ion trap*) и циклотрон резонантна јонска замка овозможуваат истовремено пропуштање и определување на сите јони. Таканаречените тандем масени спектрометри се инструменти со повеќе масени анализатори во серија. Тие овозможуваат одбирање на одреден јон со првиот анализатор и анализа на добиените јони по фрагментација (на избраниот јон) со втор анализатор. Овие инструменти се многу моќни уреди за структурна (квалитативна) анализа на органските соединенија.

Моќ на разложување и резолуција на масените спектрометри

Моќта на разложување на масениот спектрометар се дефинира како способност тој да раздели јони со две различни вредности за односот m/z . Резолуцијата бројно е еднаква на масата на единечно наелектризиран јон, M , поделена со разликата во масите меѓу M и следната m/z вредност што може да биде разделена од спектрометарот. Односно,

$$\text{моќ на разложување} = \frac{M}{\Delta M} \quad (8.1)$$

На пример, за разделување на два јони единечно наелектризирани со маси 498 Da и 500 Da потребна е моќ на разложување од $498/(500-498) = 249$. Во пракса, по правило, ако сакаме да поделиме два јона што се разликуваат за 1 Da, а имаат маса околу 600 Da, тогаш ни е потребна моќ на разложување од 600. Ако е потребно да поделиме два јона што имаат маси околу 1200 Da, што се разликуваат за 1 Da, потребна ни е моќ на разложување од барем 1200. Ова, меѓутоа, не е многу висока резолуција. Некои изотопи од различни елементи или фрагменти од молекуларни јони составени од различни комбинации на атомски изотопи може да дадат јони што се разликуваат за многу помалку од 1 Da. За да се разграничат вакви јони, потребни се масени спектрометри со висока резолуција од 20000 до 100000 или повеќе.

Моќта на разложување се одредува со мерење на добиените пикови во масениот спектар. ΔM во горната равенка, всушност, ја дава разликата во маса меѓу два соседни пика во масениот спектар. Две методи се користат за процена на разделувањето меѓу пиковите. Според првиот метод, два пика со иста висина се смета дека се раздвоени кога висината на преклопувањето меѓу пиковите не е поголема од 10% од висината на пиковите. Според вториот метод, се користи ширината на пикот на половина од максимумот/висината (*full width at half maximum* - *FWHM*) за да се измери ΔM . Колку за споредба, вториот метод (FWHM методот) дава вредност за моќта на разделување два пати поголема од онаа добиена со првиот метод, за ист случај.

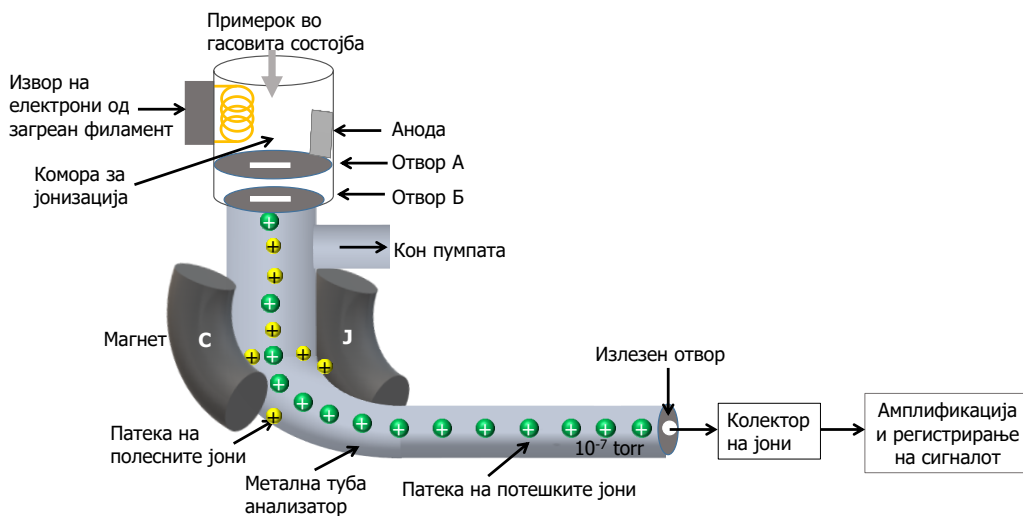
Резолуција на масениот спектрометар е вредност на ΔM за дадена маса M изразена во ppm-и. За спектрометар со моќ на разделување од 600, резолуцијата ќе биде 1 дел на 600 делови. За да се раздвои $^{14}\text{N}_2^+$ со точна маса од 28,0061 Da и $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^+$ со точна маса од 27,9949 Da, потребна е резолуција од $(28,0061-27,9949) = 0,0112$ Da на 28 Da. За да се претвори оваа резолуција во ppm-и:

$$\frac{0,0112}{28} \cdot 1 \cdot 10^6 = 400 \text{ ppm},$$

потребната моќ на разложување ќе биде: $\frac{27,9949}{0,0112} = 2500$.

Анализатор со магнетен сектор

Овие анализатори користат постојани магнети или електромагнети, под чиешто дејство јонскиот сноп од јонскиот извор патува по закривена патека, најчесто од 60° , 90° или 180° . На Слика 8.11, шематски е прикажан спектрометар со еднофокусирачки магнетен анализатор закривен за 90° , во кој јоните создадени во изворот на јонизација се забрзуваат низ отворот Б во металната цевка на анализаторот, што се држи под вакуум од околу 10^{-7} torr.



Слика 8.11 Шематски приказ на масен анализатор со магнетен сектор

Јоните настанати во процесот на јонизација, се забрзуваат во електрично поле (помеѓу отворот А и Б), под напон V . Енергијата на секој јон е еднаква на производот од полнежот на јонот $z \cdot e$, и забрзувачкиот напон V (т.е. $z \cdot e \cdot V$). Енергијата што ја добива јонот при забрзувањето во електричното поле е всушност неговата кинетичка енергија. Важно е да се подвлече дека кинетичката енергија на јон забрзан во поле со напон V зависи само од полнежот на јонот и напонот, но не и од масата на јонот. Транслаторната⁵ компонента од кинетичката енергија на јон со маса m е еднаква на $1/2 \cdot m \cdot v^2$. Кинетичката енергија на сите јони со ист полнеж ќе биде еднаква за електрично поле со даден забрзувачки напон:

$$E_k = z \cdot e \cdot V = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 \quad (8.2)$$

Според тоа, оние јони што имаат помали маси мора да се движат со поголеми брзини од потешките јони. Така, од горната равенка следува:

$$v = \sqrt{\frac{2 \cdot z \cdot e \cdot V}{m}} \quad (8.3)$$

каде што m , v и $z \cdot e$ се масата, брзината и полнежот на јонот, соодветно, а V е забрзувачкиот напон на електричното поле. Како што се менува масата, m , така мора да се менува и брзината v , за да остане константна за константен напон на електричното поле. Така, за два различни јона:

⁵ Транслаторна енергија на јон е енергијата на движење на јонот.

$$z \cdot e \cdot V = \frac{1}{2} \cdot m_1 \cdot v_1^2 \quad (\text{јон 1}) \quad (8.4)$$

$$z \cdot e \cdot V = \frac{1}{2} \cdot m_2 \cdot v_2^2 \quad (\text{јон 2}) \quad (8.5)$$

односно,

$$\frac{1}{2} \cdot m_1 \cdot v_1^2 = \frac{1}{2} \cdot m_2 \cdot v_2^2 \quad (8.6)$$

каде што m_1 и v_1 се масата и брзината на јонот 1, а m_2 и v_2 се масата и брзината на јонот 2.

По забрзувањето на јоните во електричното поле со напон V , тие влегуваат во закривениот дел од масениот анализатор што содржи магнет со хомогено магнетно поле со јачина B . Магнетното поле влијае на движењето на јоните, предизвикувајќи ги спирално да осцилираат по должината на анализаторот. Привлечната сила на магнетното поле F_M е:

$$F_M = B \cdot z \cdot e \cdot v \quad (8.7)$$

Балансирачката центрипетална сила F_c (што дејствува во спротивна насока од силата на магнетното поле) е еднаква на:

$$F_c = \frac{m \cdot v^2}{r} \quad (8.8)$$

каде што r е радиусот на кружната патека што ја опишуваат јоните движејќи се по должината во закривениот магнетен сектор на масениот анализатор (т.е. радиусот на закривената цевка на магнетниот сектор). За да можат јоните да го минат закривениот пат низ анализаторот потребно е F_M и F_c да бидат еднакви, т.е.:

$$\frac{m \cdot v^2}{r} = B \cdot z \cdot e \cdot v \quad (8.9)$$

Од тука:

$$r = \frac{m \cdot v}{B \cdot z \cdot e} \quad (8.10)$$

Со замена на v од равенката 8.5:

$$r = \frac{m}{B \cdot z \cdot e} \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot z \cdot e \cdot V}{m}} \quad (8.11)$$

Односно:

$$r^2 = \frac{m^2}{B^2 \cdot z^2 \cdot e^2} \cdot \frac{2 \cdot z \cdot e \cdot V}{m} = \frac{2 \cdot m \cdot V}{B^2 \cdot z \cdot e} \quad (8.12)$$

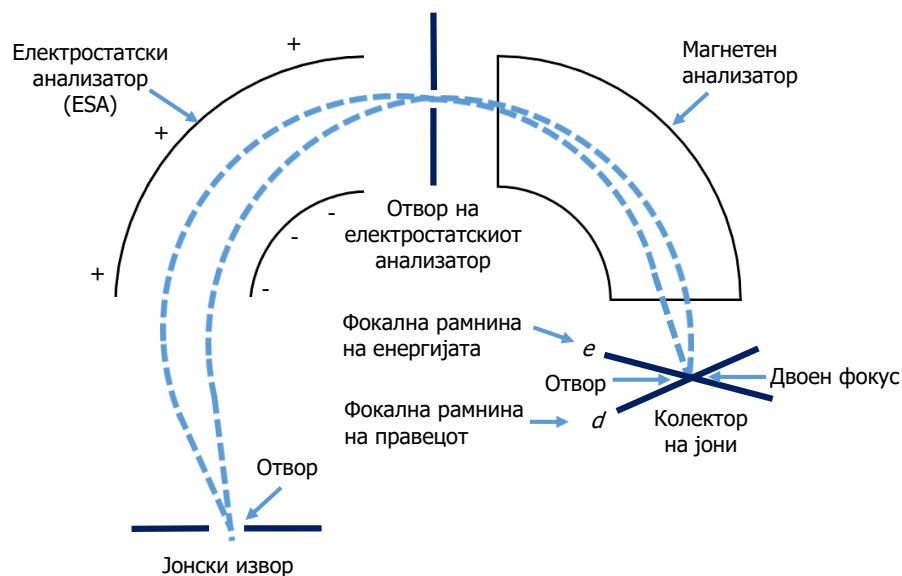
Со преуредување на равенката 8.12 се добива:

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 \cdot r^2 \cdot e}{2 \cdot V} \quad (8.13)$$

Според тоа, радиусот на кружната патека што ја опишуваат јоните зависи од забрзувачкиот напон V , јачината на магнетното поле B и односот m/z . Кога V и B се константни, радиусот на кружната патека зависи од m/z вредноста за јонизираната молекула. Јони со различни односи m/z патуваат по кружни патеки со различни радиуси, што е всушност основата на разделувањето на јоните според m/z . За дадени вредности на V и B само јоните со даден однос m/z ќе ја имаат вистинската вредност за r за да може да поминат низ масениот анализатор. Сите други јони ќе имаат патеки што завршуваат во сидовите на цевката на масениот анализатор и ќе бидат поништени. Со менување на V или на B , можеме да го одбереме посакуваниот m/z однос на јони што ќе поминат низ анализаторот. Тоа може да се постигне со менување на напонот на електричното поле што ги забрзува јоните или со менување на јачината на магнетното поле (што е многу почесто за

модерните спектрометри со магнетен анализатор, бидејќи на тој начин се постигнува поголема осетливост при анализите).

Недостатокот на еднофокусирачките спектрометри (Слика 8.11) е нееднаквата брзина на јоните што излегуваат од изворот на јонизација како резултат на неколку фактори. Јоните се добиваат од молекули со почетни вредности на енергиите што ја следат Болцмановата (*Boltzmann*) дистрибуција на енергиите. Изворот на јонизација покажува мало варирање на градиентот на електричното поле, што предизвикува јоните формирани во неговите различни региони да добиваат различно забрзување. Исто така, при процесот на фрагментација се ослободува дел од кинетичката енергија на јоните. Сите овие фактори предизвикуваат распределба на брзините на јоните во определен опсег што негативно влијае на резолуцијата на инструментот, преку ширење на сигналот во детекторот. Затоа денешните спектрометри со магнетни анализатори обично покрај магнетен имаат и електричен сектор (електромагнет), и се наречени двојно-фокусирачки масени спектрометри (Слика 8.12).



Слика 8.12 Шематски приказ на двојно-фокусирачки масен спектрометар (дизајн на Нир Џонсон, *Nier-Johnson*)

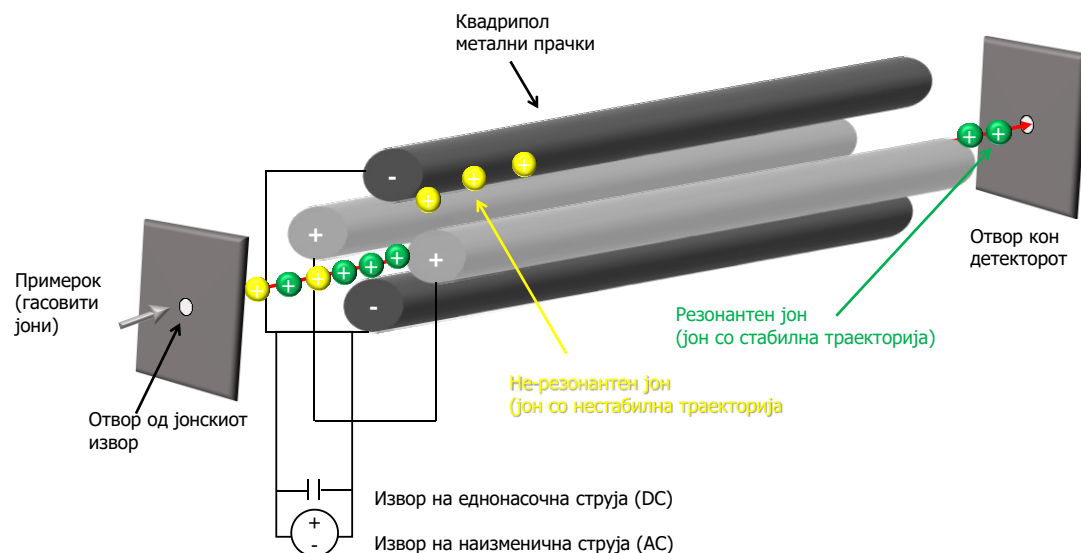
Улогата на електричниот сектор е да изврши потесно разделување (или одбирање) на јоните според големината на нивните кинетички енергии, пред тие да влезат во магнетниот анализатор (сектор). Така, електричниот сектор има улога на енергетски филтер, бидејќи низ него ќе минат само јоните со определена тесна дистрибуција на кинетички енергии. Како резултат на тоа, двојно фокусирачките масени спектрометри имаат поголема резолуција (до околу 100,000) од едно-фокусирачките.

Подрачјето на маси за спектрометрите со магнетни анализатори се во m/z граници од 1-1400 за едно-фокусирачките и 5000-10000 за двојно-фокусирачките.

Квадрипол масени анализатори

Масените спектрометри со квадрипол масени анализатори се најчесто употребуваните инструменти поради поголемата робусност и пониската цена во однос на другите типови масени спектрометри. Квадрипол масениот анализатор не користи магнетно поле за да ги раздели јоните. Нив ги разделува со помош на варијабилно електрично поле (квадрипол поле). Полето се формира меѓу четири прецизно изработени паралелни метални прачки што играат улога на електроди

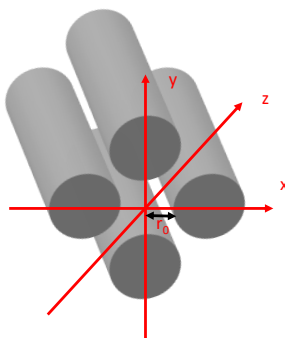
(Слика 8.13). Спротивните електроди се поврзани во електрично коло, така што еден пар е поврзан за позитивниот пол на варијабилен извор на еднонасочна струја (*direct current, DC* извор), а другиот пар за негативниот пол. Дополнително, на секој пар електроди (прачки) од квадриполот е применет варијабилен радиофреквентен потенцијал од извор на наизменична електрична струја (*alternating current, AC* извор). Тие се поврзани така што потенцијалите на паровите постојано се за 180 степени надвор од фаза. Осцилирачкиот потенцијал е многу повисок од оној на изворот на еднонасочна струја, и дава високоосцилирачко електрично поле. Радиофреквентниот осцилирачки потенцијал може да биде до 1,200 V додека потенцијалот на изворот на еднонасочна струја до 200 V.



Слика 8.13 Шематски приказ на квадрипол масен спектрометар

Потребно е прачките (електродите) да имаат хиперболична форма за да може да се обезбеди воедначено електрично поле. При вакви услови, потенцијалот во која било точка меѓу четирите пола (оттаму и името квадрипол) е функција на потенцијалот на еднонасочната струја и на амплитудата и фреквенцијата на радиофреквентниот потенцијал.

Внесениот јон во просторот меѓу четирите електроди е подложен на сложено спирално движење долж електродите како резултат на радиофреквентното (*RF*) поле и полето на еднонасочната струја (*DC* поле). Да претпоставиме дека насоката x е линијата што минува низ средината на напречниот пресек меѓу електродите A и B (поврзани за негативниот пол – негативни електроди), а насоката y е линијата што минува низ средината на напречниот пресек меѓу електродите C и D (поврзани за позитивниот пол – позитивни електроди), како што е прикажано на сликата (Слика 8.14).



Слика 8.14 Геометрија на металните прачки

Движењето на јонот по должината на оската меѓу четирите електроди (насока z) не е под влијание на електричните полиња. Спиралното движење на јонот математички може да се претстави со следните равенки:

$$\frac{d^2 \cdot x}{d \cdot t^2} + \frac{2}{r^2 \cdot (\frac{m}{z})} \cdot (V_{dc} \cdot V_{RF} \cdot \cos 2 \cdot \pi \cdot f \cdot t) \cdot y = 0 \quad (8.14)$$

$$\frac{d^2 \cdot y}{d \cdot t^2} + \frac{2}{r^2 \cdot (\frac{m}{z})} \cdot (V_{dc} \cdot V_{RF} \cdot \cos 2 \cdot \pi \cdot f \cdot t) \cdot x = 0 \quad (8.15)$$

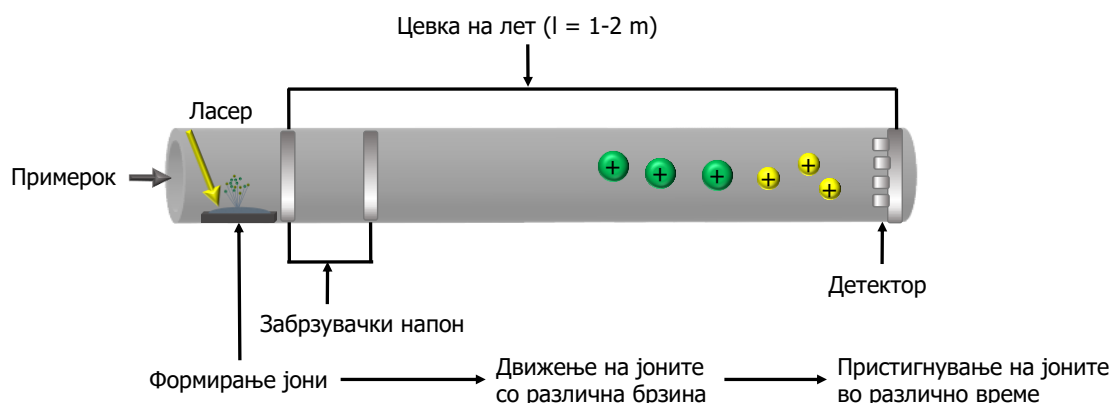
каде што V_{dc} е потенцијалот на DC сигналот, V_{RF} е амплитудата на потенцијалот на RF полето, f е фреквенцијата на осцилација на RF полето (rad/s), r е полурастојанието меѓу внатрешните краеви на спротивните полови (електроди) и t е времето.

За да може позитивно наелектризиран јон да помине низ просторот меѓу четирите електроди, потребно е секогаш кога јонот ќе биде привлечен од негативно наелектризирана електрода, да постои електрично поле од извор на наизменична струја (AC извор) што ќе го одбие од електродата, за да не се судри со неа и да биде неутрализиран. Усогласувањето меѓу осцилирачкото поле (на AC изворот) и времето на пристигнување на јонот на површината на електродите е особено важно при движењето на јонот низ квадриполот. Како резултат на наизменичното привлекување и одбивање од електродите, јонот опишува спирална траекторија при движењето низ квадриполот кон детекторот. За дадена вредност на односот на потенцијали на DC и RF полето (при константна RF фреквенција), низ квадриполот ќе може да поминат само јоните со определен однос m/z . Тоа значи дека ако односот m/z на јонот и фреквенцијата на осцилаторното поле имаат вредности што ги задоволуваат равенствата 8.14 и 8.15 дадени погоре, јонот ќе помине низ квадриполот и ќе стигне до детекторот. Ако овие барања не се задоволени, јоните ќе осцилираат во пошироки спирални патеки сè додека не се судрат со електродите (да се поништат) или, пак, додека не бидат отстранети од вакуумот на масениот анализатор. Во кој било случај, ваквите јони нема да стигнат до детекторот. Значи при даден сет на услови на работа на квадриполот, само јони со точно одреден однос m/z ќе минат низ него. На овој начин, квадриполот игра улога на *масен филтер*. Разделувањето на јоните со различни односи m/z може да се постигне на неколку начини. Фреквенцијата на осцилирање на RF-полето може да се одржи константна додека се менуваат потенцијалите на DC и RF-полињата на таков начин што нивниот однос се одржува константен. Математички може да се покаже дека најдобра резолуција се добива кога односот V_{dc} / V_{RF} е еднаков на 0,168.

Иако квадрипол масениот анализатор ја нема резолуцијата на магнетните анализатори, сепак тој е многу брз, евтин, компактен и робустен. Може да даде целосен масен спектар за помалку од 100 ms. Ова својство го прави квадриполот погоден за спрега со хроматографски системи (*GC-MS* и *LC-MS*).

Анализатор време-на-лет

Анализаторите време-на-лет (*time-of-flight, TOF*, во понатамошниот текст *TOF* анализатори) не користат надворешна сила при разделувањето на јони со различни вредности m/z . Наместо тоа, пулсеви од јони се забрзуваат во празна евакуирана цевка, наречена цевка на лет (*drift tube*). Ако сите јони имаат иста вредност за кинетичката енергија, тогаш брзината на јоните ќе зависи од нивниот однос маса/полнеж, или од нивната маса, ако јоните имаат ист полнеж. Полесните јони ќе патуваат побрзо во цевката на лет и први ќе бидат детектирани, во однос на потешките јони. Цевката на лет во *TOF*-анализаторот има должина од 1 до 2 метри (Слика 8.15).

Слика 8.15 Шематски приказ на *TOF* масен анализатор

Пулсевите од јоните може да се добијат кога примерокот за анализа ќе се подложи на пулсеви од електрони, од секундарни јони или од ласерски пулсеви (како при *MALDI*). Пулсевите од јоните се создаваат со фреквенција од 10 до 50 kHz. Јоните се забрзуваат во цевката на лет под дејство на пулсирачко електрично поле (со фреквенција 5-20 kHz), што уште се нарекува и јон-екстрахирачко поле (бидејќи ги екстрахира, одвлекува) јоните во празниот евакуиран простор на цевката на лет). Во цевката на лет, јоните се разделуваат според нивните брзини. Брзината на јонот, v , може да се изрази како:

$$v = \sqrt{\frac{2 \cdot z \cdot e \cdot V}{m}} \quad (8.16)$$

каде што V е забрзувачкиот напон (што може да биде до 30kV). Ако L е должината на празниот евакуиран простор во цевката за лет, а t е времето од моментот на забрзување до моментот на детекција на јонот (т.е. времето на лет на јонот во цевката), тогаш:

$$V = \frac{L}{t} \quad (8.17)$$

и равенката што го опишува разделувањето на јоните е:

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot V \cdot e \cdot t^2}{L^2} \quad (8.18)$$

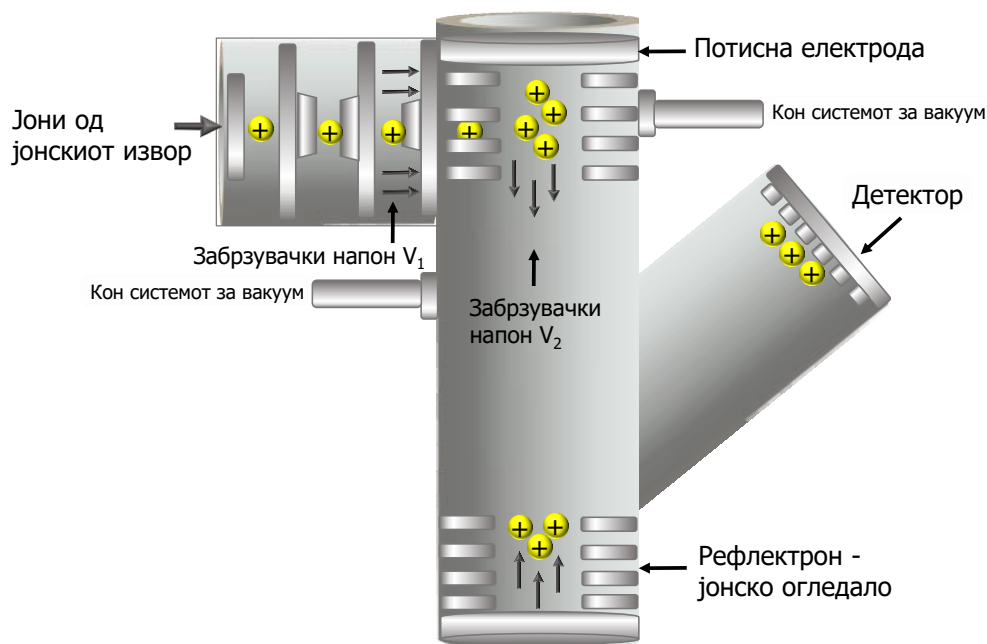
Времето на лет, t на јонот е:

$$t = L \sqrt{\frac{m}{2 \cdot z \cdot e \cdot V}} \quad (8.19)$$

Равенката 8.19 може да се искористи за пресметување на разликата во времињата на лет на два различни јони. Временската разлика на детекција на две соседни маси на јони е од редот на неколку наносекунди, со типични времиња на лет од ред на микросекунди.

Резолуцијата на *TOF*-анализаторите може да се подобри со користење на јонско огледало наречено рефлектрон. Улогата на рефлектронот е да ги одбие јоните (менувајќи им го правецот на движење) и енергетски да ги фокусира на детекторот. Рефлектронското електростатско поле дозволува брзите јони да пропатуваат подолго растојание, во однос на бавните јони со ист однос m/z , пред да им биде сменет правецот на движење за 180 степени. Така јоните со ист однос m/z , но со различни брзини пристигнуваат во исто време на детекторот, со што се подобрува резолуцијата. Во рефлектрон *TOF*-анализаторите јонизацискиот извор и детекторот се наоѓаат на иста страна од цевката на лет, додека рефлектронот се

наоѓа на спротивната страна. Јоните двапати го минуваат празниот простор во цевката на лет, движејќи се од јонизацискиот извор до рефлекtronот, а потоа назад до детекторот (Слика 8.16).



Слика 8.16 Шематски приказ на рефлекtron TOF масен анализатор

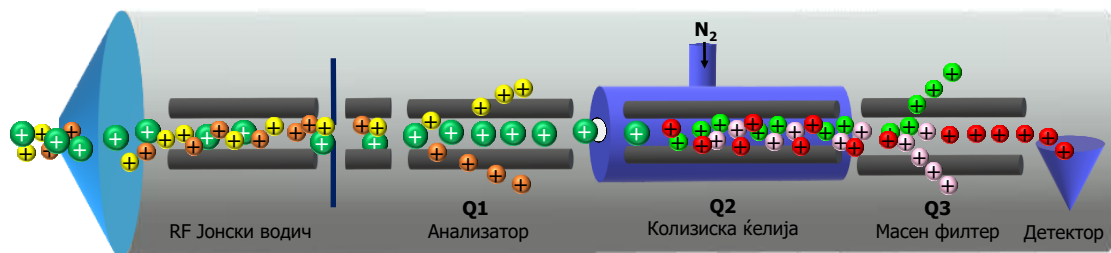
Опсегот на маси за комерцијалните TOF - инструменти се движи до 10000 Da. Резолуцијата зависи од типот на TOF - анализаторот и се движи од 1000 за инструменти што се дизајнирани за спрега со гасен хроматограф (GC-TOF/MS) до 20000 за рефлекtron инструменти.

MS/MS и MSⁿ инструменти

Бројни аналитички проблеми бараат од аналитичарот што работи на масен спектрометар да добие повеќе информации за структурата на фрагментните јони или за реакциите јон-молекула до коишто може да дојде по јонизацијата на аналитот. За да одговори на овие барања аналитичарот може ја употреби техниката MS/MS, позната како тандем MS. MS/MS е масена спектрометрирска техника што користи две (или повеќе) нивоа на масена анализа поврзани со процес што предизвикува промена на масата на јонот од интерес (како дисоцијација на јонот на полесни фрагменти при судир со инертен гас или негова конверзија во потешок јон преку реакција со неутрална молекула).

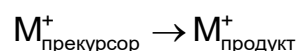
На Слика 8.17 шематски е претставен еден тандем MS инструмент. Аналитот се јонизира во јонизацискиот извор. Од сликата се гледа дека првиот квадрипол масен анализатор ќе служи за селекција на посакуваниот прекурсорски јон од другите јони добиени по јонизацијата на аналитот. Потоа прекурсорскиот јон влегува во вториот квадрипол. Меѓутоа вториот квадрипол не игра улога на масен филтер, туку претставува област во која прекурсорскиот јон дополнително се фрагментира при судир со молекули на инертен (колизиски) гас (најчесто хелиум или аргон) при што се добиваат полесни јонски фрагменти. Овој процес е познат како дисоцијација предизвикана од судир (*CID, collision induced dissociation*). Ако во вториот квадрипол (познат уште како колизиска ќелија) се доведе гас – реагенс наместо колизиски гас, прекурсорскиот јон при јон-молекулската реакција со гасот ќе биде претворен во потешок јон (адукт). Покрај тоа што главната улога на колизиската ќелија е хемиската трансформација на прекурсорскиот јон, таа

истовремено врши фокусирање и забрзување на јоните добиени при таа трансформација.



Слика 8.17 Шематски приказ на тандем MS инструмент

Шематски хемиската трансформација во колизиската ќелија може да се претстави со:



каде што прекурсорскиот јон и јоните на продуктите имаат различни вредности за односот m/z . Добиените јони на продуктите влегуваат во третиот квадрипол, што како и првиот игра улога на масен филтер. Овој дизајн на тандем MS-инструмент каде првиот и третиот квадрипол имаат улога на масени филтри, а вториот се користи за хемиска трансформација на прекурсорскиот јон и за фокусирање на добиените јони, е познат како QqQ дизајн (троен квадрипол инструмент - *triple quadrupole*).

Ако имаме инструмент со три масени анализатори, процесот на фрагментација би можел да се повтори пред крајната анализа на фрагментите. Одбраниот прекурсорски јон се фрагментира, потоа еден од неговите фрагменти се одбира и понатаму се фрагментира пред крајната анализа:



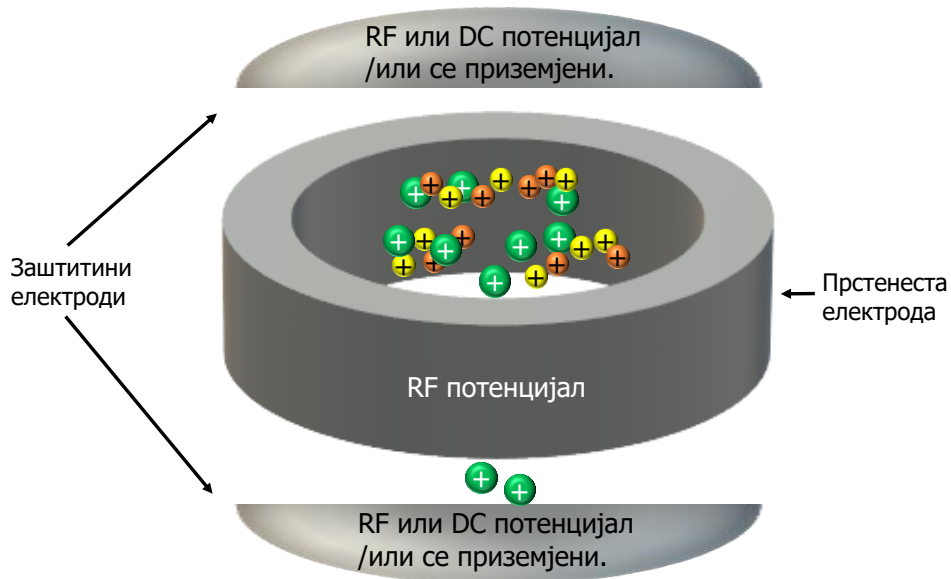
каде што сите три јони имаат различни вредности за односот m/z . Ова е пример за MS-MS-MS или MS³ инструменти. Меѓутоа, комерцијалните MS-MS инструменти се ограничени на само два масени анализатори (MS²).

Тандем масените спектрометри може да содржат три квадриполи (Слика 8.17) или други комбинации на магнетни и TOF масени анализатори. Електричните и магнетните анализатори може да се комбинираат со квадрипол и TOF анализатори.

Квадрипол јонска замка анализатор

Јонската замка (*ion trap*) е уред во кој може да се формираат и/или да се складираат гасовити јони за определено време, заробени со електрични и/или магнетни полиња. Постојат два комерцијални дизајни на јонска замка анализатори во масената спектрометрија: квадрипол јонска замка (*quadrupole ion trap* - QIT) и циклотрон резонантна јонска замка (*ion cyclotron resonance trap* - ICR).

Квадрипол јонска замка анализаторот (понатаму во текстот QIT) користи квадрипол за разделување на јоните пред тие да влезат во јонската замка. Јонската замка е составена од прстенеста (кружна) електрода и две заштитни електроди (една над и друга под прстенестата електрода, види Слика 8.18), коишто заедно формираат тридимензионално електромагнетно поле.



Слика 8.18 Шематски приказ на квадрипол јонска замка

На прстенестата електрода е применет радиофреквентен (RF) потенцијал, додека заштитните електроди или се заземјени или им е применет RF или DC потенцијал. Во замката, под дејство на електромагнетното поле, јоните се движат по стабилни траектории меѓу електродите, при што тие се задржуваат (складираат) во неа на определено време. Особено е важно да се истакне дека на овој начин различни јони со широк спектар на вредности за однос m/z , можат истовремено да бидат задржани во јонската замка. Исто така, во замката може да настане и јонизација на анализите, покрај нивната иницијална јонизација во јонизацискиот извор на масениот спектрометар.

Со промена на амплитудата на RF потенцијалот на прстенестата електрода, јоните лесно може да се екстрахираат (отстранат) од јонската замка. Како што се зголемува амплитудата, траекторијата на јоните со растечки односи m/z станува нестабилна. Овие јони се движат кон заштитните електроди, од кои едната има отвор што води до детекторот. Така, јоните со даден однос m/z минуваат низ заштитната електрода и стигнуваат до детекторот.

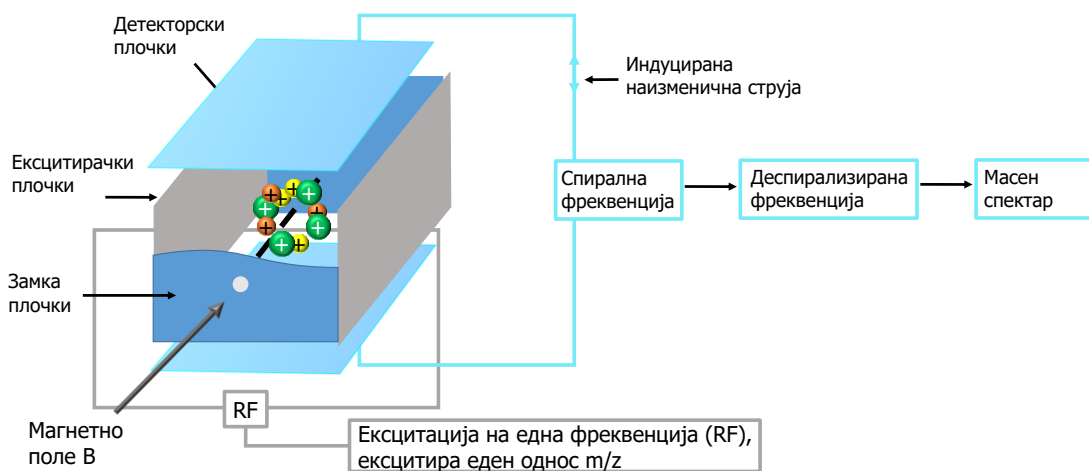
Во јонската замка може селективно да се задржат прекурсорските јони за MS-MS експериментите или јоните на анализите, отстранувајќи ги јоните од матриксот на примерокот (што резултира со пониски граници на детекција во анализите). Ова може да се постигне со примена на различни RF и DC потенцијали на заштитните електроди во замката. Меѓутоа, јонската замка има и неколку ограничувања. Во неа може да се задржат само ниски концентрации на јони, поради можните интеракции меѓу задржаните јони кога се наоѓаат во повисоки концентрации (што доведуваат до нарушување на патеките на јоните во јонската замка). Овие интеракции ја ограничуваат и точноста при мерењето на односот m/z . Поради тоа, линеарниот опсег на масените спектрометри со QIT анализатор е помал во однос на другите типови масени спектрометри. Затоа овој тип инструменти се многу поповолни за квалитативна (структурна) анализа отколку за квантитативна анализа. Меѓу другото, QIT MS инструментите се поосетливи на нечисти примероци отколку квадрипол MS инструментите, што ги отстрануваат непосакуваните јони, а ги мерат само јоните од интерес. Опсегот на m/z вредности за комерцијалните QIT масени спектрометри се движи од 10 до 1000.

Циклотрон резонантна јонска замка масени спектрометри на принцип на Фуриерова трансформација (FTICR)

Масениот анализатор на овие инструменти се состои од шест плочки-проводници што формираат коцка и играат улога на јонска замка (Слика 8.19). Јонската замка е под висок вакуум ($< 10^{-8}$ torr) и е сместена во силно магнетно поле. Примерокот се внесува во неа и се јонизира под дејство на надворешен јонизациски извор, како на пример со електронски сноп кој минува низ јонската замка. Во присуство на магнетно поле јоните почнуваат да се движат во кружни орбити поставени нормално на приложеното поле. Аголната фреквенцијата на кружното движење на јоните се нарекува циклотрон фреквенција:

$$\omega_c = \frac{v}{r} = \frac{z \cdot e \cdot B}{m} \quad (8.20)$$

каде што ω_c е аголната фреквенција на кружното движење на јоните (rad/s), e е количеството електричество на електронот (C), B е јачината на магнетното поле (T), z , m и v се полнежот, масата и брзината на јонот соодветно, и r е радиусот на кружната орбита што ја опишува јонот.



Слика 8.19 Шематски приказ на FTICR

Аголната фреквенција на кружното движење на јонот зависи обратно пропорционално од неговиот однос m/z , во константно магнетно поле. Анализата на јоните е овозможена со примена на радиофреквентен (RF) пулс на емитувачките плочи, во траење од неколку милисекунди. RF пулсот ја зголемува енергијата на јоните, предизвикувајќи ги да се движат во поголеми кружни орбити со иста аголна фреквенција. Пулс со ω_c фреквенција ги предизвикува сите јони со даден однос m/z да апсорбираат енергија и да ја зголемат орбитата на нивното кружно движење. Кога ќе се исклучи RF пулсот, движењето на јоните во јонската замка индуцира струја на приемните плочи. Индуцираната струја има синусоидален сигнал со фреквенција ω_c . Колку е поголема орбитата на јоните толку е поголема и индуцираната струја на приемните плочи. Фреквенцијата на индуцирана струја дава информации за односот m/z на испитуваниот јон (квалитативни податоци), а нејзината амплитуда зависи, пак, од бројот на јоните со дадениот m/z однос, т.е. од нивната концентрација (квантитативни податоци).

За да може истовремено (и побрзо) да се определат јони со различни вредности за односот m/z , на емитувачките плочи се применува RF-пулс што содржи поширок опсег од различни фреквенции. Опсегот на фреквенции е така избран за да може да ги побуди јоните со избран опсег на односи m/z . Кога ќе се исклучи радиофреквентниот пулс, сите побудени јони при нивното кружно

движење индуцираат струја на приемните плочи. Излезната струја, што ги содржи сите фреквенции и амплитуди за анализираните јони, математички, со користење на Фуриевата трансформација, може да се конвертира во масен спектар. Оттаму потекнува и името циклотрон резонантна јонска замка масена спектрометрија на принцип на Фуриевата трансформација (FTICR).

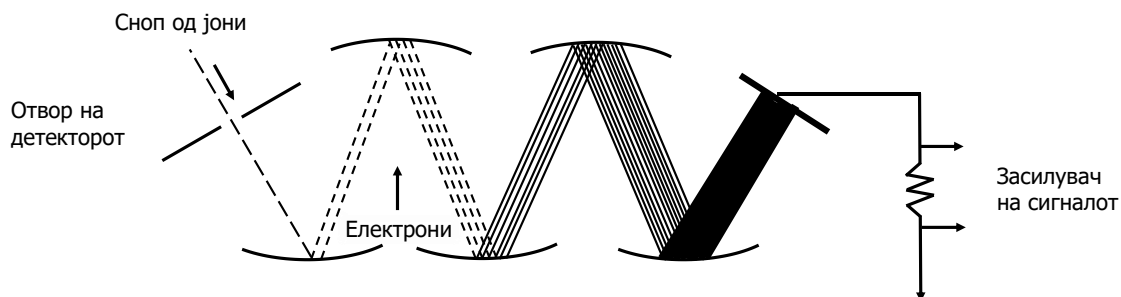
Предностите на FTICR масените спектрометри се: подобриот однос меѓу сигналот и шумот, пониските граници на детекција (можно е детектирање на атомоларни⁶ количества од анализаторот) и многу повисоката точност при определувањето на масите (резолуцијата е од редот на 1 ppb за маса од 100 Da). Главните недостатоци на овие спектрометри се ограничениот линеарен опсег на инструментот (поради истите причини како и кај квадрипол јонска замка MS инструментите), посложениот дизајн и високата цена.

Детектори

Најголемиот број масени спектрометри мерат една вредност за односот m/z во даден момент. Овие спектрометри како јонски детектори користат или електронски мултипликатор или Фарадеева чаша. TOF, јонска замка и FTICR масените спектрометри имаат способност истовремено да екстрахираат јони со различни односи m/z , па затоа за нив потребен е детектор кој ќе овозможи истовремена детекција на различните јони. Еден од пристапите за детекција на повеќе јони истовремено е користење на т.н. мултипли детектори. Во овие детектори спаѓаат т.н. *подредени мултипли детектори (array detectors)*.

Електронски мултипликатор

Електронскиот мултипликатор (ЕМ) е најчестиот употребуван детектор во масените спектрометри и е многу сличен на концептот на фотомултипликаторската цевка за оптичка детекција. Многу е осетлив и дава брз одговор. ЕМ се базира на присуство на диноди, чија површина емитува електрони кога на неа ќе удрат брзи електрони, позитивни и негативни јони или неутрални честички. Електронскиот мултипликатор со одвоени диноди (Слика 8.20) користи серија од 12 до 24 диноди, така што секоја динода е попозитивна од претходната. Удар од јон на првата динода избива (исфрла) неколку електрони од нејзината површина. Овие електрони се забразуваат до следната динода каде што секој електрон избива по неколку електрони. Овој процес продолжува сè додека каскадата од електрони (т.е. засилена струја) не стигне до колекторот. Обично, еден јон може да избие 10^5 електрони, па и повеќе.

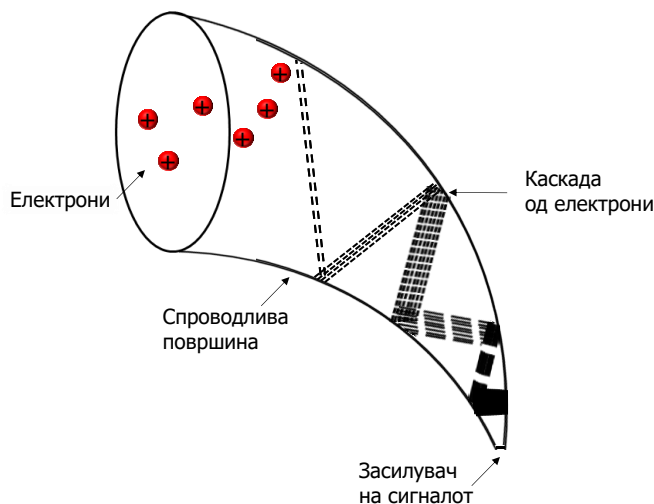


Слика 8.20 Шематски приказ на електронскиот мултипликатор со одвоени диноди

Електронскиот мултипликатор со континуирана динода, познат и како канален електронски мултипликатор (Слика 8.21), е изграден од стаклена цевка

⁶ 1 amol = 10^{-18} mol

чишто внатрешни сидови се обложени со проводлив материјал што има голем електричен отпор. По должината на цевката се применува линеарен градиентен потенцијал. Секој јон што ќе удри на внатрешната површина на цевката избива електрони, што се забрзуваат и повторно удираат на внатрешните сидови на цевката предизвикувајќи го истиот каскаден ефект како и кај електронскиот мултипликатор со одвоени диноди.



Слика 8.21 Шематски приказ на електронскиот мултипликатор со континуирана динода

Недостаток на детекторите базирани на диноди е тоа што бројот на секундарно избиеени електрони зависи од видот на упадната примарна честичка, од нејзиниот агол на паѓање и енергија.

Фарадеева чаша

Фарадеевата чаша е наједноставниот јонски детектор и претставува метална или карбонска чаша која ги „фаќа“ јоните и го „чува“ нивниот полнеж. Добиената струја при тоа се мери и се засилува. Формата на овој детектор во облик на чаша го намалува губитокот на електрони од металната површина при ударот на јоните. Фарадеевата чаша е апсолутен детектор бидејќи интензитетот на сигналот (струјата) произведен во неа е право пропорционален со бројот на јоните и со бројот на полнежи на јонот, „фатени“ во чашата. Недостаток на овој детектор е долгото време на одговор, што ја ограничува неговата употреба.

Подредени мултипли детектори

Микроканалната плоча е просторно подреден мултипли детектор изграден од 10^5 - 10^7 електронски мултипликатори (од 10-100 μm во дијаметар) со континуирана динода. Овој детектор се користи кај масените спектрометри, каде што анализираните јони се насочуваат (фокусираат) на фокална плоча, како, на пример, кај некои TOF-MS инструменти.

Пишувач

Пишувашот ги регистрира електричните сигнали на детекторот (галванометарски пишувач – електромагнетен осцилограф). Масениот спектар се регистрира на пишувачот во вид на серија пикови, во дводимензионален координатен систем. Податоците од масена спектрометрија може да се прикажат:

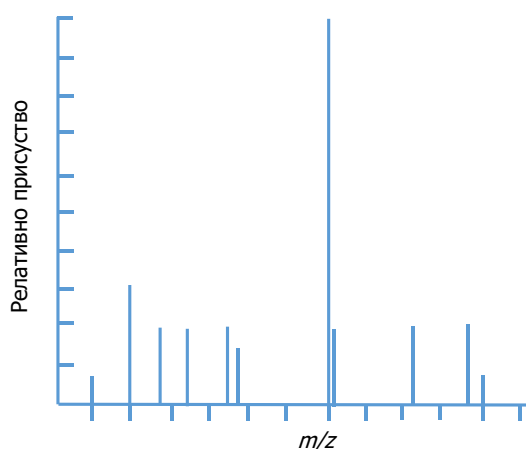
- графички (интензитетот на пиковите е претставен со вертикални линии со соодветна должина),

- табеларно (интензитетот на најголемиот, основен пик во спектарот се зема како 100 %, а интензитетот на сите други се искажува релативно во однос на него).

Модерните спектрофотометри како интегрелен дел содржат микрокомпјутери и микропроцесори за обработка на податоците.

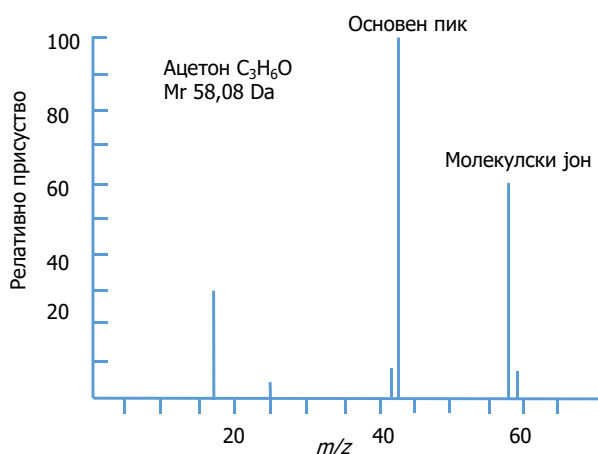
Интерпретација на масените спектри

Главна карактеристика на масениот спектар е богатството на структурни податоци што ги обезбедува. Масениот спектар претставува графички приказ на релативното присуство на јоните произведени во јонскиот извор, во функција од односот m/z (Слика 8.22). Висината на пикот (ордината) претставува мерка за релативна концентрација на соодветниот јонски вид. Положбата на пикот на апцисата претставува маса на јонот, т.е. неговиот однос m/z – карактеристична за секој јонски вид (идентификација).



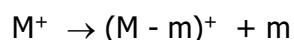
Слика 8.22 Масен спектар

Масениот спектар содржи информација за молекулската маса, структурна информација и квантитативна информација за испитуваната супстанција. Најголемиот пик чијашто вредност за релативниот интензитет по договор е 100 % се нарекува основен пик (референтен пик). Молекулскиот јон претставува јон чијашто маса ја претставува молекулската маса на испитуваното соединение и се јавува на крајот од масениот спектар (Слика 8.23). Релативниот интензитет на молекулскиот јон во однос на другите јони во спектарот зависи од неговата стабилност (неговиот интензитет се намалува со растење на големината и сложеноста на соединението).

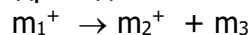


Слика 8.23 Масен спектар на ацетон

Кога јонизацијата се врши со голем вишок на енергија, молекулскиот јон се наоѓа во побудена состојба, поодделни атоми или атомски групи во неговиот состав интензивно вибрираат, при што доаѓа до кинење на одделни хемиски врски што предизвикува фрагментација на молекулскиот јон:

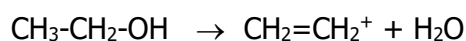


каде што m е фрагмент што се откинува од молекулскиот јон. Добиениот фрагментен јон и самиот може да се распадне на помали делови, под услов и да биде во побудена состојба (да содржи доволен вишок на внатрешна енергија).

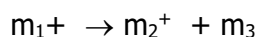


Толкувањето на фрагментацијата се врши на емпириски начин. Фрагментните јони се основа за идентификација на непознато соединение (соединенија со иста молекулска маса се идентификуваат врз основа на различните слики за фрагментните јони што тие ги даваат). Прекурсорниот јон дава информации за молекулската маса, додека фрагментните јони даваат структурни информации.

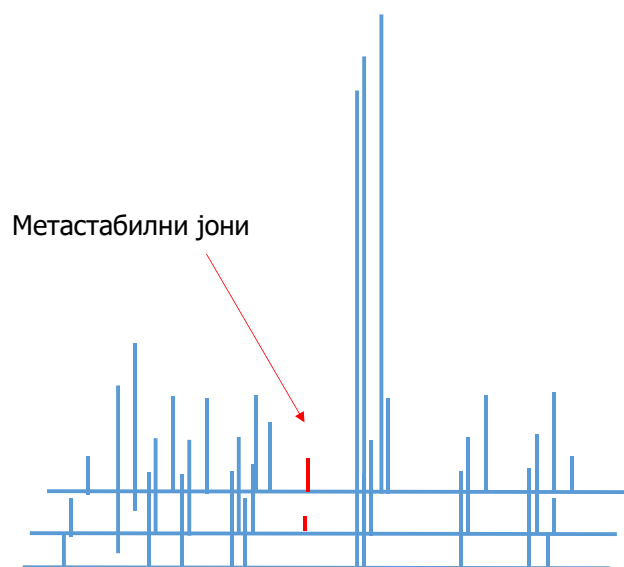
Со преместување на еден атом или група атоми од една положба во матичниот јон во друга, со цел создавање постабилни производи на фрагментацијата, се создаваат преуредени јони. При преуредувањето често доаѓа до елиминирање на стабилни неутрални фрагменти (H_2O , H_2S , HCN , C_2H_5):



Одреден број јони го напуштаат јонскиот извор со мал вишок на внатрешна енергија, што не е доволен за фрагментација во самиот извор (време од 10^{-7} s), но до фрагментација може да дојде за време на патувањето низ системот (време од 10^{-7} до 10^{-5} s) при што се создаваат метастабилни јони.

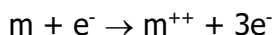


Пикот во масениот спектар што се јавува како резултат на оваа реакција се обележува со симболот m^* (Слика 8.24). Метастабилните процеси даваат пикови на децимален масен број и се најчесто со многу слаб интензитет. Метастабилните јони се од особено значење при толкување на масените спектри (метастабилниот пик ги поврзува матичните и фрагментните јони, зборува за патот на фрагментацијата и сл.).



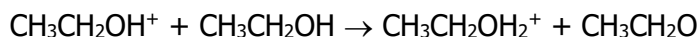
Слика 8.24 Метастабилни јони во масен спектар

Како резултат на јонизација со електрони што имаат голема количина на енергија, може да настане исфрлање на два или на повеќе електрони од молекулата при што се формираат повеќекратно наелектризирани јони:



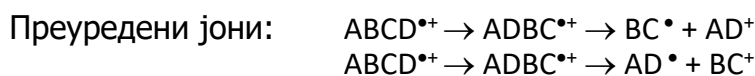
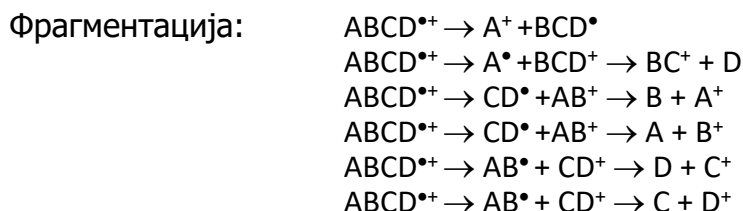
Двократно наелектризираните јони ($e = 2$) се јавуваат во масениот спектар на привидно половина смален масен број ($m/2$). Трикратно наелектризираните јони ќе се јават на масен број $m/3$. Повеќекратно наелектризирани јони се јавуваат кај соединенија чии потенцијали на јонизација се најмали (ароматични соединенија, органски соединенија што содржат N, O, S). Јонизацијата на примерокот во услови на висок вакуум е многу неефикасен процес (секоја милионита молекула на примерокот се преведува во еднократно наелектризиран јон), бројот на ефикасни судири во коишто се образуваат повеќекратно наелектризирани јони е далеку помал.

Ако дојде до зголемување на притисокот во изворот, може да дојде до јонско-молекулски реакции, при што се создаваат јони со поголема маса од молекулскиот јон:



Во масениот спектар на етанол ќе се јави пик ($M + 1$), за единица поголем од молекулската маса на етанолот (неговиот интензитет треба да расте со квадратот од промената на притисокот). Бимолекулските реакции во јонскиот извор се многу ретки.

На Слика 8.25 се прикажани видовите на јони што може да се јават во масениот спектар и реакциите со коишто може да настанат.



Слика 8.25 Видови јони во масен спектар

Примена на масена спектрометрија

Масената спектрометрија се применува за идентификација, структурни определувања врз основа на процесот на фрагментација и за определување на релативната молекулска маса.

Определување на молекулската маса од масениот спектар се врши со идентификацијата на пикот на молекулскиот јон или со идентификација на $(M + 1)^+$

или $(M - 1)^+$ пикот (положбата на пикот на апцисата ја дава молекулската маса, со точност што не може да се постигне со друг метод).

Определување на молекулската формула од точната молекулска маса се врши со помош на табели во кои се претставени сите можни комбинации на C, H, N и O добиени преку молекулската маса, изразена на трета до четврта децимала. За ова потребни се инструменти со голема резолуција што овозможуваат детектирање на разлики во масата од неколку илјадници единици. Молекулската формула може да се определи и од изотопските односи на изотопските пикови $(M + 1)^+$ и $(M + 2)^+$ на молекулскиот пик.

Во случаи кога од информациите што ги дава молекулскиот пик и неговите изотопи не може да се идентификува соединението, следен чекор е анализа на фрагментните јони во масениот спектар. Структурни информации за испитуваниот аналит може да се добијат од начините на фрагментација. Фрагментацијата не е хаотичен процес, туку се одвива на определен репродуцибилен начин. Правилата на фрагментација се емпириски и бројни и секоја класа на соединенија покажува своја особеност што овозможува нивна идентификација.

Идентификација на соединенија може да се врши и преку споредба на масените спектри со спектри на реферетни соединенија, добиени во идентични услови на добивање на масениот спектар на аналитот, како и со примена на системи за компјутеризирано пребарување на бази на податоци.

РЕФРАКТОМЕТРИЈА

Голем број методи за испитување се темелат на оптичките особини на супстанциите. Рефрактометријата и полариметријата, за разлика од спектрометриските методи, спаѓаат во групата на оптички методи во кои не настанува промена на енергијата на електромагнетното зрачење.

Принципот на рефрактометријата се базира на мерење на индексот на прекршување на светлината или индексот на рефракција. Индексот на рефракција претставува физичка особина на супстанцијата што може да се користи за идентификација, но и за определување на степенот на чистота. Постојат голем број методи кај кои што преку мерење на индексот на рефракција се определува концентрацијата на растворот или процентуалната застапеност на одредени состојки во некои производи. Мерењето на индексот на рефракција најчесто се врши на течности.

Индекс на рефракција

Брзината на простирање на светлината во вакуум е секогаш иста и е поголема во споредба со било која друга средина. При премин на светлината од вакуум во друга средина, настанува прекршување на правецот на простирање на зракот на светлина и се намалува брзината на простирање на светлината, како резултат на интеракција со атомите и молекулите во средината.

Односот меѓу брзината на светлината во вакуум и брзината на светлината во друга средина е дефиниран како индекс на рефракција (n):

$$n = \frac{c}{v_i} \quad (9.1)$$

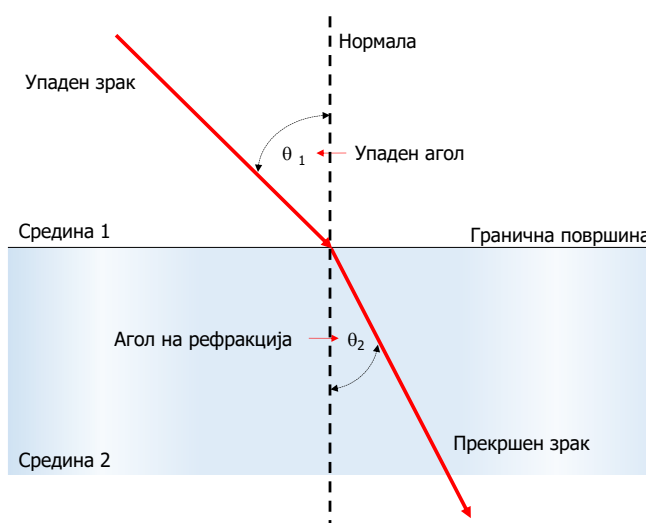
каде што v_i претставува брзина на светлината во медиум и c е брзина на светлината во вакуум. На пример, индексот на рефракција на водата е 1,33, што значи дека светлината патува за 1,33 пати побавно во вода, отколку во вакуум.

Интеракцијата на зрачењето со средината низ којшто поминува се должи на периодична поларизација (привремена деформација на електронските облаци) на атомите и молекулите што ја сочинуваат средината, предизвикана од наизменичното електромагнетно поле на зрачењето. Под услов зрачењето да не се апсорбира, атомите и молекулите ја задржуваат енергијата потребна за поларизација многу кратко време (10^{-14} до 10^{-15} s), и повторно ја емитуваат при враќање на супстанцијата во првобитната состојба. Бидејќи во овој процес нема размена на енергија, фреквенцијата на емитираното зрачење останува непроменета, но брзината на ширење на зрачењето е намалена како резултат на времето потребно за поларизација/реемисија.

Индексот на рефракција на светлината при премин од вакуум во некоја друга средина се нарекува *апсолутен индекс на рефракција*. Апсолутниот индекс на рефракцијата зависи само од природата на таа средина (супстанција) и е карактеристичен за таа средина (супстанција).

При премин на светлината низ средини што имаат различна густина, доаѓа до промена на правецот на зракот на светлината на допирната површина меѓу двете средини. Оваа појава се нарекува прекршување на светлината или рефракција и настанува како резултат на различната брзина на движење на зракот низ средини со различна густина (Слика 9.1). При премин на светлината од средина со помала густина (средина 1, Слика 9.1) во средина со поголема густина (средина 2, Слика 9.1) прекршувањето на зракот е во насока кон нормалата на допирната површина. Во спротивно, кога светлосниот зрак преминува од медиум со поголема густина кон медиум со помала густина, брзината на движење на зракот

се зголемува, а светлосниот зрак се прекршува и се оддалечува од нормалата што ги дели двете средини. Оттука, брзината на простирање на светлината зависи од природата на средината (супстанцијата) низ којашто поминува, односно различни супстанции покажуваат различна способност да ја прекршат светлината (имаат различен индекс на рефракција). Вредноста на индексот на рефракција за поголемиот број супстанции се движи помеѓу 1,3 и 1,7 за течности и 1,3 до 2,5 за цврсти супстанции. Супстанциите коишто имаат потполно исти особини во сите делови и правци (кристали со кубна симетрија) имаат само еден индекс на рефракција и се нарекуваат изотропни супстанции. Супстанциите што немаат исти особини во сите делови (особините на кристалите зависат од кристалните оски) се нарекуваат анизотропни супстанции и имаат повеќе индекси на рефракција (најчесто два или три).



Слика 9.1 Прекршување на светлината на гранична површина на две средини

Индексот на рефракција на светлината при премин од една во друга средина се нарекува *релативен индекс на рефракција* (индекс на прекршување на светлината во средина 2 во однос на средина 1).

$$n_{\lambda}^t = \frac{v_1}{v_2} \quad (9.2)$$

Индексот на рефракција е бездимензионална величина и зависи од температурата на примерокот (t) што се анализира и од брановата должина на светлината (λ), што поминува низ примерокот. Затоа, индексот на рефракција се означува така што температурата на примерокот (t) се пишува како горен индекс на десната страна на симболот, додека брановата должина на светлината (λ) на која што е вршено мерењето се означува како долен индекс на десната страна на симболот: n_{λ}^t . Индексот на рефракција вообичаено се мери на температура од 20 °C и на бранова должина на D-линијата на натриум ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$) и се означува со симболот: n_D^{20} .

Закон за рефракција

Прв закон за рефракција: Упадниот агол, аголот на прекршување на светлината и привидната права што е нормално поставена на двете средини (нормалата) лежат во иста рамнина.

Втор закон за рефракција: Снелов закон (*Snell's law*): Вредноста на аголот на прекршување на зракот зависи од вредностите на упадниот агол во средина 1

(θ_1) и на аголот на прекршување на светлината во средина 2 (θ_2) (Слика 9.1) Според Снеловиот закон, односот меѓу брзината на светлината во средина 1 (v_1) и брзината на светлината во средина 2 (v_2) е еднаков на односот меѓу синусот на аголот на упадниот зрак и синусот на аголот на рефрактираниот зрак, што е еднакво на односот меѓу индексите на рефракција во двата медиума (n_2) и (n_1) соодветно.

$$\frac{v_1}{v_2} = \frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_2} = \frac{n_2}{n_1} \quad (9.3)$$

Оваа равенка овозможува, определување на индексот на рефракција на супстанцијата преку мерење на упадниот агол на светлината во средина 1 и аголот на прекршување на светлината во средина 2, наместо да се определува брзината на простирање на зракот низ двете средини.

Релативниот индекс на рефракција е константна вредност и зависи од природата на двете средини. Средината во која што аголот θ има помала вредност се нарекува оптични погуста средина. Тука зракот патува со помала брзина и вредноста на прекршување на зракот е поголема.

Ако средината 1 е вакуум, тогаш v_1 е еднаква на c бидејќи брзината на светлината во вакуум е константа, а вредноста на индексот на рефракција на вакуум ($n_1 = n_{\text{вакуум}}$) изнесува 1 (равенка 9.1). Според тоа релативниот индекс на рефракција на средината 2 во однос на вакуум ($n_{2(\text{вакуум})}$) може да се пресмета со мерење на упадниот агол на светлината во вакуум ($\theta_{1(\text{вакуум})}$) и аголот на рефракција (θ_2):

$$n_{2(\text{вакуум})} = \frac{\sin \theta_{1(\text{вакуум})}}{\sin \theta_2} \quad (9.4)$$

Од практични причини, наместо во вакуум, мерењата за определување на релативниот индекс на рефракција се вршат со воздух како референтна средина. Во тој случај релативниот индексот на рефракција во однос на воздух се пресметува според равенката:

$$n_{2(\text{воздух})} = \frac{\sin \theta_{1(\text{воздух})}}{\sin \theta_2} \quad (9.5)$$

каде што:

$n_{2(\text{воздух})}$ е индексот на рефракција на супстанцијата во однос на воздух

$\theta_{1(\text{воздух})}$ е упадниот агол на светлината во воздух

θ_2 е аголот на рефракција.

Поголеми разлики во оптичките густини помеѓу воздухот и средината (испитуваната супстанција) доведуваат до поголема вредност на индексот на рефракција.

Индексот на рефракција на дадена супстанција во однос на вакуум $n_{2(\text{вакуум})}$ може да се пресмета од индексот на рефракција на супстанцијата во однос на воздух $n_{2(\text{воздух})}$ со примена на следната равенка:

$$n_{2(\text{вакуум})} = 1,00027 \cdot n_{2(\text{воздух})} \quad (9.6)$$

Фактори што влијаат на индексот на рефракција

Температура

Температурата има големо влијание на индексот на рефракција бидејќи доведува до промени на густината на медиумот. Со зголемување на температурата на средината, неговата густина се намалува, а се зголемува брзината на светлината

низ средината. Тоа доведува до намалување на индексот на рефракција. Кај голем број органски течни супстанции, зголемувањето на температурата за 1°C доведува до намалување на индексот на рефракција за 0,0005. Кај водата, промената на индексот на рефракција е помала и изнесува 0,0001 за секој 1°C . Од тие причини, секогаш се наведува температурата на која е вршено мерењето на индексот на рефракција. Најчесто мерењата се вршат на температура од $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (n^{20}). Во одредени случаи, како, на пример, определување индекс на рефракција на масла, се користи температура од 25°C (n^{25}). Индексот на рефракција на масти се определува на температура од 40°C (n^{40}) бидејќи мастите на собна температура вообичаено се во цврста агрегатна состојба. При определување индекс на рефракција (n^T) на температура T различна од 20°C , за вредноста на индексот на рефракција да се изрази на 20°C (n^{20}), се користи формулата:

$$(n^{20}) = (n^T) + (T - 20) \cdot 0,00045 \quad (9.7)$$

Бранова должина

Индексот на рефракција зависи од брановата должина на упадната светлина. Вообичаено пократки бранови должини се рефрактираат повеќе во однос на поголеми бранови должини, поради што индексот на рефракција се зголемува со зголемување на брановата должина на упадната светлина. Мерењата за определување индекс на рефракција се вршат со монохроматска светлина. Најчесто се користи брановата должина на жолтата (D) линија на натриумот на бранова должина од 589,3 nm (индексот на рефракција се означува со симболот n_D).

Варијацијата на индексот на рефракција на една супстанција со промена на брановата должина се нарекува дисперзија. Дисперзија претставува разлика помеѓу вредноста на индексот на рефракција на една супстанција, добиен од мерења на две различни бранови должини. За таа цел, покрај натриумовата жолта линија, се користи водородната сина линија ($\lambda = 486,1 \text{ nm}$) (индексот на рефракција се означува со симболот: n_F) и црвената линија од 656,3 nm (индексот на рефракција се означува со симболот: n_C). Често како мерка за дисперзијата се користи Абеовиот (*Abbe*) број v_d , што се дефинира како:

$$v_d = \frac{n_D - 1}{n_F - n_C} \quad (9.8)$$

Овој израз, поради неговата нумеричка вредност, се применува како мерка за дисперзијата.

Концентрација

Промената на концентрацијата на супстанцијата во растворот доведува до промена на индексот на рефракција. Со зголемување на концентрацијата на растворената супстанција, се зголемува и индексот на рефракција. Ова својство се применува при контрола на квалитетот на различни производи.

Притисок

Со зголемување на притисокот, индексот на рефракција на супстанциите се зголемува бидејќи тоа доведува до зголемување на густината. Овој ефект е најизразен кај гасовите.

Физички константи изведени од индексот на рефракција

Можноста од примена на индексот на рефракција како физичка константа на супстанциите е зголемена со воведување неколку нови физички константи, што се изведени од индексот на рефракција или од дисперзијата. Имињата на константите, нивните ознаки и математички изрази се дадени во Табела 9.1.

Табела 9.1 Физички константи изведени од индексот на рефракција

Име на константа	Ознака	Математички израз
Рефрактивност	N	$n - 1$
Специфична енергија на рефракција	K	$(n - 1)/\rho$
Специфична рефракција	$[n]$	$[(n^2 - 1)/(n^2 + 2)] \cdot 1/\rho$
Моларна рефракција	R	$[(n^2 - 1)/(n^2 + 2)] \cdot M/\rho$
Специфична дисперзија	σ	$(n_F - n_C/\rho)$
Ајкманова (<i>Еукмен</i>) константа	E	$[(n^2 - 1)/(n + 0,4)] \cdot 1/\rho$

Легенда: n - индекс на рефракција; ρ - густина; M - молекулска маса изразена во SI единици;

Гладстон-Дејл-ова равенка

Специфичната енергија на рефракција е дадена со равенката на Гладстон-Дејл (*Gladstone-Dale*):

$$\frac{n-1}{\rho} = \text{const} \quad (9.9)$$

Оваа константа се применува за анализа на намирници и во други области каде што е потребно, преку резултатите добиени од мерењето на индексот на рефракција, да се определи приближната вредност на густината на различни температури. Густината се определува преку вредноста на константата на испитуваната супстанција и оваа величина, во тесен температурен опсег, не зависи од температурата.

Специфична рефракција

Зависноста на индексот на рефракција од густината на супстанцијата може да се претстави со равенката на Лоренц и Лоренц (*Lorentz and Lorentz*):

$$[n] = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{1}{\rho} \quad (9.10)$$

каде што: $[n]$ претставува специфична рефракција, n е индексот на рефракција на супстанцијата, а ρ е густината на супстанцијата.

Иако индексот на рефракција зависи од температурата, со комбинирање на индексот на рефракција и густината на супстанцијата се добива величина што не зависи од температурата (специфична рефракција). Со помош на оваа величина, од резултатите од мерењата добиени за течната фаза на супстанцијата, може да се определи индексот на рефракција на гасната фаза. Равенката 9.10 се применува и за пресметување на индексот на рефракција на цврсти тела преку мерења на растворот на испитуваната супстанција.

Моларна рефракција

Вредноста за моларната рефракција R се добива со множење на специфичната рефракција $[n]$ со молекулската маса на испитуваната супстанција.

$$R = \frac{n^2-1}{n^2+2} \cdot \frac{M}{\rho} \quad (9.11)$$

Единици на моларната рефракција се $cm^{-3} \cdot mol^{-1}$. Вредноста на моларната рефракција зависи од видот и бројот на атомите и видот на врските помеѓу атомите во молекулот. Моларната рефракција претставува адитивна и конститутивна величина и се применува за одредување на структурата на органските соединенија.

Моларната рефракција на едно соединение теоретски може да се пресмета ако е позната неговата емпириска формула, со собирање на атомските рефракции (рефракција на поединечни атоми) и рефракциите на атомските групи (на пример двојна врска, тројна врска или прстенеста структура).

Рефлексија на зрачењето

Кога зрачењето поминува низ средини со различен индекс на рефракција, се јавува рефлексија на зрачењето. Фракцијата на рефлектираното зрачење се зголемува со зголемување на разликите во индексите на рефракција на двете средини. За зрак што поминува на граничната површина меѓу две средини со различен индекс на рефракција (n_1 и n_2), фракцијата на рефлектирано зрачење е дадена со равенката:

$$\frac{I_r}{I_0} = \frac{(n_2-n_1)^2}{(n_2+n_1)^2} \quad (9.12)$$

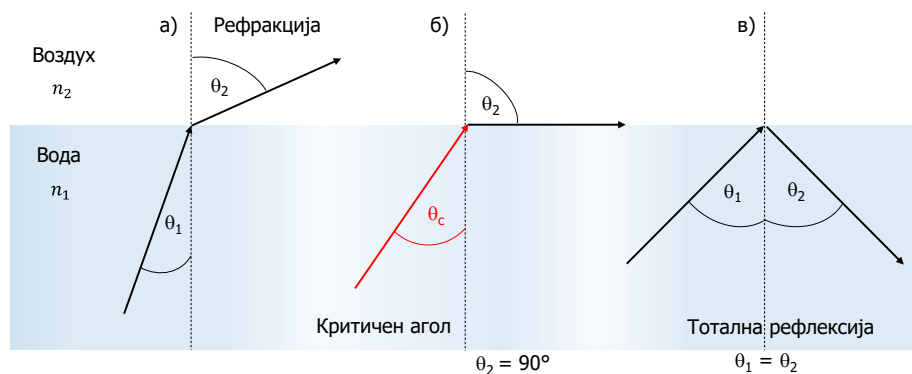
Каде што I_0 е интензитетот на упадниот зрак, а I_r е интензитетот на рефлектираниот зрак.

Инструменти за мерење на индексот на рефракција - рефрактометри

Инструментите за мерење на индексот на рефракција се нарекуваат рефрактометри. Принципот на работа на поголемиот број рефрактометри се темели на мерење на критичниот агол. Апаратурата треба да овозможува определување на пропишана температура и да обезбедува точно определување на индексот на рефракција (најмалку до трето децимално место). Термометрите, што се составен дел од современите рефрактометри, се градиурани во интервал од $0,5^\circ C$ или помалку.

Критичен агол

Критичен агол (θ_c) претставува аголот на упадната светлина што се прекршува така што рефрактираниот зрак лежи паралелно на граничната површина помеѓу двата медиума (упадниот агол на светлината во една средина, што дава агол на рефракција од 90°). Сите агли на упадниот зрак што се помали од критичниот агол се рефрактираат низ граничната површина, а сите упадни агли што се поголеми од критичниот агол во целост се рефлектираат (Слика 9.3). Зраците што се рефлектираат не можат да се прекршат и да преминат во другата средина, туку се одбиваат и се враќаат во истата средина



Слика 9.2 Приказ на: а) рефрактиран зрак, б) зрак што упаѓа под критичен агол и в) рефлектиран зрак.

Критичниот агол може да се пресмета ако е позната вредноста на индексот на рефракција на двата медиума. Тргувајќи од Снеловиот закон (равенка 9.3), кога рефрактираната светлина е паралелна со површината, аголот на рефракција е 90° . Тоа значи дека $\sin \theta_2$ изнесува 1 и критичниот агол ($\sin \theta_c$) може да се пресмета според равенката:

$$\sin \theta_c = \frac{n_2}{n_1} \quad (9.13)$$

$$n_1 \sin \theta_c = n_2 \sin 90^\circ \quad (9.14)$$

Призми

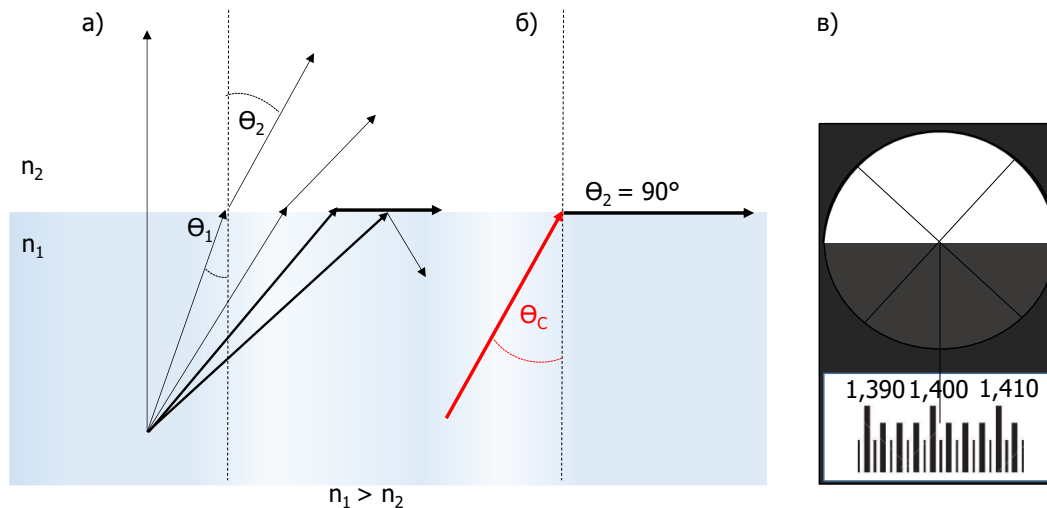
Рефрактометрите користат призми за мерење, коишто претставуваат гранична површина меѓу инструментот и супстанцијата чијшто индекс на рефракција се мери. Геометријата на оптичкиот систем е таква што светлосните зраци се проектираат на површината на призмата под одреден избран агол (критичен агол). Призмите служат како стандард за индекс на рефракција. Индексот на рефракција на призмата треба да биде поголем од индексот на рефракција на супстанцијата. Во спротивно ќе се појави тотална внатрешна рефлексија.

Материјалот од којшто е изработена призмата треба да биде што е можно повеќе механички отпорен и оптички хомоген и изотропен.

Оптичка слика

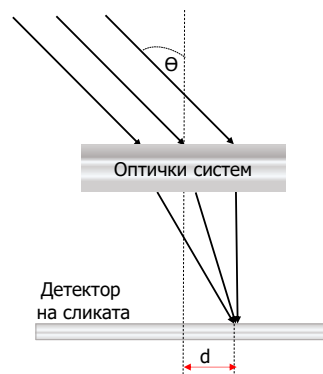
Кога средината 1 има поголем индекс на рефракција од средината 2 (Слика 9.3 а), аголот на рефракција (θ_2) е секогаш поголем од упадниот агол (θ_1). Со зголемување на аголот θ_1 аголот θ_2 достигнува вредност од 90° и прекршените зраци патуваат по должина на граничната површина (Слика 9.3 б). Со понатамошно зголемување на аголот θ_1 светлината нема да може да навлегува во средината 2 и се рефлектира назад во средината 1 (настанува целосна внатрешна рефлексија).

Принципот на работа на рефрактометрите се базира на мерење на критичниот агол при што во „видното поле“ на рефрактометарот се добива граница помеѓу светло и темно поле (Слика 9.3 в). Црното поле се добива како резултат на тоа што упадниот агол е помал од критичниот агол и светлината поминува низ примерокот, а белото поле претставува агол што е поголем од критичниот агол и светлината целосно се рефлектира (висок интензитет).



Слика 9.3 Мерење на критичен агол

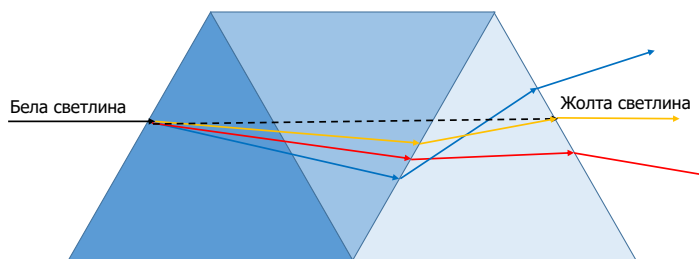
Треба да се напомене дека приказот даден на слика 9.3 б е нереален бидејќи упадниот зрак е прикажан како еден зрак што влегува само во една точка; всушност, упадниот зрак влегува во многу точки на површината и создава голем број критични зраци со ист критичен агол θ_c . Од тие причини, за да се добие остра граница меѓу светлото и темното поле во рефрактометарот (Слика 9.3 в), потребен е оптички систем од фокусирачки леќи. Сите светлосни зраци што доаѓаат од призмата и навлегуваат во оптичкиот систем под ист упаден агол (θ) се фокусираат во една точка на детекторот на сликата. Растојанието меѓу оваа точка и нормалата на оптичкиот систем зависи само од аголот на упадната светлина. Така, аголната дистрибуција на светлината може да биде конвертирана во распределба на позицијата на светлината на детекторот (Слика 9.4).



Слика 9.4 Оптика на анализаторот на рефрактометарот

Критичниот агол зависи од брановата должина, па ако се користи полихроматска светлина, не е можно да се добие остра граница помеѓу светлото и темното поле и се оневозможува точното определување на критичниот агол. Од тие причини, рефрактометрите користат монохроматска светлина. Одредени видови рефрактометри се опремени со компензатор што овозможува да се користи полихроматска светлина добиена од волфрамова ламба. Компензаторот се состои од една или две Амичи (*Amici*) призми. Амичи призмите се конструирани од призми изработени од различни видови стакла што ги скратуваат сите зраци со бранова должина различна од брановата должина на жолтата линија на натриумот (Слика 9.5). Со придвижување на овие призми во спротивни правци, можно е да се поништи или да се засили дисперзијата од самите призми, односно може да се постигне кој било степен на дисперзија на светлината. На тој начин може да се

поништи дисперзијата предизвикана од примерокот чијшто индекс на рефракција се определува. Придобивката од примената на Амичи призмите во конструкцијата на рефрактометрите е можноста да се користи бела светлина за осветлување на примерокот.



Слика 9.5 Шематски приказ на Амичи призма

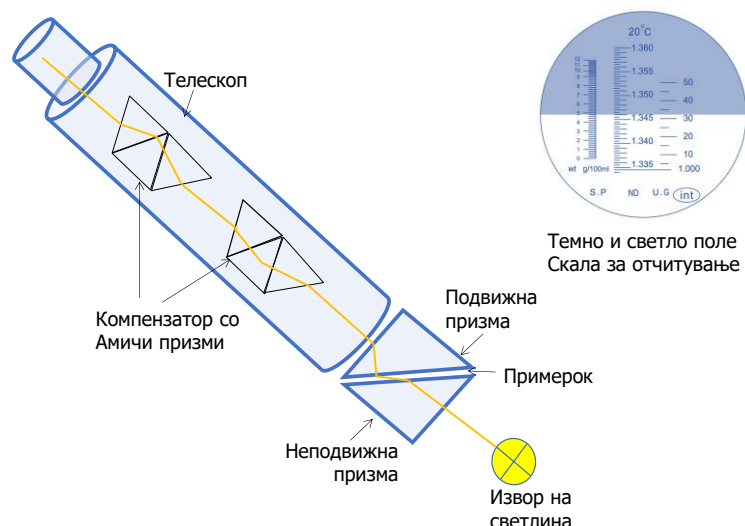
Видови рефрактометри

Постојат повеќе видови рефрактометри: лабораториски, рачни (преносливи) и вградливи (анг. *In-line*) рефрактометри.

Лабораториски рефрактометри

Првиот комерцијално достапен лабораториски рефрактометар е конструиран во далечната 1869 година од страна на Ернст Абе (*Ernst Abbe*). Абеовиот рефрактометар и денес претставува еден од најчесто употребуваните рефрактометри за лабораториска употреба (Слика 9.6). Примерокот се става помеѓу две призми - неподвижна призма (призма за осветлување) и подвижна призма (призма за мерење). Светлината, од изворот, поминува низ призмата за осветлување. Оваа призма има нерамна површина, со што се овозможува дифузија на светлината во сите можни правци, со што се добива голем број зраци што паѓаат на примерокот. Потоа зраците од примерокот поминуваат низ призмата за мерење, при што настанува нивно прекршување. Подвижната призма е направена од стакло и има голема вредност за индексот на рефракција (n_D^{20} 1,75). Со овој тип рефрактометар може да се определи индексот на рефракција на течности што имаат помал индекс на рефракција од тој на призмата. Зраците што се прекршуваат под граничен агол создаваат граница помеѓу темниот и светлиот дел на призмата, а телескопот овозможува да се одреди позицијата на границата меѓу темното и светлото поле. Телескопот ја превртува сликата, па темното поле се гледа на дното во окуларот. Индексот на прекршување на стаклото на подвижната призма и аголот на призмата се константи што се однапред познати за секоја призма. Познавајќи ја нивната вредност, може да се определи индексот на рефракција на примерокот. Со ротирање на регулаторот се добива остра граница помеѓу светлото и темното поле. Индексот на рефракција се отчитува директно од скалата за читање на апаратот.

Индексот на рефракција на супстанцијата зависи од брановата должина. Ако изворот на светлина не дава монохроматска светлина, наместо остра граница помеѓу светлото и темното поле, се добива заматена сина или црвена граница. Во тој случај не е можно точно одредување на индексот на рефракција. За да се спречи оваа појава, Абеовиот рефрактометар содржи две компензаторни Амичи призми. Двете Амичи призми може да ротираат една во однос на друга, со цел да се соберат дивергентните зраци на критичниот агол во еден зрак. Тоа овозможува да се направи корекција на дисперзијата и да се добие остра граница меѓу светлото и темното поле. Со вртење на регулаторот се менува аголот на призмите сè додека темниот и светлиот дел на полето не се совпаднаат со пресекот (Слика 9.6).

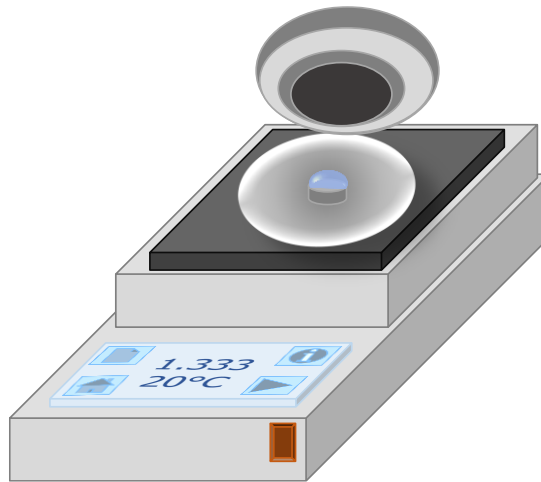


Слика 9.6 Шематски приказ на составните делови на Абеов рефрактометар

Кај современите модели за Абеовиот рефрактометар телескопот не е подвижен, но има дополнително подвижно огледало помеѓу примерокот и телескопот. Со оглед на тоа што индексот на рефракција се менува со промена на температурата, за точно одредување на индексот на рефракција потребно е температурата на примерокот да се одржува константна или да се мери за да може да се направи корекција. Современите модели на Абеовиот рефрактометар се опремени со термометар и со дел низ кој циркулира вода, со цел одржување константна температура.

Абеовиот рефрактометар се користи за определување на рефракција на течни и на цврсти супстанции во широк опсег на вредности од 1,3 до 1,7. Количината на потребниот примерок е многу мала, а точноста на инструментот изнесува $\pm 0,0002$. Со помош на Абеовиот рефрактометар може да се определи индексот на рефракција на водени, на алкохолни и на етерски раствори, масла и восоци, прехранбени производи, тинктури, смоли и синтетички материјали, оптички стакла и друго.

Дигиталните автоматските лабораториски рефрактометри (Слика 9.7) се современи рефрактометри каде што оптичката слика се претвора во дигитален сигнал и наоѓаат голема примена во лабораториите за контрола на квалитет. Овој вид рефрактометри имаат софтверски решенија што овозможуваат точно одредување на граничната линија. Главна предност на електронските над оптичките рефрактометри е што одредувањето на граничната линија, односно на индексот на рефракција, не е подложно на грешка што потекнува од операторот на инструментот.

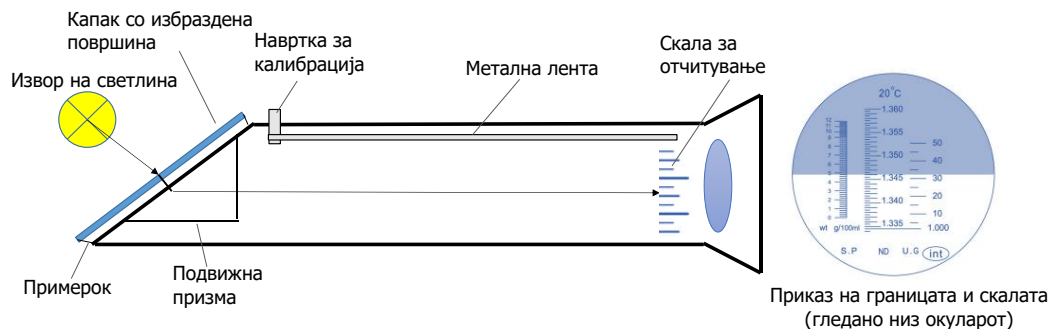


Слика 9.7 Шематски приказ на дигитален рефрактометар

Рачни (преносливи) рефрактометри

Рачните рефрактометри имаат голема примена бидејќи се преносливи и можат да се донесат на местото на испитување на примерокот. Главна разлика помеѓу лабораториските и рачните рефрактометри е во тоа што рачните рефрактометри наместо призма за осветлување (неподвижна призма) имаат капак (*illuminator flap*) за осветлување што го држи примерокот. Примерокот се става на призмата и капакот се затвора. Светлината поминува низ примерокот, низ призмата за мерење и останатите леќи и на крај паѓа на скалата за мерење (Слика 9.8).

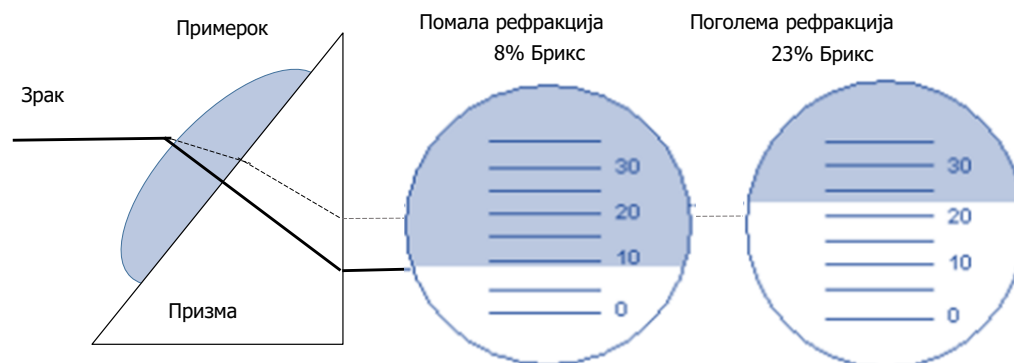
Со цел да се избегнат грешки во мерењето што потекнуваат од разлики во температурата, рачните рефрактометри пред употреба треба да се калибрираат или да се врши корекција на измерената вредност користејќи табели за корекција на температурата.



Слика 9.8 Шематски приказ на рачен рефрактометар

Многу често рачните рефрактометри, освен скалата за отчитување на индексот на рефракција, имаат и други скали како што се Бриксова (Brix) скала што овозможува директно отчитување на процентот на шеќер; скала за определување на содржината на алкохол; скала за определување на релативната густина. Бриксвата скала претставува интернационално препознаена скала што го поврзува индексот на рефракција со концентрацијата на шеќерот во растворот (Слика 9.9). Така, на пример, ако примерокот има 1 Бриксов степен (Brix% или °Be), тоа значи дека има ист индекс на рефракција како воден раствор на 1 g сахароза во 100 g вода. Многу од прехранбените производи содржат посложени

шеќери од сахарозата и други супстанции што можат да влијаат на индексот на рефракција и кај овие продукти се користи т.н. привидна Бриксва скала.



Слика 9.9 Шематски приказ на Бриксва скала

Вградливи (*In-line*) рефрактометри

Вградливите (*In-line*) рефрактометри се користат за следење и контрола на процесот на производство на течности, алкохолни и безалкохолни пијалоци, млечни производи и др. Овие рефрактометри се поставуваат во цевките на производната опрема и овозможуваат континуирано следење на индексот на рефракција на производите. Светлина од ЛЕД-извор, преку оптичко влакно, се пренесува на едната страна на призмата за мерење. Дел од оваа светлина е рефрактиран, а дел е рефлектиран назад до спротивната страна на призмата, под агол што зависи од индексот на рефракција на примерокот. Положбата на рефлектираниот зрак се менува во зависност од критичниот агол, односно од индексот на рефракција на примерокот. Потоа, се одредува промената на положбата на рефлектираниот зрак и оваа положба е калибрирана во однос на индексот на рефракција на примерокот.

Примена на рефрактометријата

Индексот на рефракција е физичка константа за дадена супстанција (пр. n_D^{20} метанол 1,3286; n_D^{20} етанол 1,3613; n_D^{20} ацетон 1,3591; n_D^{20} хлороформ 1,4456; n_D^{20} вода 1,3330) и наоѓа примена за потврдување на идентитетот на супстанцијата.

Со оглед што индексот на рефракција зависи од чистотата на примерокот, рефрактометријата се користи и за определување на степенот на чистота. Индексот на рефракција на растворите зависи од концентрацијата на растворената супстанција, па оттука овој метод наоѓа примена за определување на содржината на одредени супстанции.

Примена на рефрактометријата за квалитативна анализа

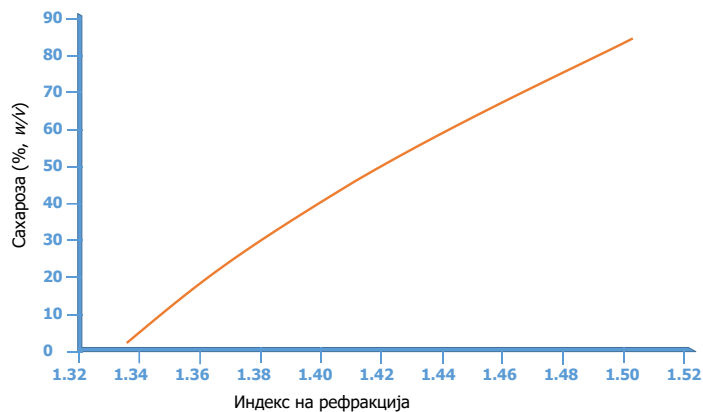
Споредбата на индексот на рефракција на испитуваната супстанција со вредност дадена во литературата овозможува да се потврди идентитетот или чистотата на испитуваниот примерок. Постојат бази на податоци што содржат вредности за индексот на рефракција на голем број супстанции. Присуството на мали количини на онечистувања во примерокот даваат големи промени во вредноста на индексот на рефракција. По правило, за задоволително совпаѓање се смета ако вредностите на индексот на рефракција на испитуваниот примерок и вредноста дадена во базата со податоци (литературна вредност) не се разликуваат за повеќе од $\pm 0,002$; при што условите при испитување на примерокот

(температура и бранова должина на светлината) треба да се совпаѓаат со условите на коишто се однесуваат вредностите дадени во базата со податоци.

Примена на рефрактометријата за квантитативна анализа

Рефрактометријата често се користи за определување на концентрацијата на супстанции во раствор. Најчесто постои линеарна зависност помеѓу индексот на рефракција и концентрацијата на растворот (Слика 9.10). Концентрацијата најчесто се определува со примена на методот на баждарен дијаграм, преку формула, со користење на рефрактометриски таблици или директно се отчитува од Бриксовата скала.

Рефрактометриските методи наоѓаат голема примена за определување на процентот на шеќер во сокови, сирупи, процентот на алкохол во пиво или во вино, содржината на NaCl во вода, концентрацијата на антифриз и друго.



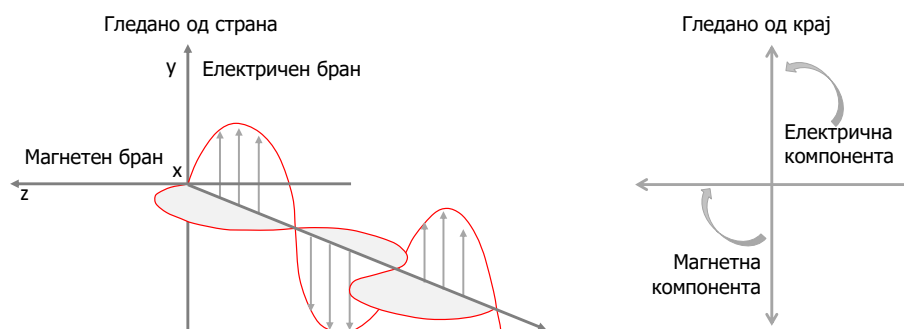
Слика 9.10 Приказ на зависноста помеѓу индексот на рефракција и концентрацијата на растворот

ПОЛАРИМЕТРИЈА

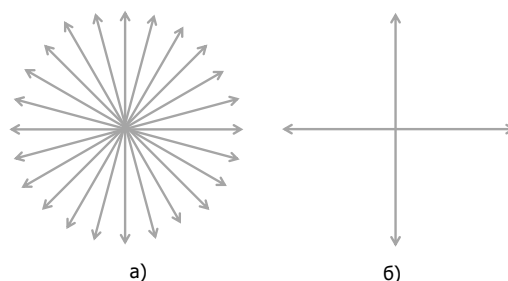
Полариметријата претставува инструментална техника што се темели на својството на оптичките активни супстанции да ја ротираат рамнината на планарно поларизираната светлина.

Поларизација на светлината

Светлината е составена од две компоненти, електричен и магнетен бран, што се шират во рамнината на светлината под агол од 90° (Слика 10.1). Природната светлина (на пример, светлината од ламбите, пламенот на свеќата и др.), се состои од голем број електрични и магнетни бранови што не осцилираат само во насока нормална на рамнината на светлината, туку во безброј рамнини кружно поставени околу правецот на нејзиното ширење. За оваа светлина се вели дека е **неполаризирана светлина** (Слика 10.2 а). Кога неполаризираната светлина ќе се пропушти низ специјални оптички призми наречени поларизатори, зракот што поминува осцилира само во една рамнина. Светлината во којашто електромагнетните бранови осцилираат само во правецот нормален на рамнината на ширење на светлината се нарекува **планарно поларизирана светлина** (Слика 10.2 б). Процесот на трансформација на неполаризираната светлина во поларизирана е познат како **поларизација**. Материјалот што се користи за поларизација има својство да апсорбира една компонента (зрак што осцилира во една рамнина), а да пропушта друга компонента (зрак што осцилира во друга рамнина).

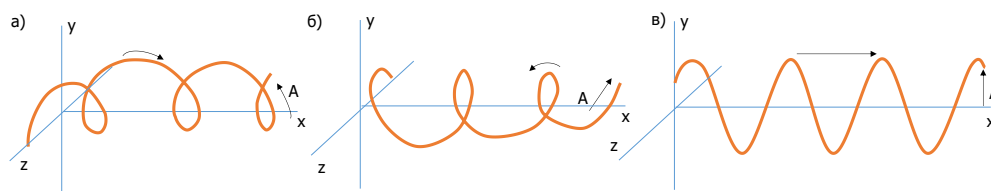


Слика 10.1. Компоненти на електромагнетното зрачење



Слика 10.2. Дијаграм на: а) неполаризирано и б) поларизирано зрачење

Електричното поле на поларизираната светлина е векторска величина и се состои од два вектора што се движат со иста брзина, но во различен правец (ротираат кружно лево и десно) (Слика 10.3 а и б). Зракот на планарно поларизираната светлина претставува збир од двата вектора (Слика 10.3 в).

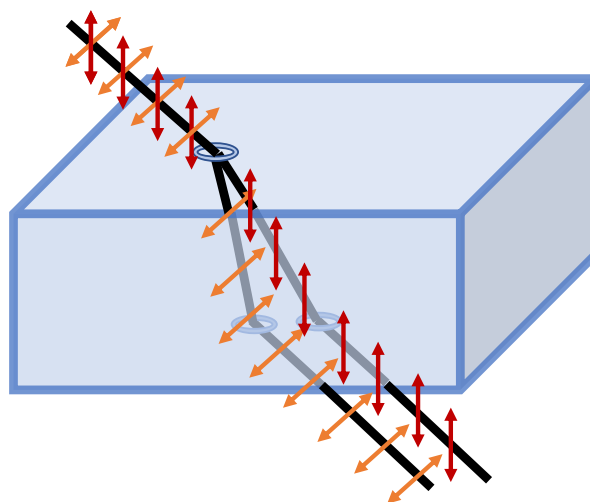


Слика 10.3 Ориентација на векторите на брановите на поларизираната светлина: а) поединечен приказ на векторот што ротира на десно, б) поединечен приказ на векторот што ротира на леви, в) збиен вектор

Зракот на светлината може да биде поларизиран до различен степен на поларизација, од нула (целосна симетрија) до 100 % (целосна поларизација).

Покрај планарно поларизирана светлина, постојат и други видови поларизација, како, на пример цилиндрично поларизирана и елиптично поларизирана светлина.

Поларизација на светлината може да настане и при рефракција на зракот. Рефракција настанува кога зракот поминува од еден во друг материјал (средина) и на граничната површина меѓу двете средини зракот го менува својот правец на простирање. Анизотропните кристали, како на пример минералот калцит (посебна форма на калциум карбонат), имаат особина двојно да ја прекршуваат светлината, односно го рефрактираат упадниот зрак во два различни правци (Слика 10.4). При поминување низ кристалот, светлината се дели на два линеарно поларизирани зрака што се простираат во меѓусебно дивергентни правци, така што се просторно одделени: едниот зрак осцилира паралелно на рамнината, а другиот осцилира нормално на рамнината (нивните рамнини се поставени нормално една на друга).



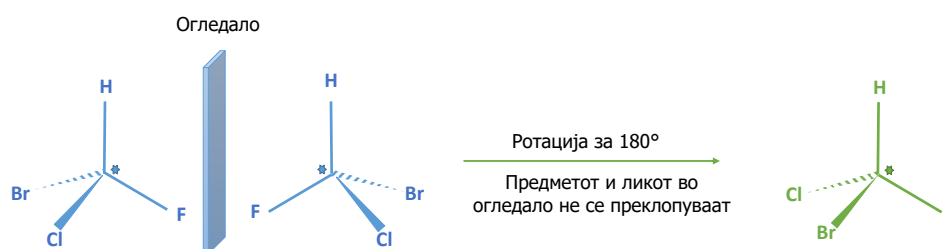
Слика 10.4 Приказ на два рефрактирани зрака што поминуваат низ кристал и се поларизирани нормално еден на друг

Кристалот калцит најчесто се користи за изработка на Николови (*Nicol*) призми, што се применуваат за поларизација на светлината. Помеѓу двете полови на кристалот се нанесува слој од канада (*Canada*) балзам (транспарентна супстанција со индекс на рефракција помеѓу двата индекси на рефракција на калцитот). Овој слој овозможува постигнување на тотална рефлексција на едниот зрак, а пропуштање на другиот зрак што поминува во средината што е цел на испитувањето.

Оптички активни супстанции

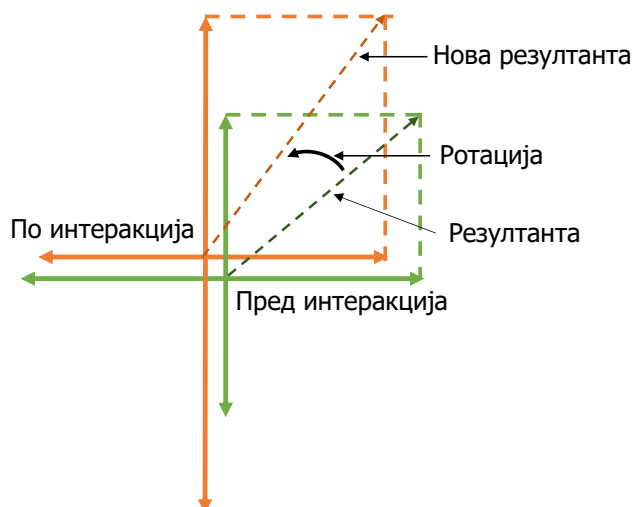
Супстанциите што имаат способност да ја вртат рамнината на планарно поларизираната светлина се нарекуваат **оптички активни супстанции**. Со други зборови, кога поларизираната светлина што осцилира во одредена рамнина ќе помине низ оптички активна супстанција, започнува да осцилира во друга рамнина.

Постојат голем број супстанции, течни или цврсти, што имаат способност да ја вртат рамнината на поларизираната светлина. Оптичка активност покажуваат органски молекули што немаат елементи на симетрија (асиметрични). Тоа се молекули коишто во својата структура имаат хирален јаглероден атом (атом што е врзан за четири различни атоми или атомски групи). Овој тип молекули постојат во две стереоизомерни форми (енантиомери) што се однесуваат како предмет и лик во огледало, што не се преклопуваат (Слика 10.5).



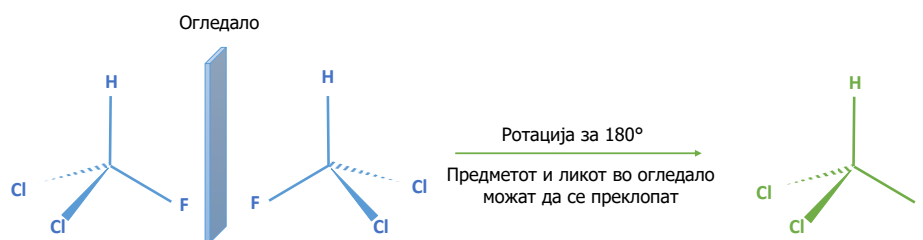
Слика 10.5 Конфигурација на асиметрична молекула (бромохлорофлуорометан)

Од сликата се гледа дека ликот во огледало (добиеен со ротација од 180°) на бромохлорофлуорометан како асиметрична молекула, во ниту еден случај не може да се преклопи со оригиналната молекула. Ако оваа молекула се озрачи со неполаризирана светлина, електричните компоненти на еден од зраците стапуваат во поголема интеракција со едната страна на молекулата во однос на другата страна. Бидејќи светлината е неполаризирана, постојат голем број зраци што се спротивно поставени од првиот зрак и реагираат со молекулата на ист начин, но од спротивен правец. Поради тоа, ефектот се поништува и нема да се забележи промената на правецот на светлината. Од друга страна, ако молекулата на бромохлорофлуорометан се озрачи со поларизирана светлина, бидејќи сите зраци осцилираат во една рамнина, не постои начин да се поништат ефектите. Во овој случај може да се забележи свртувањето на рамнината на светлината (Слика 10.6).



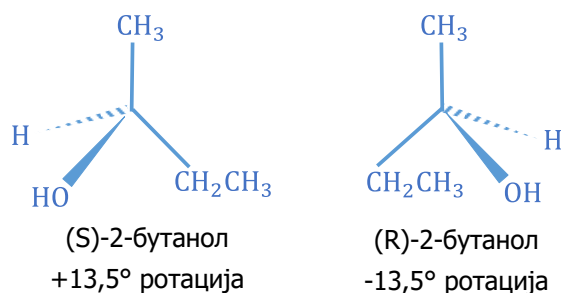
Слика 10.6. Ротација на планарно поларизирана светлина

Молекули што имаат рамнина на симетрија (Слика 10.7) не може да ја ротираат рамнината на планарно поларизираната светлина бидејќи ефектите од едната страна на молекулата се поништуваат со ефектите од другата страна на молекулата.



Слика 10.7. Конфигурација на симетрична молекула – дихлорофлуорометан

Енантиомерите имаат исти физички својства (на пример, точка на вриење, точка на топење, индекс на рефракција), но се разликуваат по својството на оптичка ротација. Тие ја вртат рамнината на поларизираната светлина за иста вредност, но во спротивна насока. Ако енантиомерот ја врти рамнината на поларизираната светлина во насока на стрелките на часовникот се означува како декстогирен (*d* или +), а доколку ја врти во насока спротивна од насоката на стрелките на часовникот се означува како левогирен (*l* или -). Меѓутоа треба да се напомене дека правецот на вртење на поларизираната светлина не е поврзан со конфигурацијата (*S* и *R*) на енантиомерот (Слика 10.8).



Слика 10.8 *S*-2-бутанол е *d*- енантиомерна форма, *R*-2-бутанол е *l*- енантиомерна форма

Рацемска смеса претставува смеса во која двата енантиомери се застапени во еднакви количини, ја вртат рамнината за ист степен но во различен правец, со што ефектот се поништува. Оттука вредноста на оптичката ротација кај рацемската смеса изнесува нула.

Кај одредени свежо подготвени раствори, вредноста за специфична оптичка ротација се менува во текот на времето и по одредено време постигнува вредност што останува константна. Оваа појава се нарекува **мутаротација**. Мутаротацијата настанува како резултат на истовремено присуство на две изомерни форми во растворот што преминуваат од една во друга, сè додека не се воспостави рамнотежна состојба. Кога ќе се воспостави рамнотежа, вредноста за специфичната оптичка ротација останува константна. Оваа појава најчесто се забележува кај раствори на циклични шеќери (на пример глукоза).

Оптичка ротација

Оптичката активност се карактеризира со агол на оптичка ротација. Ако оптички активна супстанција се наоѓа во раствор, вредноста на аголот на ротација зависи пропорционално од: должината на слојот на оптички активната

супстанција низ кој поминува светлината, концентрацијата и од природата на самата супстанција.

Агол на оптичка ротација (α) претставува агол на ротација, изразен во степени ($^\circ$), на рамнината на поларизираната светлина на бранова должина на D-линијата на натриумот ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$), измерена на температура од 20°C , што поминува низ слој на оптички активна супстанција со должина од 1 dm.

Специфична оптичка ротација $[\alpha]_D^{20}$ **на супстанција во раствор** се дефинира како агол на ротација (α), изразен во степени ($^\circ$), на рамнината на поларизираната светлина на бранова должина на D-линијата на натриумот ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$), измерена на температура од 20°C , што поминува низ слој на растворот на супстанцијата што се испитува со должина од 1 dm и концентрација од 1 g/mL. Специфичната оптичка ротација на супстанции во раствор, секогаш се изразува во однос на растворувачот и концентрацијата на растворот:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{1000 \cdot [\alpha]}{l \cdot c} \quad (10.1)$$

Специфична оптичка ротација $[\alpha]_D^{20}$ **на течности** се дефинира како агол на ротација (α), изразен во степени ($^\circ$), на рамнината на поларизираната светлина на бранова должина на D-линијата на натриумот ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$), измерена на температура од 20°C на течнота што се испитува, пресметана во однос на должина на слој 1 dm, поделено со густината на течнота на 20°C (ρ_{20}):

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{[\alpha]}{l \cdot \rho_{20}} \quad (10.2)$$

Мерните единици на специфичната оптичка ротација се $(^\circ) \cdot \text{mL} \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$. Сепак во конвенционалниот систем прифатен од Европската фармакопеја, специфичната оптичка ротација се изразува како бездимензионална величина.

Покрај специфична оптичка ротација, се користи и *моларна ротација* $[M]_D^{20}$ што се пресметува со изразот:

$$[M]_D^{20} = \frac{[\alpha]_M}{100} \quad (10.3)$$

при што M ја претставува молекулската маса на оптички активната супстанција.

Фактори што влијаат на специфичната оптичка ротација

Големината на специфичната оптичка ротација зависи од природата на супстанцијата, од дебелината на слојот на оптички активната супстанција (определена од должина на цевката во која се наоѓа супстанцијата), од температурата, од брановата должина и од концентрацијата на оптички активната супстанција што се наоѓа во раствор. Поради влијанието на овие променливи врз вредноста на специфичната оптичка ротација, условите на коишто се врши определувањето мора да бидат дефинирани. Мерењата се изведуваат на температура од 20°C , што е земена за стандардна температура и со светлина со бранова должина што одговара на D-линијата на натриум ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$) или поретко на зелената живина линија ($\lambda = 546,1 \text{ nm}$).

1. *Температура.* При загревање цевката во којашто се наоѓа оптички активната супстанција може да се забележат три појави. Најочигледна појава е ширењето на цевката во којашто се наоѓа растворот. Втората појава е намалување на густината на растворот, што доведува до намалување на бројот на оптички активни молекули на единица должина. Третата појава е влијанието на температурата врз молекулите на оптички активната супстанција, што може да доведе до нивна асоцијација, дисоцијација итн.

Не постои општо правило за влијанието на температурата, освен што со промена на температурата се зголемува подвижноста на групите врзани за хиралниот јаглероден атом, што доведува до можни промени во структурата. Супстанциите се разликуваат според својот температурен коефициент на ротација. Така, на пример, промената на температурата доведува до многу мала промена на оптичката ротација на растворот на глукоза, додека со промена на температурата настанува голема промена во вредноста на оптичката ротација на растворот на d -фруктоза. Ефектот се изразува со следната равенка:

$$[\alpha]_D^t = [\alpha]_D^0 + nt \quad (10.4)$$

каде што n претставува температурен коефициент, t е температура ($^{\circ}$). За d -фруктозата $n = 0,32$, а за глукозата $n = 0,0144$. Ротацијата на инвертниот шеќер, што се состои од еквимоларни количини на глукоза ($[\alpha]_D^{20} = +52,5^{\circ}$) и d -фруктоза ($[\alpha]_D^{20} = -93^{\circ}$) добива вредност нула на $87,2^{\circ}\text{C}$, како резултат на намалувањето на ротацијата што потекнува од d -фруктозата. Ова се применува при анализа на инвертниот шеќер.

2. *Растворувач.* Влијанието на растворувачот зависи од неговата поларност во однос на поларноста на испитуваната супстанција. Така, на пример, ротацијата на метил-1-метилнафтат, во различни растворувачи, може да се менува за 500° . Во неполарен растворувач, висока концентрација на поларна оптички активна супстанција доведува до формирање на асоцирани молекули од супстанцијата, што доведува до намалување на вредноста на аголот на оптичката ротација. Во раствори што се во целост дисоцирани, оптичката активност на електролитите не зависи од неактивните јони. Така, сите соли на оптички активни бази треба да имаат речиси иста ротација на грам еквивалент, независно од киселинскиот остаток. Во најголем број случаи влијанието на растворувачот е мало, но кај одредени супстанции можни се поголеми промени како резултат на солватација. Примена на различни растворувачи може да доведе до добивање различни вредности за специфичната оптичка ротација, па при одредувањето е неопходно да се води сметка на видот на применетиот растворувач.
3. *Концентрација на растворот.* Со зголемување на концентрацијата на растворот, специфичната оптичка ротација може да се зголеми или да се намали. Зависноста може, но и не мора да биде линеарна. Можни се три вида зависност на специфичната оптичка ротација од концентрацијата, и тоа: линеарна, параболична и хиперболична. Во најголем број случаи постои правопрпорционална зависност меѓу специфичната оптичка ротација и концентрацијата. Тоа овозможува овој метод да се користи за квантитативна анализа. Зависноста математички се изразува со Биотовиот (*Biot*) закон:

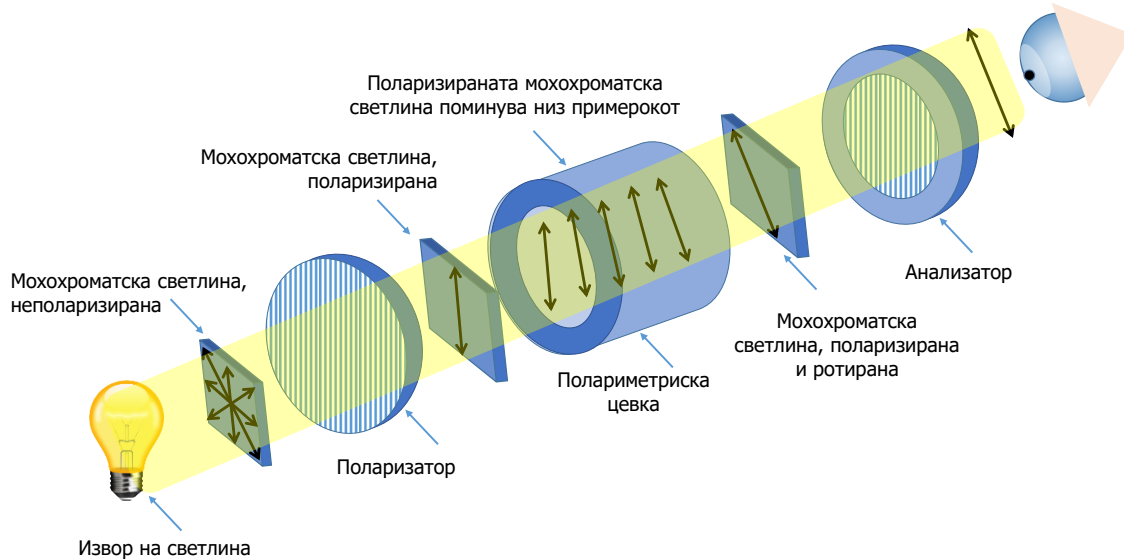
$$\alpha = [\alpha]_D^t l C \quad (10.5)$$

4. *Бранова должина.* Специфичната оптичка ротација се менува со промена на брановата должина на светлината. Кога светлина со различни бранови должини ќе помине низ оптички активна супстанција, различните бранови должини ја вртат рамнината на поларизираната светлина за различна вредност на аголот на ротација. Оваа појава се нарекува **ротациска дисперзија**.

Полариметри

Инструментите што се користат за мерење на оптичката активност се нарекуваат поларископи. Полариметар е поларископ со кружна скала. Сахариметар е специјално дизајниран поларископ што се користи за анализа на шеќери. Скалата на сахариметрите е калибрирана на начин што овозможува директно определување на содржината на шеќерот (изразен во проценти) во испитуваниот примерок.

Составните делови на полариметарот: извор на светлина, поларизатор (Николова призма), полариметриска цевка и анализатор (Николова призма) се прикажани на Слика 10.9.



Слика 10.9 Шематски приказ на составните делови на полариметар

Во полариметарот се користат два вида светлосни извори: натриумова ламба или живина ламба. Овие ламби содржат пареи од овие метали и емитираат линиски спектри со точно определена бранова должина. Се користат и одредени филтри со цел да се отстрани заднинското зрачење.

Неполаризираната емитирана светлина од изворот поминува низ првата Николова призма наречена поларизатор. Поларизаторот овозможува да продолжи понатаму (да помине низ полариметриската цевка) само поларизираната светлина.

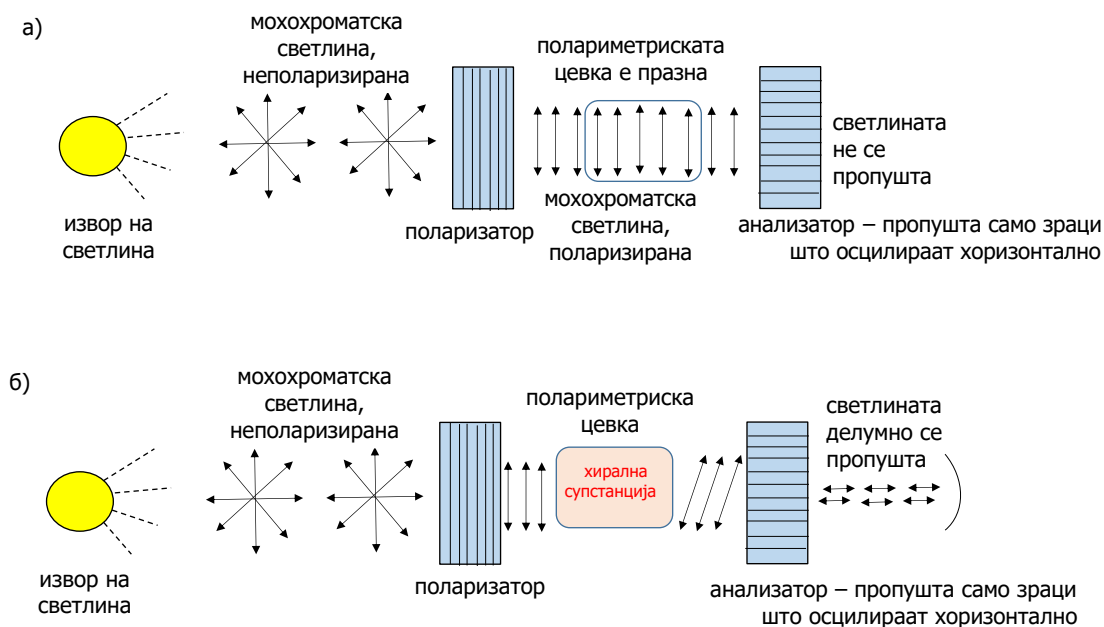
Примерокот за испитување (течна супстанција или раствор од цврста супстанција) се става во полариметриската цевка. Постојат различни видови полариметриски цевки: обични или цевки со обвивка низ која циркулира вода за контролирање на температурата. Овие цевки може да имаат различна должина (1 dm; 2 dm; 2,2 dm или 4 dm). Кога количината на примерокот за испитување е мала, може да се користат микроцевки, со капацитет од неколку cm^3 .

Светлината што излегува од полариметриската цевка во која се наоѓа примерокот, паѓа на друга Николова призма наречена анализатор. Анализаторот може да ротира, односно да зазема различна положба во однос на поларизаторот.

Анализаторот може во целост да го пропушти поларизираниот зрак што осцилира во рамнина хоризонтално поставена на рамнината на анализаторот. Ако поларизираниот зрак осцилира во рамнина што е нормално поставена на рамнината на анализаторот, тогаш анализаторот не го пропушта овој зрак и во целост го згаснува.

Ако правецот на осцилирање на поларизираните зрак зазема одреден агол помеѓу 0° и 90° , Николовата призма во својство на анализаторот, ќе пропушти светлина со интензитет што се зголемува со намалување на овој агол.

Кога поларизаторот и анализаторот се поставени така што рамнините на нивните главни пресеци се нормално поставени, светлосниот зрак што доаѓа од поларизаторот има правец на осцилирање нормален на рамнината на анализаторот и ќе биде целосно изгаснат (Слика 10.10 а). Ваквиот начин на поставеност на анализаторот во однос на поларизаторот се нарекува **вкрстена поставеност**. Оваа поставеност, во окуларот на полариметарот, се гледа како целосно темно поле. Кога поларизаторот и анализаторот се вкрстено поставени секоја промена во правецот на осцилирање на светлината, што настанува како резултат на присуството на оптички активната супстанција, може лесно да се забележи, бидејќи доведува до делумно пропуштање на светлината (Слика 10.10 б). Аголот за којшто треба да се заврти анализаторот за светлосниот зрак да биде повторно изгаснат, односно повторно да се добие темно поле, е еднаков на аголот на ротација на оптички активната супстанција.



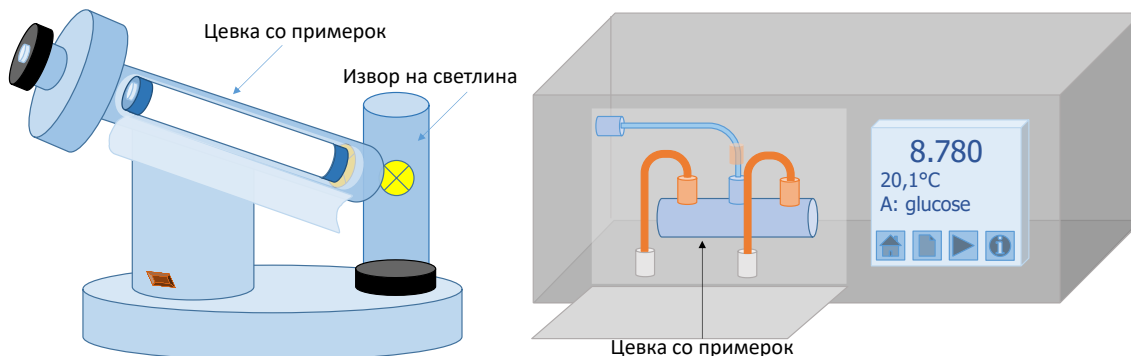
Слика 10.10 Шематски приказ на вкрстено поставени поларизатор и анализатор: а) полариметриската цевка е празна, б) во полариметриската цевка е поставена оптички активна супстанција.

Точноста на отчитувањето на аголот зависи од искуството на операторот кој треба точно да ја одреди положбата на анализаторот во која повторно настанува гаснење на светлосниот зрак. Меѓутоа човечкото око има поголема способност во видното поле да ја забележи разликата во осветлувањето на светлото и на темното поле, отколку минималната светлост. Од тие причини прецизните полариметри се конструирани така што операторот треба да оцени кога исчезнува разликата во осветлувањето на левата и на десната половина на видното поле.

Кај современите видови полариметри, мерењата се прават автоматизирано, при што анализаторот ротира и апаратот сам ја одредува ориентацијата на анализаторот со која се постигнува минимална оптичка трансмисија (Слика 10.11). Современите полариметри содржат систем за детекција што има можност од определување на аголот на оптичка ротација до најмалку втора децимала ($0,01^\circ$).

Дополнително, овие апарати се опремени со систем за одржување на температурата во граници од $\pm 0,5^\circ\text{C}$ од температурата пропишана во методот.

Дигиталните полариметри обезбедуваат поголема точност и прецизност во мерењата, а дополнително значително го скратуваат времето потребно да се изврши мерењето (околу една секунда). Кај дигиталните полариметри вредноста на аголот на оптичка ротација или концентрацијата на оптички активната супстанција се отчитува директно од дисплејот на апаратот (Слика 10.11).



Слика 10.11 Шематски приказ на а) рачен полариметар и б) дигитален полариметар

Примена на полариметријата

Полариметријата е неструктивна, осетлива техника. Правецот и големината на аголот на свртување на рамнината на планарно поларизираната светлина што поминува низ одредена дебелина на слој од оптички активна супстанција е карактеристичен за дадена супстанција и се користи за идентификација и за квантитативно определување.

Квалитативна анализа

Оптичката ротација на чиста супстанција, под дефинирани услови, претставува физичка константа. Оттука оптичката ротација, исто како и индексот на рефракција, точката на топење, точката на вриење и другите физички константи, се користи за идентификација на оптички активни супстанции. Оптичката активност е карактеристично својство за голем број природни супстанции, како, на пример, аминокиселини, стероиди, алкалоиди, јаглехидрати и антибиотици.

За да се потврди идентитетот на некоја супстанција потребно е да се определи вредноста на специфичната оптичка ротација и добиената вредност се споредува со литературно познатите вредности за супстанцијата. Овој метод може да се користи и за испитување на чистотата на оптички активните супстанции.

Квантитативна анализа

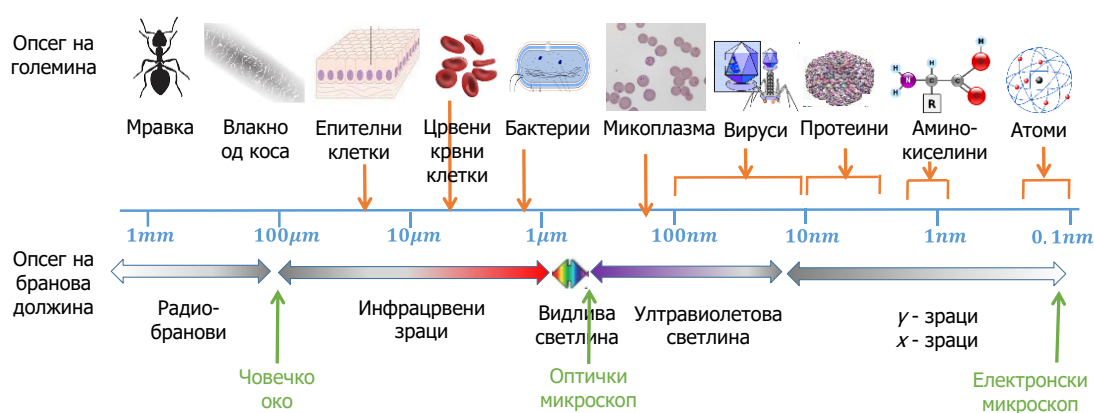
Квантитативната анализа на полариметријата се заснова на Биотовиот закон, според кој аголот на оптичката ротација зависи пропорционално од специфичната оптичка ротација, должината на слојот и концентрацијата на растворот.

За да се определи концентрацијата на оптички активната супстанција, потребно е да се измери аголот на ротација и да се знае вредноста на специфичната оптичка ротација.

$$C = [\alpha] \cdot \frac{1}{[\alpha]_D^t} \cdot \frac{100}{l} \quad (10.6)$$

ОСНОВИ НА ОПТИЧКА И НА ЕЛЕКТРОНСКА МИКРОСКОПИЈА

Човечките очи се способни да ги видат нештата до 1 mm при соодветно осветлување (за споредба влакно од коса има дијаметар од 20 до 50 μm). Многу биолошки клетки се со големина од неколку микрометри, што не е видно за човечкото око, но може да се видат како големи и јасни слики под микроскоп. Постојат и многу други помали објекти од интерес за истражување со големина под дијаметар од 1 μm . Елементите на протеините (аминокиселини) имаат дијаметар од само неколку нанометри, а атомите околу 0,1 nm. За набљудување на објекти со овој ред на големина, особено ако не се статични, потребни се микроскопи со поголема моќност, како што е скенирачки електронски микроскоп (*scanning electron microscope*, SEM). На Слика 11.1 се прикажани различни клетки и макромолекули распределени според нивната големина на логаритамска скала на должина, во однос на различни спектрални области од електромагнетниот спектар.



Слика 11.1 Електромагнетен спектар и логаритамска скала на должина (опсег од 1 mm до 0,1 nm). Со стрелки на долната страна од скалата се означени границите на резолуција на човечко око (0,1 mm), оптички микроскоп (0,1 μm) и електронски микроскоп (0,1 nm).

Микроскопите се измислени за да се визуелизираат предметите што не може да се видат со човечко око. Од првичниот развој на оптичките микроскопи, постигнати се драстични подобрувања во способноста да се набљудуваат разни објекти со нивно соодветно зголемување, како и разликување на различни структури преку подобрување на контрастот меѓу нив. Повеќето средства на визуелизирање се дел од електромагнетниот спектар и вклучуваат: светлина (фотони), x-зраци (високоенергетски фотони), електрони, ултразвук, микробранови, радиобранови итн.

Секоја од овие техники е карактеризирана со моќта на резолуција на инструментот, што претставува мерка за големина на предметот што може јасно да се идентификува со микроскопот. Со други зборови, **резолуцијата** претставува можност за разликување две мали точки, што се многу блиску една до друга, како два одделни ентитета. Врз резолуцијата на микроскопот влијаат: својства на средството за визуелизирање (на пример, бранова должина на светлината) и моќта на фокусирање на инструментот (на пример, нумерички отвор на објективот кај оптичкиот микроскоп). Овие фактори се претставени со едноставна равенка за пресметување на **граничната теоретска резолуција** за примарната леќа или леќата во објективот за даден микроскоп, предложена од Ернест Абе (*Ernest Abbe*) во 1882 година:

$$R = \lambda/2 NA \quad (11.1)$$

каде што:

R = резолуција (граничната теоретска резолуција, најмало растојание за два соседни објекти)

λ = бранова должина на светлината за визуелизирање

NA = нумерички отвор (*numerical aperture*) на леќите [пропорционален на индексот на рефракција и $\sin(\theta)$, каде θ е половина од аголот на упадната светлина до леќата].

Леќите имаат сопствени несовершености, т.н. **аберации**, што може да предизвикаат искривување на сликите, изместување на фокусот, обојување на рабовите на набљудуваните предмети итн. Корекција на оптичките аберации може да се направи со: подобрување на техниката за производство и брусење на леќите, оптимизација на формулацијата за стакло, примена на антирефлектирачки премази, контрола на оптичките патеки и комбинација на повеќе елементи на леќи. Оптималната резолуција на леќата зависи и од соодветно порамнување на фокусот на светлосните зраци што ќе овозможи воедначено и јасно осветлување на набљудуваниот примерок.

Микроскопијата претставува само еден сегмент од можните начини за разјаснување на микроструктурите и одредувањето на морфологијата на различни објекти од интерес. Дополнителен увид за изгледот на микро и наноструктури се постигнува со помош на различни техники за хемиско отсликување, како, на пример, конфокална ласерска скенирачка микроскопија (*confocal laser scanning microscope*) или алатки за определување физичка структура, како, на пример, структурна анализа со рентген-дифрактометар (*x-ray diffractometer*). Различни видови техники за микроскопирање и отсликување се дадени во Табела 11.1 (листата не е сеофатна).

Современите алатки за микроскопија и хемиско отсликување овозможуваат одредување на морфологијата и на дистрибуцијата на составните компоненти на различни предмети од интерес, како и мерење на димензиите, концентрациите, фракциите и кинетичките константи. Добиени вредности за квантитативни мерења се последното парче од сложувалката за објаснување на микроструктури.

Во ова поглавје се обработени основните принципи на оптичката и на електронската микроскопија, како и преглед на значајни карактеристики и можности за примена на секоја од техниките.

Табела 11.1 Видови микроскопи (избор на техники; листата не е сеопфатна)

Тип на микроскоп	Оптички микроскоп (<i>Compound microscope</i>)	Стереоскоп (<i>Dissection/Stereoscope</i>)	Скенирачки (<i>Scanning Tunnel microscope</i>)	SEM (<i>Scanning electron microscope</i>)	TEM (<i>Transmission Electron Microscope</i>)
Опис	оптички микроскоп составен од повеќе делови; се користи видлива светлина за илуминација; сликата што се набљудува е дводимензионална; се гледаат индивидуални клетки, вклучително и живи клетки; има висока вредност за зголемување, но ниска резолуција	се користи видлива светлина за осветлување; сликата што се набљудува е тридимензионална; се користи за дисекција на подобра слика на поголеми примероци; не се гледаат индивидуални клетки, затоа што има мала вредност за зголемување	овој микроскоп користи сонда што личи на игла за мерење на промена на напон предизвикан од електрони што протекуваат од површината на примерокот што се набљудува; компјутерски се следи движењето на електрони низ примерокот, овозможувајќи набљудување дури и на поединечни атоми, при што се добива 3D слика од површината на примерокот; може да се користи за набљудување живи организми	SEM користи електронска илуминација; сликата се гледа во 3 димензии; има висока вредност за зголемување и за резолуција; примерокот се обвиткува со злато и електроните се одбиваат површината со што се добива слика од надворешната страна на примерокот; сликите се црно-бели	ТЕМ користи електронска илуминација; сликата се гледа во 2 димензии; се гледаат пресеци од примерокот; електроните поминуваат преку пресеците; има висока вредност за зголемување и за резолуција
Извор на зрачење	видлива светлина	видлива светлина	електрони	електрони	електрони
Медиум	воздух	воздух	вакуум	вакуум	вакуум
Монтирање примерок	стаклени носачи (слајдови)	/	кермички уред за позиционирање	монтирани на алуминиумски стативи, се обвиткуваат со злато	тенок филм од колоид или друг помошен материјал врз бакарна мрежа
Природа на леќите	стакло	стакло	сонда	една електростатска леќа и неколку електромагнетни леќи	една електростатска леќа и неколку електромагнетни леќи
Фокусирање	механичко	механичко	дигитално, компјутер	електронски	електронски, т.е. се менува струјата на леќите од навртката на објективот
Приспособување на зголемување	објективи што се менуваат	вообичаено 1 објектив	дигитално, компјутер	електронски	електронски, т.е. со промена на струјата на леќите од навртката на објективот
Обезбедување контраст	апсорпција на светлина	расејување или рефлексија на светлина	разлики во напон	расејување електрони	расејување електрони

Оптичка микроскопија

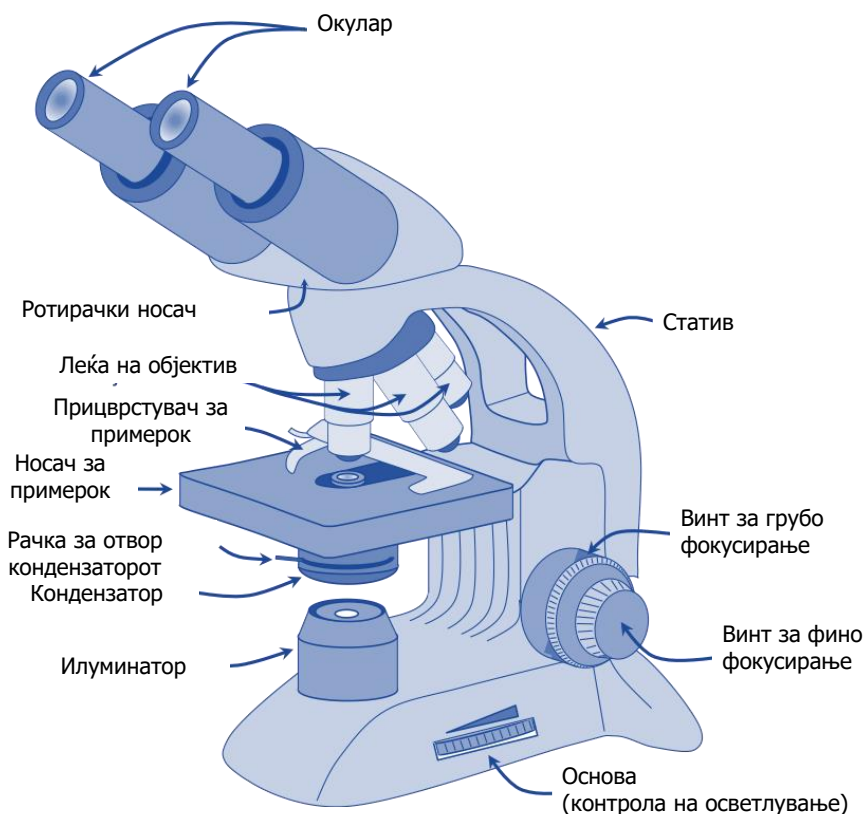
Светлосен микроскоп е оптички инструмент што користи видлива светлина за да произведе поголема слика на предмет (или примерок) што е проектирана на мрежницата на окото или на фотосензитивната површина на уредот за сликање. Зголемувањето се постигнува со помош на две леќи, објектив и окулар, при што се добива крајното зголемување на сликата M :

$$M(\text{крајно}) = M(\text{објектив}) \times M(\text{окулар})$$

Две компоненти на микроскоп се од клучно значење при формирањето на сликата:

- (1) објективот, којшто собира светлина дисперзирана од страна на примерокот и ја зголемува реалната слика врз т.н. вистинска интермедиерна рамнина на слика близу окуларите, и
- (2) кондензаторот, којшто ја фокусира светлината од осветлувачот на мала површина од примерокот.

На Сликата 11.2 се прикажани составните делови на исправен оптички микроскоп.



Слика 11.2 Оптички микроскоп, исправен

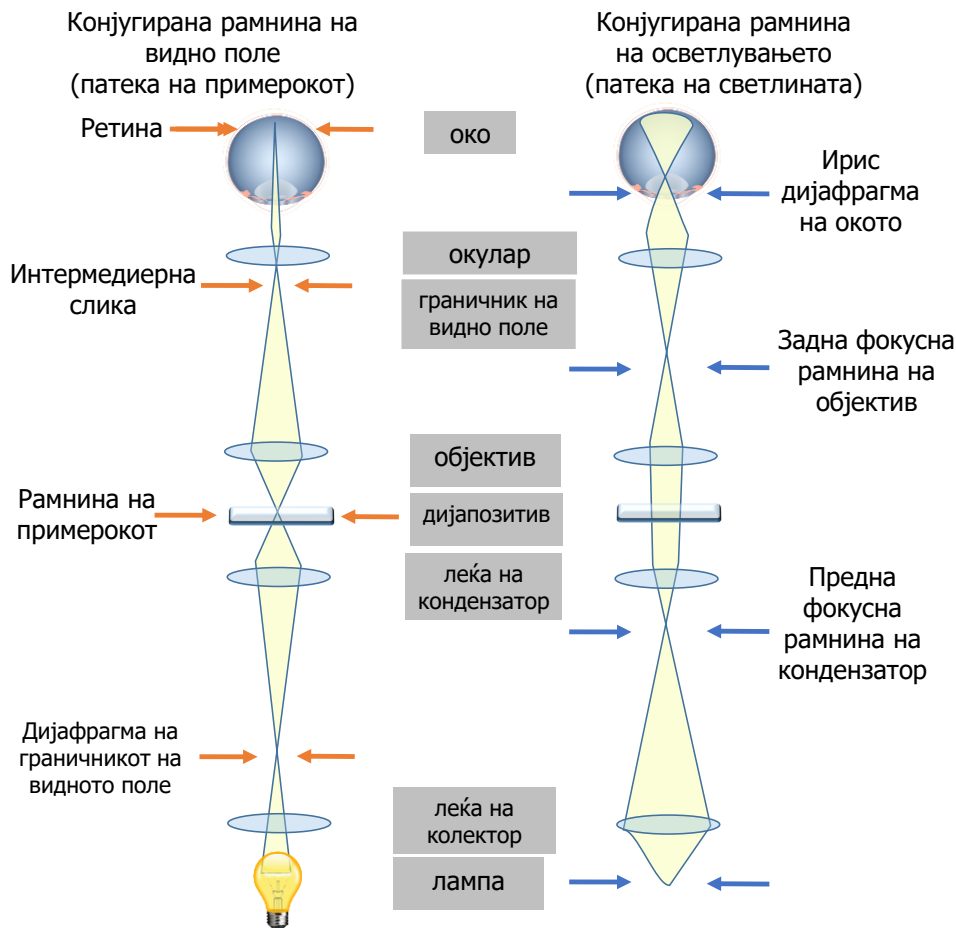
Изворот на светлина (илуминатор) овозможува осветлување на примерокот одоздола (дијаскопски начин на испитување). Постои можност за употреба на извор на флуоресцентно осветлување на примерокот (осветлување одозгора: епископски начин на испитување). Објективот и кондензаторот содржат повеќе леќи, коишто треба да се одржуваат внимателно. Другите делови на микроскопот се помалку критични за формирање слики: леќи за цевки и окулар, држач на ламби и приклучница за ламби и кабел, филтри, поларизатори, ретардери и микроскопски статив, како и винтови за грубо и фино фокусирање.

Микроскопите може да бидат со исправен или со превртен дизајн. Независно од дизајнот, рамнината на интермедиерната слика се создава на фиксна позиција, а со примена на винтот се мести на сликата на точната позиција од окуларот. Кај повеќето конвенционални (исправени) микроскопи, објективите се прицврстени на адаптер на телото од микроскоп, а винтот за контролата на фокусот го подигнува носачот за примерокот нагоре и надолу, со цел поставување на сликата на вистинското место од окуларот. Кај превртен дизајн, носачот на примерокот е фиксиран на стативот, а винтовите за фокус го движат објективот нагоре-надолу за сликата да се постави во окуларот. Овој тип микроскопи се популарни заради можноста за истражување живи клетки во сад со култура на медиум, користејќи стандардни објективи и без потреба од затворени проточни ќелии. Дополнително, положбата на центарот на маса во однос на работната маса кај овој тип микроскопи ги прави помалку подложни на вибрации. Како недостаток при работа со овој тип микроскоп се наведува можноста за физичко оштетување, ако објективот се приближи премногу до носачот на примерокот за време на ротација на куполата од објективот.

Оптичкиот микроскоп содржи два сета на испреплетени фокусни рамнини, вкупно осум, помеѓу изворот на светлина и окоето. Сите рамнини играат важна улога во формирањето на сликата. Некои од рамнините не се фиксирани и може да се поставени на различна позиција во зависност од позицијата на фокусот на објективот и кондензаторот на леќите. Од таа причина, важен чекор е да се приспособи микроскопот и неговиот извор на светлина во согласност со постапката за усогласување на рамнините, наречена „Кохлерово порамнување“, именувана според Август Кохлер (*August Köhler*), германски физичар.

Кохлерова илуминација

Осветлувањето е критичен параметар за перформансите на инструментот при оптичката микроскопија. Покрај интензитетот и опсегот на бранова должина на изворот на светлина, важно е да се насочи голем сноп на зракот светлина преку колекторската ламба кон предниот отвор на кондензаторот. Големината на осветленото поле на примерокот е приспособена да одговара на дијаметарот на објективот што се користи. Бидејќи секој зрак од изворот на светлина придонесува подеднакво за осветлување на рамнината на примерокот, варијациите во интензитетот на сликата му се препишуваат на предметот, а не на неправилното осветлување. Методот на осветлување воведен од Август Кохлер ги исполнува овие барања и е стандарден метод на осветлување што се користи во оптичката микроскопија (Слика 11.3). Според условите утврдени од Кохлер, колекторските леќи на куќиштето на ламбата се приспособени така што се фокусира сликата на влакната на светилката во предната фокусна рамнина на кондензаторот, додека отворот на блендата целосно е отворен. Под овие услови, осветлувањето на рамнината на примерокот е јако и рамномерно. За да се постигне оваа состојба, потребно е фокусирање на кондензаторот со помош на винтот за фокусирање на кондензаторот, со што се приспособуваат два комплекти на конјугирани фокусни рамнини на прецизни физички позиции во микроскопот.



Слика 11.3 Принцип на Кохлерова илуминација. Стрелките ги означуваат конјугираните фокусни рамнини (4 рамнини на патека на примерокот означени со црвени стрелки (лево) и 4 рамнини на патеката на светлината означени со сини стрелки (десно)) што се добиваат со вкрстување на зраците во дијаграмот.

Дијаграмот на левата страна покажува дека примерокот или рамнината на предметот е поврзан со рамнината на вистинската интермедиерна слика во окуларот, ретината од окото и дијафрагмата на граничникот на видното поле помеѓу ламбата и кондензаторот.

Цртежот од десната страна покажува дека влакното на лампата е поврзано со рамнините на отворот на предната фокусна рамнина на кондензаторот, задната фокусна рамнина на објективот и зеницата од окото. Двете групи на конјугирани рамнини се преклопуваат меѓусебно.

Новиот метод на осветлување што го вовеле Август Кохлер (*August Köhler*) во 1893 година додека работел на Универзитетот во Гисен (*Giessen*), Германија значително го подобри квалитетот на сликата и придонесе кон револуција на дизајнот на оптичките микроскопи. Тој вовеле колекторски леќи за ламбата за да се фокусира сликата на ламбата на предната решетка на кондензаторот. Светлечката станица на поле (дијафрагмата на полето) потоа се фокусира на примерокот со контрола на фокусот на кондензаторот. Методот обезбедува светло, рамномерно осветлување и ги утврдува позициите на фокусните рамнини на микроскопската оптика. Во подоцнежните години, овој принцип за осветлување ќе биде критичен за развој на: фазно-контрасна микроскопија (*contrast microscopy*), флуоресцентна микроскопија со епиелуминација (*fluorescence microscopy with epi-illumination*), контрастна микроскопија на диференцијална интерференција (*differential interference contrast microscopy*) и конфокални оптички системи (*confocal optical systems*).

Главните предности на осветлувањето според Кохлер во формирањето на сликите се:

- Јасно и рамномерно осветлување во рамнината на примерокот и во коњугираната рамнина на сликата. Дури и кога осветлувањето е обезбедено од неправилен извор на светлина, како што се вжарени жици, осветлувањето на предметот е воедначено во проширена област. Во овие услови на осветлување, дадена точка во примерокот е осветлена од секоја точка во изворот на светлина, и обратно, дадена точка во изворот на светлина ја осветлува секоја точка во примерокот.

- Позиционирање две различни групи на коњугирани фокусни рамнини на специфични локации по должината на оптичката оска на микроскопот, претставува строг услов за максимална просторна резолуција и оптимално формирање на слика за различни оптички системи. Центрирање на фокусот на носачот на примерокот и кондензаторот, овозможуваат правилно поставување на фокусните рамнини, додека правилното поставување на дијафрагмата на полето од примерокот и дијафрагмата на отворот на кондензаторот даваат контрола врз резолуцијата и контрастот. Откако се правилно приспособени, полесно е да се лоцираат и да се поправат интерферирачките фактори, како што се онечистувања или меури, што можат да ги намалат оптичките перформанси.

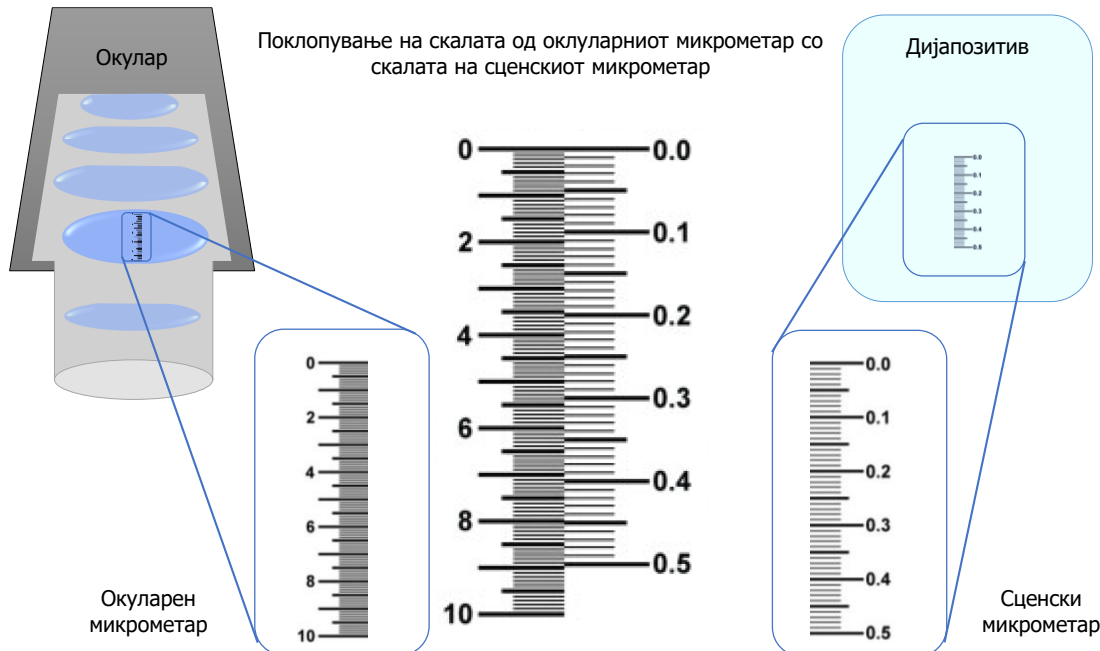
Одржување и калибрација на микроскоп

Микроскопите се софистицирани инструменти што бараат периодично одржување и чистење за да гарантираат задоволителни перформанси. Чистење на остатоци од прашина, онечистувања што потекнуваат од примероците, како и редовното одржување на механичките и на електричните компоненти на микроскопот се подеднакво важни за да се спречи постепено оштетување на работењето на решетката за фокусирање, механизмот за движење на носачот за примерок, приспособливите дијафрагми, лизгачите за филтри и помошната електроника. Критични области што треба редовно да се проверуваат за присуство на онечистувања се: предниот дел на објективот, површината на сензорот за камера (и неговата заштитна стаклена обвивка), двете површини на капакот, површината на слајдот на микроскопот, оптичките површини на адаптерот за камера, горните леќи на кондензаторот, леќите на окуларот и двете површини на мрежницата и другите стаклени површини во патека на светлината, вклучително и ламби, филтри, греди, спојници, колектори леќи и филтри за топлина.

Калибрација на микроскоп се спроведува со примена на фокусиран окулар, вграден микрометар во окуларот (ретикулар) и сценски микрометар (Слика 11.4). Окуларниот микрометар претставува тркалезен стаклен диск што обично содржи скала од 10 mm поделена на единици од 0,1 mm (100 μm). Овој микрометар е поставен во окуларот, а потоа се калибрира со помош на сценски микрометар за да се добие фактор на конверзија ($\mu\text{m}/\text{ретикуларна единица}$) што се користи за да се утврди зголемувањето добиено за секој објектив. Причината за користењето на постапка за калибрација е фактот што точноста за номиналното зголемување на објективот изнесува 5% (означено на леќата). Доколку не е неопходна прецизна вредност, приближна големина може да се определи со примена на окуларниот микрометар. Во овој случај, се отчитуваат микрометрите од окуларниот микрометар и вредноста се дели со вредноста за номиналното зголемување на објективот. На пример, за примерок што покрива 2 ретикуларни единици (200 μm): $200 \mu\text{m}/10 \times \text{Mag} = 20 \mu\text{m}$ должина.

Сценскиот микрометар се состои од скала од 1 или 2 mm поделена на единици од 10 μm , што дава 100 единици/mm. Со ротирање на окуларот се преклопуваат скалите на ретикуларот и сценскиот микрометар. Факторот на

конверзија претставува број на μm /ретикуларни единици и се пресмета со броење на бројот на микрометри содржани во неколку ретикуларни единици во окуларот. При микроскопирање на примерокот се одредува бројот на единици на окуларниот микроскоп што го опфаќа дијаметарот на структурата и се множи со факторот на конверзија за да се добие растојанието во микрометри.



Слика 11.4 Калибрирање на микроскоп

Оптичкиот микрометар (ретикулар) вообичаено е поделен на $1/100\text{ cm}$ (еден поделок = $100\ \mu\text{m}$), а сценскиот микрометар е поделен $1/100\text{ mm}$ (еден поделок = $10\ \mu\text{m}$).

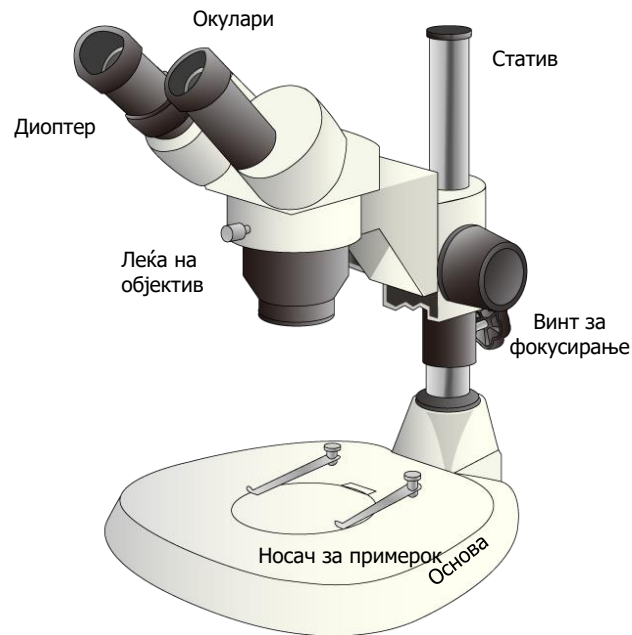
Преклопување на двете скали е прикажано во средина на сликата.

Стереомикроскоп

Стерео, стереоскопски или дисекциски микроскоп е варијанта на оптички микроскоп дизајниран за мало зголемување при набљудување на примерок, обично со користење светлина рефлектирана од површината на некој предмет, а не пропуштена преку него. Инструментот користи две одделни оптички патеки со два објективи и бинокулар, за да обезбеди различни агли на гледање со левото и со десното око. Овој аранжман произведува тридимензионална визуелизација на примерокот што се испитува. Стереомикроскопијата се споредува со макрофотографијата за снимање и испитување цврсти примероци со сложена површинска топографија, каде што е потребен тридимензионален поглед за анализа на деталите.

Стереомикроскопот често се користи за проучување на површините на цврсти примероци, како и при спроведување деликатни активности, како што се: дисекција, микрохирургија, форензика и сл.

Стереомикроскопот не треба да се меша со светлосен микроскоп опремен со две очни позиции кон окуларот. Во таков микроскоп двете очи гледаат иста слика, при што двата отвори за очи служат за да обезбедат поголема удобност за гледање. Сепак сликата во таков микроскоп не се разликува од онаа добиена со монокуларен микроскоп.



Слика 11.5 Шематски приказ на оптичките елементи кај стереомикроскоп

Фазно-контрастна микроскопија и микроскопија на темно поле

Предмети што не може да се обојат, како што се живите клетки, претставуваат проблем за оптичката микроскопија затоа што сликите под микроскоп имаат многу малку контраст и во суштина се невидливи во конвенционалната оптичка микроскопија.

Постојат два оптички методи за микроскопирање на вакви објекти:

- микроскопија со контраст на фази, што ги трансформира разликите во релативната фаза на брановите на објектите во амплитудните разлики во сликата
- микроскопија на темно поле, каде формирањето на сликата се заснова исклучиво на дистрибуирани бранови компоненти.

Со помош на овие техники, се добиваат слики со висок контраст на транспарентни примероци, како што се клетки и микроорганизми, парчиња ткива, литографски обрасци и честички како што се органели. Живите клетки во културата на ткивата, исто така, можат да бидат испитани директно, без фиксација и боење.

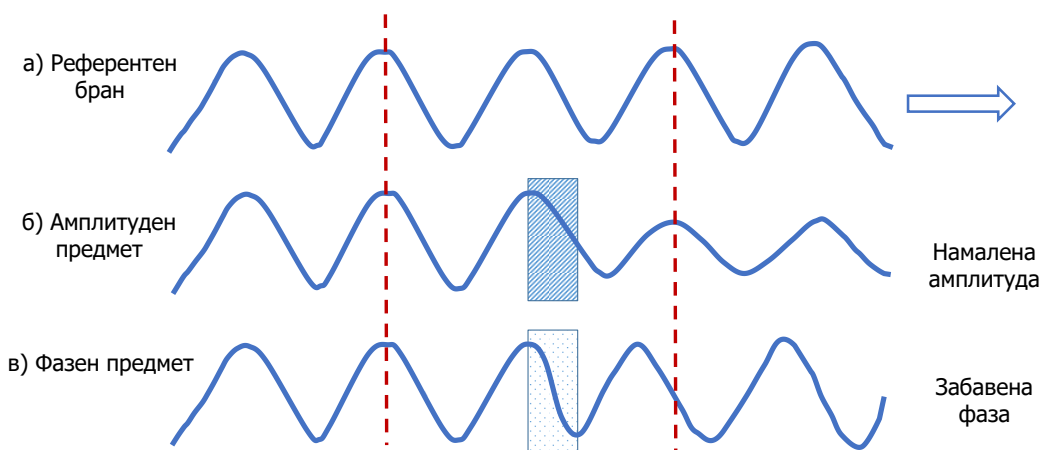
Фазно-контрастна микроскопија

Во случај на боење на хистолошките препарати или примероци со природни пигменти, боите или пигментите апсорбираат специфични бранови должини, со што се овозможува примерокот да се визуелизира како обоен кога се ќе се осветли со бела светлина.

Ако се применува монохроматско светлина и филтер за комплементарна боја (на пример, син предмет се испитува преку жолт филтер), зраците врз објективот се со значително помала амплитуда, што резултира во слика со голем контраст. Таквите предмети се нарекуваат *амплитудни предмети*, бидејќи тие директно предизвикуваат разлики во амплитудата како разлики во интензитетот на сликата што се гледа со окото (Слика 11.6). Иако повеќето транспарентни биолошки примероци не апсорбираат светлина, тие прават дифракција на светлина и предизвикуваат фазно поместување на зраците на светлината што минува низ нив - овие предмети се нарекуваат *фазни предмети*. Фазно-контрастните

микроскопи ги трансформираат разликите во фазата на објектот – расејуваните бранови во амплитудните разлики во сликата, со што предметите изгледаат како да се обоени.

Во 1930-тите години, Фриц Зерник (*Frits Zernike*), холандски физичар на Универзитетот во Гронинген, создаде оптички дизајн што може да ги трансформира фазните разлики во амплитудни разлики. Развојот на фазно-контрастната оптика, со последователно воведување на оптички елементи за фазни трансформации, ги трансформираа истражувањата во биологијата и медицината. За неговиот изум и теорија на создавање слика од транспарентни предмети со оптички микроскоп, Фриц Зерник освои Нобелова награда за физика во 1953 година.



Слика 11.6 Ефекти на амплитудни и фазни предмети врз бран од светлината. (а) Референтен зрак со карактеристична амплитуда, бранова должина и фаза. (б) Амплитуден предмет, апсорбира енергија и ја намалува амплитудата, но не ја менува фазата на зракот. (в) Фазен предмет ја менува брзината и ја менува фазата, но не и амплитудата на зракот.

Бидејќи методот зависи од дифракција и расејување на светлината, фазно-контрастната оптика ја подобрува видливоста на рабовите на проширените предмети и честички. Изведбата на современи микроскопи од контрастна фаза е извонредна, што заедно со современата електроника и можности за обработка на слика, овозможуваат детектирање на примероци што содржат само неколку молекули од протеини.

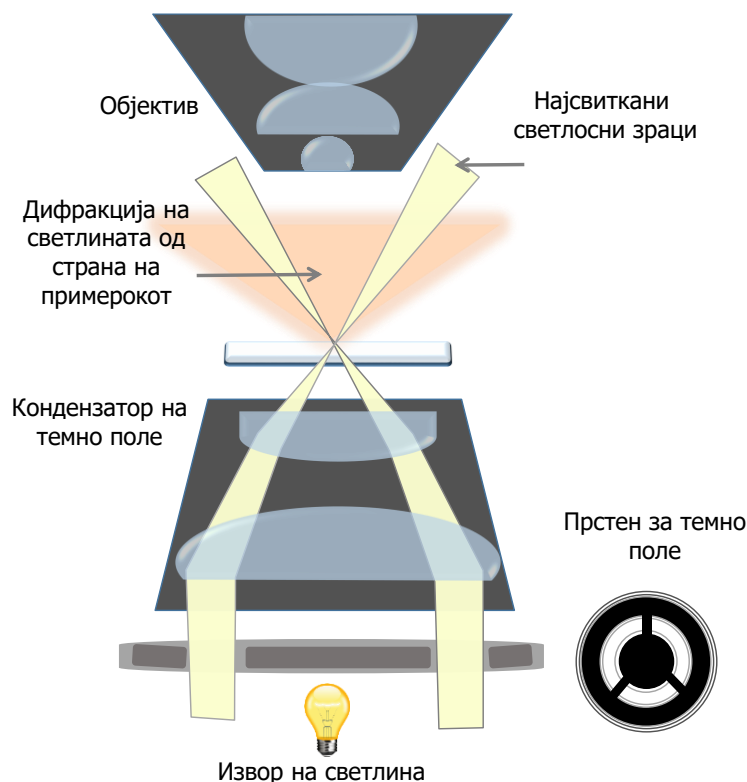
Микроскопија на темно поле

Кај повеќето форми на трансмисијска оптичка микроскопија, светлосните зраци што подлежат на дифракција (зраци што поминуваат низ примерокот) и зраците што не подлежат на дифракција (зраци што поминуваат непроменети преку примерокот) се собираат во објективот и придонесуваат за формирање слика. За необоени транспарентни примероци, видовме дека светлосните зраци што подлежат на дифракција во заднина резултираат во светли слики, со слаб контраст, каде што деталите се слабо видливи.

Освен со фазно-контрастна микроскопија, транспарентни примероци може да се набљудуваат со микроскопија на темно поле. Сликата се добива исклучиво од расеаните светлосните зраци, додека зраци што не подлежат на дифракција целосно се отстранети. Оваа техника е многу чувствителна затоа што сликите добиени со мала количина на расеана светлина се гледаат јасно на црна или на многу темна заднина. Микроскопија на темно поле најчесто се користи за примероци што ја дисперзираат светлината, како што се дијатоми, бактерии и

бактериски флагели, изолирани органели и полимери, сребрени зрна и златни честички во хистохемиски обележани ќелии и ткива.

Условите на темно поле се добиваат со осветлување на примерокот под заоблен агол, така што директните, нерасеани зраци не се собираат во објективот (Слика 11.7). Ефектот на оптиката на темно поле може да се добие со примена на оптички микроскоп со ротирање на кондензаторот, при што зраците го осветлуваат примерокот под агол. Само оние зраци што ќе бидат расеани од примерокот ќе стигнат до објективот, а директните зраци поминуваат од страните на леќата. Недостаток на оваа техника е тоа што ненасоченото осветлување на објекти што можат да предизвикаат силна дифракција на светлината, може да воведо голем отсјај. Многу подобри слики се добиваат со специјален прстен на кондензатор за создавање на темно поле, кој е поставен во куполата на кондензаторот.



Слика 11.7 Шематски приказ на оптички елементи кај микроскопија на темно поле. Геометријата дозволува само расеаните зраци да се собираат во објективот. Директните, нерасеаните се насочени премногу косо и не влегуваат во леќата.

Микроскопија на темно поле наликува на фазно-контрастната микроскопија по тоа што примерокот е осветлен со зраци што потекнуваат од транспарентен прстен во кондензаторот. Но, кај микроскопијата на темно поле, објективот ги собира само расеаните зраци; нерасеаните се насочени премногу косо и не влегуваат во леќата. Бидејќи на сликата не постои расјана светлина, предметите што расејуваат светлина изгледаат светли наспрам темното поле во заднина.

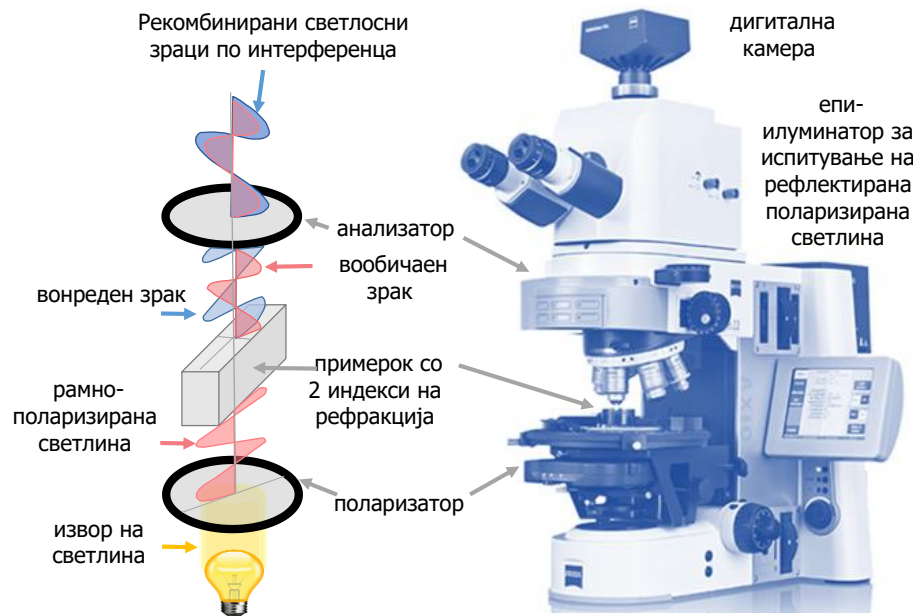
Поларизациска микроскопија

Создавање слика кај поларизациски микроскоп се заснова на уникатната способност на поларизираната светлина да интерреагира со поларизираните врски на молекули наредени во правец на светлината. Пречките на брановите на поларизирана светлина предизвикани од наредените молекули резултираат во забавување на фазите помеѓу зраците, што, пак, овозможува промена на амплитуда во рамнината на сликата во зависност од интерференцијата. Така, формирањето на сликата се заснова не само на принципите на дифракција и интерференција, туку и на постоење соодветен распоред на молекули. Степенот на редот што се среќава во молекулите се движи во опсег од речиси совршени кристали до лабаво наредени групи на асиметрични молекули или молекуларни групации. Со поларизациски микроскоп таквите структури обично се гледаат како светли слики во однос на темна заднина.

Поларизациската микроскопија се користи за проучување на формата и на динамиката на многу клеточни структури (како, на пример: елементи на митоза во клетките што се делат, влакна од актин и миозин во различни типови клетки, ДНК во јадра или митохондрии, нишки на целулоза во сидовите на растителните клетки, кондензати на скроб и лигнин во растителните клетки, вирусни кристалоиди и кристали на органски соединенија во цитоплазмата на растителните клетки, липиден двослој на клеточната плазма мембрана и митохондрии). Во многу случаи, овој тип микроскопија е единствениот достапен метод за проучување на структурата, формирање и динамика на лабилните макромолекуларни групи или испитување на ефектите на хемикалиите, лековите и состојбите во животната средина врз клеточните структури *in vivo*. Поларизацискиот микроскоп е особено значаен за квантитативни мерења потребни за пресметување на разликите во индексот на рефракција и дебелината на наредените примероци. Геолозите ги користат овие параметри заедно со референтна шема за да ги утврдат идентитетите на непознатите кристални минерали. Принципите на оваа техника се користат и за други типови интерферирачка микроскопија, вклучувајќи диференцијална интерферентна микроскопија (*differential interference microscopy*). Овие способности ја разликуваат поларизациската микроскопија од другите форми на оптичка микроскопија и ја отсликуваат нејзината популарност во биологијата, хемијата, геологијата и науката за материјали.

Поларизацискиот микроскоп е сложен оптички микроскоп што содржи поларизатор, анализатор и компензатор, доколку треба да се направат квантитативни мерења на дистрибуција на рефрактивни индекси (Слика 11.8). Компензатор (исто така, наречен ретардер) е плоча со двојна рефракција што се користи за мерење на разликите во оптичкиот пат и за подобрување на видливоста. Поларизаторот е поставен помеѓу изворот на светлина и примерокот, најчесто во близина на предната решетка на кондензаторот; анализаторот е поставен помеѓу примерокот и окото, вообично на одредено растојание зад задниот отвор на објективот. Поларизаторот е поставен во хоризонтална ориентација, ако се гледа кон микроскопот долж оптичката оска на микроскопот; анализаторот потоа се ротира на 90° во однос на поларизаторот за да се постигне намалување на интензитетот на светлината (гасење). Пожелно е поларизаторот или анализаторот да имаат можност за ротирање. Ротирачкиот држач често се обележува во степени за да се олесни приспособувањето за згаснување на светлината. Ротирачкиот држач на поларизаторот обезбедува соодветна ориентација на вкрстените полови по должината на оските хоризонтално и вертикално и овозможува прецизна контрола за добивање на гасење. Компензаторот се вметнува во оптичката патека со фиксна ориентација. Исто така, пожелно е и носачот за примероци да може да се ротира, при што неговиот центар

на вртење е приспособен да се совпаѓа со оптичката оска на микроскопот, така што е овозможено фиксниот поларизиран зрак на светло да го осветли примерокот од различни агли, со едноставно ротирање на носачот. На крај, постои отвор за вметнување за компензатор, што се наоѓа во близина и пред анализаторот.



Слика 11.8 Шематски приказ на оптичките елементи кај поларизациона микроскопија.

Флуоресцентна микроскопија

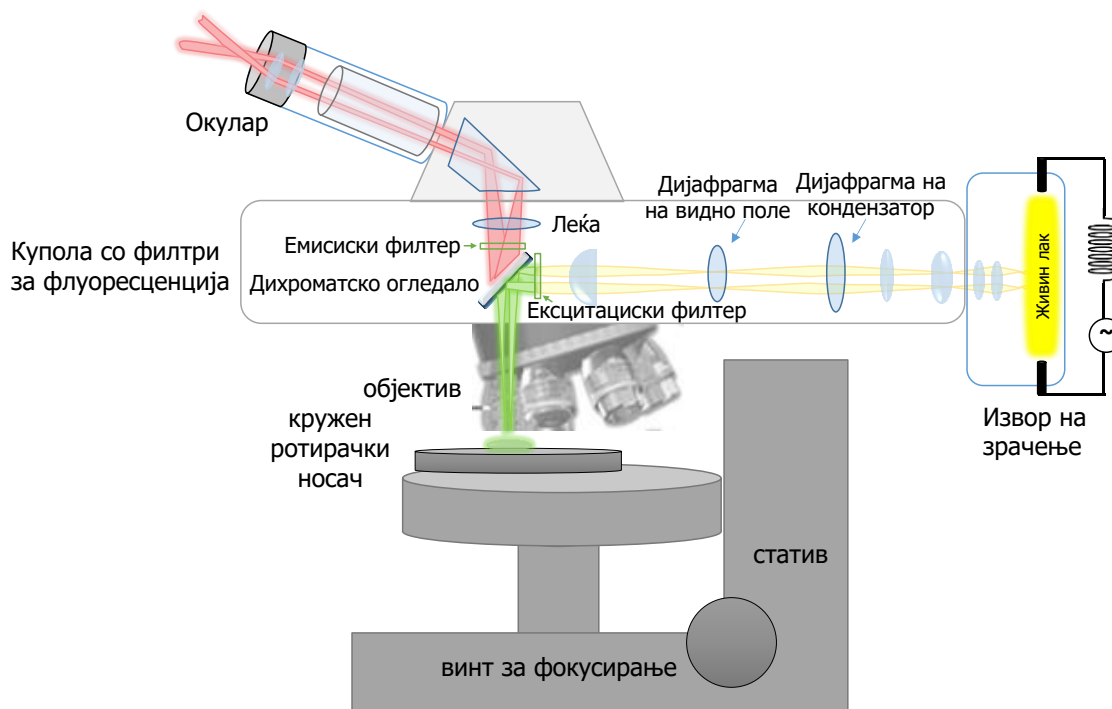
Светлосниот микроскоп може да се приспособи за флуоресцентна микроскопија, со што се овозможува да се испитува распределбата на еден молекулски вид во набљудуваниот примерок, а под специфични услови, дури и да се откријат индивидуални флуоресцентни молекули. За разлика од другите форми на оптичка микроскопија, што се засновани на апсорпција на светлина од страна на примероците, оптички разлики во патеките, промени во фазите и поларизација, микроскопијата со флуоресценција овозможува визуелизација на специфични молекули што флуоресцираат во присуство на ексцитирачка светлина.

Така, со оваа техника може да се проучуваат интраклеточниот простор, движењето на макромолекулите, малите метаболити и јоните. Вообичаено, молекули што не флуоресцираат се обележани со флуоресцентна боја или флуорохром што ги прави видливи за набљудување. Алтернативно, антитела означени со флуорохром може да се користат за означување фиксирани, пермеабилizирани клетки со метод познат како имунофлуоресцентна микроскопија. Овие методи најчесто се користат за визуелизирање на дистрибуцијата на одредени протеини во клетка или за да се направат видливи специфични органели, вакуоли, филаменти и клеточни мембрани. Се користат и разновидни нови методи за означување, вклучително и вметнување кратки ДНК секвенци со познат епитоп во кодирачките секвенци на протеините (етиопско кодирање), конструирање протеински химери со зелени или црвени флуоресцентни протеини (*green fluorescent proteins, GFP, red fluorescent proteins, RFP*) и неколку други методи.

Микроскопија со флуоресценција се здоби со популарност уште од истражувањата на Конс и соработниците (*Coons et al. 1941*) кои развија метод за конјугирање протеини со флуорохроми, подобрувања во оптиката, технологијата

со тенки филмови и зголемена специфичност и сензитивност на оптиката и електрониката за детекција на емитираната флуоресцентна светлина. Меѓу најважните достигнувања беа примената на филтри за интерференција и дихроматските огледала и нивно вградување во разновидни епи-илуминатори (Плоем - *Ploem*, 1967), воведување објективи со коригирани нумерички отвори (*numerical aperture, NA*) и појава на високо чувствителни детектори. Напредокот продолжува и денес во сите овие области. Поради одличната специфичност и релативната леснотија на употреба, флуоресцентната микроскопија е најчесто користениот тип на оптичка микроскопија што се користи денес во биомедицински истражувања.

Флуоресцентните микроскопи (Слика 11.9) содржат специјални филтри и користат уникатен метод на осветлување за да произведат слики од флуоресцентна светлина испуштена од ецитираните молекули во примерокот. Филтрите се дизајнирани на начин да се овозможи изолирање и манипулација со две различни групи на бранови должини на ексцитација и емисија. Зракот за побудување, со пократки бранови должини, од илуминаторот и од филтрите е насочен кон примерокот, додека емитираниот зрак, со подолги бранови должини, што се испушта од примерокот формира слика на примерокот во рамнината на сликата. За ефикасно микроскопирање на принцип на флуоресценција, неопходно е да се избере соодветен флуорофор, филтри и илуминатор за дадена апликација и да се оцени квалитетот на сигналите на флуоресценција.



Слика 11.9 Шематски приказ на оптичките елементи кај флуоресцентен микроскоп

Конфокална ласерска скенирачка микроскопија

Дебели флуоресцентни примероци, како што се заоблени клетки и делови од ткиво, можат да предизвикаат проблеми за конвенционалните оптички системи, бидејќи флуоресцентните сигнали од предмети што лежат надвор од фокусната рамнина прават светлосни пречки во заднината и даваат слики со низок контраст. Проблемот може да се реши со отстранување на сигналите од блиските извори над и под фокусната рамнина, принцип на којшто се базираат: конфокалната микроскопија и деконволутивното отсликување. Кај конфокалните микроскопи ова

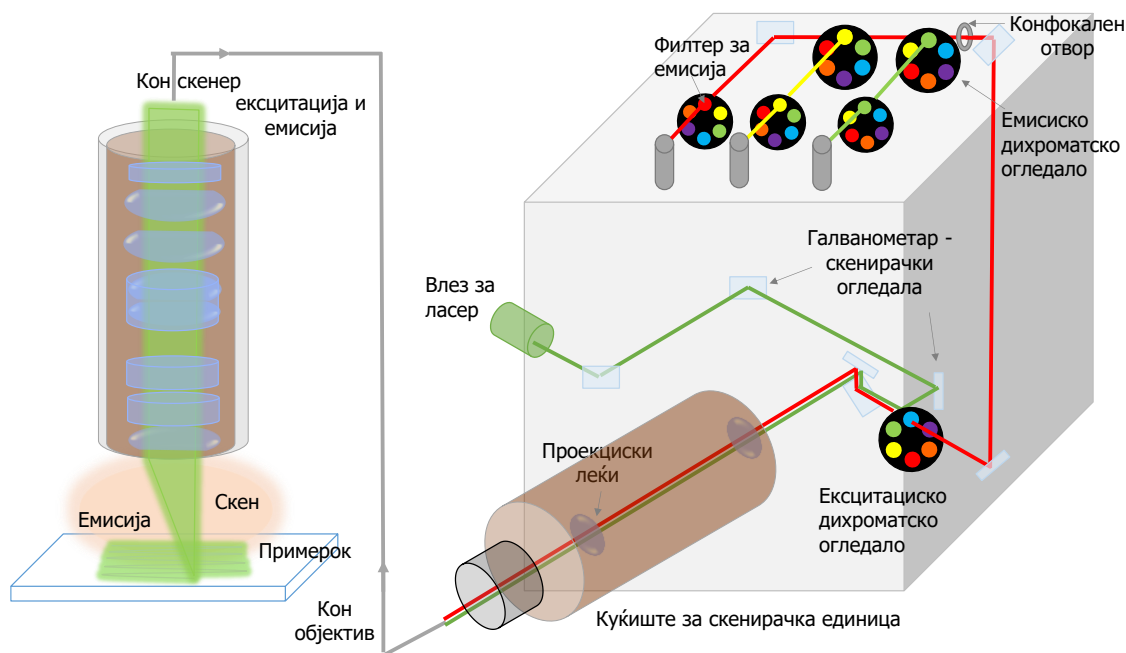
се постигнува оптички, при што примерокот се осветлува со фокусиран ласерскиот сноп за скенирање, при што зракот понатаму поминува низ отвор во рамнината на сликата пред електронскиот детектор за фотон. Со оваа техника може да се набљудуваат флуоресцентни примероци и рефлектирачки површини. Кај деконволотивната микроскопија се користи стандарден флуоресцентен микроскоп, а сликата на оптичкиот пресек се добива пресметковно со компјутер што ја отстранува светлината од фокусот.

Сликите со висок контраст, обезбедени со методите на конфокалната и деконволотивната микроскопија, можат да обезбедат јасни одговори на најчесто поставуваните прашања во врска со набљудуваните примероците под флуоресцентен микроскоп: Дали флуоресцентниот сигнал се дистрибуира на мембранска површина или е содржан низ целата цитоплазма како растворлив фактор? Во границите на резолуција на светлосен микроскоп, дали се разликуваат флуоресцентни сигнали кои се локализирани во истата структура? Која е тридимензионалната структура на примерокот?

Со помош на мотор што го менува фокусот на микроскопот во мали чекори по должината на z-оската, конфокалните и деконволотивните микроскопи овозможуваат да се добијат многу во серија, низ различни фокусни рамнини и да се генерира тридимензионален поглед на примерокот со употреба на компјутерски софтвер. Доколку се направат повеќе z – пресеци на живи ќелии во повеќе канали во боја, стекнати во редовни временски интервали, може да се конструира цел филм во боја, што покажува динамични настани во ќелија во три димензии. Ваквите секвенци се нарекуваат петдимензионални, затоа што информациите за интензитет за секоја точка во x, y и z димензии во примерокот се достапни во различни периоди (како во временска низа) и во боја.

Принципот на конфокалното отсликување беше развиен и патентиран во 1957 година од Марвин Мински (*Marvin Minsky*), кој е добро познат по работата на компјутерска нервна мрежа и вештачка интелигенција. Во следните години, Бракенхоф (*Brakenhoff*), Шепард (*Sheppard*), Вилсон (*Wilson*) и многу други придонесоа за дизајнирање на практичен работен инструмент. Амос (*Amos*) и Вајт (*White*) ја демонстрираа вредноста на конфокалното отсликување за флуоресцентни биолошки примероци околу времето кога се појавија првите комерцијални инструменти во 1987 година. Оттогаш, интересот за конфокална микроскопија и подобрувања во капацитетот на конфокалното сликање се зголеми со брзо темпо.

Влезната светлина (ласер или бел извор на светлина) влегува во објективот на микроскопот преку дихроично огледало и е насочена кон примерокот преку објективната леќа (Слика 11.10) Рефлектираната или одбиената светлина се враќа низ леќата и се конвергира на површината на детекторот, преку кој се снима сигналот од зрачењето. Со конфокална конфигурација се поставува плоча за блокирање светлина со мала дупка веднаш пред детекторот во конвергентната точка за да се овозможи рефлектираната светлината да стигне до детекторот. Светлината за отсликување може, исто така, да се рефлектира од локациите под (зелени линии) или над фокусната рамнина, но таа ќе се собере пред или по отворот, што ќе биде блокиран од плочата и нема да стигне до детекторот. Со оваа конфигурација, само светлината што доаѓа од фокусната рамнина може да биде снимена од детекторот, што овозможува снимените слики да имаат многу постар изглед. Единствено ограничување на конфокалното поставување е дека видното поле е значително помало поради големината на отворот, што може да се надмине со вградување на механизмот за скенирање, преку збир на вибрирачки огледала.



Слика 11.10 Шематски приказ на конфокалниот скенирачки дел на микроскопот и комуникацијата до објективот на микроскоп

Целиот систем на фокусирање може да се движи во вертикална насока, со што се овозможува добивање слики во различни фокусни рамнини, резултирајќи во тридимензионална слика на набљудуваните примероци. Поради ова, конфокалната лазерска скенирачка микроскопија има широка примена во биолошките и во медицинските научни дисциплини.

Електронска микроскопија

Електронската микроскопија (ЕМ) што користи електрони како средства за визуелизирање слики, е претставена со двете најчесто користени методи: **скенирачка електронска микроскопија** (*scanning electron microscopy, SEM*) и **трансмисијска електронска микроскопија** (*transmission electron microscopy, TEM*). И покрај тоа што TEM има поголема резолуција, SEM се користи почесто, што главно се должи на долготрајната и деликатна подготовка на примерокот за TEM (на пример, екстремно тенки делови од материјалот за примерок, обично 60-80 nm).

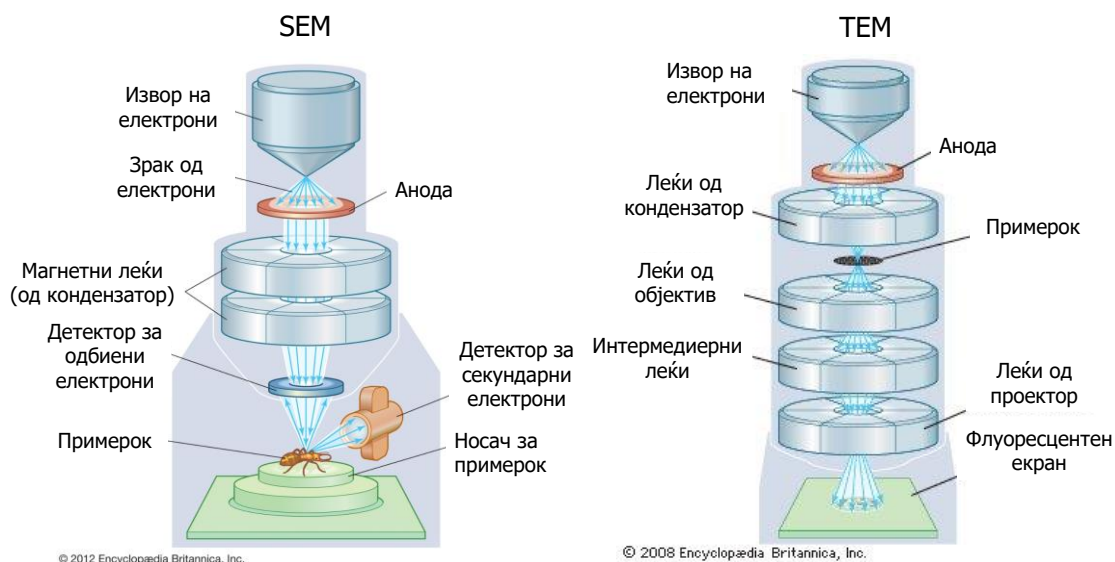
Електронската микроскопија се разликува од светлосната микроскопија според пет главни карактеристики:

1. средството за визуелизирање слика - фотони кај светлосна микроскопија наспроти електрони кај електронска микроскопија;
2. резолуција - електроните имаат до 100000 пати помала бранова должина од фотоните, што овозможува разликување до ниво на големина на поединечни атоми (Слика 11.11);
3. моќ на зголемување (широк опсег: од $20 \times$ до $1000000 \times$);
4. со светлосната микроскопија се добиваат слики со бои видливи за човечко око, додека електронската микроскопија не создава контраст во боја (можна е појава на лажни бои кај SEM, заради разлики во степенот на осветленост на сликите) и
5. електронската микроскопија работи во услови на голем вакуум, а светлосната микроскопија во амбиентални услови.

SEM користи електронски зрак за скенирање низ целата површина. По интеракција со материјалите, одбиените електрони имаат неколку различни форми. При нееластични судири со електроните од електронската сонда (примарни електрони) се произведуваат **секундарни електрони**. Електроните од примерокот се исфрлаат со помала брзина и со пониско ниво на енергија од примарните електрони. Тие се собираат кај детекторот и се добива слика со добра перцепција за длабочина. Ова е основен начин на отсликување со SEM.

Втор начин на отсликување со SEM вклучува создавање слики со **одбиени електрони** (*backscattered electrons, BSE*) добиени при еластична интеракција на електрони од високоенергетски електронски сонди со примерокот. Одбиените електрони пристигнуваат кај детекторот со речиси иста брзина и енергија како и во електронската сонда, што резултира во слика која зависи од материјалот на примерокот. Густите материјали, како металите, појавуваат светла слика кај BSE-SEM, додека помалку густите материјали (на пример, биолошки материјал базиран на јаглерод) се потемни на сликата.

Отсликување со помош на одбиените електрони создава поквалитетна слика од отсликувањето на секундарните електрони, заради можноста да се видат деталите на сликата и затоа што сликата не зависи од полнежот на примероците.



	<i>Scanning Electron Microscopes (SEM)</i>	<i>Transmission Electron Microscopes (TEM)</i>
<i>Пренос на електрони</i>	Фокусиран зрак	Широк зрак
<i>Слика</i>	Топографска/површина	Внатрешна структура
<i>Резолуција</i>	Мала	Висока
<i>Зголемување</i>	До 2 000 000 пати	До 5 000 000 пати
<i>Димензии на слика</i>	3-D	2-D
<i>Дебелина на примерок</i>	Може да се набљудуваат тенки и дебели примероци	Само ултра-тенки примероци
<i>Поминува низ примерок</i>	Не	Да
<i>Ограничувања за примероци</i>	нерестриктивно	рестриктивно
<i>Подготовка на примерок</i>	Лесна	Сложена подготовка
<i>Цена</i>	Помалку скапо од TEM	Поскапа од SEM
<i>Брзина</i>	Брзо	Побавно
<i>Употреба</i>	Лесно за употреба	Покомпликувано, бара специфична обука

Слика 11.11 SEM vs TEM

За време на отсликувањето со SEM, електроните се акумулираат на површината (**полнеж на површината**), особено таму каде што има ниска спроводливост. Нанесувањето тенок метал или спроводлива обвивка на површината на примерокот е суштински чекор за подготовка на примерокот. Друг начин за намалување артефакти од присутен полнеж на примерокот се постигнува со примена на ниска вредност за вакуум и користење водена пара или други гасови во комората на примерокот. Водената пара може, под соодветни услови, да помогне во зачувувањето на нежните биолошки примероци во услови на високиот вакуум при SEM.

Напредни методи за супер резолутивно отсликување

Микроскопија со супер резолуција е претставена со серија техники во оптичката микроскопија кои овозможуваат добиените слики да имаат резолуции повисоки од оние наметнати од ограничувањата поради дифракција на светлината.

Просторната резолуција се пресметува според равенката на Абе за резолуција на светлосните микроскопи (11.1). Според ова, резолуцијата на микроскопот подразбира можност да се направи разлика помеѓу предмети поставени блиску еден до друг во рамнината на сликата, но оваа дефиниција не опфаќа дифракција на светлината при премин на светлосните зраци низ отворот на објективот. Независно од оптичкиот квалитет на леќите, страничната резолуција (во x-y рамнината) е ограничена на највисоката вредност на нумеричкиот отвор (NA) од околу 200-250 nm, додека аксијалната резолуција (во рамнината z, по должина на оптичката оска на микроскоп) е двојно помала, некаде во опсег од 500-700 nm. Ниската вредност на аксијалната резолуција во однос на страничната се должи на асиметрична природа на светлосните зраци фокусирани на примерокот. Ова ограничување честопати се нарекува **бариера на дифракцијата** и претставува сериозна пречка за разликување на многу важни субклеточни карактеристики присутни во живите и фиксирани клетки.

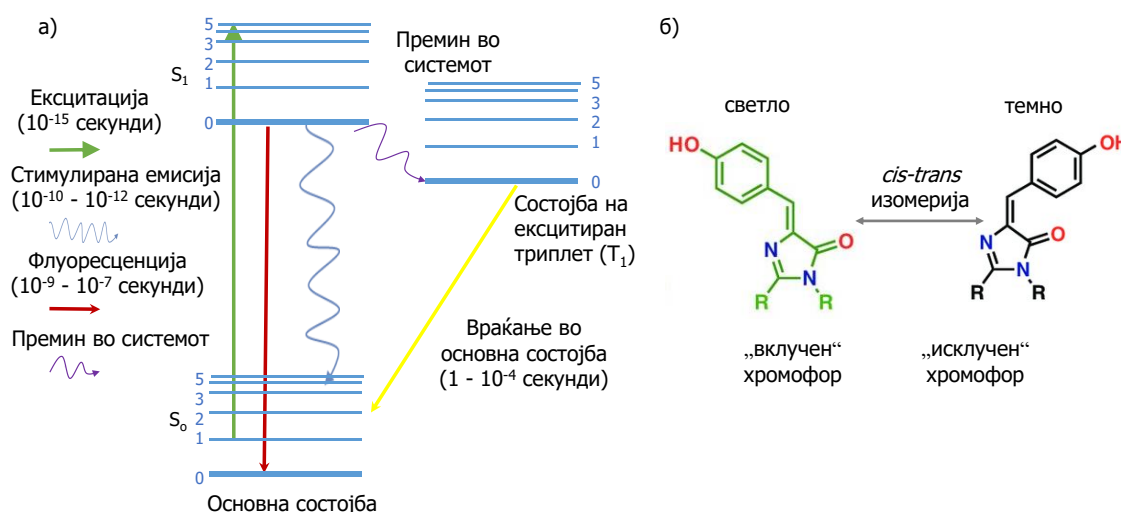
Бидејќи интересите за истражување на молекулско ниво стануваат сè поизразени, се зголемува и потребата од зголемена резолуција на соодветните оптички инструменти. Во раните 1990-ти години, воведен е широк спектар на инструменти и методи што имаат за цел подобрување на просторната резолуција. Некои од главните случувања во тоа време беа микроскопи со спротивни двојни објективи (како 4Pi и I₅M) што постигнаа резолуција во опсег од 100 nm со примена на интерференција на двоен зрак, микроскопија со постојан бран (*standing wave microscopy*) и микроскопија во блиско поле (*near - field microscopy*) што достигнаа резолуција од 1 nm.

Овие инструменти значително ја подобриле резолуцијата, но се ограничени во перформансите и применливоста, а во одредени случаи, имаат многу сложена техничка изведба. Подоцна во 90-тите години, Стефан Хел (*Stefan Hell*) воведо нова техника, т.н. СТЕД микроскопија (*stimulated emission depletion, STED*), заедно со нов концепт поврзан со примена на одредени флуоресцентни бои за отсликување со висока резолуција. Заедно, овие случувања доведоа до револуција во суперрезолутивна флуоресцентната микроскопија и воведување нови методи што нудат странична и аксијална резолуција под десетина од нанометар. Заедничка карактеристика на многу од овие методи е тоа што тие го користат откритието на Стефан Хел дека флуорофорите можат да бидат вклучени и исклучени со помош на светлина, последователно во тек на време, така што сигналите можат да се снимаат последователно со микроскопот.

Во 2014 година, Ерик Бетзиг (*Eric Betzig*), Моернер (*W.E. Moerner*) и Стефан Хел (*Stefan Hell*) добиле Нобелова награда за хемија за „развој на суперрезолутивна

флуоресцентна микроскопија“, што овозможи „оптичката микроскопија до нанодимензијата“.

Основниот принцип на којшто се базираат суперрезолутивните техники е наречен **RESOLFT**, што претставува акроним од „Реверзибилна сатурирачка оптичка флуоресцентна транзиција“ (**Reversible Saturable Optical Fluorescence Transitions**). Овој концепт се заснова на флуоресцентни сонди, што може реверзибилно да се „вклучени“ (флуоресцентна состојба) или „исклучени“ (темна, нефлуоресцентна состојба). Оваа состојба „вклучено-исклучено“ на флуорофорот, може да се постигне преку: основна и побудена синглет состојба (S_0 и S_1), побудена синглет и темна триплет состојба или светла и темна состојба на флуорофорот, што може реверзибилно да се вклучува/исклучува (Слика 11.12 а) и флуоресцентни молекули што подлежат на интраконверзија меѓу *cis-trans* изомери (Слика 11.12 б), врзани и несврзни конформации или други стабилни оптички состојби.



Слика 11.12 Клучни концепти за суперрезолутивно отсликување - RESOLFT принцип (а) Дијаграм на флуоресценција, што покажува патеки за побудување и емисија, осиромашување на основната состојба (како кај GSD) и стимулирано осиромашување на емисијата (како кај STED); (б) флуоресцентен протеин со можност за „вклучување/исклучување“ со помош на светлина базиран на *cis-trans* изомеризам.

Како најчесто користени техники за суперрезолутивна микроскопија коишто се ефикасни, лесни за корисниците и комерцијално достапни издвојуваме:

(1) локализација на единечна молекула: микроскопија со фотоактивирана локализација (*photoactivated localization microscopy, PALM*) и микроскопија со стохастичка оптичка реконструкција (*stochastic optical reconstruction microscopy, STORM*);

(2) структурна илуминациска микроскопија (*structured illumination microscopy, SIM*), комбинација на оптички метод и методи за отсликување со цел брзо извлекување информации од микроскопски слики во т.н. реципрочен простор и

(3) стимулирано осиромашување на емисијата (*stimulated emission depletion, STED*), како и микроскопија на принцип на осиромашување на основна состојба (*ground state depletion, GSD*).

ЕЛЕКТРОАНАЛИТИЧКИ МЕТОДИ

Електроаналитичките методи опфаќаат група на квантитативни аналитички методи кои се засноваат на електричните својства на растворот на анализот, кога истиот претставува дел на електрохемиска ќелија.

Принципот на електроаналитичките методи се базира на: мерење на потенцијал на електрохемиска ќелија (во отсуство на струја или јачината на струјата се одржува на определено ниво) или мерење на струја во електрохемиска ќелија, со одржување константен потенцијал. Според тоа, електрохемиските методи се поделени во две главни групи (Слика 12.1):

1. *Меѓуповршински методи* - се базираат на феноменот што се појавува на допирната површина на електродата и тенкиот слој на растворот во близина на површината на електродата). Овие методи се делат во две главни подгрупи:

- статични методи (потенциометрија и потенциометриски титрации) - се базираат на мерење потенцијал во електрохемиска ќелија.
- динамични методи - струјата во електрохемиската ќелија е од витално значење при спроведување на анализата. Тука спаѓаат:
 - методи со контролиран потенцијал (кулометрија со константен електроден потенцијал, волтаметрија, амперометриски титрации, електрогравиметрија);
 - методи со одржување константно ниво на јачината на струјата (кулометриски титрации, електрогравиметрија).

2. *Балк методи* - се базираат на феноменот што се јавува во самиот раствор. Тука спаѓаат кондуктометрија и кондуктометриски титрации.



Слика 12.1 Најчесто употребувани електроаналитички методи

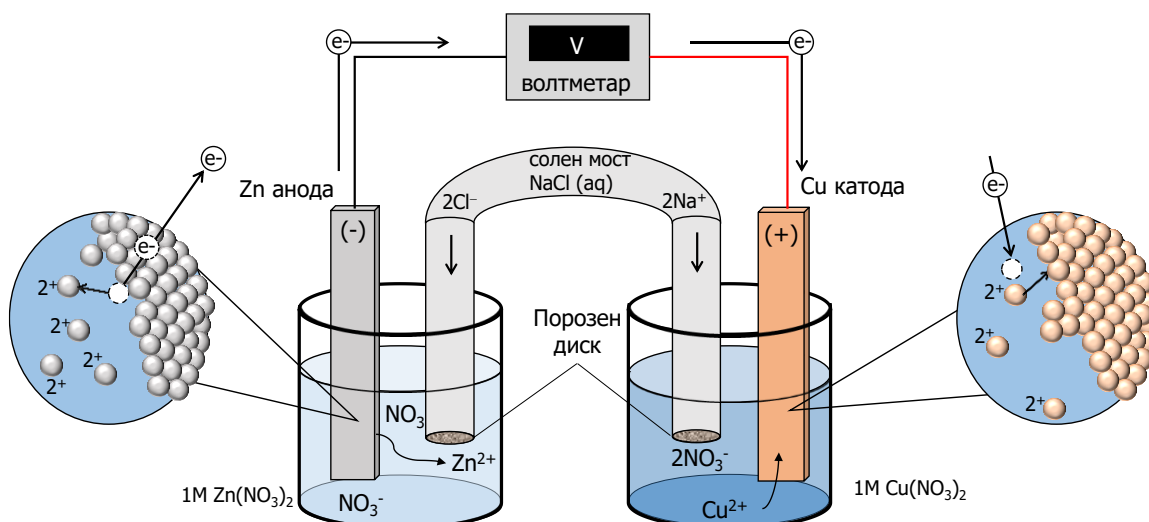
Електроаналитичките методи опфаќаат широк опсег на квантитативни методи и се карактеризираат со голема осетливост (овозможуваат ниски лимити на детекција, во опсег на пикомили). Овие методи обезбедуваат и бројни информации за карактеристиките на електрохемиските системи (стехеометрија и брзина на меѓуповршинскиот трансфер на полнежот, брзина на трансфер на масата, процент на адсорпција и хемисорпција, како и брзина и рамнотежна константа на хемиската реакција). Со примена на електрохемиските методи се добиваат повеќе

информации за активитетот (отколку концентрацијата) на одреден јонски вид. На пример: во физиолошките испитувања, определувањето на активитетот на калциумот и калиум има поголемо значење, од определувањето на нивната концентрација. Електрохемиските мерења се најчесто специфични за одредена оксидациска состојба на елементот. На пример: со електрохемиските мерења може да се одреди концентрацијата на цериум 3^+ и 4^+ во смеса (со другите аналитички методи се определува вкупната концентрација на цериум). Инструментите за електрохемиските методи се релативно евтини и може да се користат и како детектори при спроведување на хроматографска анализа.

Електрохемиска ќелија

Електрохемиската ќелија се состои од две електроди (два спроводника на електрична струја), секоја потопена во соодветен електролитен раствор. Со цел да се создаде струја во ќелијата, неопходно е електродите меѓусебно да бидат поврзани со метални проводници, двата електролитни раствори да бидат во контакт, за да се овозможи движење на јоните од еден раствор кон друг и на секоја од двете електроди да се одвива реакција на трансфер.

На Слика 12.2 е даден приказ на една електрохемиска ќелија составена од цинкова (Zn) електрода потопена во раствор на цинк нитрат ($Zn(NO_3)_2$) и бакарна (Cu) електрода потопена во раствор на бакар II нитрат ($Cu(NO_3)_2$). Двата раствора се поврзани со електролитниот мост, таканаречен „Солен мост“ (заситен раствор на KCl). Двата краја на мостот се опремени со порозни дискови, со цел да се овозможи движење на електроните низ мостот, а да се спречи мешање на двата електролитни раствори. На тој начин се спречува директна реакција меѓу бакарните јони и цинковата електрода. Целта на мостот е да се изолира содржината на двете половини на ќелијата, а притоа да се одржува електричниот контакт помеѓу нив. Ќелијата содржи две таканаречени течни крстосници или течна фазна граница (*liquid junction*): првата фазна граница на едниот крај од солениот мост претставува допирната површина помеѓу растворот на цинк нитрат и електролитниот мост, а втората фазна граница е на другиот крај на електролитниот мост каде што електролитниот раствор е во контакт со растворот на бакар II нитрат. На секоја од овие допирни површини се јавува мал потенцијал на фазната граница (*junction potential*), што може да влијае на точноста на анализите. Експериментално е потврдено дека вредноста на потенцијалот на фазната граница може значително да се намали преку воведување концентриран електролитен раствор како електролитен мост помеѓу двата раствори. Освен со зголемување на концентрацијата на солта, ефикасноста на електролитниот мост може да се подобри и со приближување на вредностите за подвижноста на јоните на солта. Заситен раствор на калиум хлорид е особено ефикасен од двете гледни точки. Имено неговата концентрација е поголема од 4 M на собна температура, а подвижноста на јоните се разликува само за 4 %. Во случаи кога хлоридните јони интерферираат, овој раствор може да се замени со концентриран раствор на калиум нитрат.

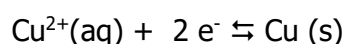
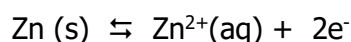


Слика 12.2 Електрохемиска ќелија

Спроведување на електричен полнеж во ќелијата

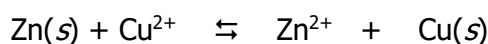
Спроведувањето на струја во ќелијата прикажана на Слика 12.2 е резултат на три различни процеси што се одвиваат во ќелијата:

1. Врз основа на разликата во потенцијалната енергија на металите од кои се изработени двете електроди, електроните (носители на полнежот) се движат од цинковата електрода низ надворешниот метален проводник кон бакарната електрода.
2. Во растворот протоколот на електричен полнеж вклучува миграција и на катјони и на анјони. Во левата полуќелија јоните на цинк мигрираат од електродата кон растворот, а нитратните јони се движат кон неа; во втората полуќелија бакарните јони се движат кон електродата, а анјоните се оддалечуваат од неа. Во електролитниот мост јоните на калиумот се движат на десно, а хлоридните јони на лево. На тој начин сите јони во трите раствори учествуваат во спроведувањето на електричниот полнеж.
3. Третиот процес се случува на површините на двете електроди преку процесите на оксидација и редукција. Во електрохемиската ќелија анода е електродата на која се одвива процес на оксидација, а катода е електродата на која се одвива процес на редукција. Во ќелијата прикажана на Слика 12.2, бакарната електрода е катода, цинковата електрода е анода.

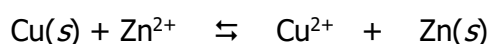


Електрохемиските ќелии може да бидат:

- Галванска ќелија - произведува електрична енергија (бакарната електрода е катода, цинковата електрода е анода)



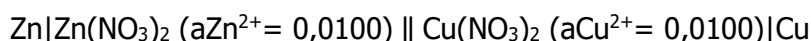
- Електролитичка ќелија - троши електрична енергија (бакарната електрода е анода, а цинковата електрода е катода)



- Реверзибилна ќелија - промената на правецот на струјата во обратна насока, едноставно ги менува реакциите на двете електроди (хемиски реверзибилна ќелија).

Шематско претставување на ќелиите:

Според конвенција, при шематско претставување на електрохемиската ќелија, анодата и информацијата за растворот со којшто е во контакт, секогаш се пишува на лева страна. Фазната граница (контактна површина) на која се развиваат разлики во потенцијалот се означува со единечна вертикална линија. Помеѓу растворите на аналитите од двете полукќелии се вметнуваат две вертикални линии, што ги претставуваат двете допирни површини на електролитниот мост со растворите на електролит во двете полукќелии. Бидејќи потенцијалот на електрохемиската ќелија директно зависи од активитетот на компонентите на ќелијата, покрај растворите на аналити во заграда се прикажува и активитетот или концентрацијата на приуствните јони). Според тоа, електрохемиската ќелија прикажана на Слика 1 може да се претстави на следниот начин:



каде што:

| - претставува фазната граница (контактна површина) на којашто се развива потенцијалот

|| - ги претставува двете фазни граници (по една на секој крај од електролитниот мост)

$a_{\text{Zn}^{2+}}$, $a_{\text{Cu}^{2+}}$ - ги претставуваат активитетите на компонентите на ќелијата.

Потенцијал на електроаналитичка ќелија

Електроаналитичките методи, може да бидат базирани на мерење на струја во електрохемиска ќелија со фиксен потенцијал или мерење на потенцијалот на ќелијата, при одржување на константно ниво на струја. Потенцијалот на електрохемиската ќелија е поврзан со активитетот (ефективната концентрација на учесниците во хемиската реакција) на реактантите и продуктите на реакцијата на ќелијата, а индиректно со нивната моларна концентрација.

$$\alpha_x = \gamma_x[X] \quad (12.1)$$

каде што:

α_x - активитет на јонскиот вид X;

γ_x - коефициент на активитет на X

[X] - моларна концентрација на X

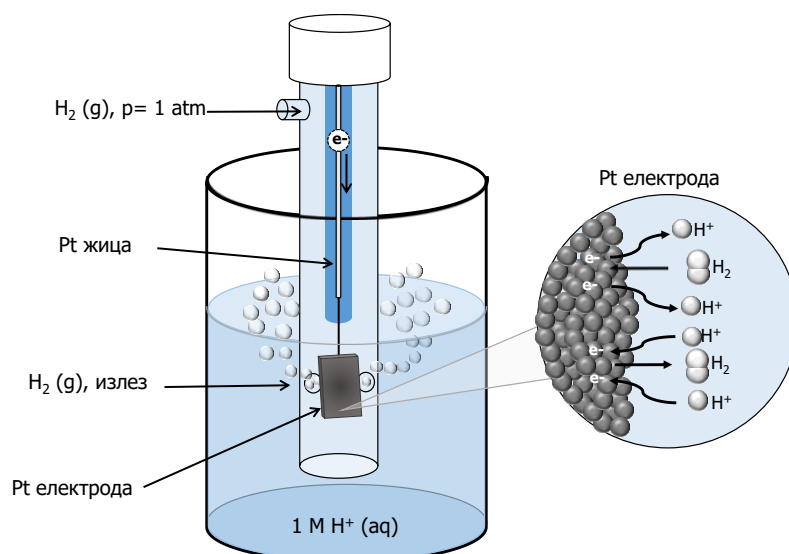
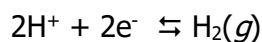
Стандардна водородна електрода

Во минатото водородните гасни електроди, имале широка примена во електрохемиските испитувања, не само како референтни, туку и како индикаторски електроди за определување на рН вредност.

Стандардна водородна електрода (Слика 12.3) се состои од електрода изработена од таканаречена црна платина: фолија од платина (Pt) обложена со тенок слој од ситно спрашена платина, при што металот изгледа црн, односно не ја рефлектира светлината како и полираната платина.

По површината на платинската електрода се воведуваат меурчиња од гас (водород), со одржување константен притисок. Протокот на водород има за цел одржување константно ниво на концентрацијата на гасот на површината (заситување на растворот што се наоѓа во непосредна близина на електродата). Електродата е потопена во раствор (киселина со познат активитет на водородни јони). Инертната платинска електрода нема директна улога во реакцијата на ќелијата, туку само служи како површина за размена на електрони. Црната платина

овозможува голема површина за брзо одвивање на реакцијата оксидација/редукција на водород/водородни јони:



Слика 12.3 Стандардна водородна електрода [$\text{Pt}, \text{H}_2 (p \text{ atm}) \mid \text{H}^+(a_{\text{H}^+} = x)$]

Потенцијалот на површината од платинската електрода зависи од активитетот на водородните јони во растворот и од парцијалниот притисок на водородот употребен за заситување на растворот.

Водородната електрода може да се однесува и како анода и како катода, зависно од полукелијата со којашто се поврзува преку солен мост. Водородот се оксидира во водородни јони кога електродата е анода, реверзната реакција се одвива на катодата. Под определени услови, водородната електрода е електрохемиски реверзибилна.

Потенцијалот на водородната електрода, зависи од температурата, активитетот на водородните јони и притисокот на водород на површината на електродата. Вредностите за овие експериментални варијабли мора да бидат внимателно дефинирани со цел полукелијата да се користи како референтна. Според спецификацијата за стандардна водородна електрода, активитетот на водородниот јон изнесува единица, а парцијалниот притисок на водород изнесува точно една атмосфера. Со конвенција, потенцијалот на оваа електрода е има вредност точно нула волти на сите температури.

Електроден потенцијал

Електродниот потенцијал се дефинира како потенцијал на ќелија што се состои од електрода, која се однесува како катода и стандардна водородна електрода што се однесува како анода. Електродниот потенцијал (релативен електроден потенцијал) е всушност потенцијал на електрохемиската ќелија, што се состои од внимателно дефинирана референтна електрода како анода. Келијата може да биде галванска или електролитичка, зависно од електронската енергија на електродата во прашање. Кога оваа енергија е поголема од онаа на стандардна водородна електрода, електродниот потенцијал ќе биде негативен, и обратно, кога електронската енергија на електродата во прашање е помала од онаа на стандардна водородна електрода, електродниот потенцијал ќе биде позитивен.

Потпишана конвенција за електроден потенцијал

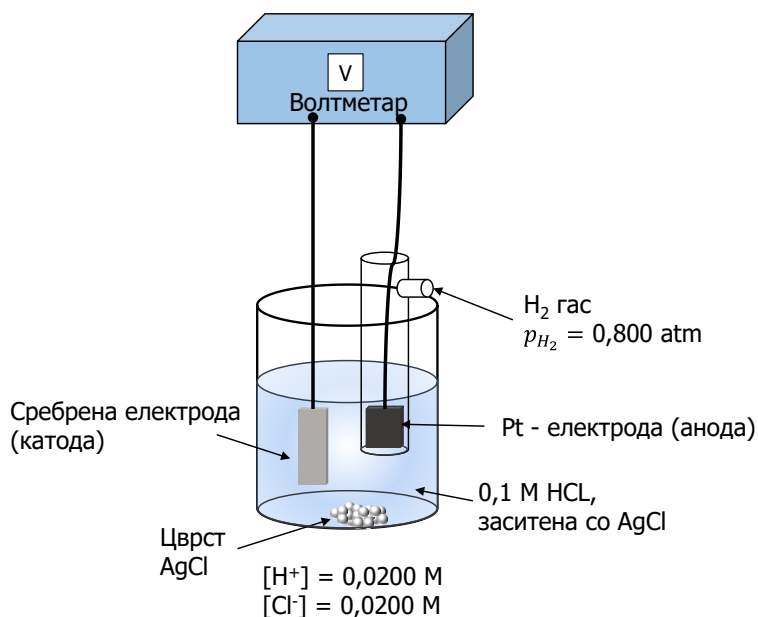
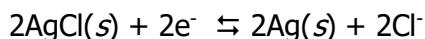
Во 1953 година, на собранието на Меѓународниот сојуз за чиста и применета хемија (*International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC*), во Стокхолм, Шведска, потпишана е конвенција наречена IUPAC - ова или Стокхолмска конвенција, според која: поимот електроден потенцијал (релативен електроден потенцијал) се однесува само за полурекации напишани како редукција. Поимот оксидациски потенцијал може да се употребува за електроден процес напишан како оксидација, но оксидацискиот потенцијал никогаш не смее да се нарекува електроден потенцијал. Знакот на електродниот потенцијал укажува на тоа дали редукцијата е спонтанa во однос на стандардната водородна електрода. Позитивен знак, значи дека реакцијата на редукција се одвива во нормални услови. Негативен електроден потенцијал, значи дека реакцијата на редукција на металната електрода не се одвива спонтано, ако не е поттикната од примена на надворешен потенцијал.

Наместо апсолутните потенцијали, се определуваат релативните потенцијали на полуреакциите на ќелијата, мерени во однос на заедничка референтна (стандардна) електрода. Релативните потенцијали можат да се искористат за пресметување на константата на рамнотежа за оксидациските - редукциските процеси.

Пример: Галванска ќелија без течна фазна граница

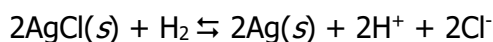
Во електрохемиската ќелија прикажана на Слика 12.4 двете електроди (електрода од сребро и водородна електрода) се потопени во заеднички електролит (раствор на 0,1 М HCl, заситена со сребро хлорид). На овој начин се елиминира појавата на потенцијалот на фазната граница.

Реакцијата во електрохемиската ќелијата се изведува преку реакциите на двете полукќелии, од кои секоја има карактеристичен електроден потенцијал. Ако двете полуреакции се напишат како редукции:



Слика 12.4 Галванска ќелија без течна фазна граница
Pt, H₂(p=0,8 atm) | H⁺ (0,02M), Cl⁻ (0,02M), AgCl (заситен раствор) | Ag

Реакција на ќелијата (втората полуреакција се одзема од првата):



Потенцијалот на ќелијата се добива со одземање на електродниот потенцијал на втората реакција од електродниот потенцијал на првата реакција:

$$E_{\text{ќелија}} = E_{\text{AgCl}} - E_{\text{H}^+} \quad (12.2)$$

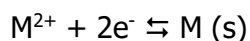
Оттука, потенцијалот на електрохемиска ќелија претставува разлика помеѓу потенцијалот на катодата и потенцијалот на анодата.

$$E_{\text{ќелија}} = E_{\text{катода}} - E_{\text{анода}} \quad (12.3)$$

$E_{\text{катода}}$ и $E_{\text{анода}}$ се електродни потенцијали за катодната и анодната полуреакција. Ако $E_{\text{ќелија}} > 0$, реакцијата на редукција во е спонтаната.

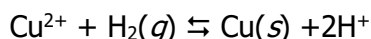
Потенцијалот на електродата е мерка за електронската енергија на електродата. За метален проводник потопен во раствор на електролит, целокупниот полнеж останува на неговата површина, при што е можно да се прилагоди густината на полнежот на неговата површина преку прилагодување на надворешниот извор на електрична енергија поврзан за проводникот.

Полуреакцијата на електрохемиска ќелија составена од електрода од метал M (катода) потопена во соодветен електролитен раствор (M^{2+}) поврзана преку електролитен мост со стандардна водородна електрода (анода) е:



По дефиниција, потенцијалот E , измерен на уредот за мерење на напон е електроден потенцијал за M/M^{2+} . Се претпоставува дека потенцијалите на фазните граници на електролитниот мост изнесуваат нула. Ако претпоставиме дека активитетот на M^{2+} во растворот е точно 1,00, потенцијалот се нарекува стандарден електроден потенцијал за системот и се означува E^0 . Оттука, стандардниот електроден потенцијал за полуреакцијата претставува електроден потенцијал кога реактантите и продуктите имаат активитет единица.

Ако M е бакар, а активитетот на бакарниот јон во растворот е 1,00, бакарната електрода се однесува како катода на галванска ќелија, а измерениот потенцијал изнесува +0,337 V. Спонтаната реакција на ќелија е:



Бидејќи бакарната електрода е катода, измерениот потенцијал по дефиниција е електроден потенцијал за Cu/Cu^{2+} полукќелијата. Бакарната електрода е позитивна во однос на водородната електрода, затоа електроните се движат во надворешното коло од негативната водородна електрода кон бакарната катода. Поради тоа, електродниот потенцијал е означен со позитивен знак:

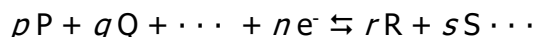


Ако M е кадмиум и активитетот на јоните во растворот изнесува 1,00, измерениот потенцијал изнесува -0,403 V. Во овој случај електродата од кадмиум се однесува како анода во галванска ќелија, така што електроните се движат од кадмиум кон водородната електрода. Затоа потенцијалот има негативна вредност.



Пресметување на електроден потенцијал

За полуреакцијата:



каде што големите букви ги претставуваат формулите на реактантите (наелектризирани или ненаелектризирани), e^- претставува електрон, малите (*italic*) букви се број на молови од секој вид, вклучувајќи и електрони) што учествуваат во реакцијата на полукелијата, електродниот потенцијал се пресметува според Нернстовата (*Nernst*) равенка:

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{(a_R)^r \cdot (a_S)^s \dots}{(a_P)^p \cdot (a_Q)^q \dots} \quad (12.4)$$

каде што:

E - потенцијал на ќелијата на соодветна температура

E^0 - стандарден потенцијал на ќелијата

R - универзална гасна константа (8,314472(15) J K⁻¹ mol⁻¹)

T - температура во Келвини

F - Фарадеева константа (96,485 coulombs/mol електрони)

n - број на молови на електрони вклучени во редокс процесот

$E_{\text{ќелија}}$ - стандарден електроден потенцијал на ќелијата

a - активитет (хемиска активност) на соодветните учесници во реакцијата

- за растворени супстанции a се однесува на концентрација (mol/L)
- за гасови a се однесува на парцијален притисок на гас (p_a)
- за цврста супстанција, чиста течност, растворувач $a = 1$.

Со замена и решавање во Нернстовата равенка се добива конечна равенка што може да се примени и за реакциите на полукелии и за реакциите во ќелијата генерално.

$$E = E^0 - \frac{0,0592}{n} \log \frac{(a_R)^r \cdot (a_S)^s \dots}{(a_P)^p \cdot (a_Q)^q \dots} \quad (12.5)$$

Константата E^0 е еднаква на потенцијалот на полукелијата кога логаритамскиот дел е еднаков на нула. Оваа состојба се јавува секогаш кога коефициентот на активитет е еднаков на единица, на пример, кога активитетот на сите реактанти и продукти е единица. Тогаш, стандардниот потенцијал се дефинира како електроден потенцијал на реакцијата на полукелијата, кога сите реактанти и продукти имаат активитет единица.

Стандардниот електроден потенцијал е важна физичка константа што дава квантитативен опис на релативната движечка сила на реакцијата на полукелијата. Електродниот потенцијал е зависен од температурата. Според тоа, температурата на којашто се определува мора да биде специфицирана. Стандардниот електроден потенцијал е релативна вредност и претставува потенцијал на електрохемиска ќелија во која анодата е внимателно специфицирана референтна електрода, стандардна водородна електрода чијшто потенцијал е со назначена вредност од нула волти. Знакот на стандардниот потенцијал зависи од проводникот, што е во контакт со полукелијата од интерес во галванската ќелија, ако другата половина е стандардната водородна електрода. Стандардниот потенцијал е мерка за движечката сила за полуреакцијата.

Стандардниот електроден потенцијал е познат за голем број полуреакции. Повеќето се определени директно од мерење на напонот на ќелии во кои водородна или друга референтна електрода ја сочинуваат другата половина на ќелијата. Возможно е и да се пресмета вредноста на E^0 од студии за рамнотежа на оксидоредуктивни системи и од термохемиски податоци поврзани со вакви

реакции. Големиот број на вредности што се наоѓаат во литературните податоци се добиени на овој начин.

Мерење на електродниот потенцијал

Иако стандардната водородна електрода е универзален стандард за референтна електрода, таа електрода никогаш не може да се добие во лабораторија. Оваа електрода е хипотетичка. Причината поради која оваа електрода не може да се добие е недостаток на знаење да се произведе раствор во кој водородните јони ќе имаат активитет единица. Не постои соодветна теорија што ќе овозможи евалуација на коефициентот на активитет на водородните јони во раствор во кој јонската сила е единица, како што е дефинирано. Затоа не може да се пресмета концентрацијата на HCl, или на друга киселина, што ќе даде активитет на водородните јони единица.

Струја во електрохемиската ќелија

Од електроаналитичките методи само потенциометриските методи се базирани на мерење на потенцијал на електрохемиска ќелија во отсуство на струја. Сите други методи, вклучуваат електрична струја и нивниот принцип се базира на мерење на струјата во ќелијата. Кога во ќелијата се спроведува еднонасочна струја, измерениот потенцијал на ќелија обично отстапува од вредноста добиена од термодинамичките пресметки. Ова отстапување може да се потекнува од повеќе феномени, вклучувајќи: Омов (*Ohm*) отпор и одредени ефекти на поларизација, како што се надпотенцијал на трансфер на полнежот, надпотенцијал на реакцијата, надпотенцијал на дифузија и надпотенцијал на кристализација. Воглавно овие феномени имаат ефект на редуцирање на потенцијалот на галванска ќелија или на зголемување на потенцијалот потребен за развивање на струја во електролитичка ќелија. Струјата се пренесува во ќелијата преку движење на јоните. Кај мали струи, обично важи Омовиот закон:

$$E = I \cdot R \quad (12.6)$$

каде што:

E = потенцијалната разлика (V) одговорна за движењето на јоните,

I = јачина на електричната струја (A)

R = отпорот (Ω) на електролитот кон струјата.

Отпорот зависи од видот и концентрацијата на јони во растворот. За да се развие струја или во галванска или во електролитичка ќелија, потребна е движечка сила во форма на потенцијал за да се надмине отпорот на јоните за движење кон анодата или кон катодата. Како и во металните порводници, оваа сила го следи Омовиот закон и е еднаква на производот од јачината на струјата и отпорот на ќелијата и се нарекува *Омов потенцијал* или *IR* - пад. Ефектот на *IR* -падот е да се зголеми потенцијалот потребен за да се управува со електролитичка ќелија и да се намали измерениот потенцијал на галванска ќелија. Затоа *IR*-падот секогаш се одзема од теоретскиот потенцијал на ќелијата:

$$E_{\text{ќелија}} = E_{\text{катода}} - E_{\text{анода}} - I \cdot R \quad (12.7)$$

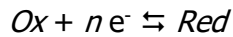
Поларизација

Одредени електроаналитички методи се базираат на криви струја-напон, добиени со мерење на промена на јачината на струјата во ќелија во функција од потенцијалот. Според горенаведената равенка, при константен електроден потенцијал, треба да постои линеарна зависност помеѓу напонот и струјата во

ќелијата. Но, всушност често се јавуваат отстапувања од линеарноста; во овие услови за ќелијата се вели дека е поларизирана. Поларизацијата може да се јави на едната или на двете електроди.

Извори на поларизација

Поларизацијата може да се јави на електродата, на површинскиот филм што е во непосредна близина на електродата и во самиот раствор.



Брзината со којашто може да се одвива оваа реакција може да биде ограничена поради неколку чекори, а со тоа и вредноста на јачината на струјата. Еден од чекорите во реакцијата, наречен трансфер на масата, вклучува движење на Ox од растворот до површинскиот филм. Кога овој чекор (или обратен трансфер на маса од Red во растворот) ја ограничува брзината на вкупната реакција, а со тоа и струјата, се нарекува концентрациска поларизација. Одредени реакции на полуќелијата се одвиваат преку интермедиерни хемиски реакции во кои се формираат видови како Ox' и Red' . Во тој случај овие интермедиери се всушност учесници во процесот на трансфер на електрони. Доколку брзината на формирање или декомпозиција на овие интермедиери ја ограничува струјата, се нарекува поларизација на реакцијата. Во одредени случаи, брзината на физички процес како адсорпција, десорпција, или кристализација ја ограничува струјата. Во тој случај, се јавува адсорпциона, десорпциона поларизација или поларизација на кристализација. Поларизацијата на трансфер на полнежот се јавува кога ограничувањето на струјата се јавува како резултат на бавен процес на трансфер на електроните од површинскиот филм или од редуцираните видови на електродата. Вообичаено не се среќаваат полуќелии кај коишто истовремено се јавуваат повеќе типови на поларизација.

Надпотенцијал

Степенот на поларизација на електродата се определува преку наднапон или надпотенцијал η , којшто претставува разлика меѓу вистинскиот електроден потенцијал (E) и термодинамичкиот или рамнотежниот потенцијал (E_{eq}).

$$\eta = E - E_{eq} \quad (12.8)$$

каде што $E < E_{eq}$. Поларизацијата секогаш го редуцира електродниот потенцијал на системот. Вредноста на E секогаш е помала од вредноста на E_{eq} , а η има секогаш негативна вредност.

Концентрациска поларизација

Концентрациска поларизација се јавува кога брзината на транспорт на реактивните видови на површината на електродата е недоволна да ја одржи струјата. Со појава на концентрациска поларизација се јавува дифузициска надпотенцијал. Општата равенка за ќелијата добива облик:

$$E_{\text{ќелија}} = E_{\text{катода}} - E_{\text{анода}} + \eta_{\text{катода}} + \eta_{\text{анода}} - IR \quad (12.9)$$

Поларизација на трансфер на полнежот се јавува и кога брзината на реакцијата на оксидација и редукција на едната или на двете електроди не е доволна за да произведе струја, при што се јавува надпотенцијал.

Големината на надпотенцијалот е тешко да се предвиди, како резултат на големиот број променливи кои не можат да се контролираат.

ПОТЕНЦИОМЕТРИСКИ МЕТОДИ

Потенциометриските методи претставуваат брзи и едноставни методи за квантитативно определување на широк опсег на катјони и анјони, а се применуваат за определување на завршната точка на титрации и за определување на концентрација на јони (со примена на јон-селективни електроди). Принципот на потенциометриските методи се базира на мерење на потенцијал на електрохемиска ќелија во отсуство на струја. Овие методи се од големо значење поради нивната брзина на спроведување на анализа, како и селективноста.

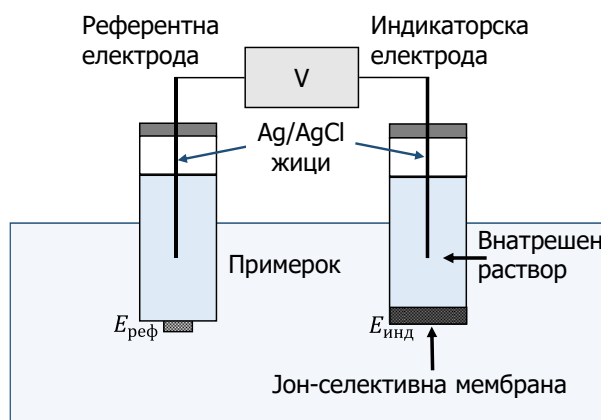
Инструменти за мерење на потенцијал на ќелија

Апаратурата за спроведување на потенциометриските методи (Слика 12.5 и 12.6) е едноставна и евтина и се состои од:

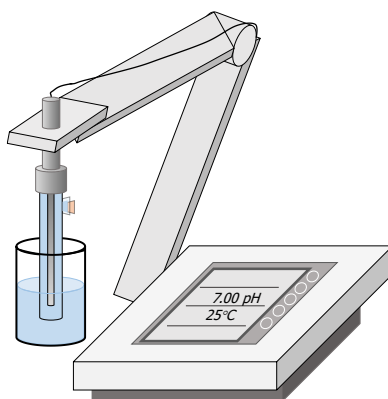
- референтна електрода (константен потенцијал, независен од концентрацијата на аналит во примерокот);
- индикаторска електрода (потенцијалот зависи од концентрацијата на аналит во примерокот);
- уред за мерење на потенцијалот (потенциометар или електронски волтметар за директно отчитување).

Според потпишана конвенција, референтната електрода е секогаш анода, а индикаторската електрода е секогаш катода и шематски се претставува на следниот начин:

Референтна електрода | раствор на електролит || електролитен мост || раствор на аналит | индикаторска електрода



Слика 12.5 Шематски приказ на апаратура за потенциометриските методи



Слика 12.6 Апарат за директно потенциометриско определување на концентрација на јони во раствор

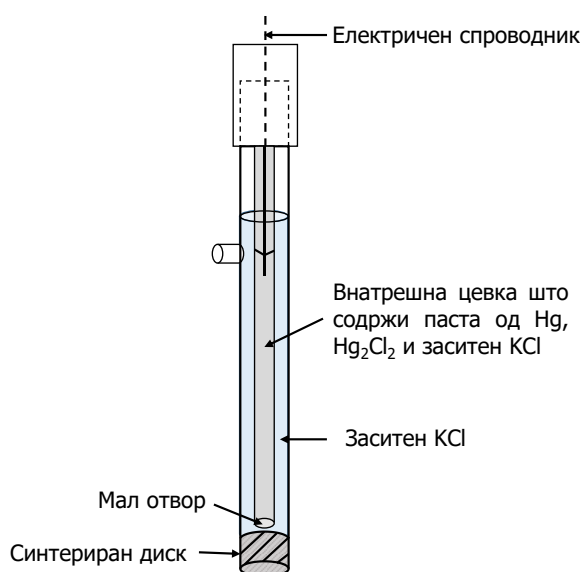
Референтни електроди

Референтната електрода во електроаналитичките методи претставува електрода со познат и константен потенцијал, целосно неостелива на составот на растворот што се испитува. Идеална референтна електрода треба да биде реверзибилна и да се покорува на Нернстовата равенка, да покажува константен потенцијал во тек на времето и да се враќа на почетниот потенцијал по изложувањето на струја со мала јачина, како и да не дава заостанување на одговорот при промени на температурата.

Видови референтни електроди

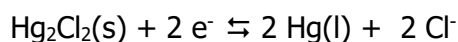
Каломелова електрода

Каломеловата електрода (Слика 12.7) е составена од жива (Hg) поврзана со раствор заситен со жива(II) хлорид (Hg_2Cl_2 или каломел), што содржи позната моларна концентрација ($x \text{ M}$) на калиум хлорид (KCl).



Слика 12.7 Шематски приказ на каломелова електрода:
 $\text{Hg} | \text{Hg}_2\text{Cl}_2 (\text{заситен pp}), \text{KCl} (x \text{ M}) ||$

Електродниот потенцијал на каломеловата електрода ($E = 0,2444 \text{ V}$ на 25°C) е определен преку реакцијата:



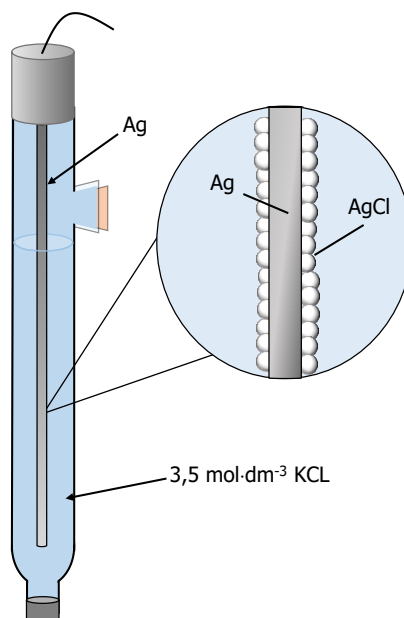
Потенцијалот зависи од концентрацијата на хлориди (x). Затоа количината на хлориди треба да биде специфицирана на секоја електрода.

Каломеловата електрода наоѓа широка примена за определување на pH вредност, а има особена важност за електрохемиските определувања како во водени така и во неводени раствори, во вискозни раствори и во колоидни суспензии. Оваа електрода се применува како референтна електрода во цикличната волтаметрија.

Каломеловата електрода е евтина и едноставна за употреба, но негативна страна е што покажува силна температурна зависност на електродниот потенцијал и може да се користи само на температури до 60°C . Поради високиот температурен коефициент, при промена на температурата потребно е значително време електродниот потенцијал да ја постигне новата вредност, поради повторно воспоставување на рамнотежата на растворливоста на KCl и каломелот да биде обновен.

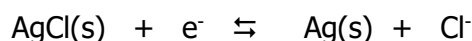
Сребро/Сребро хлоридна електрода

Сребро/сребро хлоридната електрода (Слика 12.8) е наједноставна и најчесто употребувана електрода и се состои од сребрена електрода потопена во раствор на калиум хлорид, заситен со сребро хлорид. Оваа електрода се добива со потопување на сребрена жица во разредена хлороводородна киселина, при што се формира слој од сребро хлорид, а потоа истата се потопува во заситен раствор на калиум хлорид.



Слика 12.8 Шематски приказ на Сребро/сребро хлоридна електрода:
 $\text{Ag}|\text{AgCl}(\text{заситен pp}), \text{KCl}(x \text{ M})||$

Електродниот потенцијал на оваа електрода ($E = 0,199 \text{ V}$ на 25°C) е определен преку реакцијата:



Предност на сребро/сребро хлоридната електрода е во тоа што оваа електрода може да се користи на температури и повисоки од 60°C , а негативност е што покажува силна температурна зависност на електродниот потенцијал и можност за реакции на сребрените јони (на пример, со протеини) што може да резултира со зачепување на допирната површина меѓу електродата и растворот на анализот.

Индикаторски електроди

Во потенциометриските методи, индикаторска електрода преставува електродата чиј потенцијал зависи од составот на растворот што се испитува. Идеалната индикаторска електрода треба да дава брз и репродуцибилен одговор на промените на активитетот на анализот во испитуваниот раствор. Постојат два вида на индикаторски електроди: метални индикаторски електроди и мембрански индикаторски електроди.

Металните електроди покажуваат промена на потенцијалот како резултат на редокс процесите што се одвиваат на метална површина на електродата. Мембранските индикаторски електроди, или таканаречени јон селективни електроди, развиваат потенцијал по должина на активната мембрана (мембрански потенцијал) врз основа на различна интеракција на јоните со мембраната (јонска измена, кристализација или комплексирање).

Метални индикаторски електроди

Металните електроди се составени од чист метал, што во контакт со растворот на аналит развива електричен потенцијал како одговор на редокс реакцијата што се одвива на металната површина. Одредени метални електроди, изработени од инертни метали, служат само за трансфер на електроните од и до јонските видови во растворот.

Електроди од Прв Ред

Металните електроди од прв ред (M/M^{n+} систем) се електроди од чист метал (на пример, сребро, бакар, жива...), што развиваат потенцијал како резултат на активитетот на металниот катјон во растворот, којшто потекнува од металот од којшто е изработена електродата (на пример, со индикаторска бакарна електрода Cu/Cu^{2+} се определуваат бакар(II) јони).



Потенцијалот (E_{ind}) на оваа електрода се пресметува според равенката:

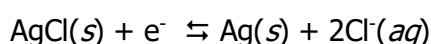
$$E_{ind} = E_{Cu}^0 - \frac{0,0592}{2} \log \frac{1}{a_{Cu^{2+}}} = E_{Cu}^0 - \frac{0,0592}{2} pCu \quad (12.10)$$

каде што pCu претставува негативен декаден логаритам од активитетот на бакар(II)јоните ($a_{Cu^{2+}}$). Според тоа, бакарната електрода овозможува директно мерење на pCu на растворот.

Металните индикаторски електроди од прв ред немаат многу широка примена во потенциометриските анализи, поради тоа што овие електроди се слабо селективни, односно може да одговараат и на други лесно редуцибилни катјони присутни во испитуваниот раствор. На пример, бакарната електрода не може да се применува за определување на бакар(II) јони, во присуство на сребро(I) јони, коишто, исто така, се редуцираат на бакарната површина. Дополнително, повеќето метални електроди, како на пример електродите од цинк и кадмиум, може да се користат само во неутрални или слабо базни раствори, бидејќи металот се раствора во кисела средина. Одредени метали се лесно оксидабилни, поради што нивната примена е ограничена само на деарирани раствори. Пример за електроди што се применуваат само во деарирани раствори се електродите од бакар (Cu/Cu^{2+}), олово (Pb/Pb^{2+}), кадмиум (Cd/Cd^{2+}), цинк (Zn/Zn^{2+}). Одредени тешки метали (на пример, железо, хром, кобалт, никел) не даваат репродуцибилни потенцијали. Поради тоа единствени електродни системи од прв ред што имаат примена во потенциометриските анализи се: сребро(Ag/Ag^{+}), жива (Hg/Hg^{2+}), во неутрални раствори и бакар (Cu/Cu^{2+}), олово (Pb/Pb^{2+}), кадмиум (Cd/Cd^{2+}), цинк (Zn/Zn^{2+}) во деарирани раствори.

Метални електроди од Втор Ред

Металните електроди од втор ред одговараат на активитетот на анјон со кој јонот формира слабо растворлив талог или стабилен комплексен јон. На пример, сребрената електрода може да се користи како електрода за определување на халогени и халоген-слични анјони. За да може електродата да се користи за определување на хлоридни јони, неопходно е само да се засати слојот на растворот на аналитот што е во непосредна близина до сребрената електрода со сребро хлорид. Реакцијата на електродата е:



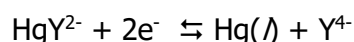
Потенцијалот (E_{ind}) на оваа електрода се пресметува според равенката:

$$E_{ind} = E_{AgCl/Ag}^0 - 0,0592 \log \frac{1}{a_{Cl^-}} = E_{AgCl/Ag}^0 - 0,0592 pCl \quad (12.11)$$

Според оваа равенка, потенцијалот на сребрената електрода е пропорционален со pCl (негативен декаден логаритам од активитетот на сребрените јони, a_{Cl^-}).

Наједноставен начин за подготовка на електрода осетлива на хлоридни анјони е да се направи анода од жица од чисто сребро во електролитичка ќелија што содржи калиум хлорид. Жицата се обложува со леплив слој на сребро хлорид, што брзо ќе се еквилибрира со површинскиот слој на растворот во којшто е потопена. Поради слабата растворливост на сребро хлоридот, вака подготвена електрода може да се користи за голем број мерења.

Друга важна електрода од втор вид е електродата за мерење на активитетот на анјонот Y^{4-} на етилендиаминтетраоцетна киселина (EDTA), врз основа на одговорот на живина електрода во присуство на мала концентрација на стабилен EDTA комплекс на Hg(II). Полу реакцијата на електродниот процес е:



Потенцијалот (E_{ind}) на оваа електрода се пресметува според равенката:

$$E_{ind} = E_{Hg}^0 - \frac{0,0592}{2} \log \frac{a_{Y^{4-}}}{a_{HgY^{2-}}} \quad (12.12)$$

За примена на овој електроден систем, неопходно е да се додаде мала концентрација на HgY^{2-} во растворот на анализот. Комплексот е толку стабилен (константата на формирање на HgY^{2-} , $K_f=6,3 \times 10^{21}$), што неговата активност останува константна за широк опсег на активитети на анјонот Y^{4-} . Според тоа равенката за пресметување на потенцијалот може да се запише како:

$$E_{ind} = K - \frac{0,0592}{2} \log a_{Y^{4-}} = K + \frac{0,0592}{2} pY \quad (12.13)$$

каде што:

$$K = E_{Hg}^0 - \frac{0,0592}{2} \log \frac{1}{a_{HgY^{2-}}} \quad (12.14)$$

Живината електрода од втор ред се применува за определување завршна точка на титрации со EDTA.

Метални електроди од Трет Ред

Одредени метални електроди, под определни услови, може да одговараат на активитетот на различни катјони. На пример, живина електрода се користи за определување на pCa на раствори што содржат калциум. Во растворот на анализот се додава мала концентрација на EDTA комплекс на Hg(II).

Метални Редокс индикаторски електроди

Електродите изработени од платина, злато, паладиум или друг инертен метал служат како електроди за оксидоредукциски системи. Во овие апликации, инертната електрода делува како извор на електрони, кои се трансферираат од редокс системот во растворот. Процесот на трансфер на електрони најчесто не е реверзибилен. Како резултат на тоа, инертните електроди не одговараат на предвидлив начин на голем број од полуреакциите. Пример ако платинска електрода се потопи во раствор на тиосулфат, тетратионатните јони не даваат репродуцибилен потенцијал, бидејќи процесот на трансфер на електрони е бавен и не е реверзибилен на електродната површина.

Мембрански индикаторски електроди (Јон селективни електроди)

Постојат голем број на комерцијално достапни мембрански електроди што овозможуваат брзо и селективно определување на голем број катјони и анјони со директно потенциометриско мерење. Поради високата селективност за одредени јони, мембранските електроди често се нарекуваат и јон селективни електроди, а се нарекуваат и *pIon* електроди, бидејќи нивниот одговор вообичаено се регистрира како р-функција (на пример, рН електроди - селективни за H^+ јони, рСа електроди - селективни за Ca^{2+} јони)

Класификација на мембраните

Мембранските електроди се разликуваат во физичкиот и хемискиот состав на мембраната. Главниот механизам со кој се равива јон-селективниот потенцијал зависи од природата на мембраната и е целосно различен од изворот на потенцијалот кај металните електроди. Потенцијалот на металните електроди се јавува како резултат на тенденцијата за одвивање на реакција на оксидоредукција на електродната површина. Кај мембранските електроди, потенцијалот е еден вид на потенцијал на допирната површина, што се јавува по должина на мембраната што го разделува растворот на аналит од референтниот раствор. Во зависност од структурата на мембраната, мембранските електроди се делат во две главни групи:

1. Електроди од кристална мембрана:
 - електроди од единечен кристал (пример, LaF_3 за определување на F^-)
 - електроди од мешан кристал или поликристални електроди (пример Ag_2S за определување на S^{2-} и Ag^+)
2. Електроди од некристална мембрана
 - стаклени електроди (пример, силикатни стакла за определување на H^+ и Na^+)
 - течни електроди (пример, течни јоноизменувачи за определување на Ca^{2+} и неутрални носачи за определување на K^+)
 - имобилизирана течност на ригиден полимер (пример, матрикс од поливинил хлорид за определување на Ca^{2+} и NO_3^-)

Својства на јон-селективната мембрана

Со цел да се обезбеди осетливост и селективност на мембранската електрода за одредени катјони и анјони, мембраната треба да ги исполнува следните услови:

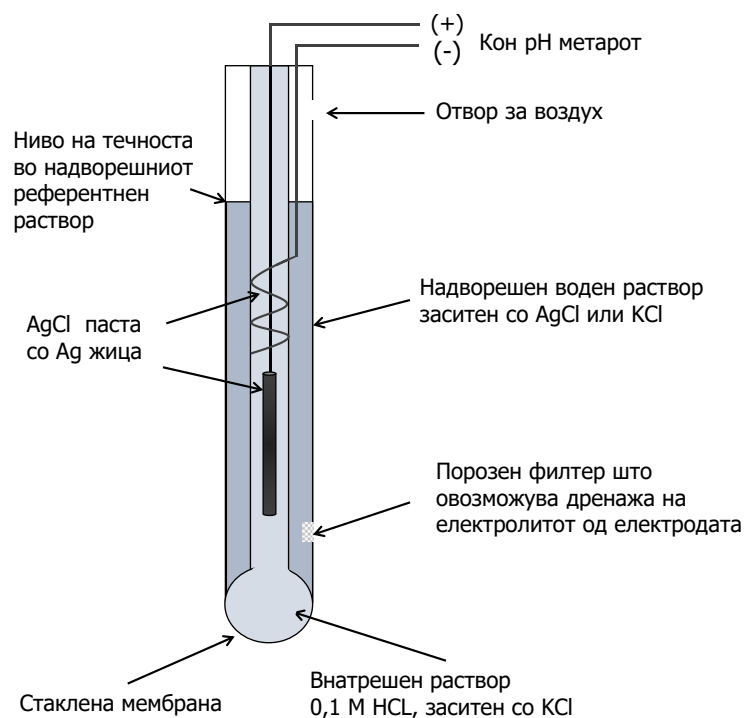
- *Минимална растворливост* - растворливоста на јон-селективниот медиум во растворите на аналитот (обично водени) да се движи кон нула претставува неопходно својство на мембраната. Затоа поголемиот број мембрани се произведуваат од големи молекули или молекулски агрегати, како што е стакло од силициум диоксид, полимерни смоли или од јонски неоргански соединенија со мала растворливост, како што е сребро хлоридот.
- *Електрична проводливост* - мембраната мора да покажува одредена електрична спроводливост, барем мала. Главно оваа проводливост зависи од формата на миграција на единечно наелектризираните јони во мембраната.
- *Селективна реактивност со аналитот* - мембраната или одредена компонента содржана во мембранскиот матрикс треба селективно да го врзува јонот на аналитот. Постојат три типа на врзување: јонска измена, кристализација или комплексирање.

Стаклена мембранска електрода

Стаклената мембранска електрода е првиот тип на јон селективна електрода и сеуште има широка примена за определување на рН вредноста и е незаменлива поради својата извонредна селективност и перформанси. Одговорот на стаклената електрода се базира на присуството на фиксирани SiO групи во стаклената мембрана, што имаат улога на јонски изменувачи. Цврстиот силикатен матрикс во внатрешноста на мембраната содржи подвижни јони на алкални метали и одговорот на електродата се базира на механизмот на јонска измена. Кога мембраната доаѓа во контакт со воден раствор, стаклената површина станува хидратирана и алкалните катјони од стаклената мембрана може да се разменуваат со другите јони во растворот, на пример H^+ јоните, создавајќи електричен потенцијал по должина на мембраната. Со додавање на алумиум оксид или други метални оксиди во различни пропорции на стаклената мембрана, се овозможува селективност на мембраната за други метални јони, како на пример, Li^+ , Na^+ , K^+ , Ag^+ или NH_4^+ .

Стаклена електрода за определување на рН вредност

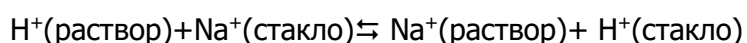
Келијата за мерење рН вредност (Слика 12.9) се состои од стаклена индикаторска електрода и референтна електрода (сребро/сребро хлорид или заситена каломелова електрода), потопени во раствор чија рН вредност треба да се измери. Индикаторската електрода се состои од тенка стаклена мембрана осетлива на рН вредност, излеана на едниот крај на стаклена цевка со дебели сидови или пластична цевка. Во цевката има мал волумен на разредена хлороводородна киселина заситена со сребро хлорид (кај некои електроди, внатрешниот раствор е пуфер што содржи хлоридни јони). Во овој раствор, сребрената жица формира сребро/сребро хлорид референтна електрода, поврзана на едниот крај со уред за мерење на потенцијалот.



Слика 12.9 Електроден систем за мерење на рН вредноста
 $Ag/AgCl$ (заситен раствор) $[Cl^-] = 1,0 M$ (надворешна референтна електрода) $\parallel [H_3O^+] = a_1$ |
 Стаклена мембрана | $[H_3O^+] = a_2$ $[Cl^-] = 1,0 M$, $AgCl$ (заситен) |
 Ag (внатрешна референтна електрода)

Келијата содржи две референтни електроди: надворешна сребро/сребро хлорид електрода (оваа електрода претставува референтна електрода на електрохемиската келија) и внатрешна сребро/сребро хлорид електрода. Улогата на внатрешната референтна електрода е да овозможи контакт со растворот, со цел да се измери граничниот потенцијал. Иако внатрешната референтна електрода е дел од стаклената електрода, оваа електрода не е елемент што ја мери рН вредноста. Тенката стаклена мембрана на врвот од електродата е јон селективната електрода што ја мери рН вредноста.

Концентрацијата на водородни јони се определува преку потенцијалната разлика што се појавува помеѓу стаклената електрода и надворешната електрода (во овој случај Ag/AgCl електрода). Кога H^+ јонот формира силанолна врска, натриумовиот јон се движи кон растворот со цел да ја одржи електронеутралноста на мембраната. При тоа се случуваат два процеси: јонска измена и дифузија. Пред употреба, рН метарот се калибрира со пуферски раствор со позната рН вредност. Накратко, мембраната претставува место на размена на катјони Na^+ и H^+ :



Кога концентрацијата на водородните јони е различна од двете страни на мембраната, помеѓу нив се јавува потенцијална разлика, поврзана со активитетот на водородни јони во растворот, односно рН вредноста на растворот. Потенцијалната разлика се мери со електронски милivolтметар или рН метар, којшто ја мониторира потенцијалната разлика помеѓу стаклената електрода и надворешната референтна електрода. Инструментот по калибрација со стандарден раствор со точно позната рН вредност, ја пресметува директно рН вредноста на растворот. Ag/AgCl електродата е попожелна за употреба од каломеловата поради еколошки причини.

За да може да служи како електрода за мерење на рН вредност, мембраната мора да биде хидратирана (50 mg вода/ cm^3 стакло). Нехигроскопни стакла не покажуваат функција од рН вредноста. Хигроскопните стакла може да ја изгубат осетливоста за рН вредноста, ако се дехидрираат во присуство на десикант. Ефектот е реверзибилен, одговорот на стаклената електрода се обновува при потопување во вода. Хидратацијата на стаклената електрода вклучува реакција на јонска измена помеѓу единечно наелектризираните катјони во стаклената решетка и протоните од растворот. Процесот вклучува само едновалетни катјони, бидејќи дво и тровалетните катјони се премногу силно врзани во силикатната структура, за да можат да вршат јонска измена со јоните од растворот. Во алкален раствор, стаклената електрода е осетлива и на водородни јони и на јоните на алкални метали. Оваа појава се нарекува алкална грешка на стаклената мембрана. Со помош на истражувања на ефектот на составот на стаклото на големината на алкалната грешка, развиени се стакла со занемарлива алкална грешка на рН вредности под 12.

Стаклени електроди за определување на други катјони

Со помош на истражувања поврзани со осетливоста на стаклената електрода, откриени се различни стакла со состав што овозможува определување катјони различни од водородните. Создадени се стаклени електроди што овозможуваат директно потенциометриско мерење на единечно наелектризираните јонски видови како што се Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Rb^+ , Cs^+ , Li^+ и Ag^+ . Некои од овие стакла се значително осетливи на одредени единечно наелектризираните катјони. Од комерцијални извори, достапни се стаклени електроди за Na^+ , Li^+ , NH_4^+ и за вкупна концентрација на едновалетни катјони.

Кристални мембрански електроди

Кристалните мембрански електроди (Слика 12.10), се произведуваат од јонско соединение или од хомогена смеса на јонски соединенија. Мембраната може да се добие со сечење на единечен кристал, со формирање дискови од фино спрашен кристал под висок притисок, или се формира со топење на кристалот во калапи и стврдување. Типичната кристална мембрана има дијаметар од 10 mm, а дебелина од 1 до 2 mm. За да се формира електродата, мембраната се излева (лепи) на крајот на цевка изработена од хемиски инертна пластика (тефлон или поливинил хлорид).



Слика 12.10 Кристална мембранска електрода

Најголемиот број јонски кристали се изолатори и немаат значителна електрична спроводливост на собна температура за да можат да служат како мембрански електроди. Оние што се спроводливи се карактеризираат со присуство на мал единечно наелектризиран јон, што е подвижен во цврстата фаза. Пример, флуориден јон во одредени ретки флуоридни руди, сребрен јон во сребрени халиди и сулфиди и бакар (I) јон во бакар (I)сулфид.

Флуоридна електрода

Лантан флуорид (LaF_3), е скоро идеална супстанција за подготовка на кристална мембранска електрода за определување на флуоридниот јон. Иако овој материјал е природен проводник, неговата спроводливост може да се зголеми преку обложување со европиум флуорид (EuF_2). Мембраните се произведуваат со сечење на дискови од единечен кристал на обложено соединение. Механизмот на развивање на потенцијал по должина на мембраната од лантан флуорид, чија големина зависи од концентрацијата на флуоридни јони, е аналоген на механизмот опишан за стаклената мембрана осетлива на водородни јони.



Страната на мембраната во контакт со помала концентрација на флуоридни јони станува позитивна во споредба со другата површина. Овој полнеж овозможува мерење на разликата во концентрацијата на флуоридни јони на два раствори. Комерцијалната електрода од лантан флуорид е достапна во различни форми и големини. Поголемиот број од нив се ригидни и можат да се применуваат на температури помеѓу 0°C и 80°C , а одговорот е линеарен до концентрации од 10^{-6} M ($0,02\text{ ppm}$). Под оваа концентрација растворливоста на лантан флуорид интерферира со концентрацијата на флуоридни јони во растворот на аналит. Единствен јон што интерферира директно со определувањето на флуориди со ова

елеткрода е водородниот јон, особено на рН вредности поголеми од 8 и на рН вредности под 5, поради формирање на недисоциран водород флуорид.

Електроди базирани на сребрени соли

Мембраните подготвени од единечни кристали или пресувани дискови од fino спрашен кристал на различни сребрени халогениди, се селективни за сребрените јони и за халогените јони. Овој тип на електроди покажуваат слаба спроводливост, слаба механичка сила и тенденција да развиваат високи фотоелектрични потенцијали. Овие недостатоци, се минимизираат ако сребрените соли се мешаат со кристален сребрен сулфид, во приближен молекулски однос 1:1. Со преципитација на еквимоларни раствори на сребро сулфид и халогени јони со сребро нитрат се добиваат хомогени смеси. По промивање и сушење, производот се обликува во дискови под притисок. Како резултат на подвижноста на сребрениот јон во сулфидниот матрикс, резултирачките дискови покажуваат добра електрична проводливост.

Електродите добиени од сребро сулфид или од смеса на сребро сулфид со друга сол на среброто, се применуваат за определување и на сулфидните и на сребрените јони. Електричниот одговор кон сребрените јони е сличен на металната електрода од прв вид (иако механизмот на активност е целосно различен). Електричниот одговор кон сулфидните јони е сличен на оној што го даваат металните електроди од втор вид. По потопување на електродата во растворот што се анализира, со растворање мала количина на сребро сулфид, брзо се заситува филмот на течност што е во допир со електродата. Растворливоста, а со тоа и концентрацијата на сребрени јони, зависи од концентрацијата на сулфиди во анализот.

Постојат и кристални мембрани што се состојат од хомогена смеса на сребро сулфид со сулфиди на бакар (II), олово или кадмиум. Електродите од овие материјали имаат сличен одговор кон овие двовалетни катјони, како и металните електроди од трет вид. Овие двовалетни суфиди, сами по себе не се проводници и не покажуваат селективна јонска активност.

Течни мембрански електроди

Течните мембрани се формираат од немешливи течности што селективно врзуваат одредени јони. Мембраните од овој вид се посебно важни, бидејќи овозможуваат директно потенциометриско определување на активитетот на одредени поливалетни катјони и одредени единечно наелектризирани анјони и катјони. Течните мембрански електроди се составени од јонски изменувачи имобилизирани на порозна инертна цврста подлога или на мембрани од поиливилнил хлорид. Течниот јонски изменувач и поливинил хлоридот се раствораат во растворувач (тетрахидрофуран). Со испарување на растворувачот, се добива флексибилна мембрана, којашто може да се сече и да се спои со крајот на стаклена или пластична цевка.

Активните супстанции во течните мембрани може да бидат: катјонски изменувачи, анјонски изменувачи и неутрални макроциклични соединенија, кои селективно комплексираат одредени јони.

Една од најважните течни мембрански електроди е селективна на јонот на калциум во приближно неутрална средина. Активната компонента на мембраната е катјонски изменувач, што се состои од алифатичен диестер на фосфорна киселина растворен во поларен растворувач. Диестерот содржи еден протон, при што две молекули на диестерот реагираат со катјонот на калциум и формираат диалкил калциум фосфат.

Калциумовата мембранска електрода го определува активитетот на калциумовиот јон и се применува за физиолошки испитувања на улогата на калциум во нервната спроводливост, формирањето на коските, контракцијата на мускулите, спроводливоста и контракцијата на срцевиот мускул и реналната тубуларна функција.

Друга течна јон-селективна електрода, од големо значење за физиолошките испитувања е калиумовата електрода. Селективноста на течната електрода за калиум во однос на натриум е од големо значење, бидејќи и двата јони се присутни во живите организми и имаат важна улога во нервната трансмисија. Голем број на течни мембрански електроди ги задоволуваат овие услови (селективност кон калиум во однос на натриум), меѓу кои и електродата базирана на антибиотикот валиномицин, нејонизиран макроцикличен етер, што има голем афинитет кон калиумовиот јон (10^4 пати поголема осетливост кон калиумовиот јон во однос на јонот на натриум).

Анјон селективните течни мембрански електроди содржат раствор на анјонски изменувач во органски растворувач.

Молекулско-селективни електродни системи

Досега се развиени два типа на мембрански електродни системи, што се селективни за одредени типови на молекули. Првиот тип се користи за определување на растворени гасови (јаглерод диоксид и амонијак). Вториот тип, базиран на биокаталитички мембрани овозможува определување на голем број на органски соединенија (глукоза и уреа).

Директни потенциометриски мерења

Определувањето на јони или молекули со примена на директни потенциометриски мерења е брзо и едноставно, и се базира на споредба на потенцијалот развиен на индикаторската електрода во испитуваниот раствор со потенцијалот на електродата потопена во еден или повеќе стандардни раствори на анализот.

За директните потенциометриски мерења потенцијалот на ќелијата се изразува како сума од потенцијалот на индикаторската електрода, референтната електрода и допирниот потенцијал:

$$E_{\text{ќелија}} = E_{\text{инд}} - E_{\text{реф}} + E_j \quad (12.14)$$

Електродниот одговор е во согласност со Нернстовата равенка. За Катјони X^{n+} на 25°C :

$$E_{\text{ќелија}} = K - \frac{0,0592}{n} pX \quad (12.15)$$

За анјони A^{n-} на 25°C :

$$E_{\text{ќелија}} = K + \frac{0,0592}{n} pA \quad (12.16)$$

каде што:

K - константа (стандарден електроден потенцијал) $K = E_j - E_{\text{ref}} + L$

L - константа, најчесто стандардниот електроден потенцијал E_0

$pX = \log \frac{1}{a_X}$, a_X е активитет на катјони,

$pA = \log \frac{1}{a_{aA}}$, a_{aA} е активитет на анјони,

E_j мора да се определи експериментално; за специфични електроди вклучува калибрација на електродата.

Зголемувањето на pX , доведува до намалување на потенцијалот на ќелијата, со катјонска селективна електрода.

Директните потенциометриски мерења се брзи и едноставни методи со можност за автоматско мониторирање и се применуваат за определување pH вредност на раствори и за определување концентрација на јони во раствори со примена на различни јон-селективни електроди.

Принципот на директните потенциометриски методи се базира на споредба на потенцијалот развиен на индикаторската електрода во растворот на аналит со потенцијалот на електродата потопена во стандарден раствор на аналитот.

Потенциометриско определување на pH вредност

pH вредноста на воден раствор се дефинира како негативен декаден логаритам од активитетот на водородните јони, изразен според конвенција како концентрација на водородни јони во растворот. Принципот на определување на pH вредноста се базира на мерење на потенцијалната разлика по должина на стаклената мембрана што го разделува растворот на аналитот од референтниот раствор со точно определена киселост.

Определувањето на pH вредноста се врши со мерење на потенцијалната разлика на две електроди: индикаторска (стаклена електрода) и референтна (сребро/сребро хлорид електрода), потопени во испитуваниот раствор. Најчесто двете електроди се комбинирани во една компактна електрода (Слика 12.9), заедно со сензор за мерење на температура на растворот. pH вредноста на растворот е во корелација со pH вредноста на референтниот раствор (pH_s) преку следната равенка:

$$pH = pH_s - \frac{E - E_s}{k} \quad (12.17)$$

каде што:

E - потенцијал (V), на ќелијата потопена во испитуваниот раствор

E_s - потенцијал (V), на ќелијата потопена во растворот со позната pH вредност (pH_s)

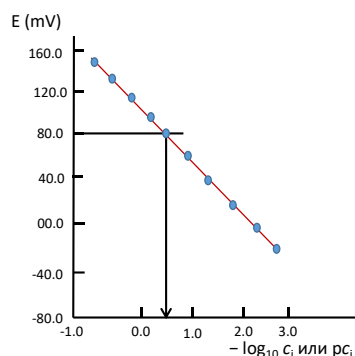
k - константа (V) и претставува промена на потенцијалот при промена на pH вредноста за единица, пресметана од Нернстовата равенка (Табела 12.1).

Табела 12.1 Вредности на k за различни температури

Температура (°C)	k (V)
15	0,0572
20	0,0582
25	0,0592
30	0,0601
35	0,0611

Метод на директна калибрација

Методот се базира на мерење на потенцијалот на најмалку три стандардни раствори подготвени во опсег на концентрација што ја опфаќа концентрацијата на аналитот во пробниот раствор. Концентрацијата на аналитот во пробниот раствор се пресметува од измерениот потенцијал на пробниот раствор со помош на калибрациона крива (Слика 12.11) конструирана од измерените вредности за потенцијалот во функција од концентрацијата на јоните (c_i) во стандардните раствори изразена како $(-\log_{10}c_i$ или $p c_i$).



Слика 12.11 Определување на концентрација на флуоридни јони со метод на директна калибрација

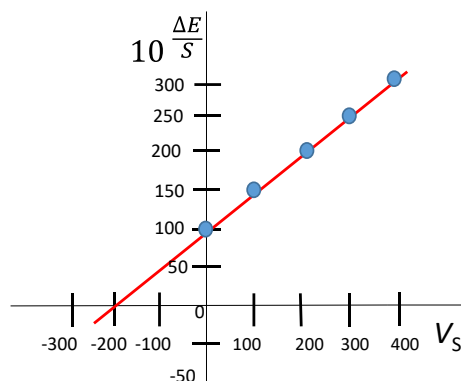
Метод на стандардни додатоци

Овој метод се применува во случај на постоење на интерференција на матриксот со определувањето на аналитот. Овој метод се базира на додавање на најмалку три последователни волумени на стандарден раствор (V_S) со концентрација (c_S) на растворот на аналит со волумен V_T , со непозната концентрација на испитуваниот јон (c_T). Се мери потенцијалот на растворот пред (E_T) и по додавање на стандарден раствор и се пресметува разликата ΔE на измерениот потенцијал по додавање на секој волумен на стандарден раствор и E_T . ΔE е пропорционална со концентрацијата на аналитот според следната равенка:

$$10^{\frac{\Delta E}{S}} = 1 + \frac{c_S V_S}{c_T V_T} \quad (12.18)$$

каде S претставува нагибот пресметан експериментално, на константна температура, при калибрација на електродата со стандардни раствори (Слика 12.12).

$$c_T = -\frac{c_S V_S}{V_T} \quad (12.19)$$



Слика 12.12 Определување на концентрација на јони со примена на метод на стандардни додатоци

Потенциометриски титрации

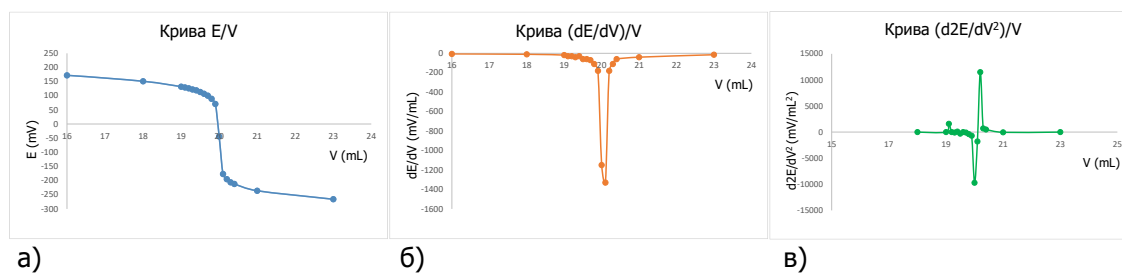
Потенциометриската титрација овозможува поразлични информации отколку директното потенциометриско мерење. Во овие методи, потенцијалот на соодветна индикаторска електрода се користи за утврдување на завршната точка на титрација. Потенциометриското определување на завршната точка се одликува

со поголема точност во однос на употребата на индикатори (пример за обоени или матни раствори, присуство на неочекувани видови во растворот). Потенциометрското определување на завршната точка е применливо за сите видови на титрации: киселинско/базни титрации, оксидоредукциски реакции, таложни и комплексометриски титрации.

Принципот на потенциометрските титрации се заснова на мерење на потенцијалот на соодветна индикаторска електрода како функција од волуменот на титрантот. Растворот на титрантот се додава внимателно во еднакви волумени и по секое додавање се отчитува потенцијалот на ќелијата (mV или pH единици). Голема промена на потенцијалот на индикаторската електрода укажува на близината на завршната точка на титрацијата. Титрантот се додава сè додека не се појават континуирани мали промени на потенцијалот. Завршната точка на титрација се определува со графичко претставување (дијаграм) на потенцијалот во функција од додадениот волумен на титрантот.

Титрациите може да бидат автоматизирани и контролирани со микропроцесор. Титрантот се додава преку автоматска бирета, а завршната точка се определува потенциометриски со стаклена електрода или друга соодветна јон-селективна електрода. Брзината на додавање на титрант може да се контролира зависно од брзината на промената на потенцијалот, колку е поголема брзината на промена на потенцијалот, титрантот се додава побавно и обратно.

Кога во координатен систем ќе се нанесе волуменот на титрантот кој се троши при титрирањето (на апсцисата, во mL) наспроти измерениот потенцијал (на ординатата, во mV) се добива крива на титрација на потенциометрската титрација. Волуменот на завршната точка на титрација се определува со интерполација од средината на стрмниот дел на кривата (најголемата промена на потенцијалот) на x - оската (Слика 12.13 а).



Слика 12.13 а) Определување на завршната точка на титрација од крива на титрација $[E/V]$, б) Определување на завршната точка на титрација од крива на титрација $[(dE/dV)/V]$, в) Определување на завршната точка на титрација од крива на титрација $[(d^2E/dV^2)/V]$

Со графички приказ на промената на потенцијалот за единица волумен на титрант (dE/dV), во функција од додадениот волумен (V), се добива крива со максимум, што одговара на најголемата промена на потенцијалот. Волуменот на завршната точка на титрација се определува со интерполација од максимумот на кривата на x - оската (Слика 12.13 б).

Со графички приказ на вториот извод од промената на потенцијалот за единица волумен на титрант (d^2E/dV^2), во функција од додадениот волумен (V), се добива крива на титрација која ја сече x - оската во точка што одговара на најголемата промена на потенцијалот. Интерсептот на кривата со x - оската претставува волумен на завршната точка на титрација (Слика 12.13 в).

КУЛОМЕТРИЈА

Кулометриските методи за базираат на електролитичка оксидација или редукација на анализот за доволен период да се обезбеди негова квантитативна конверзија во нова оксидациона состојба. Тука спаѓаат: кулометрија со примена на константен потенцијал на електродата, кулометрија со примена на константна струја (кулометриски титрации) и електрогравиметрија. Во кулометријата се мери количеството на електричен полнеж потребно да се заврши електролизата. Во електрогравиметриските методи, производот на електролиза се мери како депозит на една од електродите. Во двете постапки, количината на електричен полнеж неопходна да се комплетира електролизата, служи како мерка за количината на присутниот анализ.

Кулометриските методи имаат главно умерена селективност, осетливост и брзина, а во одредени случаи спаѓаат во најточните и најпрецизните достапни методи (мерна неодреденост помала од 0,01 %). Овие методи не бараат калибрирање со стандарди, функционалната зависност помеѓу измереното количество и масата на анализот може да се изведе од теорија.

Електролизата може да се изведе на неколку начини: со примена на константен потенцијал на ќелијата, со примена на константна струја на електролиза, или со константен потенцијал на работната електрода.

Електрогравиметриски методи на анализа

Електролитичкото таложење се применува повеќе од еден век за гравиметриско определување на металите. Металот се таложи на претходно измерена платинска катода, по што се определува зголемувањето на нејзината маса. Исклучок претставува таложење на олово на платинска анода во облик на олово (II) оксид, или хлорид во форма на сребро хлорид на сребрена анода.

Постојат две електрогравиметриски постапки. Во првата не се контролира потенцијалот на работната електрода, а напонот на ќелијата се одржува главно константен, така што се создава доволно голема струја, потребна да се заврши електролизата во разумен временски период. Вториот вид е потенциостатска постапка, кој уште се нарекува и постапка со контрола на потенцијалот на катодата или на потенцијалот на анодата, зависно од тоа дали работна електрода е анодата или катодата.

Електрогравиметрија без контрола на потенцијалот на работната електрода

Електролитичка постапка во којашто потенцијалот на работната електрода не се контролира, овозможува употреба на едноставна опрема и не бара големо внимание од аналитичарот. При тоа напонот на ќелијата во тек на електролизата се одржува константен.

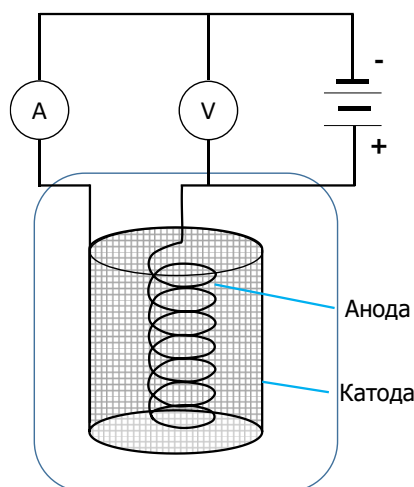
Инструменти

Апаратите за аналитичко таложење со помош на електрична струја без контрола на потенцијалот на катодата се состојат од соодветна ќелија и извор на еднонасочна струја (Слика 12.14).

Примена

Електролизата при константен потенцијал на ќелијата е ограничена на одделување на катјон што полесно се редуцира (Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ag^{1+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) од

катјон што потешко се редуцира од јоните на водород (Al^{3+}), или на одделување на некои јони што може лесно да се редуцираат како што се нитратните јони.



Слика 12.14 Апарат за електрогравиметрија без контрола на потенцијалот на катодата

Електрогравиметрија при константен потенцијал на катодата

Оваа метода претставува електроаналитичка постапка со контрола на потенцијалот на катодата или потенцијалот на анодата, зависно од тоа дали работна електрода е анодата или катодата (потенциостатска постапка).

Инструменти

Апаратурата за електрогравиметрија со контрола на потенцијалот се состои од две независни струјни кола, што делат заедничка електрода, работна електрода, на којашто се таложи анализот. Електричното коло за електролиза се состои од извор на еднонасочна струја, кој овозможува континуирана промена на потенцијалот на работната електрода, помошна електрода и амперметар. Референтното или управувачкото коло се состои од референтна електрода, дигитален волтметар со голем внатрешен отпор и работна електрода. Електричниот отпор на референтното коло е доволно голем, да овозможи струја што е неопходна за таложење во електричното коло за електролиза.

Примена

Електрогравиметријата со контрола на потенцијалот е погодна за одделување и квантитативно определување метални јони чии стандардни потенцијали се разликуваат само за неколку десетини волти. Пример е постепено таложење на бакар, бизмут, олово, кадмиум, цинк и калај во смеса на платинска електрода, што се мери по таложењето на секој поединечен метал. Првите три елементи таложат во приближно неутрална средина, во присуство на јони на тартарат, коишто создаваат комплекс со калај (IV) и спречуваат негово таложење. Најпрво, квантитативно се таложи бакарот, при што потенцијалот на катодата се одржува на $-0,2\text{ V}$, во однос на заситена каломелова електрода. По мерење на масата на електродата, се враќа катодата во растворот и на потенцијал од $-0,4\text{ V}$, се таложи бизмут. По повторно мерење, електродата се враќа во растворот и на потенцијал од $-0,6\text{ V}$, таложи олово. По целосното таложење на оловото, се додава амонијак во растворот, по што кадмиум и цинк таложат последователно на $-1,2$ и $-1,5\text{ V}$. На крајот растворот се закиселува и калајот таложи при потенцијал на

катодата од $-0,65\text{ V}$. При тоа се употребува нова електрода бидејќи цинкот се раствора под овие услови.

Кулометриски методи на анализа

Кулометријата опфаќа група на аналитички методи, што вклучуваат мерење на количината на електричен полнеж (кулон), потребни за квантитативна конверзија на аналитот во различна оксидациона состојба. Кулометријата, како и електрогравиметриските методи има предности над потенциометриските методи, во тоа што константата на пропорционалност помеѓу измерената количина (кулон) и масата на аналитот произлегува од познати физички константи, затоа вообичаено не е потребна калибрација или стандардизација. Кулометриските методи главно имаат иста точност како и гравиметриските и волуметриските методи, но за разлика од нив се побрзи и поедноставни и лесно може да се автоматизираат.

Количеството на електричен полнеж се изразува во единиците: кулон (*coulomb, C*) и фарадеј (*faraday, F*). Еден кулон (*C*) претставува количина на електричен полнеж што се пренесува за време од една секунда при константна јачина на струја од еден ампер. Еден фарадај (*F*) претставува електричен полнеж изразен во кулони (*C*) поврзан со еден мол на електрони.

Типови на кулометриски методи

Во кулометриските анализи се користат две главни техники потенциостатска техника и амперостатска техника.

Потенциостатската техника вклучува одржување на потенцијалот на работната електрода (електродата на којашто се одвива аналитичката реакција) на константно ниво, така што квантитативната оксидација или редукција на аналитот се јавува без вклучување на помалку реактивните видови присутни во примерокот или во растворувачот. Струјата е иницијално висока, но брзо се намалува и се приближува до нула, како што се отстранува аналитот од растворот. Количеството на потребен електрицитет се мери најчесто со електронски интегратор, иако и може да се применуваат и други уреди и техники за мерење.

Амперостатскиот метод на кулометрија применува константна струја, се додека индикаторот не сигнализира комплетирање на аналитичката реакција. Количеството на потребен електрицитет за да се добие завршната точка се пресметува од јачината на струјата и времето. Овој метод се нарекува и кулометриска титрација и има многу поширока апликација од претходниот.

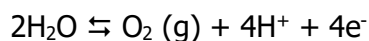
Фундаментално барање за сите кулометриски методи е определуваните видови да реагираат меѓусебе со 100% ефикасност на струјата. Ова значи дека секој фарадеј на електрицитет мора да доведе до хемиска промена во аналитот што одговара на еден мол на електрони. 100% ефикасност на струјата не значи дека аналитот мора неопходно да партиципира директно во процесот на трансфер на електрони на електродата. Најчесто, определуваната супстанција е вклучена целосно или парцијално во реакција што е секундарна на електродната реакција.

Пример:

При оксидација на железо (II) на платинска електрода, струјата резултира од реакцијата:



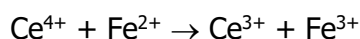
Како што се намалува концентрацијата на Fe^{3+} , се јавува концентрациска поларизација, што ќе предизвика зголемување на анодниот потенцијал, поради декомпозиција на водата како спореден процес.



Полнежот потребен за да се комплетира оксидацијата на железо (II) ќе ја надмине теоретската вредност. За да се избегне последователната грешка, се внесува цериум (III) во вишок за да започне електролизата. Овој јон се оксидира на понизок аноден потенцијал од водата.



Произведениот цериум (IV) дифундира брзо од електродната површина, каде што се оксидира еквивалетна количина на железо (II).



Конечниот ефект е електрохемиска оксидација на железо (II), со 100% ефикасност на струјата, дури иако фракција од железо (II) јоните, директно се оксидираат на електродната површина.

Кулометриското определување на хлориди е друг пример за индиректен процес. Како анода се применува сребрена електрода, и под дејство на струјата се продуцираат сребрени јони. Овие катјони дифундираат во растворот и ги преципитираат хлоридите. 100% ефикасност на струјата во однос на хлоридниот јон се постигнува, иако хлоридниот јон не е ниту оксидиран ниту редуциран во ќелијата.

Потенциостатска кулометрија

Во потенциостатската кулометрија, потенцијалот на работната електрода се одржува константен за да овозможи квантитативна реакција на анализот со струјата, без вклучување на другите компоненти од примерокот. Оваа анализа ги има сите предности од електрогравиметријата, без ограничувањата што се однесуваат на мерењето на продуктот. Оваа техника може да се применува на системи кои даваат депозити со слаби физички својства, како и за реакции што не даваат воопшто цврст продукт (на пример определување на арсен, кулометриски преку електролитичка оксидација на арсенеста киселина (H_3AsO_3) во арсенова (H_3AsO_4) на платинска електрода). Слично, може да се постигне и аналитичка конверзија на железо (II) во железо (III), преку соодветна контрола на анодниот потенцијал.

Инструменти

Апаратурата се состои од ќелија за електролиза, потенциостат (електронски уред за одржување на потенцијалот на работната електрода на константно ниво во однос на референтната електрода) и уред за интегрирање за определување на количината на електричен полнеж (C).

Примена

Кулометриските методи со константен потенцијал се применуваат за определување на 55 елементи во органски соединенија. Најчесто како катода се користи живата, при што со примена на оваа електрода се развиени методи за определување на дваесетина метали. Овој метод има голема примена во полето на нуклеарна енергија, за определување на ураниум и плутониум.

Овие методи даваат можности за електролитичко определување (и синтеза) на органски соединенија (на пример, трихлороцетната киселина и пикринската киселина, квантитативно се редуцираат на живина електрода со соодветно контролиран потенцијал). Кулометриските мерења овозможуваат анализа на овие соединенија, со мала релативна грешка (0,01%).

Кулометриските методи со варијабилна струја често се применуваат за континуирано и автоматско мониторирање на концентрацијата на конститuentите во гасови или течности. На пример, определување мали концентрации на кислород.

Кулометриски титрации (Амперостатска кулометрија)

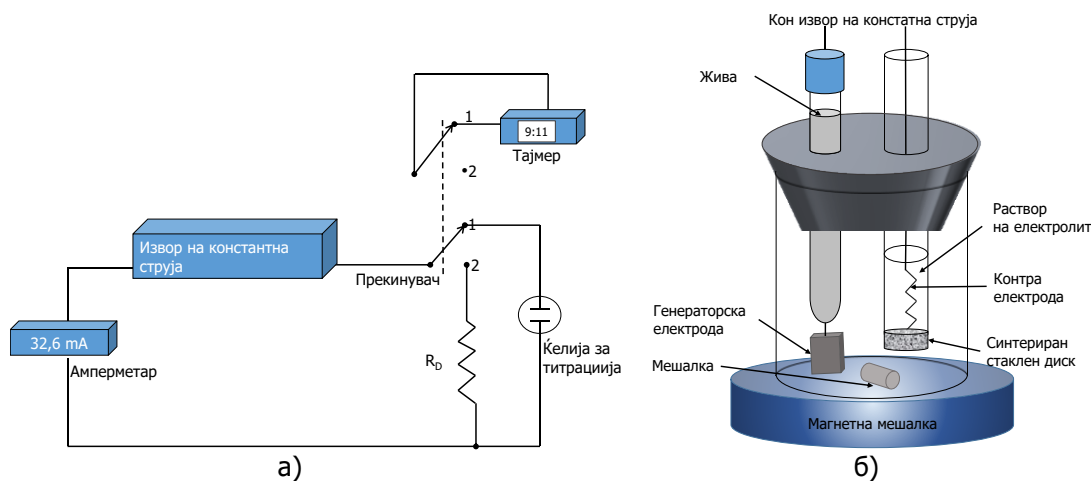
Кулометриските титрации вклучуваат титрант што се генерира електролитички од константна струја. Во некои анализи, процесот на активната електрода вклучува само генерирање на реагенс (пример, титрација на хлориди со сребрени јони продуцирани на сребрена анода). Во други титрации, анализот може директно да биде вклучен на генераторската електрода (пример кулометриска оксидација на железо (II) дел со електролитички генерираниот цериум (IV), а дел со директна реакција на електродата). Под било кои услови, вкупниот процес мора да се приближи до 100 % ефикасност на струјата, во однос на единечна хемиска промена на анализот.

Струјата во амперометриската титрација, внимателно се одржува константна и на точно познато ниво со помош на амперостат; продуктот на оваа струја во амperi и времето во секунди потребно за постигнување на завршната точка, ја дава количината на електричниот полнеж (C), што е пропорционален со количината на анализ вклучен во електролизата. Аспектот на константна струја при оваа операција, оневозможува квантитативна оксидација или редукција на непознатите видови целосно на генераторската електрода, бидејќи концентрациската поларизација на растворот е неизбежна пред да се комплетира електролизата. Електродниот потенцијал тогаш мора да порасне, за да се одржи константна струја. Доколку ова зголемување на потенцијал продуцира реактант што ќе реагира со анализот, ефикасноста на струјата мора да биде 100 %. Во кулометриската титрација, барем дел од реакцијата што го вклучува анализот се одвива далеку од површината на работната електрода.

Кулометриската титрација, како поконвенционална волуметриска постапка, бара соодветен начин за детекција на точката на хемиска еквиваленција. Поголемиот број на завршни точки применливи во волуметриските анализи се еднакво применливи и во кулометријата.

Инструменти

Кулометрискиот титратор (Слика 12.15 а) се состои од извор на константна струја, ќелија за титрација, прекинувач, електронски тајмер и уред за мерење на јачината на струјата (амперметар).



Слика 12.15. а) Шематски дијаграм на апаратура за кулометриска титрација; б) Ќелија за кулометриска титрација

Со придвижување на прекинувачот во положба 1 се вклучува тајмерот и се иницира струја во ќелијата за титрација. Кога прекинувачот е во положба 2, електролизата и тајмерот се исклучени, а струјата од изворот поминува низ лажниот отпорник (R_D), што овозможува континуирана работа на изворот и одржување константна јачина на струјата. Ќелијата за кулометричка титрација (Слика 12.15 б) се состои од генераторска електрода, на која се формира реагенсот и дополнителна електрода (контраелектрода) за затворање на колото.

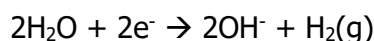
Ако се спореди апаратурата на кулометричката титрација со онаа на конвенционалните волуметриски методи, се гледа дека изворот на константна струја има функција како и стандардниот раствор, а електронскиот тајмер и прекинувачот одговараат соодветно на бирета и славина, при волуметриска титрација. На почетокот на кулометричката титрација, се пропушта електрична струја во ќелијата во подолг временски период, а како што се постигнува хемиската еквиваленција (во близина на еквивалентната точка), временските интервали се скратуваат (аналогно на волуменот на стандарден раствор во волуметриската титрација).

Кулометричките титрации имаат предности во споредба со конвенционалните методи во однос на тоа што со оваа метода реагенсот се создава и се троши во моментот на титрацијата, со што се елиминираат проблемите поврзани со подготовката, стандардизацијата и чувањето на волуметриските раствори, што е од особена важност за реагенси што се нестабилни во водени раствори (на пример, хлор, бром...).

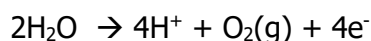
Примена на кулометричките титрации

Кулометрички титрации се применливи за сите видови волуметриски реакции со висок степен на точност:

- Реакции на неутрализација
 - *Титрација на киселини:* хидроксидните јони генерирани на платинска катода, потопена во раствор што содржи кисел аналит, може да се користат за титрација и на слаби и на јаки киселини



- *Титрација на бази:* водородните јони создадени на површината на платинска анода може да се користат за кулометричка титрација на слаби и на јаки бази.



- Титрации базирани на реакции на таложење (пример, содавање на сребрен јон на сребрена електрода) и формирање на комплекс (пример, редукција на жива (II) EDTA комплекс на живина електрода);
- Титрации базирани на оксидација/редукција преку кулометриско соодавање на различни редокс реагенси (на пример, кулометриско соодавање на бром и определување на содржина на вода при што Карл Фишер (*Karl Fisher*) реагенсот се генерира електролитички, со амперометриско определување на завршна точка).

ВОЛТАМЕТРИЈА

Волтаметријата претставува дел од динамичките електроаналитички методи што се применуваат за проучување на редокс реакциите преку односот јачина на струја/потенцијал во електрохемиска ќелија. Во овие методи информацијата за аналитот се добива со мерење на јачината на струјата што се соодава во

електрохемиската ќелија, како функција од применетиот потенцијал, во услови што поддржуваат поларизација на индикаторската или работната електрода. Воглавно, со цел да се зголеми поларизацијата, работните електроди во волтаметријата најчесто се микроелектроди со површина од неколку квадратни милиметри, а во одредени апликации и од неколку квадратни микрометри и помала.

Волтаметријата се базира на мерење на струја што се развива во електрохемиска ќелија во услови на целосна концентрациска поларизација. За разлика од волтаметријата, потенциометриските мерења се спроведуваат во услови кога јачината на струјата се приближува до нула и во отсуство на поларизација. Волтаметријата се разликува од кулометријата по тоа што при кулометриските мерења се преземаат мерки да се минимизира концентрациската поларизација. Во волтаметријата има минимална потрошувачка на аналитот, додека во кулометријата, есенцијално целата количина на аналит се претвора во друга состојба.

Историски, полето на волтаметријата е развиено од поларографијата, првиот тип на динамичка електрохемиска техника, откриен од страна на чехословачкиот хемичар Јарослав Хејровски (*Jaroslav Heyrovski*), во раните дваесетти години на минатиот век, за што добил Нобелова награда за хемија. Поларографијата е се уште важна гранка на волтаметријата, и се разликува од другите типови на волтаметрија во тоа што како работна микроэлектрода се користи живина електрода што капе.

Волтаметријата има широка примена во неорганската и физичката хемија, како и биохемијата за неаналитички цели, вклучувајќи ги фундаменталните студии на процесите на оксидација и редукција во различни медиуми, процеси на адсорпција на површини и механизми на трансфер на електрони на хемиски модифицирани електродни површини. Порано волтаметријата (посебно класичната поларографија), била важна алатка за определување на неорганските јони и одредени органски видови во водени раствори. Во доцните 1950-ти и 1960-тите, повеќето од овие аналитички апликации се заменети со различни спектроскопски методи и волтаметријата станала помалку важен метод за анализа, освен за одредени специјални апликации, како што е определување молекуларен кислород во раствори.

Во средината на 1960-тите, одредени модификации на класичните техники на волтаметрија овозможиле значително зголемување на осетливоста и селективноста на методот. Истовремено, предноста на евтините амплификатори на операциите овозможиле комерцијално да се развијат релативно евтини инструменти што ги вклучуваат овие модификации, правејќи ги достапни на аналитичарите. Ова резултирало во повторно зголемување на интересот за примена на волтаметриските методи за определување на голем број на соединенија, посебно во областа на фармацијата, биологијата и екологијата. Волтаметријата поврзана со високо ефективната течна хроматографија е моќна алатка за анализа на комплексни смеси.

Експлицитни сигнали во волтаметријата

Во волтаметријата, струјата се развива како резултат на применет варијабилан потенцијал (експлицитен сигнал) во електрохемиската ќелија што содржи микроэлектрода. Овој експлицитен сигнал, покажува карактеристичен одговор на струјата, на што се базира и принципот на оваа метода.



Слика 12.16 Експитациски сигнали во волтаметрија

Класичниот волтаметриски експитациски сигнал има линеарна форма (Слика 12.16), во кој еднонасочниот потенцијал применет во ќелијата линеарно се зголемува во функција од времето (вообичаено 2-3 V). Струјата што се развива во ќелијата се снима како функција од време (и како функција од применетиот потенцијал). Се применува во поларографија и линеарна волтаметрија.

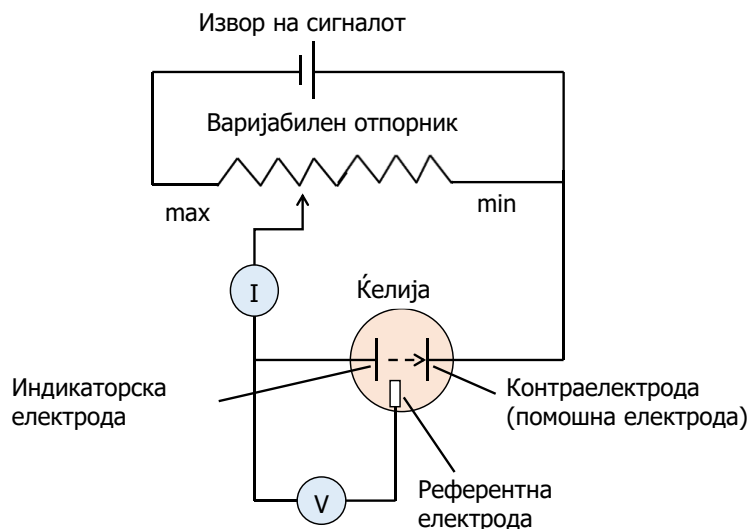
Постојат и два вида на пулсен тип на експитациски сигнал (Слика 12.16). Струјата се мери во различно време на овие пулсови. Диференцијалниот пулс се применува кај поларографијата со диференцијален пулс, а квадратниот бран се применува кај квадратно-бранова волтаметрија.

Кај триаголниот вид на експитациски сигнал (Слика 12.16), потенцијалот се менува во циклуси помеѓу две вредности, прво се зголемува линеарно со ист нумерички нагиб како неговата оригинална вредност. Овој процес може да се повторува повеќе пати, при што струјата се снима како функција од времето. Комплетен циклус може да трае 100 или повеќе секунди, или да се комплетира за помалку од една секунда. Се применува кај цикличната волтаметрија.

Инструменти за волтаметрија

Модерниот инструмент за спроведување на волтаметриски мерења се состои од ќелија, составена од три електроди, потопени во раствор што го содржи анализот и вишок на нереактивен електролит наречен помошен електролит (Слика 12.17). Една од трите електроди е работна електрода, чиј потенцијал варира во функција од времето. Оваа електрода има мали димензии, со цел да се зголеми тенденцијата да настане поларизација. Втората електрода е референтна електрода (најчесто заситена каломелова или сребро/сребро хлорид), чиј потенцијал

останува константен во тек на целиот експеримент. Третата електрода е помошна електрода и најчесто е намотана платинска жица или резервоар на жива, што едноставно служи за спроведување на електрицитет од изворот на сигналот низ растворот до микроелектродата.



Слика 12.17 Шематски приказ на инструмент за волтаметрија

Извор на сигналот е генератор на линеарен напон (променлив извор на еднонасочна струја), кој се состои од батерии споени во серија со варијабилен отпорник R . Потребниот потенцијал се постигнува со поместување на контактот во соодветна положба на отпорникот. Електричниот отпор на колото со референтната електрода е толку голем ($> 10^{11} \Omega$), така што во него практично не тече струја. Така целата струја од изворот тече од помошната електрода до микроелектродата. Контролното коло ја прилагодува оваа струја така што потенцијалот помеѓу микроелектродата и референтната електрода е идентичен со надворешниот потенцијал од генераторот на линеарен напон. Резултирачката струја се конвертира во напон и се снима како функција од времето, што е директно пропорционално со потенцијалот помеѓу парот референтна електрода | микроелектрода. Независна варијабла во овој експеримент е потенцијалот на микроелектродата спроти референтната електрода, а не потенцијалот помеѓу микроелектродата и помошната електрода.

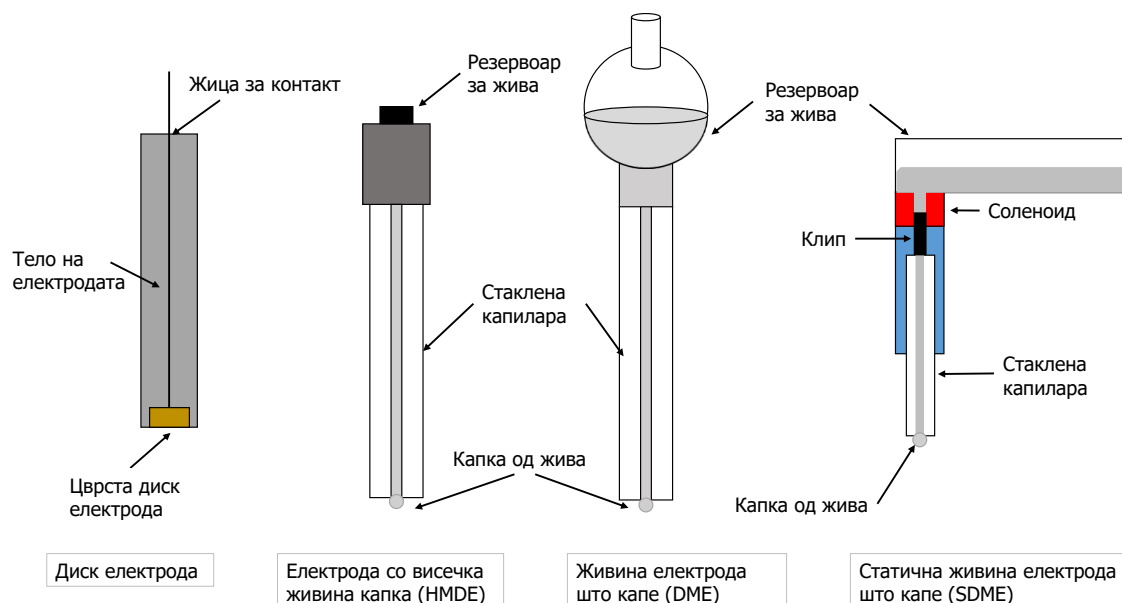
Микроелектроди

Живината микроелектрода има широка примена во волтаметријата, посебно поради високиот негативен потенцијален опсег. Понатаму, свежата метална површина настанува брзо и едноставно, само со создавање на нова капка. Можноста за формирање на свежа метална површина, е многу важна бидејќи струјата мерена во волтаметријата е многу осетлива на чистотата. Дополнителна предност на живината електрода е во тоа што многу јони на металите (пример, Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+}) реверзибилно се редуцираат во амалгами на површината на живината електрода, што го олеснува хемизмот на рекацијата.

Опсегот на потенцијали што може да се применува со овие електроди варира и зависи од материјалот на електродата, но и од составот на растворот во кој е потопена. Воглавно ограничувањата на позитивниот потенцијал се предизвикани од јаките струи што се развиваат поради оксидација на водата и формирање на молекуларен кислород. Ограничувањата на негативниот потенцијал потекнуваат од редукција на водата при што се формира водород. Кај живините

електроди се толерираат релативно ниски негативни потенцијали, поради високиот наднапон на водородот на овој метал.

Микроелектродите што се користат во волтаметријата имаат различни форми и облици (Слика 12.18). Често се во форма на мали рамни дискови на проводник, вметнати во цевки од инертен материјал (пример, тefлон), со вграден контакт од жица. Наједноставна форма на живината електрода се добива со електродепозиција на металот на диск електрода. Проводникот може да биде инертен метал (платина или злато), пиролитички графит или стаклест јаглерод, полупроводник (калај или индиум оксид), или метал обложен со филм од жива.



Слика 12.18 Типови на живина микроелектрода

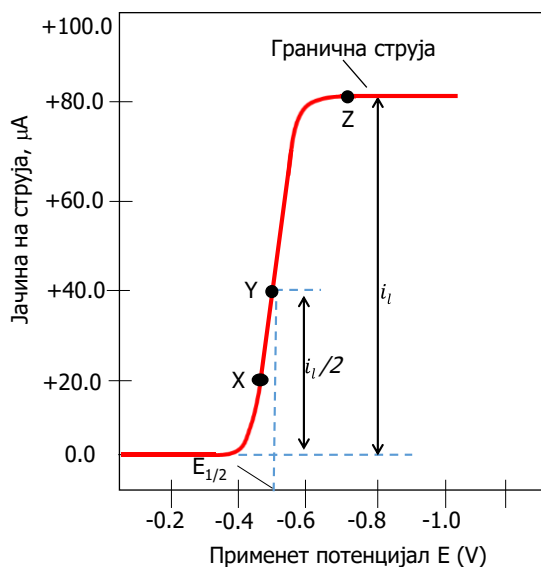
Електродата со висечка живина капка (*hanging mercury drop electrode, HMDE*), достапна комерцијално, се состои од многу фина капиларна цевка поврзана со резервоар на жива. Металот се истиснува надвор од капиларата со клип, што се движи под дејство на микрометарска навртка. Навртката овозможува формирање капки што имаат површини со репродукцибилност од 5%, а можеби и подобра.

Живината електрода што капе (*dropping mercury electrode, DME*), е користена во скоро сите поранешни поларографски инструменти. Постои и комерцијално достапна живина електрода, којашто може да функционира и како живина електрода што капе и како висечка живина електрода и се нарекува статична живина електрода што капе (*static dropping mercury electrode, SDME*). Живата е сместена во резервоар со пластичен капак на горниот крај од капиларата. Овој систем има предност во тоа што капката се формира брзо и овозможува мерењето да се одложи се додека површината не е стабилна и констатна, со што се елиминира големата флукуација на струјата што се јавува при мерење со класична електрода што капе.

Волтамограми

Волтамограмот (Слика 12.19) претставува графички приказ на зависноста на јачината на струјата (μA) во функција од применетиот потенцијал (V). Кривата што се добива има сигмоидална форма и се нарекува волтаметриски бран. Граничната струја во волтаметријата претставува струјата на врвот од волтаметрискиот бран, којашто не се менува со зголемување на применетиот

потенцијал. Оваа струја е директно пропорционална со концентрацијата на анализот во растворот.



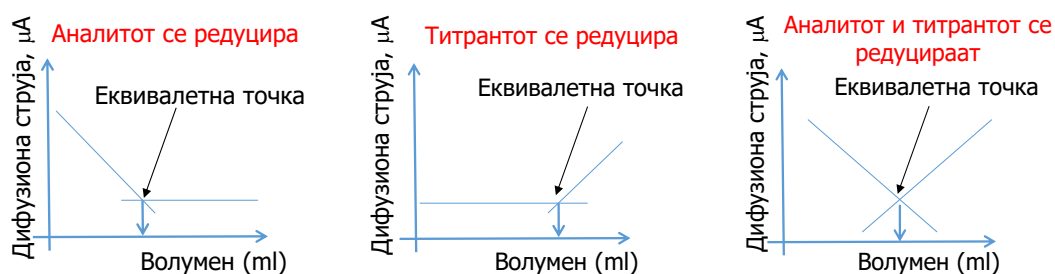
Слика 12.19 Волтамограм со линеарна промена на потенцијалот за редукција на вид А во производ Р

Хидродинамички волтаметриски методи

Волтаметријата со линеарна промена на потенцијалот во која растворот се меша или електродата ротира се нарекува хидродинамичка волтаметрија. Овој тип на волтаметрија се применува за идентификација и определување на хемиските видови по нивно хроматографско разделување, за рутинско определување кислород и одредени видови од биохемиски интерес (глукоза, лактоза, сахароза), како и за детекција на завршната точка во кулометриски и волуметриски титрации.

Амперометриски титрации

Хидродинамичката волтаметрија може да се примени за определување на еквивалентната точка на титрации, доколку барем еден од реактантите или продуктите вклучени во реакцијата може да се оксидира или редуцира на микроелектродата. При тоа струјата при фиксен потенцијал во ограничен опсег на струја се мери како функција од волуменот на титрантот (или во функција од времето ако реагентот е генериран со помош на кулометриски процес при константна струја). Амперометриските криви на титрација на едната страна од еквивалентната точка се прави линии, завршната точка се определува со интерполација (Слика 12.20).



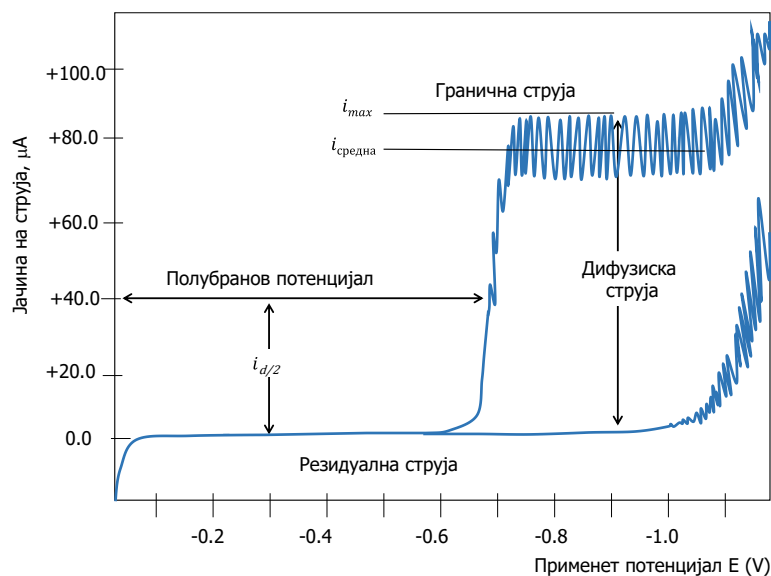
Слика 12.20 Амперометриски криви на титрација

Амперометриските титрации со една индикаторска електрода се ограничени на титрации во кои продуктот е преципитат или стабилен комплекс. Преципитирачките реагенси вклучуваат сребро нитрат за халогени јони, олово нитрат за сулфатен јон, одредени органски реагенси 8-хидроксихинолин, диметилглиоксим, купферон за различни метални јони. Исклучок се титрација на органски соединенија феноли, ароматични амини, олефини, хидразин и арсен (III) и антимон (III) со бром. Најчеста метода за определување на завршната точка на титрациите по Карл Фишер, е амперометриска метода со двојно поларизирани електроди.

Полаграфија

Поларографијата е првиот тип на волтаметриски метод. Принципот на линеарна-скен поларографија се базира на мерење на струјата во функција од потенцијалот, применет на живина електрода што капе. Електродата е поврзана за негативниот крај на извор на еднонасочна струја, потенцијалот на оваа струја се зголемува линеарно, се додека струјата не се зголеми експоненцијално како последица на редукцијата на растворувачот или помошниот електролит.

Струјата во ќелијата што содржи електрода што капе, подложи на периодични флукуации, што одговара на фреквенцијата на брзината на капење. Како што капката паѓа од капиларата, струјата паѓа на вредност нула, а потоа нагло се зголемува како што расте површината на електродата, поради зголемената површина на дифузија. Типичен поларограм на зависноста на јачината на струјата (μA) во функција од применетиот потенцијал (V) е прикажан на Слика 12.21. Дифузиската струја (i_d) претставува разлика помеѓу граничната струја (вкупната измерена вредност на струјата) и резидуалната струја (струјата во ќелијата во отсуство на анализот) и е директно пропорционална со концентрацијата на анализот. Средната струја ($i_{\text{средна}}$) претставува хипотетичка константна струја, што за времето на капење ќе продуцира исто количество на електричен полнеж, како и струјата што флукуира во тек на истиот временски период.



Слика 12.21 Поларограм

Во минатото линеарната-скен поларографија е користена за квантитативно определување голем број на неоргански и органски видови. Денес пулсните методи ги истиснуваат класичните, поради нивната поголема осетливост и селективност.

Квантитативната апликација се базира на крива на калибрација, во којашто висината на пикот е во функција од концентрацијата на аналит. Во одредени случаи се користи и метод на стандардни додатоци. Во двата случаи е неопходно стандардот да има сличен состав како и аналитот во однос на концентрацијата на електролит и рН вредноста.

Поларографскиот метод има широка примена и за анализа на неоргански супстанции. Поголемиот број на метални катјони, се редуцираат на живина електрода што капе. Дури и алкалните и земно-алкалните метали се редуцибилни, ако помошниот електролит не реагира на потребните високи потенцијали (тетраалкиламониум халиди). Успешно поларографско определување на катјони, зависи од користениот помошен електролит.

Поларографскиот метод е применлив за анализа и на неоргански јони како бромат, јодат, дихромат, ванадат, селенит и нитрит. Воглавно поларограмите на овие супстанции зависат од рН вредноста на растворот, бидејќи водородниот јон учествува во нивната редукција. Затоа за добивање на репродуцибилни податоци, неопходно е пуферирање на некои раствори.

Одредени функционални групи се редуцибилни на електрода што капе, овозможувајќи определување голем број органски соединенија. Оксидабилните органски функционални групи може да се определуваат волтаметриски со платинска, златна или карбонска микроэлектрода.

ВОВЕД ВО ХРОМАТОГРАФИЈАТА

Голем број од техниките на спектроскопијата се селективни за одредени атоми или функционални групи и за структурна анализа на молекулите. Но оваа селективност најчесто не е доволна за да се направи разлика меѓу компонентите со сродна структура. Исто така, селективноста може да биде недоволна за определување мали количини на компоненти во смеса со други компоненти што имаат интерферирачки спектрален сигнал. Така, во случај кога е потребно да се утврди присуството и количината на голем број различни компоненти во смеса, дури и ако постојат единствени спектрални карактеристики за секој аналит, потребно е да се извршат повеќе мерења со различни спектроскопски техники за смесата да се карактеризира комплетно. Поради тоа, анализата на комплексните смеси најчесто бара разделување и изолација на компонентите или на класи од компонентите. Разделувањето на аналитите од потенцијалните интерферирачки компоненти нејчесто е клучен чекор во аналитичките постапки.

До средината на дваесеттиот век, за разделување на компонентите од смеса се користеле класични, неинструментални методи, како што се: преципитација, дестилација и екстракција. Но, ако физичко-хемиските карактеристики на компонентите се многу слични, дистрибуцијата помеѓу фазите во состојба на рамнотежа резултира со благо збогатување на една од фазите со секоја компонента, но не и со целосно разделување. За да се постигне комплетно разделување, постапката за разделување мора да се повтори многу пати, делумно разделените фракции да се рекомбинираат и повторно да се изведе разделувањето на внимателно организиран начин. Ова се постигнува со макотрпна сериска течностна екстракција, фракциска кристализација или фракциска дестилација.

Со постапката наречена хроматографија автоматски и едноставно се применуваат принципите на „фракционите“ разделувања. Хроматографијата се применува за разделување на многу комплексни смеси составени од компоненти коишто се многу слични меѓу себе.

Техниката на разделување и терминот хроматографија за прв пат е употребен од рускиот ботаничар Михаил Семенович Цвет (*Mikhail Semenovitch Tswett*, 1872-1919) на почеток од дваесеттиот век. Со помош на техниката, тој разделувал различни растителни пигменти, како што се хлорофили и ксантофили, така што пуштал раствори од овие компоненти низ стаклена колона пакувана со фино поделен калциум карбонат. Разделените компоненти изгледале како обоени ленти во колоната, што придонело за изборот на име за овој метод (грчки *chroma* - боја и *graphein* - да пишува).

Примената на хроматографијата драстично се зголемила во последните педесетина години, што се должи не само на развојот на неколку нови хроматографски техники, туку и на растечката потреба на научниците за изнаоѓање подобри методи за карактеризирање комплексни смеси. Развојот на различните типови на комерцијално достапни хроматографски инструменти во изминатиов половина век овозможи тие да бидат најзастапени аналитички инструменти за определување огромен број различни аналити во смеси. Со единствена хроматографска анализа може да се изолираат, да се идентификуваат и да се квантифицираат дури стотици компоненти во смеса. Денес хроматографијата е моќен метод на разделување, што се употребува во сите гранки на науката.

За огромното значење на овие методи за науката кажува и Нобеловата награда доделена на Мартин и Синг (*A.J.P. Martin, R.L.M. Synge*) во 1952 година за нивните откритија на ова поле. Уште поимпресивни се 12-те нобелови награди во

период помеѓу 1937 и 1972 година, доделени на научници во чија работа хроматографијата имала важна улога. Досега овој список многукратно е зголемен.

Дефиниции за хроматографија

Првата дефиниција за хроматографијата гласела: „Хроматографијата претставува метод со кој се разделуваат компоненти од смеса на адсорбирачка колона во услови на проточен систем“.

Хроматографијата многукратно се развила од времето на Цвет и денес вклучува бројни варијации на основниот процес на разделување. Терминот хроматографија вклучува голем број техники. Организациите за стандардизација во некои земји имаат развиено сопствена терминологија и дефиниции. Со цел унифицирање на терминологијата поврзана со хроматографијата, во 1993 Меѓународниот сојуз за чиста и применета хемија (*IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry*) го објави документот: Унифицирана номенклатура за хроматографија (*Unified Nomenclature for Chromatography*), во кој е дадена и дефиницијата: „Хроматографија претставува физички метод на разделување, при што компонентите што се разделуваат се дистрибуираат помеѓу две фази, од кои едната е стационарна, додека другата се движи во определена насока“.

Хроматографијата опфаќа различни и важни групи на методи што овозможуваат разделување на соединенија со сродна структура од сложени смеси, што многупати е невозможно на друг начин. Кај сите хроматографии, примерокот се пренесува со мобилната фаза, којашто може да биде: гас, течност или суперкритична течност. Мобилната фаза протекува низ стационарна фаза, којашто е фиксирана во колона или на цврста површина. Стационарната фаза не реагира со мобилната фаза. Двете фази се избрани така што компонентите од примерокот се распределуваат во различен степен помеѓу стационарната и мобилната фаза. Оние компоненти што се задржуваат на стационарната фаза се движат многу бавно со протокот на мобилната фаза. Обратно, компонентите што слабо се задржуваат на стационарната фаза патуваат многу брзо. Како резултат на разликите помеѓу нивната подвижност, компонентите од примероките се разделуваат во одделени *ленти* или *зони*, коишто понатаму може да се анализираат квалитативно и/или квантитативно.

Класификација на хроматографските методи

Хроматографските методи може да се поделат на повеќе начини.

1. Поделба според начинот на пакување на стационарната фаза

1. Хроматографија на колона

2. Планарна хроматографија

- а) хартиена хроматографија
- б) тенкослојна хроматографија

Првата поделба се базира на физичкиот принцип со кој стационарната и мобилната фаза стапуваат во контакт. Кај *хроматографија на колона*, стационарната фаза се наоѓа во тесна цевка, низ која под притисок протекува мобилната фаза. Кај *планарната хроматографија*, стационарната фаза се наоѓа на рамна плоча или во пукнатините од хартија. Тука мобилната фаза се движи низ стационарната фаза по капиларен пат или под дејство на земјината тежа. Важно е да се нагласи дека принципите на рамнотежата врз коишто се базираат двата типа на хроматографија се идентични, а теоријата на хроматографија на колона лесно се применува и на планарната хроматографија.

II. Поделба според типот на мобилната и на стационарната фаза

Втората, пофундаментална поделба на хроматографските методи се базира на типовите на мобилните и на стационарните фази, како и на видовите рамнотежа што се воспоставуваат при пренесување на растворените супстанции помеѓу фазите.

1. Течна хроматографија - мобилна фаза: течност

- а) течно-течна: стационарната фаза е течност, адсорбирана на цврста подлога (партициска)
- б) течно-цврста: цврста стационарна фаза (адсорпциска)
- в) хроматографија со јонски изменувачи: стационарната фаза е јоно-изменувачка смола
- г) ексклузивна "size exclusion": стационарната фаза е течност сместена во меѓупросторот на полимерна цврста супстанција

2. Гасна хроматографија - мобилна фаза: гас

- а) гасно-течна: стационарната фаза е течност адсорбирана на цврста подлога (партициска)
- б) гасно-цврста: цврста стационарна фаза (адсорпциона)

3. Хроматографија на суперкритична течност - мобилна фаза: суперкритична течност

Во Табела 13.1 се наведени трите основни типа на хроматографија: *течна хроматографија*, *гасна хроматографија* и *хроматографија на суперкритична течност*. Како што укажува и името, мобилните фази кај трите техники се: течност, гас и суперкритична течност, соодветно.

Табела 13.1 Поделба на хроматографските методи на колона

Општа поделба	Специфичен метод	Стационарна фаза	Тип на рамнотежа
Течна хроматографија (мобилна фаза:течност)	Течно-течна, или партициска	Течна, адсорбирана на цврста подлога	Распределување помеѓу немешливи течности
	Течна-врсана фаза	Органски видови врзани на цврста подлога	Распределување помеѓу течност и врзаната површина
	Течно-цврста, или адсорпциска	Цврста	Адсорпција
	Јоно-изменувачка	Јоно-изменувачка смола	Размена на јони
	Гел-хроматографија (size exclusion)	Течност во пукнатини на полимерна цврста супстанција	Распределување/сееење
Гасна хроматографија (мобилна фаза:гас)	Гасно-течна	Течна, адсорбирана на цврста подлога	Распределување помеѓу гас и течност
	Гасно-врсана фаза	Органски видови врзани на цврста подлога	Распределување помеѓу течност и врзаната површина
	Гасно-цврста	Цврста	Адсорпција
Суперкритична течна хроматографија (мобилна фаза: суперкритична течност)		Органски видови врзани на цврста подлога	Распределување помеѓу суперкритична течност и врзаната површина

Потребно е да се нагласи дека само течната хроматографија може да се изведува и на колона и на рамна површина, додека гасната и хроматографија на суперкритична течност се ограничени само на колона.

III. Поделба според механизмот на разделување

1. **Партициска (поделбена) хроматографија** - хроматографскиот систем се состои од две течни фази. Разделувањето на компонентите се врши врз основа на различните партициски коефициенти во бинарниот течен систем.
2. **Атсорпциска хроматографија** - карактеристична е за гас-цврста и течно-цврста хроматографија. Разделувањето е резултат на интеракцијата или врзување на компонентите од примерокот на некоја цврста површина или на определени активни места на цврстата површина.
3. **Јоно-изменувачка хроматографија** - принципот на разделување се заснова на размена на јони со ист полнеж, помеѓу јоноизменувачката смола и растворот.
4. **Гел хроматографија** - разделувањето се врши врз основа на разликите во големината на молекулите на супстанциите.

IV. Поделба според техниката на развивање

1. **Хроматографија со елуирање**
2. **Хроматографија со истиснување**
3. **Фронтална анализа**

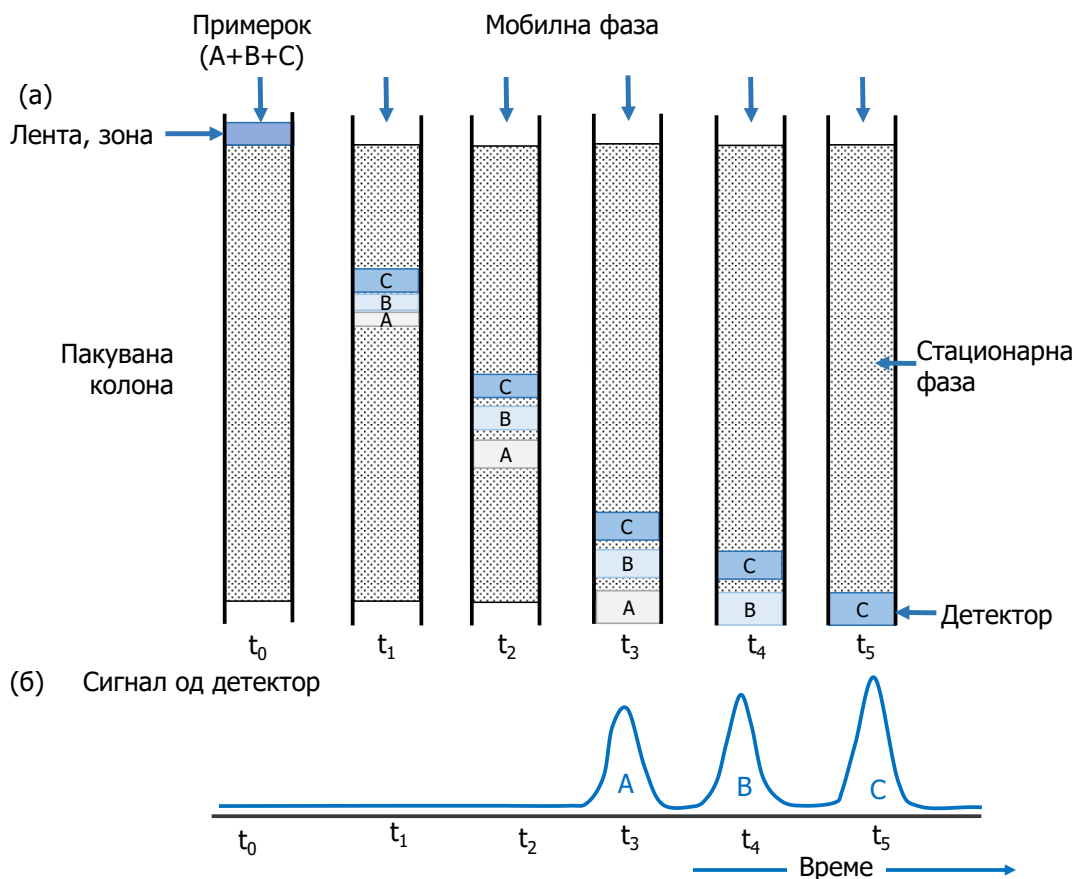
Во пракса, најчесто се користи хроматографија со елуирање и поретко хроматографијата со истиснување. Елуирањето може да биде изократско (постојан состав на учесници на мобилна фаза кај течната, односно постојана температура кај гасната хроматографија) и градиентно (постепено менување на составот на учесниците на мобилната фаза, односно на температурата, кај течната и гасната хроматографија, соодветно).

Хроматографија на колона со елуирање

На Слика 13.1 шематски е прикажано разделувањето на две супстанции А и В во колона, со помош на хроматографија со елуирање со течна мобилна фаза. Елуирањето може да се објасни како движење и промивање на примероците низ колоната со постојано додавање свеж растворувач. Како што е прикажано на сликата, мала количина од примерокот (смеса од компонентите А и В) се нанесува на врвот на колоната (време t_0 , Слика 13.1), по што компонентите од примерокот се распределуваат помеѓу двете фази. Со додавање нова количина од мобилната фаза (елуент), компонентите се движат надолу низ колоната, каде што се врши понатамошно распределување помеѓу мобилната фаза и нова порција од стационарната фаза (време t_1).

Со континуирано додавање растворувач се носат растворените молекули низ колоната по пат на континуирани серии на трансфери помеѓу мобилната и стационарната фаза, при што доаѓа до континуирана распределба на компонентите помеѓу двете фази. Бидејќи движењето на растворените молекули може да се случи само кога тие се наоѓаат во мобилната фаза, просечната *брзина* со која зоната со растворената супстанција патува низ колоната *зависи од делот од времето поминато во таа фаза*. Овој дел од времето е мал за супстанции што силно се задржуваат од стационарната фаза (на пример, компонентата В на Слика 13.1) и голем кога задржувањето во мобилната фаза е поверојатно (компонента А). Идеално, разликите во брзините, предизвикуваат разделување на компонентите од смесата во ленти или зони, распределени долж колоната (време t_2 , Слика 13.1). Компонентата В се задржува многу посилено од стационарната фаза, поради што се движи побавно низ колоната од компонентата А. Со зголемување на поминатиот пат растојанието меѓу лентите се зголемува, со што се подобрува и нивното

разделување, но истовремено доаѓа и до нивно ширење со што се намалува ефикасноста на колоната за разделување. Бидејќи ширењето на зоната е неизбежно, потребно е да воспостават хроматографски услови при кои ширењето на зоните се одвива многу побавно од разделувањето на зоните, како, на пример, употреба на доволно долга колона. Изолацијата на разделените компоненти се постигнува со пропуштање доволна количина на мобилна фаза низ колоната, со цел да се предизвика поединечните зони да излезат од колоната, каде што може да се детектираат или да се соберат (време t_3 и t_4 , Слика 13.1).



Слика 13.1 (а) Дијаграм што покажува разделување на смеса од компоненти A и B по пат на хроматографија на колона со елуирање, (б) Детекторски сигнал во различни етапи на елуирањето прикажани во (а).

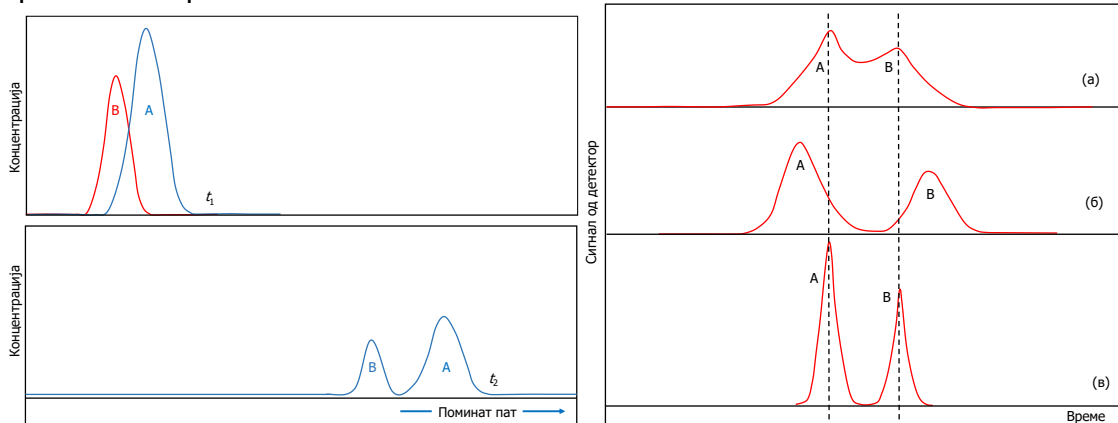
Разредување на аналитот

На Слика 13.1 е претставена една важна карактеристика на процесот на разделување: процесот на разделување скоро секогаш е проследен со разредување на аналитите. Така, големината на првичната зона што го содржи аналитот е видливо помала од која било од двете зони што стигнуваат до детекторот, што значи дека е постигнато значајно разредување на аналитите за време на нивното разделување. Како резултат на тоа, детекторите што се употребуваат при сепаративните техники често мора да бидат поосетливи отколку што би требало да бидат доколку ако не се применува процес на разделување.

На Слика 13.2 се прикажани на профилите на концентрација на лентите што ги содржат аналитите A и B (примерот од Слика 13.1) за време на елуирање t_1 и подоцна t_2 . Со оглед на тоа дека аналитот B е повеќе задржан на стационарната фаза отколку аналитот A, аналитот B доцни за време на патувањето. При патување низ колоната, растојанието помеѓу зоните од двата аналита се зголемува.

Истовремено, двете зони се шират, со што се намалува ефикасноста на колоната за разделување. И покрај тоа што ширењето на зоните е неизбежно, сепак условите на разделување може да се приспособат за ширењето да биде побавно од разделувањето.

Неколку хемиски и физички варијабли влијаат на брзината на разделување и ширење на зоните. Како последица, подобрување на сепарацијата може да се постигне со (1) зголемување на брзина на разделување или (2) намалување на брзина на ширење на зоните.



Слика 13.2 На левата страна од сликата се прикажани профилите на концентрација на лентите што ги содржат анализите A и B на две различни времиња (t_1 и подоцна t_2) при патување низ колоната. Дијаграмите на десната страна од сликата прикажуваат хроматограми добиени при разделување на двокомпонентната смеса, каде што се илустрирани методи за подобрување на сепарацијата: (а) оригинален хроматограм со препоклопени пикови, (б) подобрена сепарација по пат на зголемување на разделувањето и (в) подобрена сепарација по пат на намалување на ширина на пиковите. Обратната местоположба на A и B во двете слики се должи на разликите во апцисата: на левата страна означува поминат пат низ колоната, а на десната страна означува време).

Хроматограми

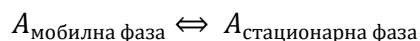
Ако на крајот од колоната се стави детектор што дава одговор на концентрацијата на растворената супстанција и се конструира графички приказ од неговиот одговор како функција од времето (или волуменот на додадената мобилна фаза), ќе се добијат серии на пикови, прикажани на Слика 13.1 б. Овој графички приказ е наречен *хроматограм* и се употребува за квалитативни и квантитативни анализи. Положбата на пиковите на оската на која е претставено времето се користи за идентификација на компонентите од примерокот, а површините под пиковите се квантитативна мерка за количината на секоја компонента.

Брзина на патување на растворените супстанции

Ефективноста на хроматографската колона за разделување на две растворени супстанции делумно зависи од релативните брзини со кои се елуираат двете компоненти. Овие брзини се определени со рамнотежните константи за реакциите со кои растворените супстанции се распределуваат помеѓу стационарната и мобилната фаза.

Константа на дистрибуција

Воспоставената рамнотежа при процесот на распределба во хроматографијата често се објаснува со релативно едноставни равенки што го вклучуваат трансферот на анализот помеѓу мобилната и стационарната фаза. Така, за растворена супстанција А се пишува:



Рамнотежната константа (К) за оваа реакција се нарекува константа на дистрибуција, партициски однос или партициски коефициент (препорака на Комисијата на IUPAC за аналитичка номенклатура за хроматографија е да се употребува терминот константа на дистрибуција, K_c) и се дефинира како:

$$K_c = \frac{c_S}{c_M} \quad (13.1)$$

каде што c_S е моларната концентрација на растворената супстанција во стационарната фаза, а c_M нејзината моларна концентрација во мобилната фаза. Идеално, K_c е константна во големо концентрациско подрачје каде што c_S е директно пропорционална на c_M . Хроматографијата, каде што оваа равенка е применлива се нарекува линеарна хроматографија и се карактеризира со симетрични пикови во облик на Гаусова (*Gauss*) крива, а времињата на ретенција се независни од концентрацијата на инјектираниот анализ. Сите теоретски дискусии ќе бидат ограничени на линеарната хроматографија.

Време на ретенција

На Слика 13.3 е прикажан типичен хроматограм добиен од раствор што содржи само еден анализ. Времето што е потребно анализот по инјектирање на примерокот да стигне до детекторот се нарекува *време на ретенција* и се означува со симболот t_R . Малиот пик на левата страна од хроматограмот на Слика 13.3 ги претставува компонентите што не се задржуваат во колоната. Времето t_M , што е потребно компонентите што не се задржуваат да стигнат до детекторот се нарекува *мртво време*. Обично, примероците или мобилната фаза содржат компоненти што не се задржуваат. Во спротивно, се додаваат компоненти што не се задржуваат, за да се изврши идентификација на пикот на мртвото време. Брзината на патување на компонентите што не се задржуваат е иста со просечната брзина со која се движат молекулите на мобилната фаза.

Средната линеарна брзина \bar{v} на растворената супстанција се изразува како:

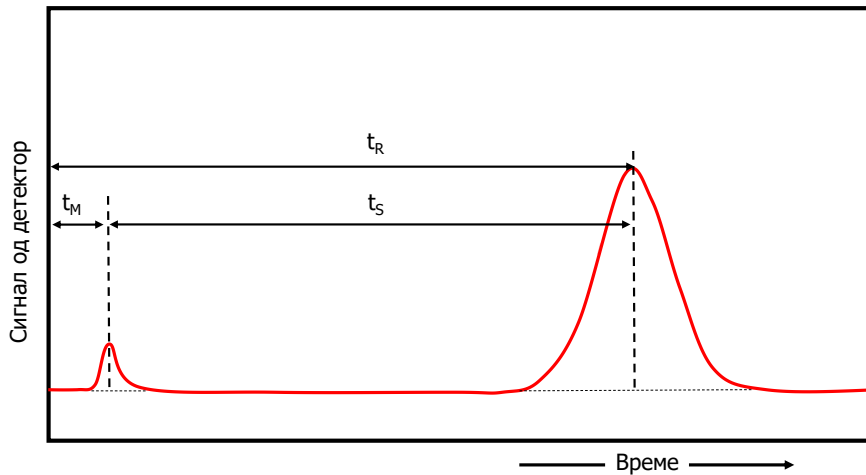
$$\bar{v} = \frac{L}{t_R} \quad (13.2)$$

каде што L е должината на колоната.

Слично, средната линеарна брзина u на молекулите на мобилната фаза е:

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (13.3)$$

каде што t_M , мртвото време, е времето потребно молекулите од мобилната фаза да поминат низ колоната.



Слика 13.3 Типичен хроматограм добиен од раствор на двокомпонентна смеса. Малиот пик на левата страна од хроматограмот ги претставува компонентите што не се задржуваат во колоната и стигнуваат до детекторот речиси веднаш по започнување на елуирањето. Времето на ретенција t_M е приближно еднакво на времето потребно молекула од мобилната фаза да помине низ колоната.

Врска помеѓу времето на ретенција и константата на дистрибуција

За да се определи зависноста на времето на ретенција на растворената супстанција од нејзината константа на дистрибуција, потребно е да се изрази брзината на патување на растворената супстанција како дел од брзината на мобилната фаза:

$$\bar{v} = u \cdot \text{дел од времето што растворената супстанција го поминува во мобилната фаза} \quad (13.4)$$

Делот од времето што растворената супстанција го поминува во мобилната фаза, исто така, е еднаков на просечниот број на молекули на растворената супстанција во мобилната фаза во кое било време, поделено со вкупниот бројот на молекули на таа супстанција во колоната:

$$\bar{v} = u \cdot \frac{\text{молекули на растворена супстанција во мобилна фаза}}{\text{вкупни молекули на растворената супстанција}} \quad (13.5)$$

Вкупниот број на молекули на растворената супстанција во мобилната фаза е еднаков со моларната концентрација c_M на растворената супстанција во мобилната фаза помножена со волуменот на мобилната фаза V_M . Слично, бројот на молекули на растворената супстанција во стационарната фаза е производ од концентрацијата на растворената супстанција во стационарната фаза c_S и волуменот на стационарната фаза V_S .

$$\bar{v} = u \cdot \frac{c_M \cdot V_M}{c_M \cdot V_M + c_S \cdot V_S} = u \cdot \frac{1}{1 + \frac{c_S \cdot V_S}{c_M \cdot V_M}} \quad (13.6)$$

Со замена на равенката (13.1) во оваа равенка се добива израз за брзината на патување на растворената супстанција како функција од нејзината константа на дистрибуција и како функција од волумените на стационарната и мобилната фаза:

$$\bar{v} = u \cdot \frac{1}{1 + \frac{Kc \cdot V_S}{V_M}} \quad (13.7)$$

Двата волумени може да се пресметаат од методот за подготовка на колоната.

Брзина на патување на растворената супстанција, фактор на ретенција

Факторот на ретенција, или факторот на капацитет, е важен параметар што се употребува за да се опише брзината на патување на растворената супстанција низ колоната (препорака на Комисијата на IUPAC за аналитичка номенклатура за хроматографија е да се употребува терминот фактор на ретенција, k') и за компонентата А се дефинира како:

$$k'_A = \frac{K_A \cdot V_S}{V_M} \quad (13.8)$$

каде што K_A е константа на дистрибуција за компонента А. Со замена на оваа равенка во равенката (13.7) се добива:

$$\bar{v} = u \cdot \frac{1}{1+k'_A} \quad (13.9)$$

За да се покаже како може да се пресмета k'_A од хроматограмот, треба да се заменат равенките (13.2) и (13.3) во равенката (13.9):

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_M} \cdot \frac{1}{1+k'_A} \quad (13.10)$$

што може да се изрази и како:

$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (13.11)$$

Како што е прикажано на Слика 13.3, вредностите за t_R и t_M се добиваат од хроматограмот. Во случај кога факторот на ретенција на растворената супстанција е многу помал од единица, елуирањето се случува многу брзо и е многу тешко точно да се определи времето на ретенција. Кога факторот на ретенција е голем (од 20 до 30), времето на елуирање е премногу долго. Идеално, разделувањата се извршуваат под услови кога факторите на ретенција на растворените супстанции во смеса се движат помеѓу 2 и 10.

Релативна брзина на патување, фактор на селективност

Факторот на селективност α на колоната за две компоненти А и В се дефинира на следниот начин:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \quad (13.12)$$

каде што K_B е константа на дистрибуција на компонентата В, што повеќе се задржува во стационарната фаза, а K_A е константа на дистрибуција на компонентата А што не се задржува долго, односно се елуира побрзо. Според оваа дефиниција, α секогаш има вредност поголема од единица.

Со замена на равенката (13.8) и соодветните равенки за компонентата В во равенката (13.12), се добива врската помеѓу факторот на селективност за двете компоненти и нивните фактори на ретенција:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad (13.13)$$

каде што k'_B и k'_A се факторите на ретенција за В и А, соодветно. Со замена на равенката (13.11) за двете компоненти во равенката (13.13) се добива израз што овозможува определување на α од експериментално добиениот хроматограм:

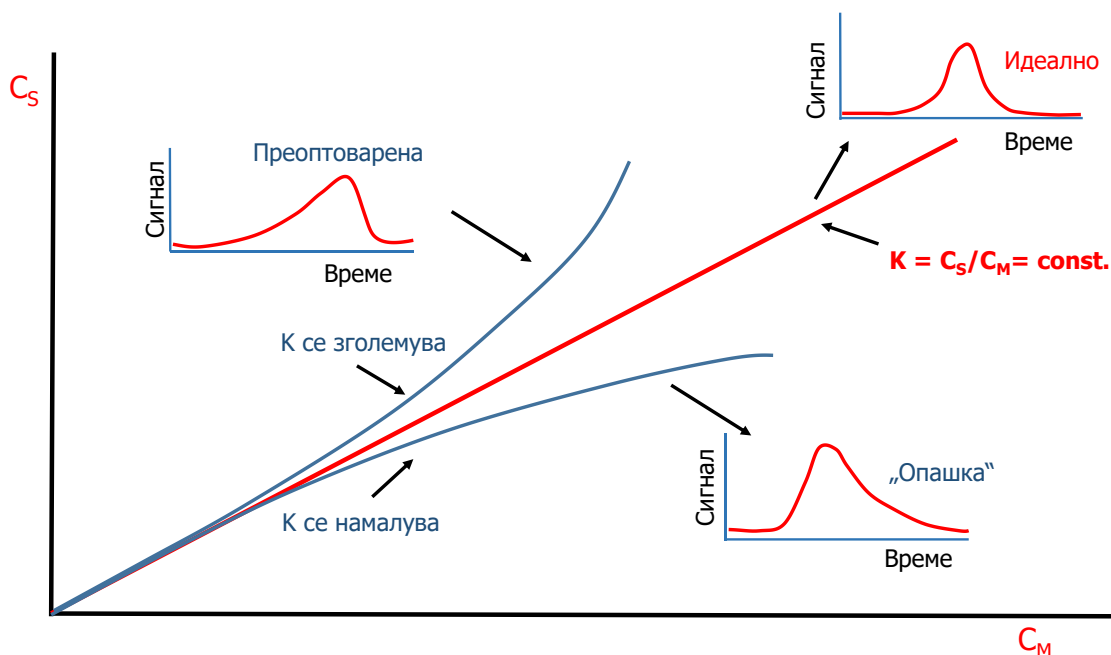
$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M} \quad (13.14)$$

Ширење на зоните и ефикасност на колоната

Кинетичката теорија на хроматографијата успешно ги објаснува обликот на хроматографските пикови и влијанието на ефектите на неколку променливи величини врз ширината на пиковите, со квантитативни термини. Оваа теорија особено обрнува внимание на начинот со кој променливите ја подобруваат ефикасноста на колоната преку намалување на ширината на пиковите.

Облик на хроматографските пикови

Пиковите добиени на хроматограмот покажуваат голема сличност со Гаусовата крива на нормална распределба, добиена кога вредностите од повеќекратни мерења се претставуваат со графички приказ како функција од честотата на нивното појавување. Но, не сите хроматографски пикови се идеални. Некои пикови покажуваат опашка (*tailing*) или фронтална асиметрија (*fronting*). Во случај на опашка, десната страна на пикот е извлечена, а предната страна е исправена, додека тоа е обратно во случај на фронталната асиметрија (Слика 13.4). Најчеста причина за појавата на опашка или на фронтална асиметрија се нелинеарните константи на дистрибуција. Фронталната асиметрија се појавува и кога во колоната е аплицирана премногу голема количина од примерокот. Искривувања од овој тип се непожелни, затоа што водат кон слабо разделување и нерепродуцибилни времиња на елуирање. Во дискусијата што следи, претпоставено е дека не постои појава на опашка или фронтална асиметрија или, пак, тие се многу мали.



Слика 13.4 Изглед на хроматографските пикови во зависност од вредноста на константа на дистрибуција

За да се објасни изгледот на пикот, потребно е најпрво да се разгледа однесувањето на поединечна молекула од растворената супстанција која што, за време на движењето, поминува низ илјадници трансфери помеѓу стационарната и мобилната фаза. Времето што го поминува молекулата во која било од фазите по секој трансфер е многу нерамномерно и зависи од случајното добивање топлинска енергија од околината за да се случи обратниот трансфер. Така, во некои случаи, времето поминато во определена фаза може да е краткотрајно, а во друг случај, тој период може да е релативно долг. Со оглед на фактот дека молекулата се

елуира само додека е во мобилната фаза, патувањето низ колоната е, исто така, нерамномерно. Поради променливоста на времето на задржување во мобилната фаза, просечната брзина со која поединечните молекули се движат варира во однос на брзината на мобилната фаза. Поединечни честички патуваат брзо, поради нивниот случаен престој во мобилната фаза за поголем дел од времето. Спротивно на ова, други честички може да заостануваат поради тоа што биле задржани од стационарната фаза подолго време од просечното време на задржување. Како последица на овие поединечни процеси настанува симетрична распределба на брзините на движење околу средната вредност, што го претставува просечното однесувањето на една молекула.

Ширината на лентата се зголемува со движењето низ колоната, затоа што има повеќе време за појава на ширењето. Така, ширината на лентата директно е зависна од престојот во колоната, а обратно пропорционална од брзината со која протекува мобилната фаза.

Методи за опишување на ефикасноста на колоната

Двата термина што се употребуваат како квантитативни мерки за ефикасноста на колоната се:

- 1) висина на под, H и
- 2) број на подови, N

Овие два параметри се поврзани со равенката:

$$N = \frac{L}{H} \quad (13.15)$$

каде што L е должина на колоната (обично во сантиметри). Ефикасноста на хроматографските колони се зголемува со зголемување на бројот на подовите и со намалување на висината на подовите. Огромните разлики во ефикасноста на колоната се забележуваат како резултат на разлики на типот на колоната и на мобилните и стационарните фази. Ефикасноста на колоните во однос на бројот на подовите може да варира од неколку илјади до неколку стотици илјади подови, а во однос на висината на подовите и од неколку десетини до илјадити дел од центиметар или дури и помала висина на под.

Генезата на поимите висина на под и број на теоретски подови потекнува од пионерските теоретски студии на Мартин и Синг (*Martin* и *Synge*), кои објаснувале дека хроматографската колона, слично на колоната за дестилација, е составена од бројни одвоени, но допирни тесни слоеви наречени теоретски подови. На ниво на секој под, се претпоставува дека растворената супстанција воспоставува рамнотежа помеѓу мобилната и стационарната фаза. Движењето на растворената супстанција по должина на колоната се објаснува како скалест трансфер на еквилибрираната мобилна фаза од еден под на друг.

Теоријата на подови го објаснува Гаусовиот облик на хроматографските пикови и нивната брзина на движење низ колоната, но не го зема предвид ширењето на пиковите на механистички начин. Затоа, оваа теорија е заменета со кинетичката теорија (теорија на брзина), со тоа што оригиналните термини за ефикасност се прифатени и во кинетичката теорија. Оваа номенклатура е веројатно несоодветна, затоа што го промовира митот дека колоната содржи подови каде што постојат услови на рамнотежа, а всушност, рамнотежата никогаш не може да се постигне бидејќи мобилната фаза е во постојано движење.

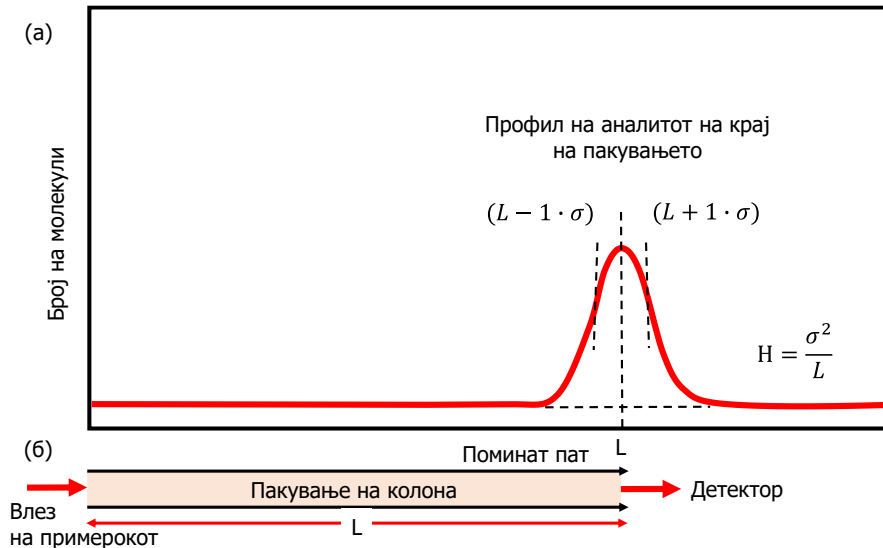
Дефиниција за висина на под

Бидејќи се претпоставува дека хроматографските ленти, главно, имаат облик на Гаусова крива, ефикасноста на колоната може соодветно да се дефинира

како варијанса (σ^2) на единица должина на колона. Така, висината на подот е дадена со равенката:

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (13.16)$$

Дефиницијата за висина на подови е илустрирана на Слика 13.5.



Слика 13.5 Дефиниција на висина на под

Во равенката (13.16) L има димензии изразени во сантиметри, а σ^2 сантиметри на квадрат, така што H претставува линеарно растојание во сантиметри. Всушност, висината на подот би можела да се претстави како должина на колоната (на крајот на колоната) што содржи дел од анализот што лежи помеѓу $L - \sigma$ и L . Бидејќи површината под Гаусовата крива ограничена со $\pm \sigma$ изнесува 68 % од вкупната површина, висината на подот, по дефиниција, содржи околу 34 % од анализот.

Експериментално определување на H и N

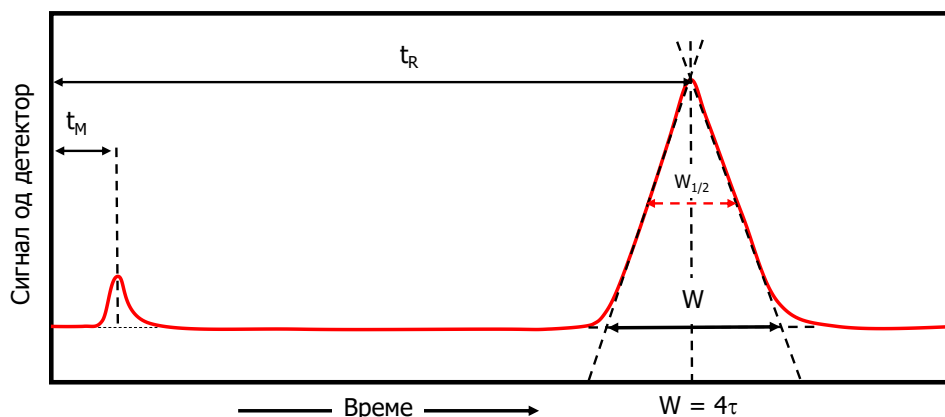
Поаѓајќи од фактот дека околу 96 % од површината под Гаусовата крива е вклучена во опсег од две стандардни девијации ($\pm 2\sigma$) околу нејзиниот максимум, отсечката на Слика 13.6 претставува околу ($\pm 2\sigma$) од максимумот, $W = 4 \cdot \sigma$, каде што W е ширината на пикот (растојание помеѓу пресекот на повлечените тангенти и базната линија). Ако формулата:

$$\sigma = \frac{L \cdot W}{4 \cdot t_R} \quad (13.18)$$

се замени во равенката (13.16), се добива:

$$H = \frac{L \cdot W^2}{16 \cdot t_R^2} \quad (13.19)$$

каде што W претставува ширина на пик во базниот дел, а t_R е времето за кое се елуира половина од зоната на супстанцијата (време на ретенција), прикажани на Слика 13.6.



Слика 13.6 Определување број на теоретски подови преку ширина на хроматографски пик, $W = 4 \cdot \sigma$

Со замена на H од равенката (13.19) во равенката (13.15) и преуредување на истата се добива:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \quad (13.20)$$

Така, N може да се пресмета со две временски мерки t_R и W , а за да се добие H потребно е да се знае и должината на колоната L .

Друг начин да се пресмета N , поверодостоен според многу аналитичари, е преку определување на ширината на пикот на половина од максималната висина ($W_{1/2}$). Бројот на подовите тогаш е даден со равенката:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)^2 \quad (13.21)$$

Бројот на подовите и висината на подовите широко се употребуваат во литературата и од страна на производителите на колони како мерки за ефикасноста на колоните. Но, за да имаат значење при споредба на две колони, неопходно е да бидат определени со примена на иста супстанција на двете колони.

Кинетички променливи што влијаат на ширењето на зоните

Ширењето на зоните е резултат на крајната брзина со која се случуваат неколку процеси на трансфер на маса за време на движење на растворената супстанција долж колоната. Некои од овие брзини се контролираат со прилагодување на експерименталните променливи (најважните променливи се дадени Табела 13.2), со што се подобрува разделувањето.

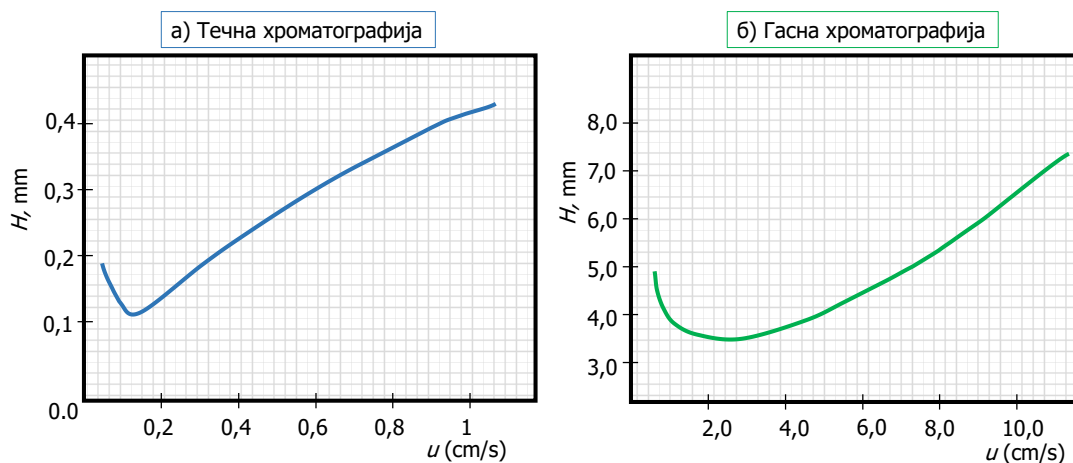
Табела 13.2 Променливи што имаат влијание врз ефикасноста на колоната

Променлива	Симбол	Вообичаени единици
Линеарна брзина на мобилната фаза	u	cm s^{-1}
Коефициент на дифузија во мобилната фаза*	D_M	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
Коефициент на дифузија во стационарната фаза*	D_S	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
Фактор на ретенција	k'	без единица
Дијаметар на пакуваните честички	d_p	cm
Дебелина на течната обвивка (филм) на стационарната фаза	d_f	cm

* се зголемува со зголемување на температурата и намалување на вискозноста

Влијание на брзината на протокот на мобилната фаза

Влијанието на кинетичките ефекти врз ефикасноста на колоната зависи од должината на времето за кое мобилната фаза е во контакт со стационарната фаза, што од своја страна зависи од брзината на протокот на мобилната фаза. За да се определи ефикасноста на колоната, најчесто се определува H , како функција од брзината на мобилната фаза u . Податоците од овие испитувања се прикажани на Слика 13.7. Двата графички прикази покажуваат најмала вредност за H (или најголема ефикасност) на мал проток на мобилната фаза. Минимумот за H за течната хроматографија (Слика 13.7 а) се јавува при протоци што се далеку помали од протоците на гасната хроматографија (Слика 13.7 б) и често се толку мали што е невозможно да се изведат под нормални експериментални услови. Кинетичката теорија на ширење на хроматографските зони точно го предвидува обликот на кривата добиена од зависноста на H од u , наречена Вандемтерова крива, според авторот на теоријата (*van Deemter*).



Слика 13.7 Влијание на брзината на протокот на мобилна фаза врз висината на подот за а) течна хроматографија и б) гасна хроматографија.

Како што е прикажано на Слика 13.7, протоците на мобилната фаза за течна хроматографија се значајно помали од оние што се употребуваат во гасната хроматографија. Ова значи дека разделувањето кај гасната хроматографија вообичаено завршува за многу пократко време отколку кај течната. Исто така, висината на подовите кај колоните за течна хроматографија се помали од висината на подовите кај колоните за гасна хроматографија. Поради ова, непрacticalно е да се употребуваат колони за течна хроматографија подолги од 25 до 50 cm (заради големата промена во притисокот), додека колоните за гасна хроматографија може да бидат со должина од 50 m и подолги. Оттука, бројот на теоретски подови, како и ефикасноста на колоните, се многу поголеми кај колоните за гасната хроматографија. Така, во споредба со течната, гасната хроматографија е помоќна техника за побрзи разделувања и разделувања со поголема ефикасност, и покрај тоа што тоа често не се постигнува истовремено.

Зависност помеѓу висината на подот и променливите вредности на колоната

Ниту една од досегашните математички равенки не е целосно ефикасна во објаснување на комплексните физички интеракции и ефекти што водат до ширење на зоните. Но, некои, и покрај тоа што не се совршени, успешно се употребуваат за подобрување на перформансите на колоната. Такви се математичките апроксимации на однесувањето на хроматографските колони, направени во 1950-

тите години, со студиите на холандскиот хемиски инженер, Ван Демтер (*van Deemter*). Вандемтеровата равенка може да се претстави во следната форма:

$$H = A + B/u + C \cdot u = A + B/u + (C_S + C_M) \cdot u \quad (13.22)$$

каде што H претставува висина на под во сантиметри, u е линеарна брзина на мобилната фаза изразена во центиметри на секунда, а вредностите A , B и C се коефициенти поврзани со феномените на *повеќекратни патеки на проток*, *лонгитудинална дифузија* и *трансфер на маса помеѓу фазите*, соодветно. Како што е прикажано, коефициентот C може да се раздели на два коефициенти, еден поврзан со стационарната фаза C_S , а вториот со мобилна фаза C_M .

Новите теоретски студии детално ја разработуваат оваа равенка, но експериментално е покажано дека основата на Вандемтеровата равенка е задоволителна за да се разбере ефикасноста на колоната.

Од Вандемтеровата равенка може да се забележи дека содржи компоненти што се право или обратно пропорционални, а некои и независни од брзината на мобилната фаза. Променливите што влијаат на компонентите од равенката, се дадени во Табела 13.3.

Табела 13.3 Кинетички процеси што влијаат на ширењето на пиковите

Процес	Компонента од Вандемтеровата равенка	Зависност помеѓу карактеристиките на колоната* и аналитот
Повеќекратни патеки на проток	A	$A = 2 \cdot \lambda \cdot d_p$
Лонгитудинална дифузија	B/u	$\frac{B}{u} = \frac{2 \cdot \gamma \cdot D_M}{u}$
Трансфер на маса до и од течната стационарна фаза	$C_S \cdot u$	$C_S \cdot u = \frac{f_S \cdot (k') \cdot d_f^2}{D_S} \cdot u$
Трансфер на маса во мобилната фаза	$C_M \cdot u$	$C_M \cdot u = \frac{f_M \cdot (k') \cdot d_p^2}{D_M} \cdot u$

* $u, D_S, D_M, d_f, d_p, k'$ се дефинирани во Табела 13.2.

f_x е функција од x ; λ, γ се константи коишто зависат од квалитет на пакувањето.

B е коефициент на лонгитудинална дифузија.

C_S и C_M се коефициенти на масен трансфер во стационарна и мобилна фаза, соодветно.

Повеќекратни патеки (A). Зоните се шират делумно поради повеќекратните патишта што молекулата (или јонот) може да ги помине низ пакуваната колона. Како што е прикажано на Слика 13.8, должината на овие патишта може значајно да се разликува, поради што и времето што го поминуваат молекулите од ист вид е различно. Растворените молекули доаѓаат до крајот на колоната во определен временски интервал, што води до широка зона. Овој ефект, што понекогаш се нарекува вртложна дифузија, е директно пропорционален со дијаметарот на честичките од кои е направено пакувањето на колоната.

Коефициенти на трансфер на маса (C_S и C_M). Потребата за двата коефициенти на трансфер на маса C_S и C_M во равенката (13.22) се јавува бидејќи рамнотежата помеѓу мобилната и стационарната фаза се воспоставува многу бавно, поради што може да се каже дека хроматографската колона работи во услови на нерамнотежа. Како резултат на тоа, молекулите на анализот од предниот дел на зоната се поместуваат напред, пред да имаат време да воспостават рамнотежа со стационарната фаза и да бидат задржани. Слично, рамнотежата не се воспоставува и на опашката од зоната и додека мобилната фаза се движи брзо напред, молекулите заостануваат во стационарната фаза.

Ширењето на зоните поради ефектот на трансфер на маса се јавува бидејќи многуте струи при протокот на мобилната фаза во колоната и слојот на стационарната фаза имаат ограничени ширини. Како резултат на тоа, потребно е време за да можат растворените молекули да дифундираат од внатрешноста на фазите до површината каде што се случува трансферот. Ова мртво време резултира со појава на нерамнотежни услови долж колоната. Ако брзините на трансферите на маса помеѓу двете фази се бесконечно големи, ширењето од овој тип нема да се случува.

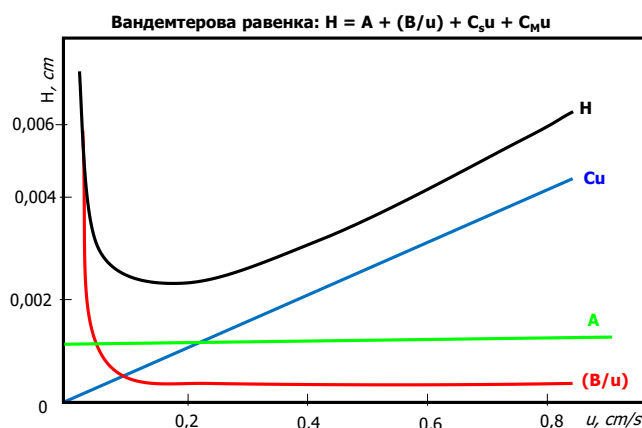
Степенот на ширење што потекнува и од лонгитудиналната дифузија и од трансферите на маса зависи од брзината на дифузија на молекулите на анализот, но правецот на дифузијата во двата случаја е различен. Лонгитудиналното ширење потекнува од тенденцијата на молекулите да се движат во правец паралелен на протокот на мобилната фаза, додека ширењето на зоната како резултат на трансферите на маса се јавува поради дифузија чија насока е нормална на правецот на протокот на мобилната фаза. Како резултат на тоа, степенот на лонгитудиналната дифузија е обратно пропорционален со брзината на протокот. Спротивно на тоа, при ширењето поради трансфер на маса, колку што е побрзо движењето на мобилната фаза, помало е времето за постигнување на рамнотежа и влијанието на трансферот на маса врз висина на подовите е право пропорционален со брзината u на движење на мобилната фаза (равенка 13.22).

Трансфер на маса до и од стационарна фаза ($C_S \cdot u$). Третата равенка во Табела 13.3 покажува дека кога стационарната фаза е неподвижна течност, коефициентот на трансфер на маса е пропорционален со комплексната функција $f_S \cdot (k')$ на факторот на ретенција k' , како и со квадратен корен од дебелината на филмот нанесен на честичките-носачи од кои е изработена колоната d_f^2 , а е обратно пропорционален со коефициентот на дифузија D_S на растворената супстанција во филмот. Ефектите на оваа зависност може да се разберат ако се земе предвид дека овие фактори влијаат на просечната фреквенција со која молекулите на анализот доаѓаат до површината каде што се случуваат трансферите до мобилната фаза. На пример, кај дебелиите филмови, молекулите треба подолго да патуваат за да стигнат до површината; молекулите со помали коефициенти на дифузија патуваат побавно. Резултат на овие два фактора е помала брзина на трансфер на масата и зголемена висина на подовите.

Трансфер на маса во мобилна фаза ($C_M \cdot u$). Четвртата равенка во Табела 13.3 покажува дека коефициентот на трансфер на маса во мобилна фаза е пропорционален со комплексната функција $f \cdot (k')$ на факторот на ретенција k' , како и со квадратен корен од дијаметарот на честичките од коишто е изработена колоната d_p^2 , а обратно пропорционален со дифузискиот коефициент D_M во мобилната фаза.

Влијание на брзината на протокот на мобилната фаза врз висината на подовите

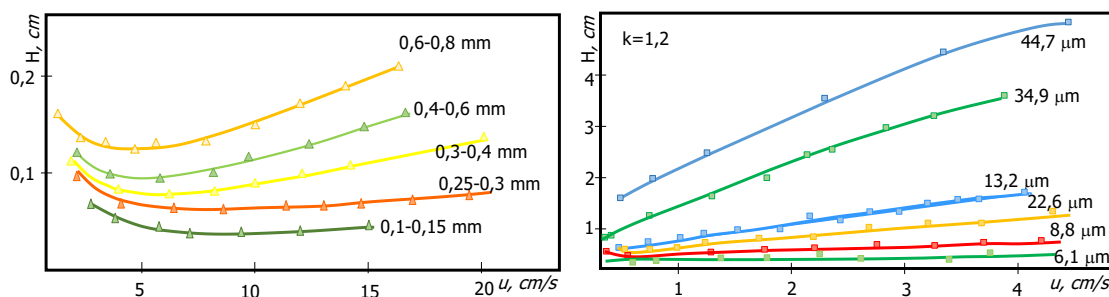
Горната крива прикажана на Слика 13.9 со црна боја е добиена од експериментални податоци, а линијата со зелена боја е добиена со нумеричко прилагодување на Вандемтеровата равенка со податоците. Кривите на сина и црвена боја, го прикажуваат влијанието на повеќекратните патишта, лонгитудиналната дифузија и комбинираниите ефекти на трансфер на маса. Согласно Вандемтеровата равенка, горната крива претставува резултат на сумирање на овие различни ефекти. Важна карактеристика на графичкиот приказ е дека секој хроматографски систем ќе има минимална вредност за H како функција од u . Оваа вредност ги дефинира условите на протокот што ќе обезбеди најдобро можно разделување, односно оптимална брзина на проток на мобилната фаза се јавува каде што висината на подовите е минимална и ефикасноста на разделувањето максимална.



Слика 13.9 Вандемтерова крива за пакувана колона за течна хроматографија. Елуираниот аналит е бензил ацетат во раствор на *n*-хексан што содржи неколку проценти етил ацетат. Точките од горната крива се експериментални. Влијанието на разните компоненти со прикажани со долните криви: A , повеќекратните патишта; B/u , лонгитудиналната дифузија и $C \cdot u$ трансфер на маса во двете фази

Преглед на методите за намалување на ширењето на зоните.

Два важни променливи параметри што може да се контролираат и што влијаат на ефикасноста на колоната се: дијаметарот на честичките од коишто е изработено пакувањето на колоната и дијаметарот на колоната. Влијанието на дијаметарот на честичките е претставено со податоците прикажани на Слика 13.10. За да се искористи предноста на ефектот од дијаметарот на колоната, повеќе се произведуваат колони со помал дијаметар.



Слика 13.10 Влијание на големината на честичките врз висината на подот кај пакувана колона за (а) гасна хроматографија и (б) течна хроматографија. Броевите од десната страна се дијаметрите на честичките.

За гасна мобилна фаза, брзината на лонгитудиналната дифузија може значително да се намали со намалување на температурата, а со тоа и коефициентот на дифузија, D_M . Како резултат на тоа, доаѓа до значително намалување на висината на подовите на ниски температури. Ова влијание вообичаено не се забележува кај течната хроматографија бидејќи дифузијата е доволно бавна, така што лонгитудиналната дифузија има мал ефект на висината на подовите. Кај течната хроматографија, дебелината на слојот на адсорбираната течност треба да се намали, бидејќи C_S е пропорционален со квадратниот корен на d_f (трета равенка во Табела 13.3).

Оптимизирање на перформансите на колоната

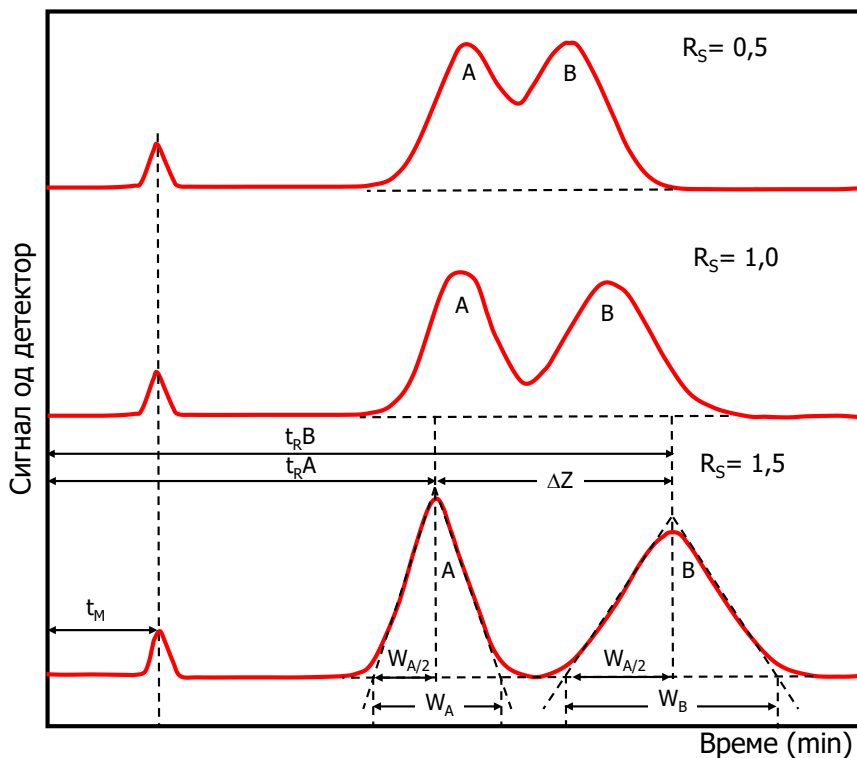
Оптимизирањето на хроматографското разделување се врши со промена на експерименталните услови, сè додека компонентите од смесата не се комплетно разделени, за најкратко можно време. Експериментите за оптимизација се насочени или кон намалување на ширењето на зоните или кон промена на релативната брзина на патување на компонентите. Ширењето на зоната се зголемува со кинетичките параметри што ја зголемуваат висината на теоретските подови на колоната. Брзината на патувањето, пак, може да се менува со промена на параметрите што влијаат на факторите на ретенција и селективност.

Резолуција на колоната

Резолуцијата, R_S , на колоната е квантитативна мерка за можност на колоната да раздели два анализа. На Слика 13.11 се прикажани хроматограмите на компонентите А и В, добиени на три колони со различни резолуции. Резолуцијата на колоната се дефинира како:

$$R_S = \frac{\Delta Z}{W_A/2 + W_B/2} = \frac{2 \cdot \Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2 \cdot [(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \quad (13.23)$$

Сите поими од равенката се прикажани на Слика 13.11.



Слика 13.11 Разделување, во услови на три различни резолуции

Од сликата јасно се гледа дека при резолуција од 1,5 е добиено комплетно разделување на двете компоненти, додека тоа не е случај при резолуција од 0,75. При резолуција од 1,0 зоната А содржи околу 4% од В и зоната В содржи слична површина од А. При резолуција од 1,5, препоклопувањето на зоните е околу 0,3%. Резолуцијата на определена стационарна фаза може да се подобри со продолжување на колоната, со што се зголемува бројот на подовите. Недостаток од употребата на колона со поголема должина, односно поголем број подови, е зголемување на времето потребно за разделување.

Влијание на факторот на ретенција и селективноста врз резолуцијата

Влијанието на факторите на ретенција k'_A и k'_B на две растворени супстанции, факторот на селективност α и бројот на подовите N , врз резолуцијата на колоната R_S може да се претстави со математички модел на зависност. За таа цел, се разгледуваат само две компоненти А и В, што имаат многу блиски времиња на ретенција, при што може да се претпостави дека $W_A = W_B = W_S$. Равенката (13.23) тогаш добива форма:

$$R_S = \frac{[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W} \quad (13.24)$$

Ако W се изрази преку $(t_R)_B$ и N од равенката (13.20), а потоа се замени во равенката (13.24) се добива:

$$R_S = \frac{[(t_R)_B - (t_R)_A]}{(t_R)_B} \cdot \frac{\sqrt{N}}{4} \quad (13.25)$$

Со замена на $(t_R)_A$ и $(t_R)_B$ изразени од равенката (13.11), во равенката (13.25) и преуредување, R_S може да се изрази преку факторите на ретенција (k') за А и В:

$$R_S = \frac{k'_B - k'_A}{1 + k'_B} \cdot \frac{\sqrt{N}}{4} \quad (13.26)$$

Ако k'_A се изрази од од равенката (13.13) и се замени во равенката (13.26), со преуредување се добива:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \cdot \left(\frac{k'_B}{1 + k'_B}\right) \quad (13.27)$$

Бројот на теоретските подови потребни за добивање на бараната резолуција, може да се пресмета со преуредување на равенката (13.27):

$$N = 16 \cdot R_S^2 \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1}\right)^2 \cdot \left(\frac{1 + k'_B}{k'_B}\right)^2 \quad (13.28)$$

Поедноставени форми на равенките (13.27) и (13.28) може да се применат ако се работи за пар на растворени супстанции чии константи на дистрибуција се многу слични и нивното разделување е отежнато. Така, кога $K_A \approx K_B$, од равенката (13.8) следува дека $k'_A = k'_B = k'$, а од равенката (13.13) дека $\alpha \rightarrow 1$. Со овие апроксимации, равенките (13.27) и (13.28) се поедноставуваат до:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot (\alpha - 1) \cdot \left(\frac{k'}{1 + k'}\right) \quad (13.29)$$

$$N = 16 \cdot R_S^2 \cdot \left(\frac{1}{\alpha - 1}\right)^2 \cdot \left(\frac{1 + k'}{k'}\right)^2 \quad (13.30)$$

каде што k' е средна вредност од k'_A и k'_B .

Влијание на резолуцијата врз времето на ретенција

Во хроматографијата особено е значајно да се изведе и равенка за определување на карактеристиките на колоната, односно за времето потребно целосно да се разделат две компоненти А и В. Исто така, во хроматографијата се

бара најголема можна резолуција, за најкратко можно време. За жал, овие две барања не може секогаш да се исполнат под исти услови, поради што треба да постои компромис.

Времето што е потребно да се заврши целосно разделување е определено со брзината \bar{v}_B на молекулата што се движи побавно, како што е прикажано со равенката (13.2). Оттука:

$$\bar{v}_B = \frac{L}{(t_R)_B} \quad (13.31)$$

Со комбинирање на овој израз со равенките (13.9) и (13.15) и по преуредување, се добива:

$$(t_R)_B = \frac{N \cdot H \cdot (1+k'_B)}{u} \quad (13.32)$$

каде што $(t_R)_B$ е времето потребно пикот на компонентата В да дојде до крајот на колоната, кога брзината на мобилната фаза е u . Кога оваа равенка ќе се искombинира со равенката (13.28) и ќе се преуреди, се добива:

$$(t_R)_B = \frac{16 \cdot R_S^2 \cdot H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right)^2 \cdot \frac{(1+k'_B)^3}{(k'_B)^2} \quad (13.33)$$

Променливи што влијаат врз перформансите на колоната

Равенките (13.27) и (13.33) се значајни бидејќи служат како водич за избор на услови што ќе му овозможат на аналитичарот да постигне, понекогаш недостижна цел, целосно разделување за најкратко време. Овие равенки се составени од три дела. Првиот дел, што е поврзан со кинетичките ефекти што придонесуваат за ширење на зоните, го содржи параметарот \sqrt{N} или H/u . Вториот и третиот дел се поврзани со термодинамиката на компонентите што треба да се разделат, односно со релативната големина на нивните константи на дистрибуција и волумените на мобилната и на стационарната фаза. Вториот дел од равенките (13.27) и (13.33), го содржи параметарот за селективност α , што зависи само од карактеристиките на двете растворени супстанции. Третиот дел го содржи параметарот k'_B , што зависи од карактеристиките и на растворената компонента и на колоната.

При воспоставување на оптимални услови за добивање на потребното разделување, треба да се знае дека основните параметри α , k' и N (или H) може да се прилагодат повеќе или помалку, независно еден од друг. Така, α и k' може да се менуваат најлесно преку промена на температурата или составот на мобилната фаза, а потешко со употреба на различни пакувања на колоната. Исто така, може да се менува и N преку промена на должината на колоната, да се менува H преку промена на протокот на мобилната фаза, големината на честичките на пакувањето, вискозноста на мобилната фаза (менувајќи ги и D_M или D_m), како и дебелината на филмот на адсорбираната течност што ја претставува стационарната фаза (Табела 13.3).

Промена на бројот на подови, N

Подобрување на резолуцијата се постигнува со зголемување на бројот на подовите на колоната (равенка 13.27).

Зголемувањето на N може да се изведе или преку намалување на висината на подовите или преку зголемување на должината на колоната, што често е непрактично бидејќи се продолжува времето потребно за разделување на компонентите (изведување на анализата).

Промена на висината на подот, H

Значително подобрување на резолуцијата, а без продолжување на времетраењето на анализата, се постигнува со намалувањето на висината на подовите. Во Табела 13.3 се дадени параметрите што може да се менуваат за да се постигне оваа цел. Со намалување на големината на честичките од пакувањето на колоната, значително се подобрува H . Кај течната мобилна фаза, каде што вредноста за B/u вообичаено е незначителна, намалувањето на висината на подовите може да се постигне со намалување на вискозноста на растворите, при што се зголемува коефициентот на дифузија во мобилната фаза.

Промена на факторот на ретенција

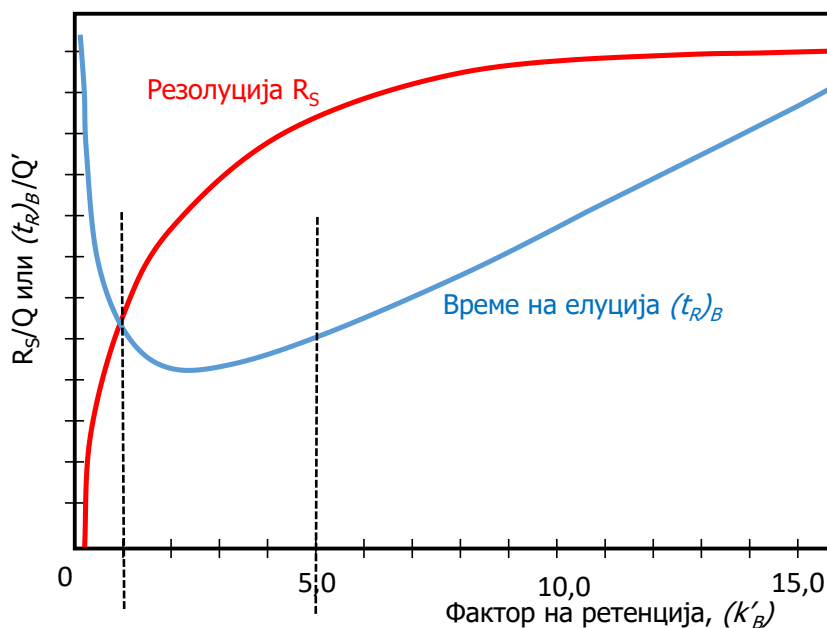
Разделувањето често може значително да се подобри преку промена на факторот на ретенција k'_B . Со зголемување на k'_B , се зголемува и резолуцијата (но за сметка на подолго време на елуирање). За да се определи оптималното подрачје за вредностите на k'_B , потребно е равенката (13.27) да се напише во следната форма:

$$R_S = \frac{Q \cdot k'_B}{1+k'_B} \left(\frac{k'_B}{1+k'_B} \right) \quad (13.34)$$

а равенката (13.33) како:

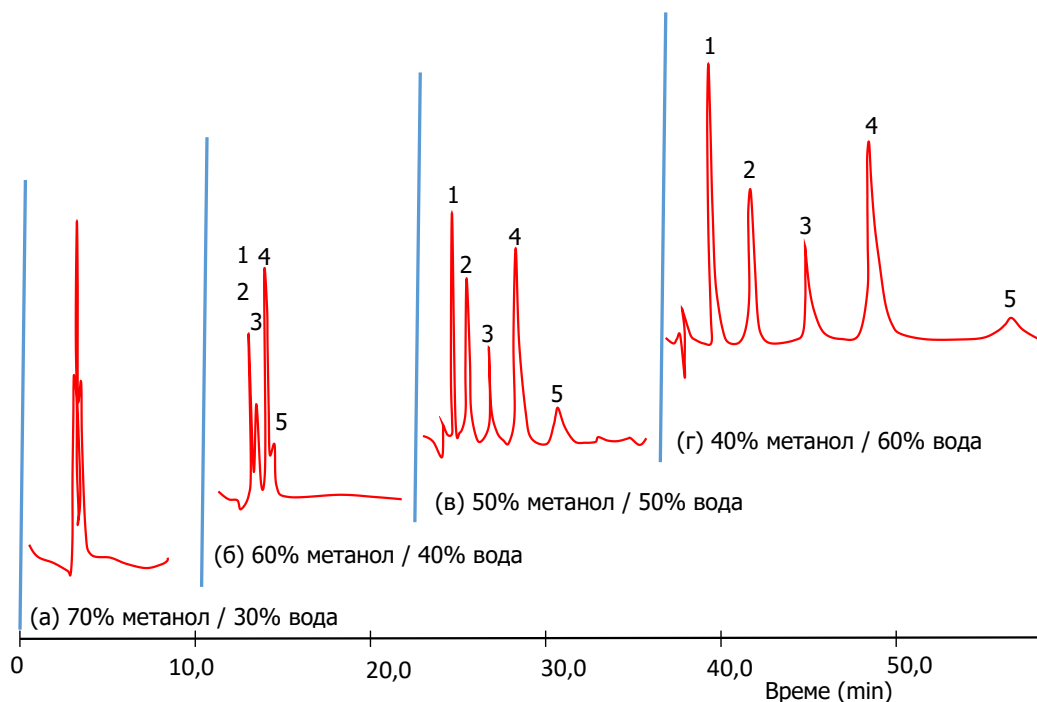
$$(t_R)_B = Q' \cdot \frac{(1+k'_B)^3}{(k'_B)^2} \quad (13.35)$$

каде што Q и Q' го содржат остатокот од двете равенки. На Слика 13.12 претставен е графички приказ на R_S/Q и $(t_R)_B/Q'$ како функција од k'_B , со претпоставка дека Q и Q' остануваат приближно константни вредности. Од сликата се гледа дека, вредностите за k'_B околу 10 треба да се избегнуваат, бидејќи не овозможуваат значително зголемување на резолуцијата, но значително го зголемуваат времето потребно да се изврши разделувањето. Најмалото време на елуирање одговара вредност за k'_B еднаква на 2. Земајќи ги предвид и резолуцијата и потрошеното време, оптималната вредност за k'_B , често се наоѓа во подрачјето помеѓу 1 и 5.



Слика 13.12 Ефект на факторот на ретенција k'_B врз резолуцијата R_S и времето на елуирање $(t_R)_B$. Се претпоставува дека Q и Q' остануваат константни при промени на k'_B

Обично, најлесниот начин за подобрување на резолуцијата е оптимизирањето на k' . За гасна мобилна фаза, k' може да се подобри со зголемување на температурата. За течна мобилна фаза, промената на составот на растворувачите на мобилната фаза овозможува промена на k' , со цел да се добие подобро разделување. На Слика 13.13 е прикажано постигнувањето на голем ефект во разделувањето на компонентите со релативно едноставна промена на растворувачите во составот на мобилната фаза. Имено, со умерена промена на односот метанол/вода се добиваат хроматограми со добро раздвоени пикови за секоја од компонентите (в и г), при што хроматограмот (г) е најзадоволителен, бидејќи покажува соодветна резолуција за најкратко време.



Слика 13.13 Промена на растворувачите во составот на мобилната фаза (поларност) со цел оптимизација на k' . Аналити: (1) 9,10-антрахинон; (2) 2-метил-9,10-антрахинон; (3) 2-етил-9,10-антрахинон; (4) 1,4-диметил-9,10-антрахинон; (5) 2-t-бутил-9,10-антрахинон

Промена на факторот на селективност

Кога вредноста за α се приближува кон единица, со оптимизирање на k' и зголемување на N не се добива задоволително разделување на компонентите, за разумно време. Во тој случај, мора да се зголеми α , а k' да се задржи во оптималното подрачје од 1 до 10. За таа цел можни се неколку опции:

- (1) промена на составот на мобилна фаза, вклучувајќи и промена на pH;
- (2) промена на температурата на колоната;
- (3) промена на составот на стационарна фаза;
- (4) употреба на посебни хемиски ефекти.

Пример за употреба на промена на составот на мобилна фаза претставува разделувањето на анизол и бензен. Со употреба на мобилна фаза 50% смеса на метанол и вода, k' за двете компоненти изнесува 4,5 и 4,7, соодветно, додека вредноста за α е 1,04. Со замена на мобилната фаза со водена мобилна фаза што содржи 37% тетраhydroфуран се добиваат вредности за k' еднакви на 3,9 и 4,7, а за α , 1,20. Препоклопувањето на пиковите е значително во првиот систем, а занемарливо во вториот.

За разделување на јонизирани киселини и бази, промената на рН на мобилната фаза често дозволува промени на вредноста на α , без промена на вредноста на k' , што резултира со подобрување на разделувањето.

Помалку погоден, но често многу ефикасен метод за подобрување на вредноста на α , а одржување на k' вредностите во оптималното подрачје, претставува промената на составот на стационарната фаза.

Зголемувањето на температурата обично резултира со зголемување на k' , но има мал ефект врз вредностите на α во течно-течната и течно-цврстата хроматографија. Спротивно на тоа, кај јоно-изменувачката хроматографија, промената на температурата може да има голем ефект.

Последниот метод за подобрување на резолуцијата е вградување определени компоненти во стационарната фаза, што може да се врзуваат или на друг начин да реагираат со една или со повеќе компоненти од примерокот. Добро познат пример за примена на оваа можност е импегнирање на атсорбентот со соли на сребро, со цел да се подобри разделувањето на олефините како резултат на формирање комплекси помеѓу јоните на сребро и незаситените органски компоненти.

Општ проблем со елуирањето во хроматографијата

На Слика 13.14 се прикажани хипотетички хроматограми на шест-компонентна смеса составена од три пара компоненти со доста различни константи на дистрибуција и фактори на ретенција.

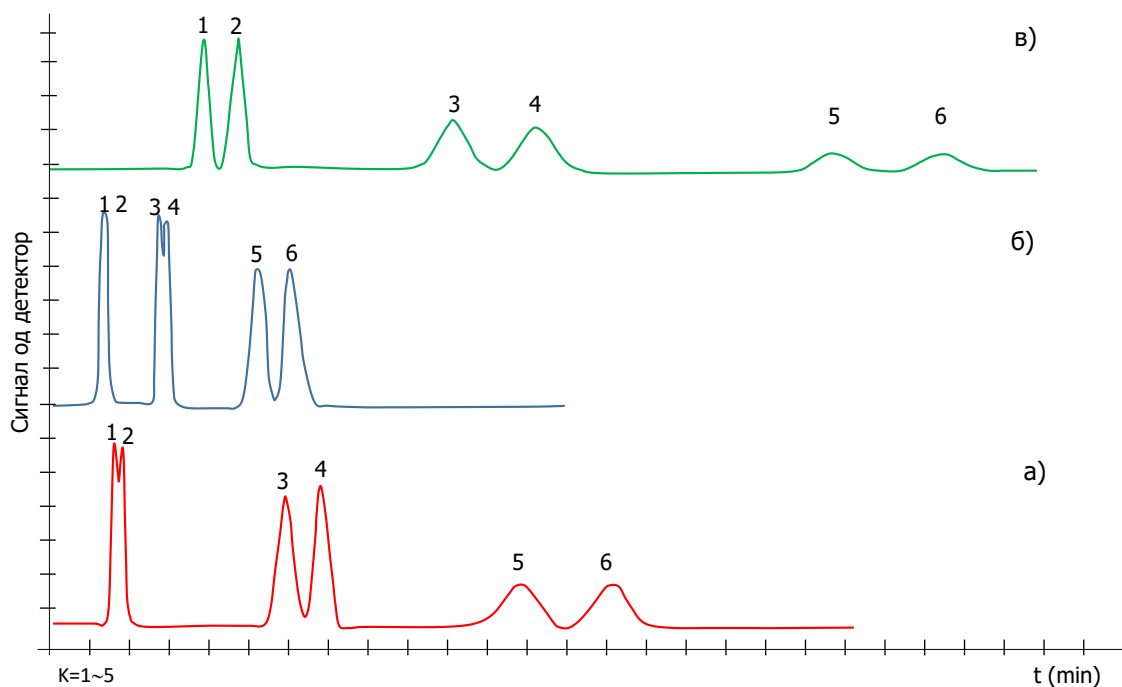
На хроматограмот (а), условите се прилагодени така што факторите на ретенција на компонентите 1 и 2 (k'_1 и k'_2) се наоѓаат во оптималното подрачје од 2 до 5. Соодветните фактори за другите компоненти се далеку од оптимални. Така, пиковите 5 и 6 се елуираат за невообичаено долго време. Овие пикови се толку широки, што тешко може со сигурност да се идентификуваат.

На хроматограмот (б), менувањето на условите за да се оптимизира разделувањето на компонентите 5 и 6, ги групира пиковите на првите 4 компоненти на место каде што резолуцијата помеѓу нив е незадоволителна. Со промена на условите е оптимизирано разделувањето на пиковите 5 и 6, но првите четири компоненти се збиени во дел каде што резолуцијата помеѓу нив е незадоволителна. Во овој случај, вкупното време на елуирање е идеално.

На третиот хроматограм (в), условите овозможуваат оптимални вредности за k' за компонентите 3 и 4. Но, повторно не е задоволително разделувањето на другите два пара.

Феноменот прикажан на Слика 13.14 се јавува често и е наречен општ проблем на елуирањето. Најчесто решение на овој проблем е промена на условите од коишто зависи вредноста на k' , додека се одвива разделувањето. Овие промени може да се изведуваат во чекори или континуирано. Така, за смесата прикажана на хроматограмите на Слика 13.14 условите на почетокот може да се оние што резултираат со хроматограмот (а). Веднаш по елуирањето на компонентите 1 и 2, условите се менуваат на начин што овозможува оптимално разделување на компонентите 3 и 4 (хроматограм (в)). Понатаму елуирањето продолжува под услови што ги дава хроматограмот (б). Често, овој пристап води кон задоволително разделување на сите компоненти во смесата за најкратко време.

Кај течната хроматографија, промената на вредностите на k' се постигнува со промена на составот на мобилната фаза за време на елуирањето (градиентно елуирање или програмирање на растворувачите). Кај гасната хроматографија оптималните услови за разделување се постигнуваат со зголемување на температурата со тек на време (температурно програмирање).



Слика 13.14 Приказ на општиот проблем на елуирањето во хроматографијата

Збир на важни равенки што се применуваат во хроматографијата

Во Табелите 13.4 и 13.5 дадени се најважните дефиниции и равенки што се користат во хроматографските техники.

Табела 13.4 Важни хроматографски, експериментални мерки и равенки

Име	Симбол на експериментална мерка	Определени преку
Време на патување на незадржани компоненти	t_M	Хроматограм (Слика 13.7.)
Време на ретенција за компонентите А и В	$(t_R)_A, (t_R)_B$	Хроматограм (Слика 13.7.)
Прилагодено време на ретенција за компонентата А	$(t'_R)_A$	$(t'_R)_A = (t_R)_A - t_M$
Ширина на пик за компонентите А и В	W_A, W_B	Хроматограм (Слика 13.7.)
Должина на колона	L	Директно мерење
Проток (брзина на движење на мобилна фаза)	F	Директно мерење
Волумен на стационарна фаза	V_S	Податоци од подготовката на пакувањето на колоната
Концентрација на аналит во мобилна и стационарна фаза	C_M, C_S	Податоци од анализата и подготовка на колоната

Табела 13.5 Важни изведени мерки и зависимости

Име	Изведена мерка	Зависност со други мерки
Линеарна брзина на мобилна фаза	$u = \frac{L}{t_M}$	
Волумен на мобилна фаза	$V_M = t_M \cdot F$	
Фактор на ретенција	$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$	$k' = \frac{K \cdot V_S}{V_M}$
Константа на дистрибуција	$K_c = \frac{k' V_M}{V_S}$	$K_c = \frac{c_S}{c_M}$
Фактор на селективност	$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$	$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{K_B}{K_A}$
Резолуција	$R_S = \frac{2 \cdot [(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$	$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \cdot \left(\frac{k'_B}{1 + k'_B}\right)$
Број на подови	$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W}\right)^2$	$N = 16 \cdot R_S^2 \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1}\right)^2 \cdot \left(\frac{1 + k'_B}{k'_B}\right)^2$
Висина на под	$N = \frac{L}{H}$	
Време на ретенција	$(t_R)_B = \frac{16 \cdot R_S^2 \cdot H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1}\right)^2 \cdot \frac{(1 + k'_B)^3}{(k'_B)^2}$	

Примена на хроматографијата

Хроматографијата е најмоќна техника за разделување на смеси составени од хемиски компоненти со слична структура. Дополнително, таа се применува за идентификација и квантитативно определување на разделените компоненти.

Квалитативна анализа - идентификација на аналити

Од хроматограмот се добива само еден податок што служи како информација за идентификација на аналитот, а тоа е времето на ретенција, односно неговата положба на стационарната фаза по определено време на елуирање. Дополнителни информации од хроматограмот би можеле да се добијат со употреба на различни мобилни и стационарни фази, како и со примена на различни температури на коишто се врши елуирањето. Но, информациите за идентификација на аналитот добиени од хроматографијата се мали, во споредба со информациите што би можеле да се добијат од IR, NMR или MS спектарот. Од друга страна, хроматографијата има многу важна улога како техника што претходи на квалитативната спектроскопска анализа.

Исто така, хроматографијата е многу често употребувана техника за утврдување на присуство или отсуство на компоненти во смеса, што содржи ограничен број компоненти чиј идентитет е познат. Притоа е важно да се напомене дека од хроматограмот не може со сигурност да се потврди идентитетот на компоненти што се наоѓаат во смесата, но со сигурност може да се потврди отсуство на определени компоненти. Така, ако на хроматограмот од примерокот нема пик со исто време на ретенција како во хроматограмот од стандардот, добиен под исти хроматографски услови, може да се претпостави дека компонентата од интерес не е присутна во примерокот, или ја има во концентрација под лимитот на детекција.

Времето на ретенција зависи од физичко-хемиските својства на компонентата, од составот на стационарната и на мобилната фаза, од протокот на мобилната фаза и од димензиите на колоната. Вообичаено, не е практично да се предвиди времето на ретенција од овие променливи, ниту да се идентификува компонентата врз основа на претходно добиени податоци за ретенција на таа компонента. Во подрачјето на k' од 2 до 10, каде што резолуцијата е оптимална и времето на ретенција не е предолго, може да се елуираат најмногу стотина компоненти на еден хроматограм. Но постојат илјадници компоненти што би можеле да се елуираат во ова подрачје, што укажува на фактот дека е возможно да се појават коелуенти и времето на ретенција да не е единствено за една компонента.

При примена на хроматографијата за квалитативна анализа често се прашуваме колку блиску треба да биде времето на ретенција на аналитот од интерес со времето на ретенција на стандардната супстанција, за да можеме со сигурност да кажеме дека станува збор за иста компонента. Мала промена во времето на ретенција може да биде предизвикана од промена на протокот, од температурата или од составот на мобилната фаза помеѓу снимањата на хроматограмите. Еден од начините да се намали оваа неодреденост е да се снимат хроматограм на вештачка смеса подготвена од стандардна супстанција и примерокот (непознатата смеса). Втор начин, што воедно ги намалува и промените што потекнуваат од инструментот, најчесто при инјектирање на примерокот, е да се употреби методот на внатрешен стандард. Внатрешниот стандард има време на ретенција различно од било кој аналит или онечистување што би можеле да коелуираат блиску и да предизвикаат забуна. Од односот на времињата на ретенција на внатрешниот стандард и на стандардната супстанција се пресметува

релативното време на ретенција (*relative retention time - RRT*). Релативното време на ретенција е репродуцибилно и споредливо помеѓу иста стационарна фаза, мобилна фаза и услови на хроматографирање, дури и при мали промени во димензијата на колоните. Употребата на релативното време на ретенција има предност во однос на употребата на вештачки смеси за потврда на идентитетот, особено кога во хроматограмот се јавуваат многу пикови.

Квантитативна анализа

Брзиот развој на хроматографијата во изминатиов половина век се должи на нејзината брзина, едноставност, релативно ниската цена и широката применливост како моќна техника за разделување и за квантитативно определување на разделените компоненти.

Квантитативната анализа може да се изврши на повеќе начини. Кај планарната хроматографија, како аналитички параметар се користи површината под пиковите на разделените компоненти. Квантитативната хроматографија на колона се заснова на споредување на висината или на површината на пикот на анализот со онаа добиена од стандардната супстанција. Ако сите параметри на инјектирање, разделување и детектирање се контролираат соодветно за време на анализите, одговорот (изразен преку висина или површина на пик) се менува линеарно со промена на концентрацијата, а прецизноста на добиениот резултат е помала од 1%.

Квантитативно определување преку висина на пикот

Висината на хроматографскиот пик се добива со мерење на растојанието помеѓу базната линија на пикот и врвот на пикот, под прав агол. Ова мерење би можело да се изведе со голема прецизност. Но важно е да се напомене дека висината на пикот е обратно пропорционално зависна од ширината на пикот. Така, точни резултати се добиваат само ако промените на хроматографските услови не ја менуваат ширината на пикот за време на снимањето на хроматограмите на примерокот и стандардите, во периодот потребен да се добијат хроматограми од стандардот и примерокот. Променливите параметри што мора да се контролираат се: температура на колоната, проток на елуентот, големина на инјектиран примерок. Дополнително, мора да се внимава колоната да не се преоптовари. Ефектот од големина на инјектиран примерок е особено критичен за пиковите што се елуираат први.

Квантитативно определување преку површина на пикот

Површините на пиковите се независни од ефектот на ширење предизвикани од претходно споменатите променливи. Оттука, површината на пикот е многу посигурен аналитички параметар за квантитативни пресметки отколку висината. Од друга страна, висините се мерат многу полесно, а кај тесни пикови и точно се определуваат.

Современите хроматографски инструменти се опремени со дигитални електронски интегратори што овозможуваат прецизна процена на површините. Големината на аналогниот сигнал постојано се мери и се дигитализира, а збирот на овие дигитални одмерувања за време на елуирањето на пикот, ја дава вредноста на површината на пикот. Притоа операторот на апаратурата мора да ги зададе параметрите со коишто се дефинира интеграцијата на пикот.

Ако ваква опрема не е достапна, површината може да се определи и рачно. Наједноставен метод, применлив за симетрични пикови со разумни ширини, е да се помножи висината на пикот со ширината на полувисината на пикот. Прецизноста

на добиените резултати со рачно интегрирање, вообичаено е на ниво од 2 до 5%, за разлика од дигиталните интегратори што се многу попрецизни.

Метод на баждарен дијаграм

Методот на баждарен дијаграм за квантитативна хроматографска анализа вклучува подготовка на серија на стандардни раствори во концентрациско подрачје концентрацијата на непознатата компонента. Баждарниот дијаграм се конструира како функција на висините или на површината на пиковите на стандардните раствори од концентрацијата. Графичкиот приказ дава права линија што поминува низ координатниот почеток. Квантитативното определување на примерокот се врши врз основа на баждарниот дијаграм. За поголема точност, потребно е често подготвување на баждарниот дијаграм.

Најчест извор на грешка на овој метод е мерната неодреденост на волуменот на инјектирање. Оваа појава е особено честа кај гасната хроматографија каде што примерокот мора да се внесе во загреан дел при инјектирањето, при што е можно да дојде до испарување од врвот на иглата и до големи промени на инјектираниот волумен.

Метод на внатрешен стандард

Најпрецизни квантитативни пресметки се добиваат при употреба на методот на внатрешен стандард, бидејќи на овој начин се избегнува мерната неодреденост при инјектирање на примерокот. Кај овој метод, една иста точно определена количина од внатрешниот стандард се додава на секој раствор од серијата на стандардни раствори и во примерокот за анализа. Како аналитички параметар за квантитативните пресметки се користи односот меѓу површината (или висината) на пикот на анализот и на внатрешниот стандард. За успешно спроведување на овој метод неопходно е пикот на внатрешниот стандард да биде добро разделен од другите пикови на хроматограмот ($R_S > 1,25$). Од друга страна, пикот на внатрешниот стандард треба да е блиску до пикот на анализот. Со соодветен внатрешен стандард, може да се постигне прецизност на резултатите помала од 1%.

Метод на нормализација

Друг метод со којшто може да се избегне мерната неодреденост поврзана со инјектирањето на примерокот е методот на нормализација. При тоа, потребно е комплетно елуирање на сите компоненти од примерокот. Се пресметуваат површините на сите елуирани пикови и се коригираат за разликите што потекнуваат од одговорот на детекторот за различни типови на компоненти. Концентрацијата на анализот се пресметува од односот меѓу површината на пикот на анализот и вкупната површина на сите пикови. Но, за жал, не е секогаш возможно да се обезбедат услови при кои ќе се елуираат сите компоненти од смесата во разумен временски период. Како резултат на тоа, методот на нормализација има ограничена примена.

ТЕНКОСЛОЈНА ХРОМАТОГРАФИЈА

Во планарни хроматографски техники се вбројуваат тенкослојната хроматографија (*Thin-layer Chromatography, TLC*), хартиената хроматографија (*Paper Chromatography, PC*) и електрохроматографијата (*Electrochromatography, EC*). Стационарната фаза кај овие хроматографски техники претставува рамен, релативно тенок слој на материјал што може да биде нанесен на стаклена, пластична или метална површина. Мобилната фаза се движи низ стационарната фаза по капиларен пат, под дејство на земјината тежа или под дејство на електричен потенцијал.

Тенкослојната хроматографија претставува најчесто и најшироко применувана техника од групата на планарни хроматографски техники. Оваа техника нуди подобра резолуција, поголема осетливост и побрзо разделување во однос на хартиената хроматографија.

Постои голема сличност помеѓу тенкослојната и течната колонска хроматографија во однос на видот на стационарна и мобилна фаза, како и во однос на нивната примена. Многу често тенкослојната хроматографија служи како водич при развојот на хроматографски метод и избор на оптимални хроматографски услови што понатаму можат да се применат при воспоставување метод во течната колонска хроматографија.

Тенкослојната хроматографија се применува во лабораториите за контрола на квалитет во фармацевтската индустрија за идентификација и утврдување на чистотата на лековите, во клиничките лаборатории, во биохемиските и биолошки испитувања итн.

Разделување со примена на тенкослојна хроматографија

Најчесто разделувањето се изведува на рамни стаклени, алуминиумски или пластични плочи покриени со тенок слој на фино уситнети честички. Овој слој, што е нанесен на подлогата, всушност ја претставува стационарната фаза. Стационарната фаза во TLC е слична со стационарната фаза опишана во течната колонска (атсорбциска, нормално-фазна и реверзно-фазна партициска, јоно-изменувачка и гел) хроматографија. Мобилната фаза, односно растворувачите (елуентите) што влегуваат во нејзиниот состав, се слични со елуентите што се користат како мобилна фаза кај течната хроматографија под висок притисок.

Плочи за тенкослојна хроматографија

Димензиите на плочите за тенкослојната хроматографија најчесто изнесуваат 5 cm x 20 cm, 10 cm x 20 cm и 20 cm x 20 cm. Плочите се комерцијално достапни и може да бидат конвенционални или плочи со високи перформанси (*High-performance TLC, HPTLC*) (Слика 14.1). Дебелината на слојот на стационарната фаза кај конвенционалниот тип хроматографски плочи изнесува од 200-250 μm , а големината на честичките се движи од 2-25 μm . HPTLC плочите имаат дебелина на слој од 100 μm и честички со дијаметар од 2-10 μm . Конвенционалните плочи имаат околу 2000 теоретски подови на 12 cm, со потребно време за разделување (развивање на плочата) од 25 минути. За споредба, HPTLC плочите имаат 4000 теоретски подови на 3 cm, и потребното време за развивање на плочата изнесува 3 минути.

Оттука може да се заклучи дека HPTLC плочите, во однос на TLC плочите, имаат значително поголема ефикасност. Недостатокот на HPTLC плочите е што имаат значително помал капацитет за примерок за анализа.

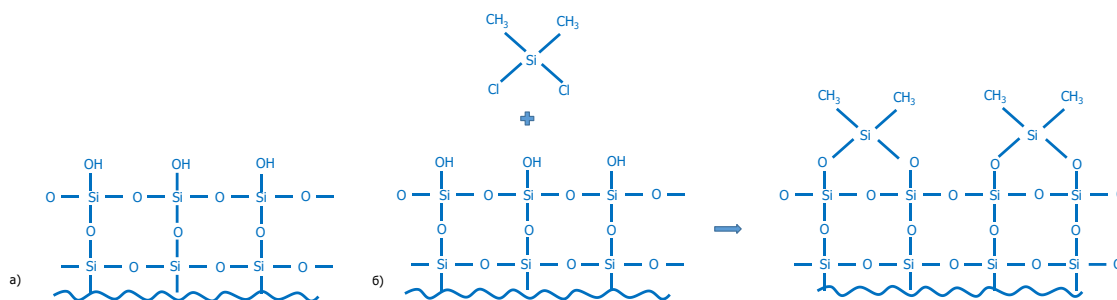


Слика 14.1 Плочы за тенкослојна хроматографија

Стационарна фаза во TLC

Најчесто користен апсорбент (стационарна фаза) во тенкослојната хроматографија е силика-гелот (*Silica gel 60 G*). Силика-гелот (Слика 14.2 а) претставува исклучително поларна стационарна фаза.

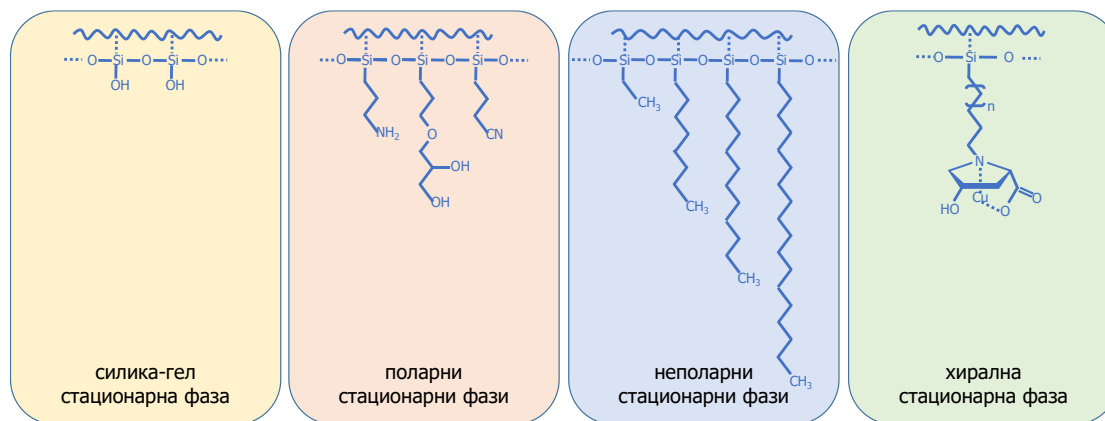
Брзината со која анализите мигрираат низ силика-гелот зависи од нивната поларност. За определено време, супстанцијата (аналитот) со најголема поларност ќе помине најмало растојание од местото на апликација, додека анализот со најмала поларност ќе помине најголемо растојание низ поларната стационарна фаза. Супстанциите со голема поларност подобро се задржуваат на поларната стационарна фаза, додека неполярните компоненти немаат афинитет кон силика-гелот и помалку се задржуваат.



Слика 14.2 (а) Силика-гел стационарна фаза, (б) модификација на површината на силика гелот со дихлородиметилсилан

Освен *Silica gel 60 G*, како стационарни фази во TLC се применуваат и *Silica gel 60 W* (водоотпорна силика), силика-гел со инкорпориран флуоресцентен материјал (*Silica gel GF₂₅₄*), алуминиум оксид, целулоза, дијатомејска земја (*Keiselturk G*), полиамид, различни типови на реверзно-фазни (*reverse-phase, RP*) стационарни фази.

Реверзно-фазните стационарни фази се добиваат со модификација на површината на силика-гелот. За модификација на површината на силика-гелот се користат различни реагенси за силанизација, како, на пример, дихлорометилсилан (Слика 14.2 б). Со примена на различни реагенси за силанизација, се добива цела палета на стационарни фази со различен степен на поларност (Слика 14.3). Должината на ланецот со којшто е направена модификацијата на површината на силика-гелот ја одредува и хидрофобноста на стационарната фаза, што има големо влијание на процесот на разделување.



Слика 14.3 Стационарни фази со различен степен на поларност

Мобилна фаза во TLC

Во тенкослојната хроматографија како мобилна фаза најчесто се користи смеса од органски растворувачи.

Поларноста на мобилната фаза има големо влијание на миграцијата на поларните аналити низ стационарната фаза. Колку е поголема поларноста на применетата мобилна фаза, толку еден поларен аналит ќе помине поголем пат (ќе се придвижи повеќе) низ силика-гел стационарната фаза. Од друга страна, зголемување на поларноста на мобилната фаза нема големо влијание врз миграцијата на неполарните аналити низ силика-гел стационарната фаза. Неполарните аналити немаат афинитет кон поларна стационарна фаза и се движат со фронтот на мобилната фаза, независно од нејзината поларност.

Со соодветен избор на растворувачи што влегуваат во состав на мобилната фаза, како и нивниот волуменски удел во вкупната смеса, се постигнува оптималната поларност на мобилната фаза. Изборот на соодветна стационарна и мобилна фаза потребна за да се постигне разделување на компонентите од смеса, претставува клучен сегмент од развојот на хроматографскиот метод.

Растворувачи што најчесто се користат како составен дел од мобилната фаза при тенкослојна хроматографија се: хексан, толуен, диетилетер, дихлорметан, бутанол, хлороформ, етил ацетат, ацетон, метанол, етанол и други.

Водата не се применува како мобилна фаза во TLC бидејќи голем број од органските супстанции не се растворливи во вода, па најчесто се користи во комбинација со поларни органски растворувачи, како што е метанолот.

При подготовка на мобилната фаза важно е секој растворувач што влегува во нејзиниот состав поединечно да се одмери и потоа да се внесе во хроматографската комора во којашто ќе се врши развивањето на хроматограмот. На овој начин се избегнува контаминацијата на растворувачот со пареи од претходно делумно измешани растворувачи.

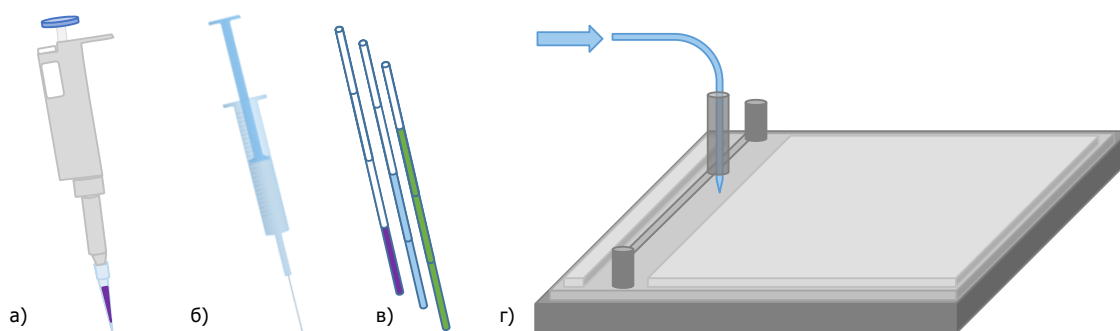
Нанесување (апликација) на примерок

Една од предностите што ја нуди тенкослојната хроматографија е можноста за истовремено разделување на различни примероци за анализа и соодветни референтни супстанции. Примерокот за анализа и референтните супстанции треба да бидат растворени во ист растворувач, со што се обезбедува споредлива дистрибуција на анализите низ стационарната фаза.

За да се постигне минимална големина на дажките по апликацијата, потребно е волуменот на апликација на примерокот да изнесува најмногу до 5 μL кај TLC плочите, односно 500 nL кај HPTLC плочите.

Нанесувањето (апликацијата) на примерокот за анализа претставува еден од најкритичните чекори во тенкослојната хроматографија, особено при квантитативната анализа. Најчесто примерокот се нанесува како 0,01% до 0,1% раствор, на растојание од 1-2 cm од работ на плочата. Најдобра ефикасност во разделувањето се постигнува ако дијаметарот на нанесената дамка изнесува околу 5 mm или и помал, во зависност од тоа дали станува збор за квалитативна или за квантитативна анализа. Разредени раствори се нанесуваат со три до четири последователни апликации, со воведување на чекорот сушење на дамките помеѓу апликациите.

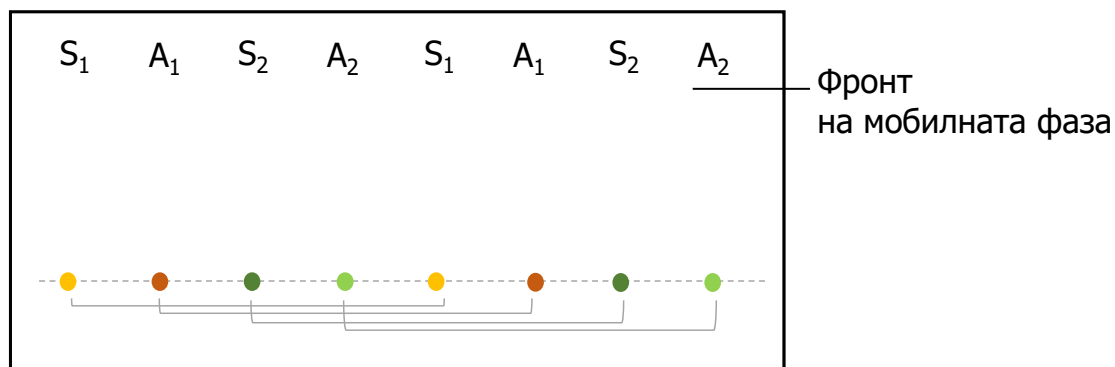
Мануелната апликација на примерокот се изведува со допирање на капиларата што го содржи примерокот до хроматографската плоча или со примена на микропипетори. Постојат голем број на комерцијално достапни механички диспанзери и капиларни пипети за апликација на примерок за анализа (Слика 14.4). Овие направи значително ја зголемуваат прецизноста и точноста при нанесувањето.



Слика 14.4 Уреди за апликација на примерок: а) микропипетор, б) микрошприц, в) капиларни пипети, г) механички диспанзер

Примерокот се аплицира 1-2 cm над работ на плочата, со што се избегнува потопување на аплицираниот примерок директно во мобилната фаза. Потребно е мобилната фаза прво да помине (протече) низ стационарната фаза, за потоа да го повлече нанесениот примерок. Пожелно е на иста хроматографска плоча да има по две апликации од секој примерок за анализа и од референтниот раствор.

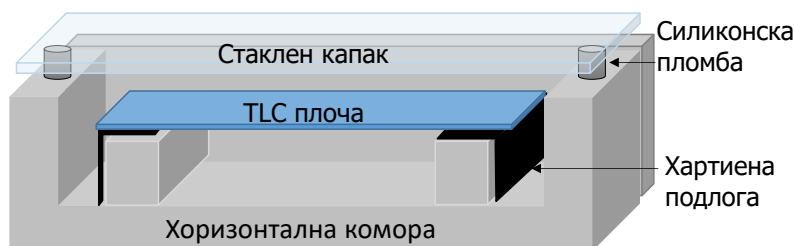
Пред развивање на плочата треба да се примени шема на означување на редоследот на аплицираните раствори на плочата (примероци за анализа и референтни раствори), со што би се избегнале грешки при евалуација на развиениот хроматограм (Слика 14.5). Означувањето на плочата се прави со молив и не треба да биде под почетната линија бидејќи на тој начин се оштетува слојот од стационарната фаза, што може да доведе до поразлична дистрибуција на анализите и грешки при фотометриската детекција. Најдобро е означувањето на хроматограмот да биде над линијата на фронтот на мобилната фаза. Фронтот на мобилната фаза се означува веднаш по развивање на плочата, на нејзиниот лев и десен раб.



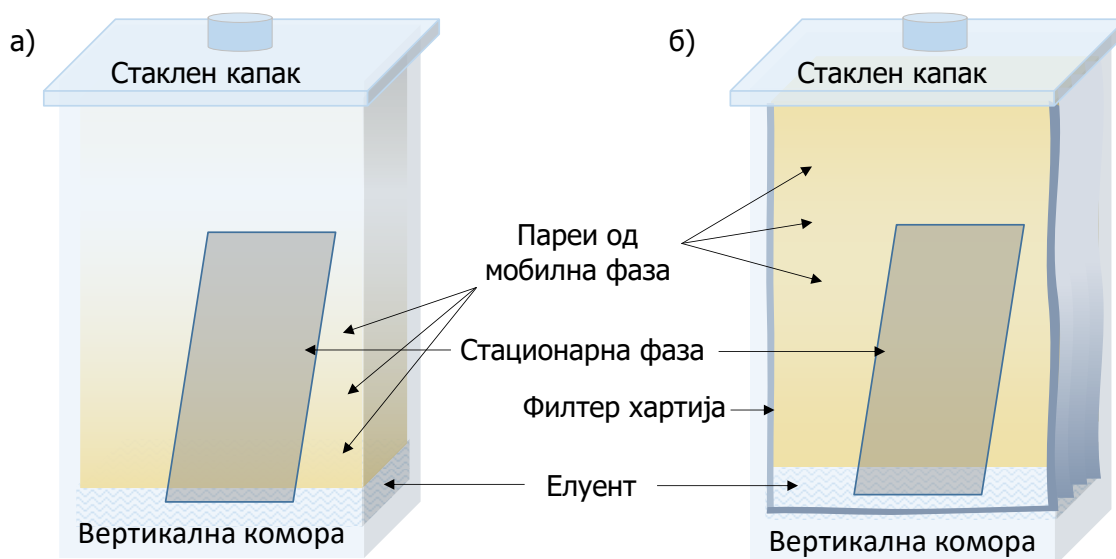
Слика 14.5 Приказ на шема на означување на аплицирани раствори: S_1 и S_2 - референтни раствори; A_1 и A_2 - примероци за анализа.

Развивање хроматографска плоча

Под развој на хроматографска плоча се подразбира процес во којшто аплицираниот примерок, со помош на мобилната фаза, се движи низ стационарната фаза и во овој процес настанува разделување на компонентите од смеса. Овој процес е аналоген со процесот на елуирање во течната колонска хроматографија. Развивањето на плочите се врши во специјално дизајнирани хроматографски комори за развивање. Постојат комори за хоризонтално и за вертикално развивање на плочите (Слика 14.6 и 14.7).



Слика 14.6 Хроматографски комори за хоризонтално развивање плочи

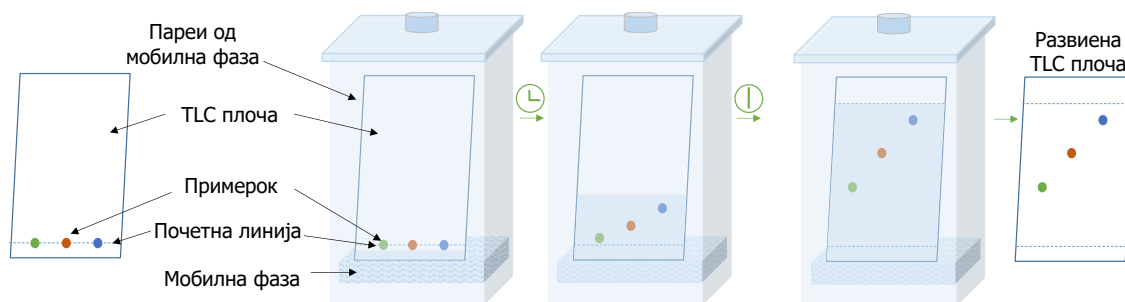


Слика 14.7 Комори за вертикално развивање плочи: а) комора со нормално заситување со пари, б) комора обложена со филтер хартија, заситена со пари на мобилната фаза

Многу често во коморите, од двете страни на дното, се става парче филтер хартија во U-форма. Филтер хартијата треба да биде потпрена на сидовите на комората и да биде потопена во мобилната фаза (Слика 14.7 б). Мобилната фаза, по извесно време, испарува од површината на филтер хартијата и ја заситува внатрешноста на комората со пари од мобилната фаза. Испарувањето на мобилната фаза од филтер хартијата е показател дека комората е заситена со пари од мобилна фаза. Времето потребно за заситување на комората со пари од мобилна фаза зависи од составот на мобилната фаза и најчесто се движи од половина час до два часа. Ако TLC плоча се поставува во комора што не е заситена со пари од мобилната фаза, можно е мобилната фаза побрзо да испарува од краевите на плочата, што ќе доведе до нерамномерно патување на мобилната низ стационарната фаза и развлекување на дамките.

По нанесување на примерокот на плочата и испарување на растворувачот од местото на апликација, плочата се внесува во хроматографската комора. Едната страна на плочата (страната на која е нанесен примерокот) се потопува во мобилната фаза, при што се внимава да се избегне директен контакт помеѓу примерокот и мобилната фаза (Слика 14.8).

Откако мобилната фаза ќе пропатува една половина или две третини од должината на хроматографската плоча, плочата се вади од комората и се остава да се исуши. Потоа следи чекорот на детекција (одредување на положбата на дамките) на анализите на развиената плоча.



Слика 14.8 Шематски приказ на развивање на TLC плоча

Сушење на развиениот хроматограм

По развивање на хроматограмот, TLC плочата се отстранува од хроматографската комора и се поставува хоризонтално во дигестор. На тој начин се овозможува разделените супстанции да мигрираат кон површината на стационарната фаза и подобро да се детектираат. Многу често за сушење на плочата се користи фен (сушење со топол или ладен воздух). Ако се користи фен за сушење, треба да се обрне внимание дали сушењето има влијание врз супстанциите. Имено:

- супстанции што се осетливи на оксидација можат да се разградат под дејство на покачена температура;
- компоненти од есенцијални масла можат да испарат и да се образуваат наслаги на слоевите на стационарната фаза, што ќе доведе до формирање нејасни зони;
- честички од прав од воздухот во лабораторијата можат да се исталожат на хроматограмот и да имаат влијание на понатамошната анализа.

Методи за детекција

Постојат различни методи што се користат за детекција (локација, визуелизација) на разделените компоненти на развиениот хроматограм. За детекција на дажките можат да се користат физички, хемиски или биолошки методи.

1. Физички методи

Физичките методи се засноваат на специфичните физички својства на супстанциите. Овие методи се темелат на апсорпција или емисија на електромагнетно зрачење или на инхибиција на флуоресценцијата или фосфоресценцијата (гаснење на флуоресценција). Овие методи спаѓаат во групата на недеструктивни методи.

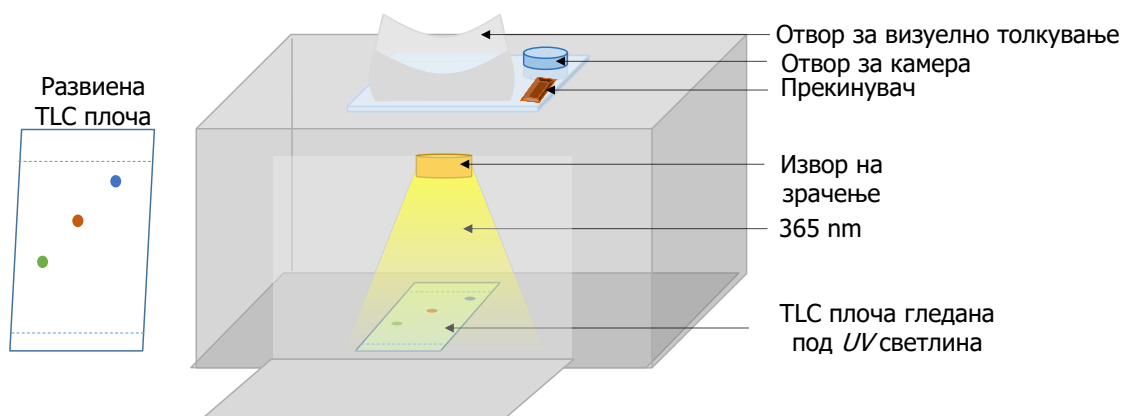
Разделувањето на обоени аналити најчесто се набљудува визуелно. Овие компоненти апсорбираат одреден дел од полихроматската (бела) светлина во видливиот дел од спектарот. Другиот дел од зрачењето, што не е апсорбирано од страна на аналитот (комплементарното зрачење), се рефлектира и ја одредува бојата на аналитот.

Супстанциите што се безбојни, апсорбираат на пократки бранови должини, односно во UV дел од спектарот ($\lambda = 200 - 400 \text{ nm}$). Овие супстанции можат да се детектираат со примена на детектори од типот на фотомултипликатори.

Физичка детекција на супстанции што апсорбираат во UV дел од спектарот може да се постигне и со примена на метод на инхибиција на флуоресценцијата или фосфоресценцијата. За таа цел се инкорпорира флуоресцентен материјал во стационарната фаза. Постојат комерцијално достапни TLC плочи со силика гел како стационарна фаза во којшто има инкорпориран флуоресцентен материјал (*Silica gel GF₂₅₄*). За детекција на дажките на овие плочи се користат специјално дизајнирани комори за изведување на UV/флуоресцентни анализи што овозможуваат плочите да се набљудуваат под UV-светлина (Слика 14.9).

Плочата се става во комората и се осветлува со светлина со бранова должина од 254 nm. На местата на плочата на коишто се наоѓаат дажките од аналитот, се намалува емисијата и тие се гледаат како темни дамки на жолта заднина. Компонентите од примерокот ја гаснат флуоресценцијата и целата плоча флуоресцира, со исклучок на местата каде што се наоѓаат дажките од компонентите. На тој начин се постигнува визуелизација на дажките.

Супстанциите што во својата структура содржат флуорофор, можат да се детектираат со нивно озрачување со светлина со поголема бранова должина ($\lambda = 356 \text{ nm}$). Со оглед на релативно малиот број супстанции што можат да емитираат флуоресцентно зрачење, овој тип на детекција има голема селективност.



Слика 14.9 Комори за детекција на дажките во UV/флуоресцентни анализи

2. Хемиски методи

Детекцијата на дамките на супстанции што немаат хромофор или флуорофор, се постигнува со помош на хемиска реакција.

Целта на хемиската реакција е да се образува продукт (дериват) што ќе овозможи детекција на дамките. Оваа постапка се нарекува дериватизација. Оттука произлегува дека хемискиот метод се заснова на хемиска реакција меѓу аналитот и реагенс-растворот за дериватизација. За таа цел се користат универзални реагенси или реагенси што се специфични за одредена функционална група. За разлика од физичките методи, хемиските методи се деструктивни.

Најчесто користени реагенси за дериватизација се:

- *Пареи на јод.* Третманот на хроматограмот со пари на јод е брз и економичен универзален метод за детекција на липофилни супстанции. Неколку кристали на јод се ставаат на дното на сува, затворена комора. Кога комората ќе се засити со виолетови пари на јод, плочата се внесува во затворената комора и се остава да стои за време од 30 s до неколку минути. Јодот реагира со голем број органски супстанции и дава кафено обоени дамки. Со оглед што јодот испарува, ова боење е реверзибилно. Иреверзибилно боење се постигнува со прскање на плочата со раствор на скроб, со што се спречува испарување на јодот. Овој тип детекција се користи во TLC тестовите за анализа на масла.
- *Калиум перманганат.* Овој реагенс се користи за визуелизација на јаглехидрати и супстанции со двојни врски. Се применува и за идентификација на макролидни антибиотици, како, на пример, клиндамицин и линкомицин.
- *Раствор на нинхидрин.* Овој реагенс се користи за визуелизација на амини. При реакција со примарни амини се добиваат розово обоени дамки, а со терциерни амини жолто обоени дамки. Се користи во фармакопејките тестови за идентификација на аминокликозидни антибиотици, како што е гентамицинот.
- *Алкален тетразолин, син.* Овој реагенс е специфичен за кортикостероиди, дава сини дамки на бела заднина.

Постапката на дериватизација може да се спроведе пред хроматографското разделување на компонентите (за време на подготовката на примерокот) или по хроматографското разделување (по развивањето на хроматографската плоча).

Со постапката на **претхроматографска дериватизација** се воведува хромофор во аналитот и се формира дериват што силно апсорбира или флуоресцира. На тој начин се зголемува селективноста на разделувањето, се зголемува осетливоста на детекцијата и се подобрува линеарноста на методот. Најчесто целта на претхроматографската дериватизација е зголемување на осетливоста на определувањето (на пример, определување аналити во трагови).

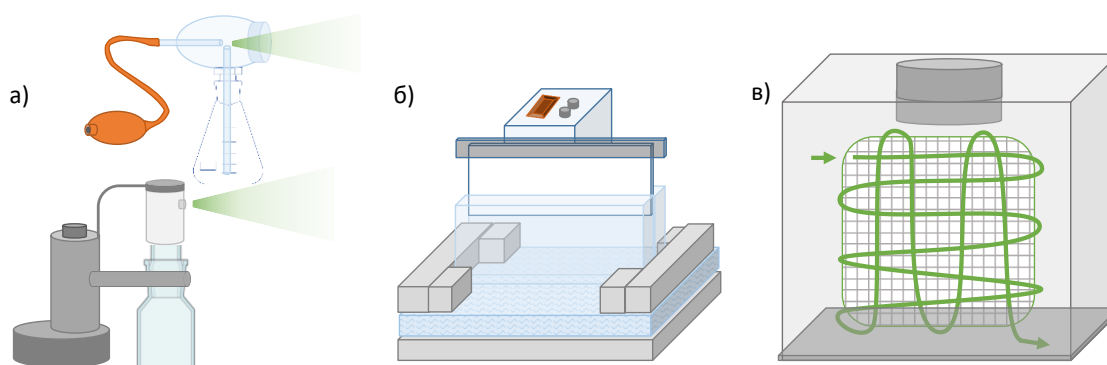
Кај **постхроматографската дериватизација** реагенсот за дериватизација се додава по развивање на плочата. Целта на овој тип на дериватизација е првенствено детекција на дамките. Треба да се напомене дека супстанциите што поминуваат помал пат низ плочата се бојат поинтензивно во споредба со супстанции во иста концентрација што поминуваат поголем пат. Колку една дамка е помала, за дадена количина на супстанција, толку таа е поконцентрирана, што доведува и до поголема осетливост.

Постојат различни техники на воведување на реагенсот за дериватизација на TLC плочата:

- *Техника со прскање.* Со помош на распрскувач, реагенс-растворот рачно се нанесува на плочата, по што безбојните супстанции стануваат видливи. Бидејќи нанесувањето на реагенс растворот е рачно, во пракса не може да се постигне негово воедначено нанесување на плочата. За да се избегне вдишувањето аеросоли од реагенсот за дериватизација, прскањето на TLC

плочите секогаш треба да се врши во дигестори со добра вентилација. Оваа техника во последните години сè почесто се заменува со техниката на потопување (Слика 14.10 а).

- *Техника со потопување.* По развивањето, плочата се потопува во реагент-растворот што се наоѓа во специјални комори за потопување. На овој начин се постигнува хомогена дистрибуција на реагентот за дериватизација низ целата плоча (развиениот хроматограм). Кај оваа техника потребно е да се внимава на изборот на растворувачот на реагентот за дериватизација. Растворувачот не треба да ги раствора ниту разделените аналити, ниту продуктите на дериватизација. Вообичаено, времето на потопување е многу кратко (помалку од 5 s), со што се избегнува растворање на супстанциите од стационарната фаза. По потопувањето, хроматограмот се положува хоризонтално и се суши на воздух (Слика 14.10 б).
- *Техника со изложување на пари.* Оваа техника, како и техниката на потопување, овозможува хомогено третирање на целата плоча со реагентот за дериватизација. TLC хроматограмите можат да се третираат со голем број реагенси, за што се користат специјално дизајнирани комори. Многу често користен реагент за оваа техника е јодот. Парите на јод овозможуваат неспецифична, најчесто неструктивна детекција на голем број супстанции. Други реагенси што се користат за оваа техника се: пари на бром, пари на хлор, амонијак, амониум хидроген карбонат, диетиламин, оксиди на азот, формалдехид и други (Слика 14.10 в).



Слика 14.10 Техники за воведување реагент за дериватизација: а) со прснување; б) со потопување; в) со изложување на пари

Влијание на покачена температура на хроматограмот по нанесување на реагентот

Голем бројот хемиски реакции се одвиваат побрзо при покачена температура. Од тие причини понекогаш е потребно загревање на хроматограмот по негово третирање со реагентот за визуелизација. Вообичаено загревањето на 100 - 120°C за време од 5 до 10 минути е доволно да се обезбеди завршување на реакцијата. Озрачување со UV светлина (живина лампа), исто така, доведува до забрзување на реакцијата.

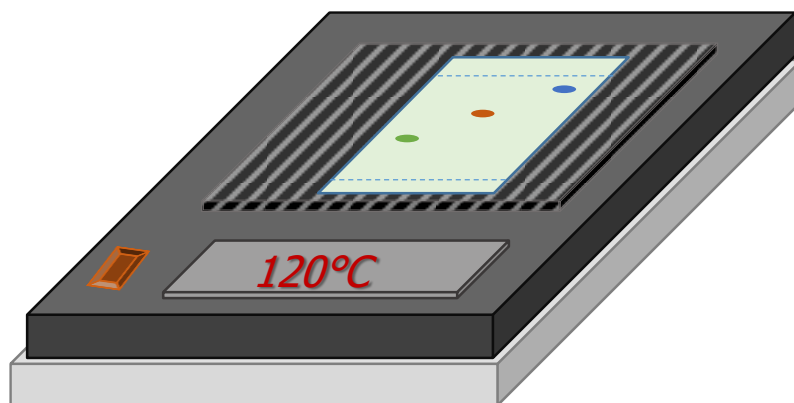
Развиените хроматограми можат да се загреваат во комори за сушење, со примена на топлински плочи или со помош на извори на IR зрачење.

Ако TLC плочата се загрева во комори за сушење, таа не треба да биде директно поставена на перфорираната полица на комората, бидејќи трансферот на топлина е поголем на местата на директен контакт со металот. Во тој случај постои можност дупките од полицата да станат видливи на самиот хроматограм, со што ќе се доведе

во прашање квантитативното определување. Подобро е TLC плочата да биде поставена вертикално во коморите за сушење.

Во последните години примената на топлински плочи за загревање на хроматограмите станува сè поголема. Предноста е што со оваа апаратура може визуелно да се следи текот на реакцијата и TLC плочата да се отстрани кога ќе се добие соодветното (оптимално) обојување на дамките. Температурата на топлинските плочи се движи во опсег од 30°C до 190°C (Слика 14.11).

Понекогаш за загревање на плочите се користат и извори на IR зрачење. Хроматограмот се поставува хоризонтално и се озрачува со кварцни спирали што се загреваат на температура од 800°C, на растојание од 10 cm до 20 cm. Кај овој тип апаратура не постои регулација на степенот на загревање, па единствено можат да се применуваат за испитување пиролиза.



Слика 14.11 Топлинска плоча за TLC

Стабилизација на развиените зони

Третманот на хроматограмот со реагенс за дериватизација доведува до формирање обоен продукт или формирање зони што флуоресцираат, што понатаму се користат за квалитативна или за квантитативна анализа. За таа цел потребно е бојата или интензитетот на флуоресценција да биде стабилен најмалку 30 минути.

За стабилизација на развиените зони, општа препорака е хроматограмот, да се чува во атмосфера на азот и заштитен од светлина сè до неговата евалуација. Познат метод за стабилизација на дамки од нинхидрин реагенс е додавање соли на кадмиум или бакар. За стабилизација на флуоресцентните зони, хроматограмот може да се третира со вискозни липофилни или хидрофилни агенси (на пример, прскање со масло на парафин, полиетилен гликол 400).

3. Биолошки методи

Овие методи се засноваат на биолошката активност на разделените аналити, независно од нивните физички или хемиски својства. Постојат неколку биолошки техники на детекција:

- *Мануелен трансфер* на соодветен „детектор“ на хроматографски разделените супстанции. Под „детектор“ се подразбира некоја супстанција со којашто испитуваната компонента реагира специфично. Овој метод се користи за детекција на антибиотици, растителни и животински хормони, микотоксини, инсектициди, алкалоиди.
- *Биоавтографско определување* во кое се користат тест организми, ткивни хомогенати или клеточни органели. Овие „детектори“ се внесуваат на раствор на агар или желатин и директно се нанесуваат на развиениот хроматограм.

- *Репринт метод* со кој развиениот хроматограм се нанесува на слој од агар во кој е присутен соодветен микроорганизам што служи како „детектор“. Активните агенси (супстанцииите што се определуваат) дифундираат од TLC плочата во слојот на агар чија дебелина изнесува 1 mm до 4 mm. Овие активни агенси, за време на периодот на инкубација, го забрзуваат или го инхибираат растот на детекторот.
- *Ензимско определување* при што хроматограмот најпрво се прска со раствор со ензим. По периодот на инкубација, ензимски третираните компоненти се детектираат со реакција со соодветен реагенс.

Биолошките методи се подложни на одреден степен на варијабилност, што потекнува од нивната природа. Предноста на овие методи е што се многу селективни (независно од процесот на разделување); другите супстанции во примерокот не интерферираат со определувањето (олеснета е постапка за прочистување на примерокот) и лимитот на детекција е споредлив со класичните методи на детекција. Овие методи се применуваат за детекција и определување антибиотици и супстанции со сличен ефект, како што се: алкалоиди, пестициди, фунгизиди, микотоксини, витамини и сапонини.

Параметри за перформансите во тенкослојната хроматографија

Поголемиот број термини и хроматографски параметри што се однесуваат на колонската хроматографија, со мало приспособување, можат да се применат и кај тенкослојната хроматографија. Кај овој тип хроматографија се воведува нов термин - фактор на задржување R_f .

Фактор на задржување

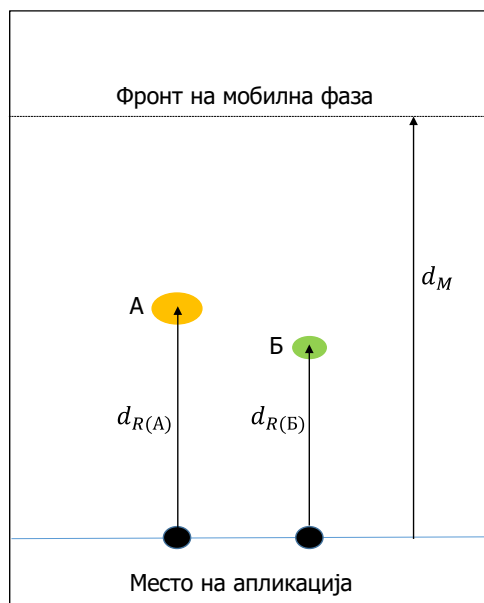
Фактор на задржување (R_f) на еден аналит претставува однос на миграциското растојание на аналитот, (d_R) и миграциското растојание на мобилната фаза, (d_M):

$$R_f = \frac{d_R}{d_M} \quad (14.1)$$

каде што d_M и d_R претставуваат линеарни растојанија измерени од линијата на стартот, до фронтот на мобилната фаза и до средината на дамката од аналитот, соодветно.

Вредностите на факторот за задржување се движат од еден кај аналити што воопшто не се задржуваат на стационарната фаза и патуваат со фронтот на мобилната фаза, до нула за аналити што во целост се задржуваат на местото на апликација. Во случај кога дамките не се симетрични, вредноста за d_R се одредува од положбата на најголемиот интензитет на дамката на аналитот.

На Слика 14.12 е прикажан едноставен TLC хроматограм на силика-гел стационарна фаза, добиен од два примероци (А и Б) за анализа што содржат само една компонента. Бидејќи супстанцијата А има помала поларност во однос на супстанцијата Б, помалку се задржува на поларната стационарна фаза и поминува поголем пат од местото на апликација. Оттука супстанцијата А ќе има поголема вредност за R_f во однос на супстанцијата Б.



Слика 14.12 Шематски приказ на TLC хроматограм

Фактор на ретенција

Равенките опишани во поглавјето Основи на хроматографија (Табела 13.5) се применливи и за тенкослојната хроматографија. За таа цел неопходно е да се поврзат d_R и d_M со t_R и t_M . За TLC хроматограм t_M претставува времето потребно мобилната фаза да помине определено растојание, а t_R е времето потребно анализот да помине определено растојание, во овој случај d_R . За мобилната фаза, ова време е еднакво на односот меѓу растојанието што го поминува мобилната фаза и нејзината линерна брзина (u):

$$t_M = \frac{d_M}{u} \quad (14.2)$$

Но, анализот не ја достигнува оваа иста точка сè додека мобилната фаза не помине растојание d_M . Оттука:

$$t_R = \frac{d_R}{u} \quad (14.3)$$

каде што t_R е времето потребно анализот да помине растојание d_R .

Со заменување на овие равенки во равенката за факторот на ретенција (13.11) се добива:

$$k' = \frac{d_M - d_R}{d_R} \quad (14.4)$$

Факторот на ретенција k' може да се претстави и со следнава равенка:

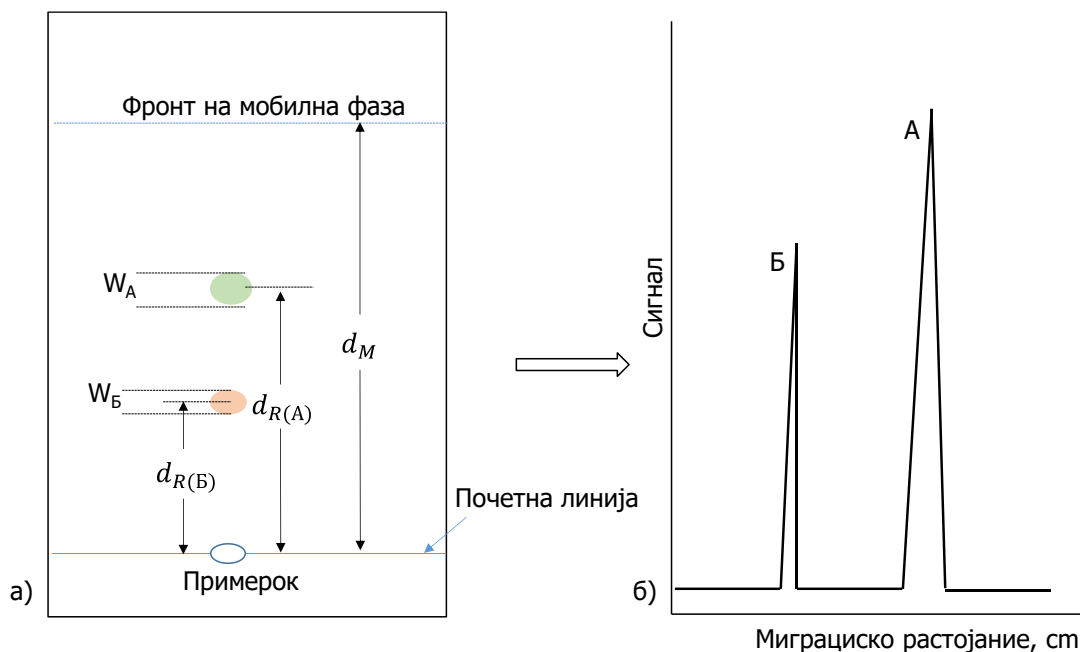
$$k' = \frac{1 - \frac{d_R}{d_M}}{\frac{d_R}{d_M}} = \frac{1 - R_f}{R_f} \quad (14.5)$$

Висина на теоретски под

Бројот на теоретските подови (N) за одреден тип на пакување во тенкослојната хроматографија е даден со изразот:

$$N = 16 \left(\frac{d_R}{W} \right)^2 \quad (14.6)$$

при што d_R е линейното растојанието што го поминува аналитот, а W е ширината на дамката (Слика 14.13). Многу често дамките што се добиваат по развојот на плочите не се симетрични како што е прикажано на сликата.



Слика 14.13 Шематски приказ на: а) TLC плоча по развивање (примерокот содржи два аналити А и Б), б) TLC хроматограм

Висината на теоретскиот под е дадена со изразот:

$$H = \frac{d_R}{N} \quad (14.7)$$

Примена на тенкослојната хроматографија

Квалитативна анализа

Податоците што се добиват од TLC хроматограмот, вообичаено не се доволни за идентификација на различните аналити, присутни со смеса, бидејќи вредностите за R_f не се постојани, туку се менуваат во зависност од големината на аплицираниот примерок, TLC плочата и условите што се применуваат при развивање на плочата. Дополнително, можно е два различни аналити, под одредени хроматографски услови, да имаат исти или приближно исти вредности за R_f .

Фактори што имаат најголемо влијание на R_f вредноста се дебелината на стационарната фаза, содржината на влага во мобилната и во стационарната фаза, температурата, степенот на заситување на хроматографската комора со пари од мобилната фаза, како и големината на примерокот што е аплициран на плочата. Целосна контрола на сите овие фактори не е возможна, ниту е практична. Ефектите од овие фактори можат да се намалат доколку наместо R_f вредноста, за идентификација се користи вредноста за *релативниот фактор на задржување* R_x :

$$R_x = \frac{\text{поминато растојание на аналит}}{\text{поминато растојание на референтна супстанција}}$$

Примена на референтни супстанции

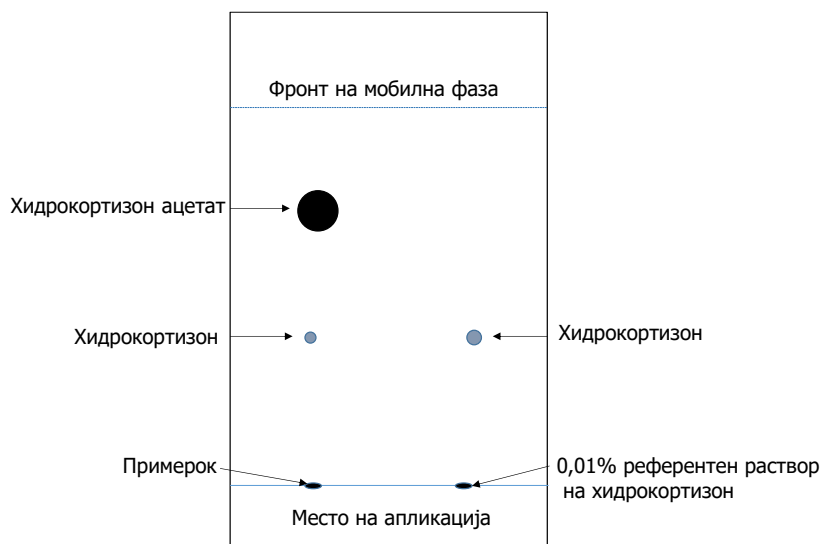
Идентификација на непознат анализ со примена на TLC може да се постигне кога на иста плоча се аплицира примерокот за анализа и референтен раствор (раствор од референтна супстанција). По развивање на плочата се набљудуваат дажките на анализот и се споредуваат вредностите за R_f на анализот и на референтната супстанција. Совпаѓање меѓу R_f вредностите на анализот и на референтната супстанција овозможува идентификација на непознатиот анализ. Понекогаш е потребен и дополнителен тест за потврда. Тоа се постигнува со повторување на експериментот со примена на различна стационарна и мобилна фаза, или со примена на друг реагенс за визуелизација.

Метод на елуција

Идентификација на непознат анализ може да се постигне со внимателно отстранување на дажките од интерес од хроматографската плоча со помош на шпатула. Содржината внимателно се собира на хартија и потоа се префрла во соодветен лабораториски сад. Анализот се раствора во соодветен растворувач, по што со помош на филтрација или центрифугирање, се разделува од стационарната фаза. Идентификација се постигнува со примена на масена спектроскопија, нуклеарно магнетна резонанција или со инфрацрвена спектроскопија.

Полуквантитативна анализа

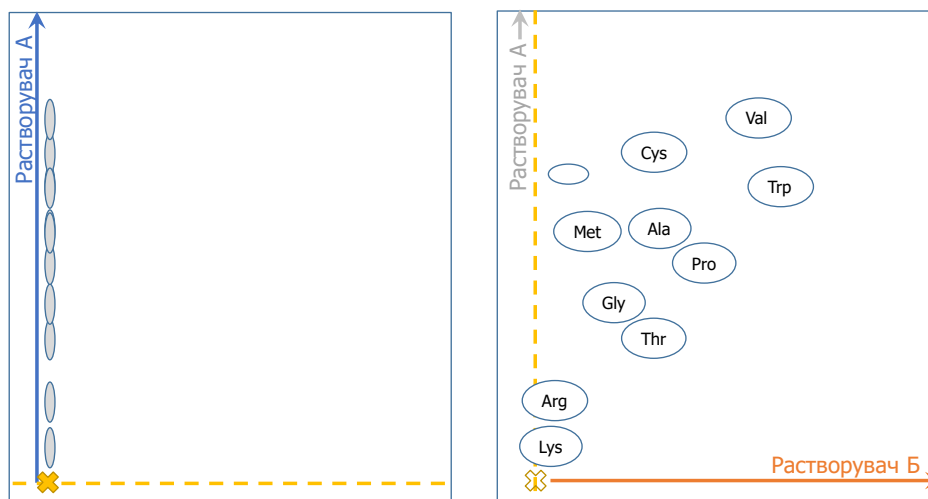
Полуквантитативно определување на содржината на анализот што е присутен во примерокот може да се постигне со визуелна споредба на големината или интензитетот на добиените дажки на раствор од примерок за анализа и референтен раствор. Оваа техника често се применува како лимит тест за определување на онечистувања на активни супстанции во монографиите на Европската фармакопеја. TLC лимит тестовите се темелат на споредба на интензитетот на дажките добиени од концентриран раствор на примерок за анализа и разреден раствор на референтна супстанција од онечистувањето, аплицирани на иста хроматографска плоча (Слика 14.14).



Слика 14.14 Полуквантитативно определување на хидрокортизон во хидрокортизон ацетат

Дводимензионална планарна хроматографија

На Слика 14.15 прикажано е разделување на смеса од аминокиселини со развивање на плочата во две димензии, односно со примена на дводимензионална тенкослојна хроматографија. Примерокот се аплицира на едната страна на плочата и се развива во насока на растворувачот А. Потоа овој растворувач се отстранува со испарување, плочата се ротира за 90° и се развива во насока на растворувачот Б. По развивање на плочата во втората мобилна фаза, дамките од аминокиселини се визуелизираат со примена раствор на нинхидрин, како реагенс за визуелизација. Идентификација на аминокиселините се постигнува со споредба на положбата на дамките добиени од референтни раствори на аминокиселини.

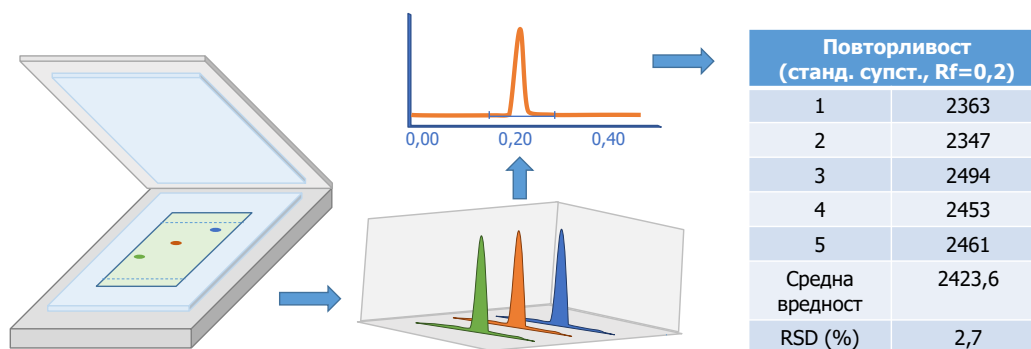


Слика 14.15 Шематски приказ на дводимензионална TLC на аминокиселини
 Растворувач А: етанол и хлороформ (2+1, V/V)
 Растворувач Б: метанол и диоксан (2+1, V/V)

Квантитативна анализа

Квантитативно определување во тенкослојната хроматографија се постигнува на два начина: со директна оптичка евалуација на TLC хроматограмот („*in situ*“ евалуација) или со примена на индиректни методи за квантитативно определување.

Скенерите за TLC (дензитометри) претставуваат современа апаратура за директна оптичка евалуација на TLC хроматограмот (Слика 14.16). Оваа апаратура ја трансформира дистрибуцијата на супстанцијата на плочата во дигитални компјутерски податоци. TLC скенерите овозможуваат квантитативно определување што се заснова на мерење на апсорбанцијата или флуоресценцијата, а во поново време и на рефлексијата.



Слика 14.16 Приказ на квантитативно определување со примена на TLC скенери

Апаратурата на TLC скенерите се состои од: извор на зрачење (деутериумова, халоген-волфрамова или живина ламба); монохроматор; оптички систем и детектор (фотомултипликатор). Квантитативното определување со примена на TLC скенерите се заснова на споредба на висината на пик или површината под пик добиени од раствор на примерок за анализа и од референтен раствор, развиени на иста хроматографска плоча.

Кај индиректните методи за квантитативно определување, дажките што го содржат анализот од интерес внимателно се отстрануваат од плочата, анализите се раствораат во соодветен растворувач и се анализираат спектрофотометриски. Овие техники сè почесто се заменуваат со методот на директно оптичка евалуација на TLC хроматограмите.

ВИСОКОПЕРФОРМАНСНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЈА

Високоперформансната течна хроматографија (*High performance liquid chromatography, HPLC*) е најшироко употребувана аналитичка сепаративна техника. Причината за популарноста на овој метод е неговата осетливост, адаптивбилноста за точни квантитативни определувања, соодветноста за разделување неиспарливи или термално нестабилни видови и, пред сè, широка примена за супстанции што се од примарен интерес во индустријата, во науката и во јавноста. Вакви примери вклучуваат: аминокиселини, протеини, нуклеински киселини, јаглехидрати, јаглеводороди, лекови, терпеноиди, пестициди, антибиотици, стероиди, метало-органски видови и голем број неоргански супстанции.

Различните хроматографски техники се комплементарни во однос на областа на примена (Слика 15.1). За аналити со голема молекулска маса (поголема од 10000) најчесто се применува ексклузиската хроматографија, иако постои можност за нивно разделување и со примена на реверзно-фазна партициска хроматографија.



Слика 15.1 Примена на течна хроматографија

За јонски видови со помала молекулска маса, најмногу се применува јоно-изменувачката хроматографија. Малите неполарни и поларни нејонизирани молекули се разделуваат со примена на партициската хроматографија. Атсорпциската хроматографија се применува за разделување неполарни видови, структурни изомери и класи на соединанија, како што се јаглеводородите и алифатичните алкохоли.

Ефикасност на колоната во течна хроматографија

Ефикасноста на колоната во течната хроматографија значително зависи од големината на честиците на стационарната фаза. Со намалување на големината на честиците на пакувањето на стационарната фаза се зголемува ефикасноста на колоната.

Во течната хроматографија, понекогаш се јавува значително ширење на пиковите независно од пакувањето на колоната. Ова таканаречено екстра-колонско ширење на пиковите се јавува при пренесување на аналитот низ цевките (капиларите) во системот за инјектирање, регионот на детекторот и цевките (капиларите) што ги поврзуваат различните компоненти на системот. Тука ширењето на пиковите настанува како резултат на разликите во протокот на мобилната фаза помеѓу слоевите на течност во близина на сидовите и во центарот на цевките (капиларите). Како последица на ова, централниот дел од растворот се движи побрзо отколку периферниот дел. Во гасната хроматографија, екстра-колонското ширење значително се неутрализира со дифузијата. Дифузијата кај течностите, во споредба со гасовите е значително побавна и затоа ширењето на пиковите од овој тип е забележливо.

Придонесот на екстра-колонскиот ефект на вкупниот број на теоретски подови е даден со следната равенка:

$$H_{ex} = \frac{\pi r^2 u}{24 D_M} \quad (15.1)$$

каде што u е линеарната брзина на протокот во cm/s, r е радиусот на цевката во cm и D_M е коефициентот на дифузија на растворот во мобилната фаза во cm²/s.

Екстра колонското ширење може да биде значително сериозно кога се користат колони со мал отвор. Тука треба да се внимава да се редуцира радиусот на екстра колонските компоненти до 2,54 mm или помалку.

Како дополнителен фактор што влијае на ефикасноста на колоната се јавува и големината на примерокот.

Инструменти за течна хроматографија

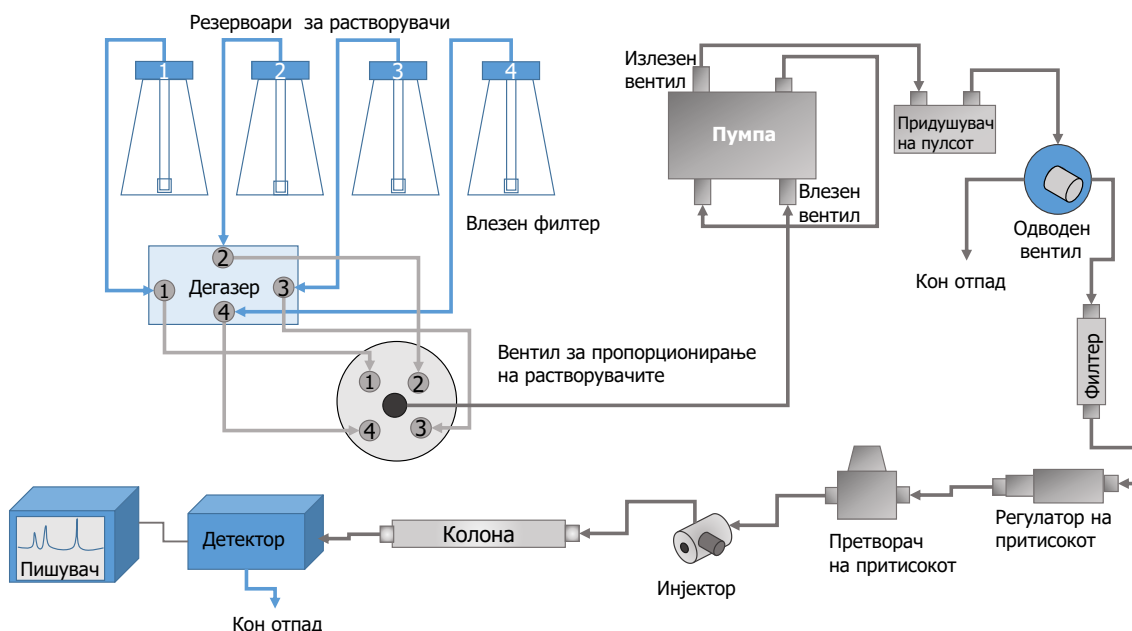
Со цел да се обезбеди соодветен проток на мобилната фаза за пакување на колона со големина на честици од 2-10 μm, што се употребуваат во модерната течна хроматографија, потребни се големи притисоци. Како последица на ова, опремата потребна за HPLC, треба да биде покомплексна и поскапа, во споредба со инструментите за другите типови на хроматографија.

На Слика 15.2 даден е шематски приказ на составните делови на типичен HPLC систем.

Резервоари за мобилна фаза и системи за растворувачи

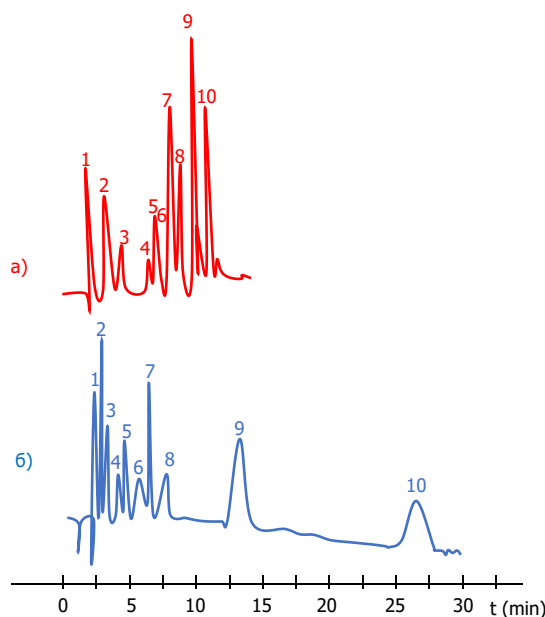
Модерните системи за HPLC се опремени со еден или повеќе стаклени или челични резервоари, што може да содржат 200 до 1000 mL растворувач. Резервоарите се опремени со дегазер, уред за отстранување на растворените гасови (најчесто кислород и азот) коишто интерферираат преку формирање на меурчиња во колоната и детекторските системи. Овие меурчиња предизвикуваат ширење на пиковите и дополнително интерферираат со перформансите на детекторот. Дегазерите може да бидат составени од вакуум систем за испумпување, систем за дестилација, помагала за загревање и мешање на растворувачите или системи за барботирање (*sparging* системи), во коишто растворените гасови се отстрануваат преку нивно растворање во меурчиња од

инертен гас со слаба растворливост (хелиум). Системите содржат и делови за филтрирање на прашина и честички од растворувачите, со што се спречува оштетување на пумпите, системите за инјектирање и запушување на колоната. Дегазерите и филтрите не се секогаш неопходен составен дел на системот за HPLC. Пример, соодветен начин за третирање на растворувачите пред да се внесат во резервоарот е да се филтрираат под вакуум низ филтер со микрометарски димензии на порите.



Слика 15.2 Шематски приказ на HPLC систем

Хроматографското разделување што вклучува мобилна фаза со константен состав во тек на анализата е наречено **изократно елуирање**. Често ефикасноста на хроматографското разделување се зголемува со примена на **градиентно елуирање** (составот на мобилната фаза се менува за време на анализата). Тука може да се вклучат два или три система за растворање, со значително различна поларност. По започнување на елуцијата, односот на растворувачи варира според програмиран начин, понекогаш континуирано, а понекогаш во серија од чекори. Модерните системи за HPLC, често се опремени со уреди, за внесување на растворувачите од два или од повеќе резервоари и комора за мешање, со брзини што варираат континуирано, а волуменскиот однос на растворувачите може да се променува линеарно или експоненцијално во текот на времето. На Слика 15.3 е дадена предноста на градиентната елуција во сепарацијата на смеса од хлоробензени. Со примена на изократно елуирање (50:50 % (V/V) раствор на метанол/вода) добиен е хроматограмот прикажан на Слика 15.3 б. Со примена на градиентна елуција, со смеса на двата растворувачи со почетен однос од 40:60 (V/V), а потоа концентрацијата на метанол се зголемува со брзина од 8% во минута, добиен е хроматографот прикажан на Слика 15.3 а. Градиентното елуирање значително го намалува времето на разделување, без да се промени резолуцијата на првите пикови. Градиентното елуирање дава ефекти слични на програмирана температура во гасната хроматографија.



Слика 15.3 Разлика помеѓу а) градиентно и б) изократно елуирање на смеса (1. Бензен, 2. Монохлорбензен, 3. Ортодихлорбензен, 4. 1,2,3-трихлорбензен, 5. 1,3,5-трихлорбензен, 6. 1,2,4-трихлорбензен, 7. 1,2,3,4-тетрахлорбензен, 8. 1,2,4,5-тетрахлорбензен, 9. Пентахлорбензен и 10. Хексахлорбензен).

Системи за пумпање

Барањата за системот за пумпање на апаратурата за HPLC се строги и вклучуваат: 1) генерирање притисоци до 6000 psi (414 bar), 2) одвод што ќе овозможи континуирано испумпување на мобилната фаза, без пулсирања, 3) протоци од 0,1 до 10 mL/min, 4) контрола на протокот и репродуцибилност на протокот од релативни 0,5 % или подобри, 5) компонентни отпорни на корозија (од нерѓосувачки челик или тефлон). Треба да се нагласи високиот притисок генериран од пумпата на системот за HPLC не треба да претставува опасност од експлозија, бидејќи течностите не се компресибилни. Така, прекин на која било од компонентите на системот, резултира во течење на растворувачот. Но вакво течење може да претставува ризик од пожар.

Постојат три типа пумпи: клипни пумпи, шприц-пумпи и пневматски пумпи (пумпи со константен притисок).

Клипните пумпи се применуваат во околу 90% од комерцијално достапните системи за HPLC. Овие пумпи се составени од мала комора во којашто мобилната фаза се испумпува со движење на клипот напред-назад и два вентили што се отвораат и што се затвораат наизменично и го контролираат протокот на мобилна фаза. Недостаток на овие пумпи е што може да продуцираат пулсирачки проток, што мора да биде придушен, бидејќи пулсирањето на протокот на мобилната фаза се јавува како шум на базната линија во хроматограмот. Предноста на овие пумпи е во тоа што вклучуваат мал внатрешен волумен (35-40 μL), овозможуваат висок притисок (до 10 000 psi), лесно се адаптираат за градиентно елуирање и продуцираат константни протоци на мобилната фаза, независно од заднинскиот притисок на колоната и вискозноста на растворувачот.

Шприц-пумпите се состојат од големи комори во форма на шприц, опремени со клип што се активира од механизам на навртка, напојуван од мотор. И овој тип на пумпи, како и клипните продуцираат проток што е независен од вискозноста на мобилната фаза и заднинскиот притисок на колоната, без пулсирање. Недостаток

на овие пумпи е малиот капацитет на растворувачи (околу 250 mL) и значителни потешкотии при промена на растворувачите.

Пневматските пумпи се составени од контејнер на расклопување, сместен во сад, што може да се доведе под притисок со примена на компримиран гас. Пумпите од овој тип се евтини и овозможуваат проток без пулсирање, но имаат ограничен капацитет и притисокот зависи од вискозноста на мобилната фаза, како и од заднинскиот притисок на колоната. Овие колони не се применливи за градиентно елуирање и се ограничени на притисоци до најмногу 2000 psi. Поради тоа најчесто се применуваат за препаративни цели.

Контрола на протокот и програмирачки системи

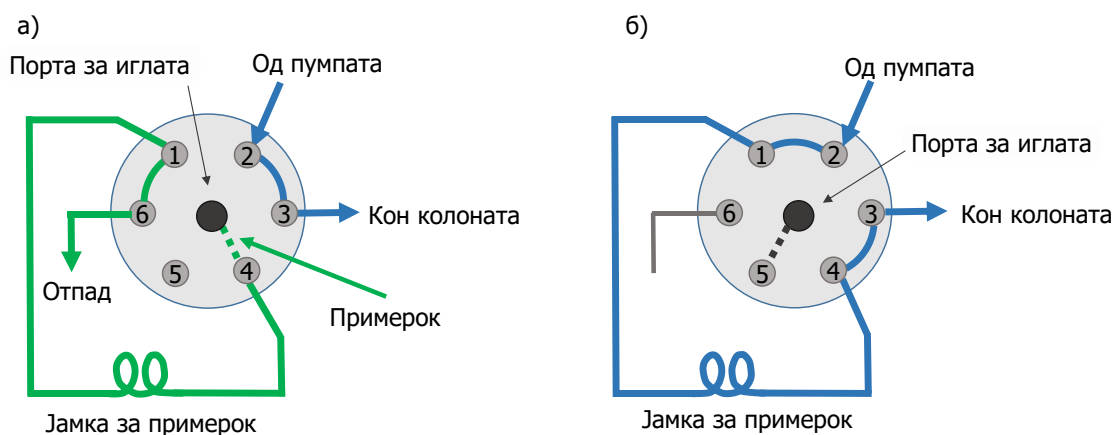
Како дел од системот за пумпање на мобилната фаза, многу комерцијални инструменти се опремени со компјутерски контролирани делови за мерење на брзината на протокот, преку определување на пад на притисокот по должина на рестриктор лоциран на излезот на пумпата. Секоја разлика во сигналот од однапред дефинираната вредност се користи за зголемување или намалување на брзината на моторот на пумпата. Повеќето инструменти имаат начин на варирање на составот на растворувачи, континуирано или чекор по чекор. На пример, инструментот прикажан на Слика 15.2 содржи вентил за пропорционирање на растворувачите, што овозможува мешање на максимум четири растворувачи на програмиран и континуирано варијабилан начин.

Системи за инјектирање на примерок

Многу често ограничувачки фактор за прецизноста на мерењата во течната хроматографија претставува репродукцибилноста со која примероците се внесуваат на колоната. Проблемот се зголемува со ширење на пиковите, како резултат на преголемата количина на примерок внесена во колоната. Волумените на инјектирање на примерок мора да бидат во мали количини: од неколку десетини на микролитар до 500 μL . Дополнително, системот за инјектирање треба да овозможи внесување примерок без да се намали притисокот на системот за HPLC.

Најшироко употребуван метод на внесување примерок се базира на внесување на примерокот со јамка (*sample loop*) прикажан на Слика 15.4.

Овие уреди се често интегрален дел на опремата за течна хроматографија, при што јамката може да се менува овозможувајќи избор на волумен на инјектирање од 5 до 500 μL .



Слика 15.4 Шематски приказ на јамка за инјектирање на систем за HPLC: а) позиција на внесување на примерок (*load*), б) позиција на инјектирање (*inject*).

Во позиција на полнење на примерок (Слика 15.4 а), со иглата од шприцот се внесува примерокот во јамката, а мобилната фаза се движи од пумпата кон колоната заобиколувајќи ја јамката, при што јамката се полни со примерок. Во позиција на инјектирање (Слика 15.4 б), јамката е помеѓу пумпата и колоната, при што мобилната фаза поминува низ јамката и го носи примерокот кон колоната.

Модерните системи за HPLC се опремени со автоматски систем за внесување примерок што овозможуваат висока прецизност на мерењата. Принципот на инјектирање е идентичен на принципот на јамката за примерок. Овие системи содржат јамки за инјектирање и шприц-пумпи за инјектирање што овозможуваат инјектирање на примероци од помалку од 1 μL до повеќе од 1 mL. Автоматските системи може да содржат и термостат за регулирање на температурата на примерокот во вијалите и за спроведување на реакции на дериватизација пред чекорот на инјектирање на примерокот. Повеќето од овие системи може да бидат програмирани за инјектирање на подготвените примероци во системот за HPLC, без присуство на аналитичарот.

Колони за течна хроматографија

Постојат голем број колони за течна хроматографија, достапни во различна големина и пакување. Колоните за течна хроматографија најчесто се направени од челик, но се среќаваат и стаклени колони со дебело стакло, ограничени на притисоци од околу 600 psi. Дополнително, постојат колони изработени од полимери (на пример, полиетеретеркетон, PEEK) и колони изработени од челик обложени со стакло или PEEK.

Аналитички колони

Поголемиот број аналитички колони за течна хроматографија, имаат должина од 5-25 cm. Може да се комбинираат две или повеќе колони заедно со цел зголемување на должината, а со тоа и ефикасноста на разделувањето. Внатрешниот дијаметар на колоните најчесто иснесува од 3 до 5 mm, а големината на честици на пакувањето најчесто изнесува од 3-5 μm . Најчесто употребувана колона е со димензии од 10 до 15 cm должина, 4,6 mm внатрешен дијаметар, пакувана со честици со големина 5 μm . Колоните од овој тип генерираат 40 000 - 60 000 теоретски подови/метар (обично 10 000 теоретски подови/метар).

Во поново време се произведуваат колони со високи перформани и голема брзина на разделување, со помали димензии од погоре опишаните колони. Вакви колони може да имаат должина од 3-7,5 cm, внатрешен дијаметар од 1-4,6 mm, и се пакувани со честици со големина од 2-5 μm . Овој тип колони содржат и до 100 000 теоретски подови/метар и имаат предности во однос на брзината на анализа и минимална потрошувачка на растворувачи, што е од особена важност бидејќи за овој тип анализи се потребни растворувачи со висок степен на чистота, чија набавка и отстранување е многу скапа. Денес се достапни и микроколони со дијаметар од 0,5 - 2 mm, како и капиларни колони со дијаметар помал од 0,3 mm.

Претколони

Со цел да се продолжи животот на аналитичката колона, често пати пред колоната се поврзува кратка колона (предколона), што овозможува отстранување честички и контаминенти од растворувачите и од компонентите на примерокот, што може иреверзибилно да се врзат со стационарната фаза. Дополнително, во течната хроматографија претколониите служат за заситување на мобилната фаза со стационарната фаза, со што губитоците на растворувачот од аналитичката колона се сведени на минимум. Составот на пакувањето на претколониата треба да биде

сличен со пакувањето на аналитичката колона, големината на честичките е вообичаено поголема, за да се минимизира падот на притисокот. Кога претколоната е контаминирана, се фрла и се заменува со нова од истиот тип. На тој начин се заштитува скапата аналитичка колона.

Термостат на колоната

Голем број апликации се изведуваат на собна температура и не е неопходна контрола на температурата на колоната. Но понекогаш подобро разделување се постигнува со одржување константна температура на колоната. Најголемиот број инструменти за HPLC се опремени со грејачи на колоната што ја контролираат температурата од собна до 100-150 °C. За одредени хроматографски разделувања, одржувањето на константна температура на колоната е есенцијално за репродукцибилноста на разделувањето.

Типови материјал за пакување на колоните

Во течната хроматографија се користат два основни типа на пакување: пеликуларни честички (цврсто тело со тенка порозна обвивка) и целосно порозни честички.

На почетокот, пеликуларните честички беа изработени од сферични, непорозни стаклени или полимерни зрна со дијаметар од 30-40 μm , на чијашто површина беше нанесуван тенок порозен слој на силика, алуминиум оксид, синтетска смола од полистирен-дивинил бензен или јоноизменувачка смола. Подоцна, малите порозни микрочестички целосно ги заменија овие големи пеликуларни честички. Во последните неколку години повторно се воведуваат мали честички (до 5 μm) за разделување на протеини и на биомолекули.

Типичните порозни честички за пакување колони за течна хроматографија имаат дијаметар од 3 до 10 μm ; за дадена големина на честички, пожелна е многу тесна дистрибуција на големината на честички. Честичките се составени од силициум диоксид, алуминиум оксид, синтетска смола полистирен-дивинил бензен или јоноизменувачка смола. Најчесто пакување во течната хроматографија е силициум диоксид. Честичките од силициум диоксид се подготвуваат со агрегирање на субмикронски честички од силициум диоксид, под услови во кои се овозможува добивање поголеми честички со воедначени дијаметри. Добиените честички најчесто се обложуваат со органски филмови, поврзани хемиски или физички за нивната површина.

Детектори

Главен предизвик во развојот на течната хроматографија е подобрување на детекторот.

Идеален детектор во течната хроматографија треба да ги има следните карактеристики:

- соодветна осетливост
- добра стабилност и репродукцибилност
- линеарен одговор на аналитот
- кратко време на одговор, независно од протокот
- висока сигурност и лесно ракување
- селективен одговор
- недеструктивност кон примерокот
- минимален внатрешен волумен со цел да се намали ширењето на пикот
- компатибилни со протокот на течноста.

Типови детектори

Во течната хроматографија се употребуваат два основни типа детектори:

- детектори што одговараат на карактеристиките на мобилната фаза (индекс на рефракција, диелектрична константа, густина) што се менуваат во присуство на анализот
- детектори што одговараат на некои својства на анализот, како, на пример, апсорпција во ултравиолетиовиот (UV) или инфрацрвениот (IR) дел од спектарот, флуоресценција, дифузииската струја), што ги нема мобилната фаза.

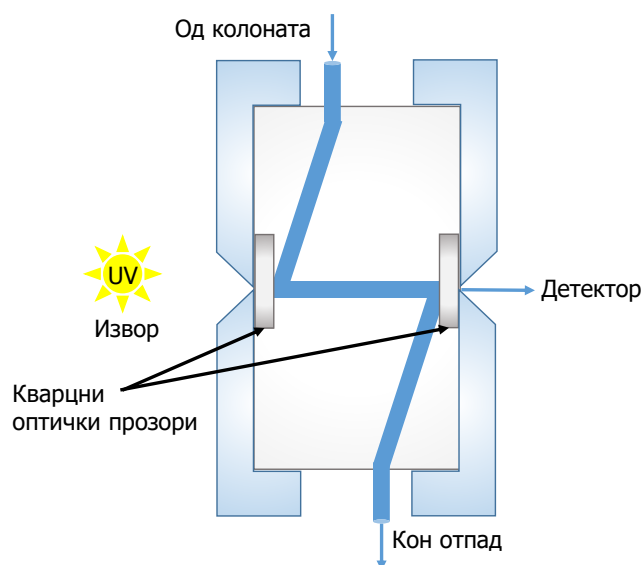
Најчесто употребуваните детектори во системите за HPLC и некои од нивните поважни својства се наведени во Табела 15.1.

Табела 15.1 Својства на детектори во системите за HPLC

HPLC детектор	Комерцијално достапен	Типичен лимит на квантификација (маса)
Апсорбанција	да	10 pg
Флуоресценција	да	10 fg
Електрохемиски	да	100 pg
Индекс на рефракција	да	1 ng
Кондуктивност	да	100 pg - 1 ng
Масен детектор	да	< 1 pg
FTIR	да	1 µg
Расејување на светлина	да	1 µg
Оптичка активност	не	1 ng
Селективен за елемент	не	1 ng
Фотојонизација	не	< pg

Детектори базирани на апсорбанција

Детекторите базирани на апсорпција во UV и видливиот дел на спектарот се најшироко употребуваните детектори во системите за HPLC. На Слика 15.5 е даден шематски приказ на типична проточна ќелија во форма на латинската буква Z, за мерење на апсорпција на елуатот од хроматографската колона. Со цел да се минимизира екстраколонскиот ширење на пиковите, волуменот на ќелијата треба да биде што е можно помал (обично од 1 до 10 µL за ќелија со должина од 2 до 10 mm).



Слика 15.5 Шематски приказ на UV детектор во систем за HPLC

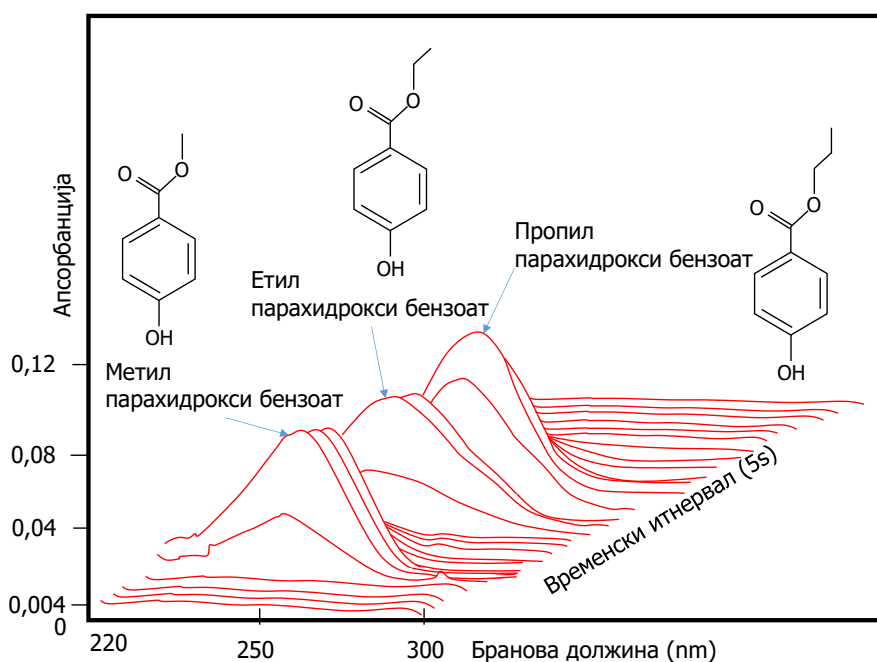
UV детектори со филтри

Најстарите UV детектори се фотометрите со филтер, што користат живина лампа како извор. Линиите на спектарот се изолираат со филтри (најчесто 245 nm, а со некои апарати со замена на филтрите се добиваат линии на 250, 313, 334 и 365 nm). Овој тип детектор е ограничен на аналити што апсорбираат на овие бранови должини.

Применувани се и детектори со деутриумова или волфрамова жица, со интерферирачки филтри за едноставно детектирање на апсорбирачките видови како што истите се елуираат од колоната. Се применуваат и инструменти што содржат повеќе подвижни филтри што може брзо да се менуваат со цел да се овозможи детектирање на различни видови според редоследот на нивно елуирање. Вакви апарати се особено корисни за повторливи, квантитативни анализи каде што квалитативниот состав на примерокот е познат, така што може однапред да се избере секвенца на соодветни филтри. Обично промените на филтрите се контролираат компјутерски. Денес детекторите со филтри комплетно се заменети со скенирачки UV детектори или со детектори со диодна низа.

UV детектори со можност за скенирање

Најголем број од производителите на системи за HPLC нудат скенирачки детектори базирани на диодна низа. Одредени детектори се ограничени само на зрачење од ултравиолетовиот дел на спектарот, а други ги опфаќаат и ултравиолетовиот дел на спектарот и видливиот дел на спектарот. Постојат повеќе можности за работа на овие детектори. На пример, целиот хроматограм може да биде снимен само на една бранова должина или дополнително, кога елуираните пикови се соодветно разделени, може да е применат различни бранови должини за секој поединечен пик. За таа цел се применува компјутерско контролирање за избор на соодветната бранова должина. Во случаи кога има потреба од снимање на целиот спектар, за идентификациски цели, протокот на елуентот може да биде стопиран за доволен период да овозможи скенирање на регионот на бранови должини од интерес.



Слика 15.6 Апсорпциски спектар на елуент од смеса на три компоненти снимен во интервал од 5 секунди

Најмоќниот UV спектрофотометриски детектор е детекторот со диодна низа (*diode array* детекторот). Одредени производители нудат ваков тип на инструменти, коишто овозможуваат собирање податоци за целиот спектар, за време од приближно една секунда. Така спектралните податоци може да се снимаат и да се чуваат за секој хроматографски пик, со негово појавување на крајот од колоната. Еден од начините на прикажување на хроматограмот, претставува и тридимензионален графикон, корисен за идентификација на видови и за избор на услови за квантитативно определување (Слика 15.6).

IR детектори

Комерцијално се достапни два типа IR детектори. Првиот е конвенционален IR детектор и снима во област од 2,5 до 14,5 μm или 4000 до 690 cm^{-1} . Вториот тип е многу пософистициран и е базиран на принцип на Фуриеровата трансформација. Келијата на IR детекторот е слична на онаа што се применува кај UV детекторите, со таа разлика што е составена од натриум хлорид или од калциум флуорид. Должината на келиите се движи од 0,2 до 1,0 mm и волумен од 1,5 до 10 μL .

Наједноставниот IR детектор може да биде управуван на едно или на повеќе местења на брановата должина, алтернативно, спектрите на пиковите може да бидат снимани со стопирање на протокот, во моментот на елуција на пикот од интерес. Детекторите базирани на принцип на Фуриерова трансформација се користат на аноген начин како и *diode array* детекторите опишани претходно.

Најголемо ограничување на употребата на IR детекторите е во малата транспарентност на голем број растворувачи. На пример, широките спектрални апсорпциски линии на водата и алкохолите во IR делот од спектарот ја оневозможува нивната примена за голем број апликации.

Исто така, употреба на водени мобилни фази може да доведе до оштетување на материјалите од коишто е изработена келијата ако не се користат специјални заштитни прозорци. Слабите лимити на детекција на голем број анализи дополнително ја ограничуваат употребата на овие детектори. Со воведување детектори базирани на масена спектрометрија, употребата на IR детекторите значително се намали.

Детектори базирани на флуоресценција

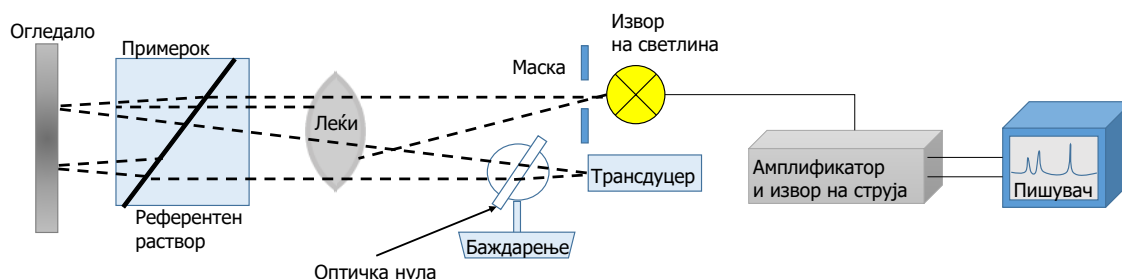
Детекторите базирани на флуоресценција имаат сличен дизајн со флуорометрите и со спектрофлуорометрите. Флуоресценцијата се набљудува со фотоелектричен детектор лоциран на 90 степени со зракот на екситација. Наједноставните детектори, користат живин извор на екситација и еден или повеќе филтри за изолирање на траката на емитираната радијација. Пософистицираните инструменти се базирани на ксенонски извор и користат монохроматор со решетка за изолирање на флуоресцентното зрачење. Се применуваат и флуоресцентните детектори, со ласерски извори, што овозможуваат поголема осетливост и селективност.

Предност на флуоресцентните методи е нивната висока осетливост, што е обично поголема од повеќе од еден ред величина во споредба со другите техники базирани на апсорпција. Оваа предност е искористена во течната хроматографија за разделување и определување компоненти од примероци што флуоресцираат. Флуоресцентни соединенија често се среќаваат во анализа на материјали, како што се: фармацевтски препарати, природни производи, клинички примероци и нафтени продукти. Често бројот на флуоресцирачки видови, може да се зголеми со претходно третирање на примероците со реагенси што формираат флуоресцентни деривати. На пример, дансилхлорид (5-диметиламинонафтален-1-сулфонил

хлорид) при реакција со примарни и со секундарни амини, аминокиселини и феноли дава флуоресцентни соединенија и има широка примена за детекција на аминокиселини во хидролизати на протеини.

Детектори базирани на индекс на рефракција

На Слика 15.7 е даден шематски приказ на диференцијален детектор базиран на индекс на рефракција.



Слика 15.7 Шематски приказ на детектор базиран на индекс на рефракција

Растворувачот поминува низ едната половина од ќелијата на пат кон колоната, а елуатот поминува низ втората половина. Двата дела од ќелијата се одделени со стаклена плоча монтирана под агол така што овозможува прекршување на упадниот зрак ако двата раствора се разликуваат во индексот на рефракција. Поместувањето на зракот во однос на фотосензитивната површина на детекторот предизвикува варијација во сигналот, што се засилува (амплифицира) и се снима како хроматограм.

Детекторите базирани на индекс на рефракција имаат значителна предност во тоа што даваат одговор од речиси сите аналити. Така тие се, главно, детектори аналогни на пламен или на термално кондуктивните детектори во гасната хроматографија. Дополнително, овие детектори се издржливи и на нив не влијае протокот. Но се температурно осетливи и мора да се одржуваат на константна температура, до неколку илјадити делови од степен Целзиусов. Дополнително, овие детектори не се осетливи како некои други типови на детектори. Овие детектори најчесто се применуваат за определување шеќери.

Испарувачки детектор со принцип на расејување на светлината (Evaporative light scattering detector - ELSD)

Принципот на ELSD се базира на расејување на светлината на примерокот преведен во пареа. Кај овој тип детектор, елуатот се внесува во распрскувач, каде што со помош на азот или воздух се преведува во фина пареа. Фините капки се носат низ носечки цевки со контролирана температура, каде што настанува испарување на мобилната фаза, што води до формирање фини честички од аналитот. Облакот од честички на аналитот поминува низ ласерски зрак. Расеаното зрачење се детектира со силиконска фотодиода.

Голема предност на овие детектори е во тоа што одговорот е речиси ист за сите неиспарливи аналити. Дополнително, овој тип детектор е значително поосетлив од детекторот базиран на индекс на рефракција, со лимит на детекција 0,2 ng/ μ L. Недостаток на овој детектор е ограничувањето на мобилни фази со испарливи компоненти.

Електрохемиски детектор

Моментално постојат повеќе типови електрохемиски детектори, базирани на амперометрија, поларографија, кулометрија и кондуктометрија. Иако електроаналитичките детектори не се искористени до таа мера како и оптичките детектори, тие даваат одредени предности, во многу случаи, висока осетливост, едноставност и широка применливост.

Детектори базирани на масена спектрометрија

Комбинацијата од течна хроматографија (LC) и масена спектрометрија (MS) претставува идеална комбинација за разделување и детекција. Масената спектрометрија може многу да помогне во идентификација на компонентите што се елуираат од хроматографската колона.

Основен проблем при поврзување на течна хроматографија со масена спектрометрија е огромното несовапаѓање помеѓу релативно големиот волумен на растворувач од течната хроматографија и вакуум потребите на масениот спектрометар. За разрешување на овие проблеми, развиени се повеќе уреди. Најпопуларен пристап за решавање на овој проблем е примената на техника на јонизација под атмосферски притисок на мали протоци на мобилна фаза.

Комбинацијата на HPLC со масена спектрометрија овозможува висока селективност, бидејќи овозможува изолирање неразделени пикови со мониторирање само на селектирана молекулска маса. LC/MS овозможува недвосмислена идентификација („отпечатоци на прсти“) на елуатот, во споредба со идентификацијата преку ретенциското време во конвенционалната HPLC. Комбинацијата од овие две техники дава податоци за молекулската маса, структурни информации и точна квантитативна анализа на анализот.

За одредени комплексни смеси комбинацијата од LC и MS не дава соодветно решение. За таа цел во последните неколку години се применува поврзување два или повеќе масени спектрометри (LC/MS/MS). Овие инструменти се наречени тандем-системи и се најчесто троен квадрипол масени системи или квадрипол јонска замка спектрометри. За подобра резолуција се комбинираат и квадрипол анализатор со време на лет анализатор (TOF). Можно е поврзување и на масени спектрометри со магнетен анализатор или поврзување јонска замка системи со циклотрон резонантна јонска замка на принцип на Фуриерова трансформација (FTICR). LC/MS системите се компјутерски контролирани.

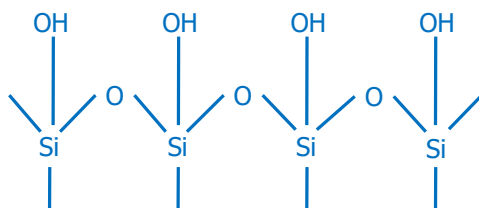
Партициска хроматографија

Партициската хроматографија е најшироко употребуван тип хроматографија, чиј принцип се базира на течна стационарна фаза што не се меша со мобилната фаза. Во минатото, најголем број од апликациите на партициската хроматографија беа ограничени на нејонски, поларни соединенија со ниска до средна молекуларна маса (обично <3000). Поновите методи со дериватизација и јонски парови ја проширија примената на партициската хроматографија и на разделување јонски соединенија.

Партициската хроматографија е поделена на течно-течна и хроматографија на врзана фаза. Разликата помеѓу двата типа хроматографија е во начинот на кој стационарната фаза се држи за честичките од пакувањето. Во течно - течната хроматографија, стационарната фаза се задржува на површината на стационарната фаза преку физичка адсорпција. Во хроматографијата на врзаната фаза - стационарната фаза, хемиски е врзана за честичките. Во поново време хроматографијата на врзана фаза ја заменува течно-течната хроматографија.

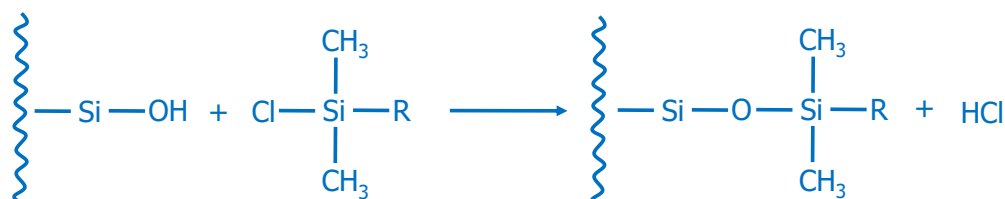
Колони за хроматографија на врзана фаза

Честичките што служат како подлога за врзаната фаза во поголемиот број колони се направени од цврсти материјали, составени од ригиден силициум диоксид или се базираат на силициум диоксид. Овие честички се формираат како воедначени, порозни, механички отпорни честички, со дијаметар од 1,5 до 10 μm (најчесто се применуваат честички со димензии од 3 до 5 μm). Површината на целосно хидролизираниот силициум диоксид (со загревање со 0,1 М НСl за време од еден или два дена) се состои од хемиски реактивни силанолни групи (Слика 15.8). Типична површина на силициум диоксид содржи 8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ОН групи.



Слика 15.8 Хемиски реактивни силанолни групи

Најчесто употребувани материјали за врзаната фаза се силоксаните (Слика 15.9), што се формираат со реакција на хидролизираната површина со органохлорсилани со различна група R (алкил група или супституирана алкил група).



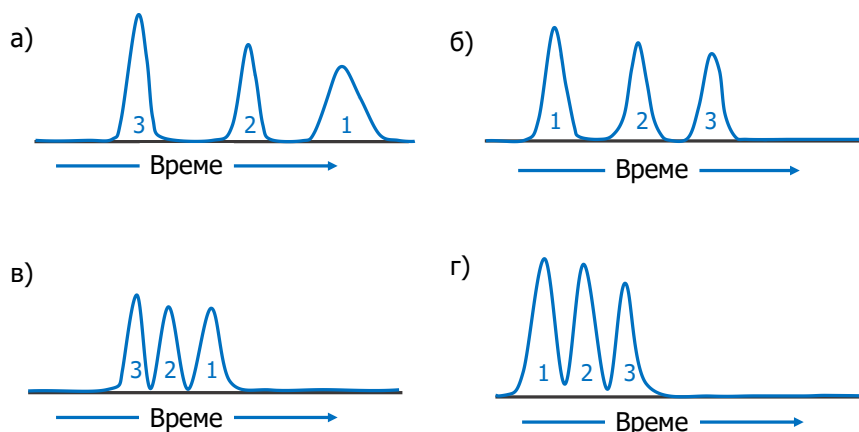
Слика 15.9 Добивање силоксани

Површината покриена со силанизација е ограничена на 4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ или помалку поради стерни ефекти. Неизреагираните силанолни групи даваат непожелна поларност на површината на стационарната фаза, што може да доведе до развлекување на пиковите, особено кога се работи за базни супстанции. Со цел да се намали овој ефект, пакувањата се покриваат со понатамошна реакција со хлоротриметилсилан, што како помала молекула може да се врзе со неизреагираните силанолни групи.

Пакувања со нормално-фазна и реверзно-фазна стационарна фаза

Постојат два типа партициска хроматографија, врз основа на релативната поларност на мобилната и на стационарната фаза. Во нормално-фазната хроматографија, стационарната фаза е поларна. На пример, вода или триетилен гликол нанесени на честички од силициум диоксид или алуминиум диоксид, или R групата на силоксаните е супституирана со цијано ($-\text{C}_2\text{H}_4\text{CN}$), диол ($-\text{C}_3\text{H}_6\text{OCH}_2\text{CHONCH}_2\text{OH}$), amino ($-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$) или диметиламино група ($-\text{C}_3\text{H}_6\text{N}(\text{CH}_3)_2$), а мобилната фаза е релативно неполарен растворувач (на пример, n-хексан, етилетер, хлороформ или изопропилетер). Поларноста на материјалите за пакување варира значително (цијано групата е најмалку поларна, а аминокрупата е најполарна). Во реверзно-фазната хроматографија, стационарната фаза е неполарна (најчесто јагледород: октил C8, или октадецил C18), а мобилната фаза е релативно поларна (на пример, вода, метанол или ацетонитрил).

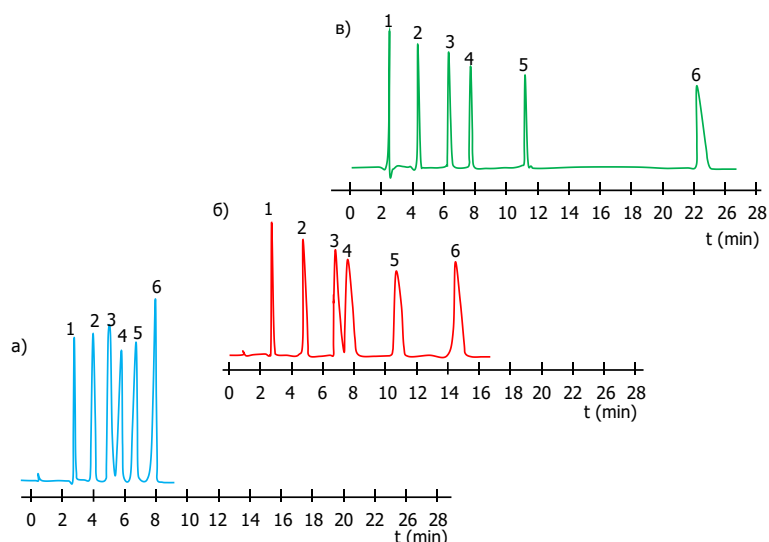
Во нормално-фазната хроматографија, прва се елуира најмалку поларната компонента, бидејќи е најмногу растворлива во мобилната фаза; со зголемување на поларноста на мобилната фаза, се намалува времето на елуирање. Спротивно на тоа во реверзно-фазната хроматографија најполарните компоненти се појавуваат први во хроматограмот и со зголемување на поларноста на мобилната фаза се зголемува времето на елуирање (Слика 15.10). Според прикажаното на сликата, може да се заклучи дека постои значително поклопување во начинот на ретенција на анализот помеѓу нормално-фазната хроматографија и адсорпциската хроматографија.



Слика 15.10 Поврзаност помеѓу поларноста на анализот (поларност $1 > 2 > 3$) и времето на елуирање за: а) нормално-фазна хроматографија со мобилна фаза со мала поларност, б) реверзно-фазна хроматографија со мобилна фаза со висока поларност, в) нормално-фазна хроматографија со мобилна фаза со средна поларност и г) реверзно-фазна хроматографија со мобилна фаза со средна поларност.

Околу три четвртини од сите HPLC методи се базираат на реверзно-фазна хроматографија. Најголема предност на реверзно-фазната хроматографија во однос на другите типови е во тоа што во состав на мобилната фаза може да се користи водата, како евтин, нетоксичен и UV-транспарентен растворувач, компатибилен со биолошките течности. Исто така, трансферот на маса е брз во неполарна стационарна фаза, а исто така и еквилибрацијата по градиентно елуирање. Механизмот со кој површината на полнењето на реверзно-фазните колони ги задржува молекулите на анализот, е комплексен и е поразличен од партиционирањето помеѓу две течности и сè уште не е доволно разјаснет.

На Слика 15.11 прикажано е влијанието на должината на ланецот на алкил групата од стационарната фаза, на перформансите на разделувањето на смеса. Подолг ланец, овозможува подобра ретенција на компонентите од смесата и овозможува употреба за разделување поголеми примероци (повеќе компоненти).



Слика 15.11 Влијание на должината на ланецот на реверзно-фазна силиксан стационарната фаза со големина честици од 5 μm , пакувана во колона: а) R=метил б) R = октил в) R=октадецил за разделување на смеса од 1. Урацил, 2. Фенол, 3. Ацетофенон, 4. Нитробензен, 5. Метил бензоат, 6. Толуен. Како мобилна фаза користена е смеса од метанол/вода (50/50, V/V) со проток од 1 mL/min.

Во поголемиот број апликации, елуирањето се спроведува со примена на високополарни мобилни фази, како што се водените раствори со различна концентрација на растворувачи од типот на метанол, ацетонитрил или тетраhydroфуран. Притоа треба да се внимава рН вредноста на мобилната фаза да не надмине 7,5, бидејќи може да настане хидролиза на силиксаните, што може да доведе до деградација на пакувањето.

Развој на метод во партициската хроматографија

Развојот на метод во течната хроматографија е многу покомплексен во споредба со гасната хроматографија, бидејќи во течна мобилна фаза, компонентите од примерокот стапуваат во интеракција и со стационарната фаза и со мобилната фаза. Спротивно во гасната хроматографија, мобилната фаза се однесува како идеален гас и не влијае на процесот на разделување, служи само за да ги носи компонентите на примерокот низ стационарната фаза. Во гасната хроматографија, за разделувањето незначителна е разликата дали мобилната фаза е хелиум, азот или водород. Спротивно, успехот на разделувањето во партициската хроматографија критично зависи од составот на мобилната фаза (ацетонитрил, хексан или диоксан).

Избор на колона во партициската хроматографија

За успешна хроматографија со интерактивна мобилна фаза, потребна е соодветна рамнотежа на интермолекуларните сили помеѓу трите активни учесници во процесот на разделување: анализот, мобилната фаза и стационарната фаза. Овие интермолекулски сили зависат од релативната поларност на трите реактанти. Поларноста на различни функционални групи на анализот расте според следниот редослед: јаглеводороди < етри < естри < кетони < алдехиди < амиди < амини < алкохоли. Водата е пополарна од сите соединенија што содржат која било од овие функционални групи.

При избор на колона во партициската хроматографија, поларноста на стационарната фаза се совпаѓа со поларноста на анализот. Во тој случај за елуција

се користи мобилна фаза со значително различна поларност. Оваа постапка е многу поуспешна отколку кога анализот има слична поларност со мобилната фаза, а различна со стационарната фаза. Тогаш стационарната фаза не може успешно да конкурира за компонентите од примерокот, времињата на ретенција би биле премногу мали за практична апликација. Од друга страна, кога поларноста на анализот се совпаѓа премногу со поларноста на стационарната фаза, а многу е различна од поларноста на мобилната фаза, времињата на ретенција би биле премногу големи.

Поларноста на анализот, мобилната фаза и на стационарната фаза треба да бидат внимателно комбинирани за да се добие добра партициска сепарација, за прифатливо време на анализа. За жал теориите за интеракција помеѓу мобилната и стационарната фаза, со сет од компоненти на примерокот не се идеални, и во најдобар случај, научниците може само да го стеснат изборот на стационарна фаза на генерален тип. Откако еднаш ќе се направи изборот, може да се спроведат серија од испитувања, со различни мобилни фази, додека да се добие задоволително разделување. Доколку резолуцијата на сите компоненти од смеса, се покаже дека не е задоволителна, се одбира друг тип колона.

Избор на мобилна фаза во партициската хроматографија

Во течната хроматографија, факторот на ретенција (k') зависи од составот на мобилната фаза. За оптимални перформанси k' треба да биде помеѓу 2 и 5, за комплексни смеси овој опсег често може да се прошири од 0,5 до 20, со цел да се овозможи време за да се појават пиковите од сите компоненти.

Понекогаш прилагодувањето на k' не е доволно само по себе за разделување пикови и тогаш мора да се внимава и на факторот на селективност (α). Наједноставен начин на промени во α е да се промени составот на мобилната фаза, притоа да се внимава k' да биде во соодветен опсег. Алтернативно, α може да се промени со промена на типот на пакување на колоната.

Влијание на јачината на растворувачот на факторот на ретенција

Растворувачи што покажуваат силна интеракција со анализот често се нарекуваат „силни“ растворувачи, што најчесто, но не секогаш, се поларни растворувачи. Јачината на растворувачите зависи од природата на анализот и од стационарната фаза. Развиени се неколку индекси за да се опише квантитативно поларноста на растворувачите. Најчесто употребуван индекс во партициската хроматографија е индекс на поларност (P'), развиен од страна на Снајдер (*Snyder*). Овој параметар е базиран на мерењата на растворливост на супстанција од интерес во три растворувачи: диоксан (слаб дипол протон акцептор), нитрометан (силен дипол протон акцептор) и етил алкохол (силен дипол протон донор). Индексот на поларност е нумеричка вредност за релативната поларност на различни растворувачи. Индексот на поларност варира од 10,2 за водата што има висока поларност и -2 за флуороалканите како високонеполарни растворувачи. Бараниот индекс на поларност може да се добие со мешање на два соодветни растворувачи. Индексот на поларност P'_{AB} на смеса од растворувачи А и В е даден со следната равенка:

$$P'_{AB} = \phi_A P'_A + \phi_B P'_B \quad (15.2)$$

каде што P'_A и P'_B се индексите на поларност за двата растворувачи, а ϕ_A и ϕ_B се нивните волуменски фракции.

Еден од најлесните начини да се подобри хроматографското разделување на две компоненти е преку манипулирање со факторот на ретенција k , што може

да варира со промена на индексот на поларност на растворувачот. Местењето на P' лесно се постигнува со примена на мобилна фаза што се состои од смеса од два растворувача. Обични промена на P' за 2 единици, доведува до промена во k за 10 пати (грубо). За нормално фазна сепарација:

$$\frac{k_2}{k_1} = 10^{(P'_1 - P'_2)/2} \quad (15.3)$$

каде што k_1 и k_2 се иницијалната и конечната вредност на k за анализот и P'_1 и P'_2 се соодветните вредности за P' .

За реверзно-фазна колона:

$$\frac{k_2}{k_1} = 10^{(P'_2 - P'_1)/2} \quad (15.4)$$

Често при реверзно-фазно разделување, како растворувач се применува смеса од вода и поларен органски растворувач. Факторот на ретенција, тогаш се манипулира преку варирање на концентрацијата на вода.

Влијание на мобилната фаза на селективноста

Во голем број случаи, местењето на k до соодветно ниво, е единствено нешто што е потребно за да се добие задоволително разделување. Во случај кога сè уште има преклопување на два пика, треба да се зголеми факторот на селективност α на двете компоненти. Ваква промена може да се добие наједноставно преку промена на хемиската природа на мобилната фаза, притоа вредностите за k' да останат повеќе или помалку исти.

За реверзно-фазната хроматографија, за добивање систем од растворувачи што теоретски ќе ја разделат смесата за минимално време, развиена е оптимизирачка постапка наречена триаголник на селективноста на растворувачите. Се претпоставува дека ефектите на мобилната фаза што придонесуваат за селективноста се протон донор, протон акцептор и диполарни интеракции. Растворувачи што вклучуваат ваков тип интеркации се одбираат за статистичко дизајнирање на експерименти со цел да се најде оптимална смеса на растворувачи.

За местење на вредностите на α во реверзно-фазната хроматографија, се применуваат три компатибилни растворувачи. Тука се вклучени метанол, ацетонитрил и тетраhydroфуран. Водата се користи за местење на јачината на смесата за да се добие соодветна вредност за k' .

За нормално фазна хроматографија се користи сличен систем на триаголник на растворувачи, каде што селективни растворувачи се етил етер, метилен хлорид и хлороформ, а јачината на растворувачот се мести со *n*-хексан.

Со примена на овие системи на растворувачи оптимизацијата се постигнува со минимален број на експерименти.

Примена на партициската хроматографија

Реверзно-фазните пакувања во комбинација со растворувачи со висока поларност (најчесто водени) се доближува до идеален, универзален систем за течна хроматографија. Поради широкиот опсег на применливост, погодност и лесното манипулирање со вредностите на k' и α , во водени мобилни фази, овие комбинации често се применуваат за анализа на нови типови на примероци.

Формирање деривати

Во одредени случаи, корисно е да се претворат компонентите од примерокот во деривати пред или по хроматографското разделување. Ова може да биде

пожелно да се намали поларноста на примероците, со цел да се овозможи примена на партициски колони, а не атсорпциски или јоно-изменувачки колони, да се зголеми одговорот на детекторот, а со тоа и осетливоста за сите компоненти на примерокот, како и селективно да се зголеми одговорот на детекторот за одредени компоненти на примерокот.

Хроматографија на јонски парови

Хроматографијата на јонски парови (*ion-pair chromatography*) е тип на реверзно-фазна партициска хроматографија, што се користи за разделување и определување јонски видови. Мобилната фаза во хроматографијата на јонски парови се состои од воден пуферски раствор што содржи органски растворувач (метанол или ацетонитрил) и јонско соединение што содржи каунтер јон од спротивен полнеж на анализот (органска сол што содржи голем каунтер јон како што е кватернерен амониум јон или алкил сулфонат). Каунтер јонот е јон што се групира со анализот и формира јонски пар, неутрален вид, што се задржува на реверзно-фазно пакување. Најголем број од каунтер јоните содржат алкил групи со цел да се зголеми ретенцијата на резултирачкиот јонски пар на неполарна стационарна фаза. Елуцијата на јонските парови се постигнува со воден раствор на метанол или друг органски растворувач растворлив во вода.

Примената на хроматографијата на јонски парови, често се поклопува со примената на јоноизменувачката хроматографија. За разделување мали неоргански и органски јони, предност има јоноизменувачката хроматографија, освен ако не е проблем селективноста. Пример за подобро разделување со примена на хроматографијата на јонски парови во однос на јоноизменувачката хроматографија е анализа на смеса што содржи хлоратен и нитратен јон. За овие анализи селективноста во јоноизменувачката хроматографија е многу мала, додека разделувањето со формирање на јонски пар е одлично. За големите јони, резолуцијата во јоно-изменувачкото разделување е намалена, поради тоа што јоно-изменувачките смоли имаат густа внатрешна мрежа што го намалува процесот на трансфер на маса со последователно губење на ефикасноста. За површинските активни материји, хроматографијата на јонски парови е метод од избор не само поради големината на јоните, туку и поради нивниот голем афинитет кон јонските изменувачи, што го отежнува нивното елуирање.

Хроматографија на хирална стационарна фаза

Хиралните стационарни фази се применуваат за разделување на хирални компоненти (енантиомери). За разделување енантиомери може да се користат хирални стационарни фази или мобилни фази со хирални супстанции. Комплексирањето на хиралниот агенс за разделување (хиралниот агенс во мобилната фаза или хирална стационарна фаза) и еден од изомерите во испитуваниот примерок резултира во разделување на енантиомерите. Во хиралните стационарни фази, хиралниот агенс е имобилизиран на цврста подлога (најчесто полимерен материјал со поврзан оптички активен изомер, нанесени на честички од силика гел).

Атсорпциска хроматографија

Атсорпциската или течно-цврста хроматографија е класична форма на течна хроматографија, за прв пат воведена од Цвет (*Tswett*) на почетокот на дваесеттиот век.

Стационарна фаза што се користи во течна цврста HPLC, е фино спрашен силициум диоксид (силика) и алуминиум оксид, при што силиката има поголема примена, поради поголемиот капацитет и поширокиот опсег на корисни форми.

Избор на растворувач за атсорпциска хроматографија

Во течна-течната хроматографија, единствена променлива вредност за оптимизација на k' и α е составот на мобилна фаза (спротивно од партициската хроматографија каде пакувањето на колоната има изразен ефект на α). За среќа, во атсорпциската хроматографија, големи варијации во резолуцијата и ретенциското време, ги придружуваат варијациите во системот од растворувачи и ретко се случува да не се најде соодветна мобилна фаза.

Јачина на растворувачот

Индексот на поларност P' може да послужи како груб водич за јачината на растворувачите за атсорпциска хроматографија. Подobar индекс е јачина на елуентот ε^0 , што претставува атсорпциска енергија на единица површина од растворувач. Овој параметар зависи од атсорбенсот.

Избор на систем од растворувачи

Техниката за избор на систем од растворувачи за атсорпциска хроматографија слична на онаа во партициска хроматографија. Се одбираат два компатибилни растворувачи, едниот е со голема јачина, а другиот е многу слаб. Соодветна вредност за k' се добива со варирање на волуменските односи на двата растворувача.

Покажано е дека со зголемување на вредноста на ε^0 за 0,05 единици се намалуваат сите вредности на k' за фактор 3 до 4. Во тој случај се можни огромни варијации на k' и некои бинарни системи може да дадат соодветни времиња на ретенција за речиси сите примероци. ε^0 не варира линеарно со промена на односот на волумените, како што е случај со P' во партициската хроматографија. Затоа пресметувањето на оптимална смеса е многу потешко. При појава на пикови што се преклопуваат, замената на еден јак растворувач со друг, а при тоа k' да се одржува помалку или повеќе константна, ќе доведе до промена на вредностите на α и ќе ја даде бараната резолуција.

Примена на атсорпциската хроматографија

Атсорпциската хроматографија има примена за анализа на неполарни соединенија со молекулска маса помала од 5000. Иако постои некое преклопување помеѓу атсорпциската и партициската хроматографија, методите се комплементарни.

Течно-цврстата хроматографија е најпогодна за примероци растворливи во неполарни растворувачи и соодветно имаат ограничена растворливост во водени растворувачи, како што се оние што се користат во реверзно-фазната партициска хроматографија.

Со оваа постапка се овозможува разделување на соединенија со различни видови и број функционални групи. Посебна особина на атсорпциската хроматографија, што другите типови на хроматографија ја немаат е можноста да се разликуваат соединенија од изомерни смеси.

Јоноизменувачка хроматографија

Јоноизменувачката хроматографија, или јон-хроматографија се однесува на модерни и ефикасни методи за разделување и определување јони, базирано на јоно-изменувачки смоли.

Процесот на разделување во јоноизменувачката хроматографија се базира на рамнотежата на размена на јоните во раствор и јоните со ист знак на површината на есенцијално нерастворлива цврста супстанција со висока молекулска маса. Најчести активни места за катјон-изменувачки смоли се групите на сулфонска киселина $-\text{SO}_3^-\text{H}^+$, јака киселина и групата на карбоскилна киселина $-\text{COO}^-\text{H}^+$, слаба киселина. Анјонските изменувачи содржат силно базни терцерни амински групи $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$ или слабо базните примарни амински групи $-\text{NH}_3^+\text{OH}^-$.

Мобилната фаза во јоноизменувачката хроматографија мора да има исти општи својства како и за сите итпови на хроматографија. Мобилната фаза мора да го раствора примерокот, да има јачина што ќе овозможи добивање на разумни ретенциони времиња и да покажува интеракција со растворените супстанции од примерокот, со цел да се овозможи задоволителна селективност. Мобилната фаза во јоноизменувачката хроматографија е воден раствор што може да содржи умерени количини на метанол или други органски растворувачи што се мешаат со вода, како и јонски видови во форма на пуфери. Јачината на растворувачот и селективноста се определени од видот и концентрацијата на додадените составни компоненти. Јоните на мобилната фаза компетитивно со аналитот се врзуваат за активните места на јоноизменувачката стационарна фаза.

Гел-хроматографија (*Size-exclusion chromatography*)

Гел-хроматографијата е можна техника за разделување компоненти со голема молекулска маса. Пакувањата за овој тип хроматографија се состојат од мали ($\sim 10 \mu\text{m}$) честички од силициум диоксид (силика) или од полимер, во коишто молекулите на аналитот и на растворувачот може да дифундираат. Кога ќе се најдат во порите на честичките од гелот, молекулите се заробуваат и се отстрануваат со протококот на мобилната фаза. Просечното време на задржување во порите на гелот на аналитот, зависи од ефективната големина на молекулите на аналитот. Молекулите што се поголеми од големината на порите на гелот се исклучени, не се задржуваат во порите, и први се елуираат. Молекулите со дијаметар значително помал од дијаметарот на порите на гелот може да пенетрираат во порите и остануваат заробени подолго време и најмалите молекули последни се елуираат од колоната. Помеѓу овие два екстреми, молекулите со средна големина, се задржуваат во порите во зависност од нивните дијаметри. Разделувањето е поврзано со големината на молекулите и до одреден степен со обликот на молекулите. Овој тип хроматографија се разликува од другите по тоа што при разделувањето нема никаква физичка ниту хемиска интеракција на аналитот со стационарната фаза. Напротив, каква било интеракција може да доведе до намалување на ефикасноста на разделувањето.

Хроматографијата базирана на хидрофилно пакување (дивинил бензени или полиакриламиди) и водени мобилни фази се нарекува гел-филтрација, додека хроматографијата базирана на хидрофобно пакување (вкрстено поврзани кополимери на стирен дивинилбензен) и неполярни мобилни фази се нарекува гел-пермеација. Гел-филтрацијата и гел-пермеацијата се комплементарни во тоа што гел-филтрацијата се применува за примероци растворливи во вода, а гел-пермеацијата се применува за супстанции растворливи во помалку поларни органски растворувачи. Гел хроматографијата се применува за разделување молекули со голема молекулска маса како што се протеините.

ГАСНА ХРОМАТОГРАФИЈА

Принципот на гасната хроматографија се базира на елуирање на примерокот (инјектиран во главата на хроматографската колона по преведување во гасовита состојба-испарување) со проток на мобилна фаза од инертен гас. За таа цел со гасна хроматографија можно е разделување само на испарливи примероци. За разлика од повеќето типови хроматографии, мобилната фаза не стапува во интеракција со молекулите на анализот, туку само служи за транспорт на анализот низ колоната. Постојат два типа гасна хроматографија: **гасно-цврста хроматографија** и **гасно-течна хроматографија**. Гасно-течната хроматографија наоѓа широка употреба во сите полиња на науката, при што името вообичаено е скратено на **гасна хроматографија**.

Гасно-цврстата хроматографија се базира на употреба на цврста стационарна фаза кај којашто ретенцијата на анализите е последица на физичка адсорпција. Гасно-цврстата хроматографија има ограничена примена поради непостојаната ретенција на активни или на поларни молекули и големи опашки на елуираните пикови (последица на нелинеарниот карактер на адсорпцискиот процес). Така, оваа техника нема широка примена, освен за разделување на одредени гасовити компоненти со мала молекулска маса.

Гасно-течната хроматографија се базира на распределување на анализот помеѓу гасната мобилна фаза и течната фаза имобилизирана на површината на инертна цврста подлога. Концептот на гасно-течната хроматографија прв пат е воведен во 1941 година од Мартин и Синг (*Archer J.P. Martin & Richard L.M. Synge*), кои воедно беа одговорни и за развојот на течна-течната партициска хроматографија. Значењето на примената на гасно-течната хроматографија е потврдено по повеќе од една декада, а првиот гасен хроматограф е произведен во 1955 година. Од тогаш, постојано се зголемуваат можностите за примена на оваа техника.

Принцип на гасно-течна хроматографија

За гасната хроматографија важат општите принципи за хроматографија, со мали модификации од аспект на компресибилноста на гасната мобилна фаза.

Волумени на ретенција

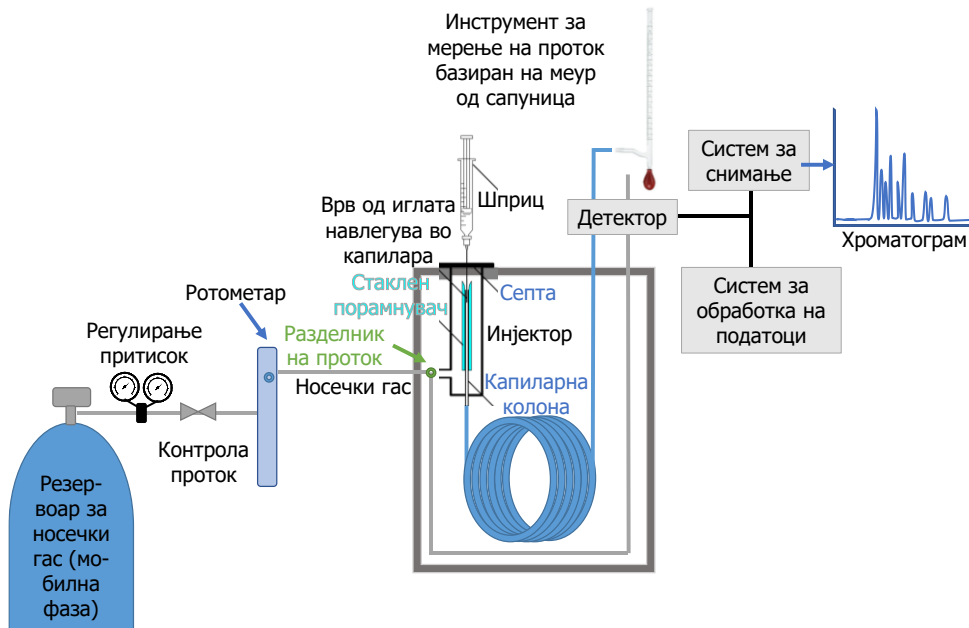
Во гасната хроматографија, најчесто се употребува поимот волумен на ретенција, наместо време на ретенција, за да се земат предвид ефектите на притисокот и температурата. Односот помеѓу овие два поима е претставен со равенките:

$$V_R = t_R F \quad (16.1)$$

и

$$V_M = t_M F \quad (16.2)$$

каде што F е просечен волуметриски проток (проток изразен како волумен на гас) во колоната, V и t претставуваат волумен на ретенција и време на ретенција, соодветно, а индексите се однесуваат на компоненти што се задржуваат (R) и компоненти што не се задржуваат (M) на колоната. Просечната брзина на протокот не е директно мерлива величина, но наместо тоа експериментално се мери брзината на гасот што поминува низ колоната. Оваа брзина се мери со мерен инструмент базиран на меур од сапуница (Слика 16.1).



Слика 16.1 Шематски приказ на гасен хроматограф

Просечната брзина на протокот потоа се пресметува со равенката:

$$F = F_m \times \frac{T_c}{T} \times \frac{(P - P_{H_2O})}{P} \quad (16.3)$$

каде што T_c е температура во колоната изразена во келвини, T е температура во мерниот инструмент, F_m е измерената брзина на протокот, а P е притисокот на гасот на крајот од колоната. Вообичаено, P и T се амбиенталните притисок и температура. Во мерниот инструмент базиран на меур од сапуница, гасот станува заситен со вода. Така, притисокот мора да се коригира за парниот притисок на водата P_{H_2O} .

V_R и V_M зависат од просечниот проток во колоната, вредност што се наоѓа помеѓу притисоците на влез од колоната P_i и на излез од колоната P (атмосферски притисок). Фактор на корекција за падот на притисокот j се користи за да се предвиди фактот дека притисокот во колоната претставува нелинеарна функција од односот P_i/P .

Коригираните волумени на ретенција V_R^0 и V_M^0 , што одговараат на волумените за просечниот притисок во колоната, се добиваат од равенките:

$$V_R^0 = j t_R F \text{ и } V_M^0 = j t_M F \quad (16.4)$$

каде што j може да се пресмета од равенката:

$$j = \frac{3[(P_i/P)^2 - 1]}{2[(P_i/P)^3 - 1]} \quad (16.5)$$

Специфичниот волумен на ретенција V_g се дефинира со равенката:

$$V_g = \frac{V_R^0 - V_M^0}{W} \times \frac{273}{T_c} = \frac{jF(t_R - t_M)}{W} \times \frac{273}{T_c} \quad (16.6)$$

каде што W претставува маса на стационарната фаза, величина определена за време на производство на колоната, а T_c е температура на колоната изразена во Келвини.

Однос помеѓу V_g и K

За да се направи однос помеѓу V_g и константата на дистрибуција K , потребно е да се изрази k' од равенките за t_R и t_M (равенка 13.11 од поглавјето за општи принципи на хроматографијата) и да се замени во равенката (16.6), со што се добива:

$$V_g = \frac{jFt_M k'}{W} \times \frac{273}{T_c}$$

Со комбинирање на оваа равенка во равенката (16.4), се добива:

$$V_g = \frac{V_M^0 k'}{W} \times \frac{273}{T_c}$$

Со замена на равенката (13.8) за k' , (овде V_R^0 и V_M^0 се идентични), се добива:

$$V_g = \frac{KV_s}{W} \times \frac{273}{T_c}$$

Густината ρ_s на течнота имобилизирана во стационарната фаза е дадена со:

$$\rho_s = \frac{W}{V_s}$$

оттука:

$$V_g = \frac{K}{\rho_s} \times \frac{273}{T_c} \quad (16.7)$$

Потребно е да се забележи дека V_g на дадена температура зависи само од константата на распределба на растворената супстанција и од густината на течнота од стационарната фаза. Во принцип, тоа е корисен параметар за идентификација на компоненти. Во литературата постојат голем број специфични волумени на ретенција, но за жал овие податоци не се систематизирани и се често несигурни.

Ефект на брзина на проток на мобилна фаза

Равенката 13.22, како и равенките дадени во Табела 13.3 во поглавјето за општи принципи на хроматографијата, во целост се применливи и за гасна хроматографија. Лонгитудиналната дифузија (B/u) е поважен поим кај гасната хроматографија, отколку кај другите хроматографски процеси, поради многу поголемите брзини на дифузија кај гасовите (10^4 пати поголеми отколку кај течности). Како последица, минимумот на кривата на зависност помеѓу висината на теоретските подови N и брзината на протокот, вообичаено е поширок кај гасната хроматографија (види Слика 13.7 и Слика 13.10 од поглавјето за општи принципи на хроматографијата).

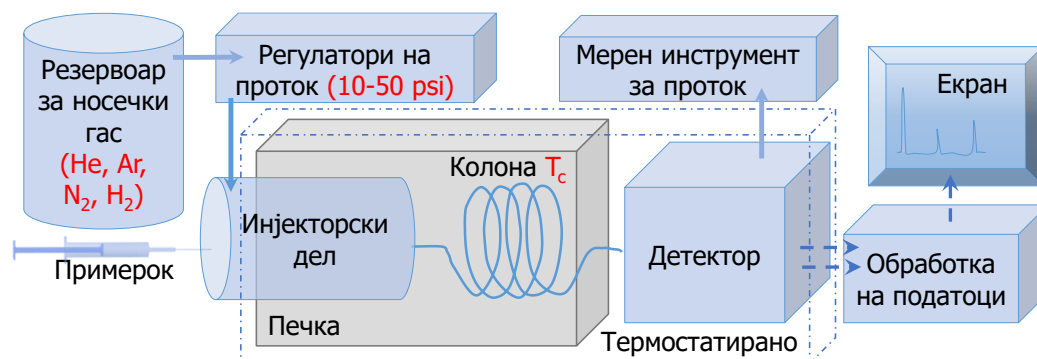
Инструменти за гасно-течна хроматографија

Основните компоненти на гасен хроматограф се прикажани на Слика 16.2. На сликата се гледа дека протокот на гасот се дели пред да влезе во колоната. Ова се применува само доколку се употребува детектор што мери промена на својствата на гасното струење во присуство на молекулите на анализот. Со други типови на детектори, вообичаено не се употребуваат разделувачи на гасниот проток.

Снабдување со носечки гас

Вообичаено носечки гасови (што мора да бидат хемиски инертни) се хелиум, азот, водород и аргон. Изборот на гас често е одреден од типот на детекторот што

се употребува. Во системот за снабдување со носечки гас се вклучени регулатори на притисок, мерачи на проток, а често и молекуларно сито за отстранување вода или други онечистувања.

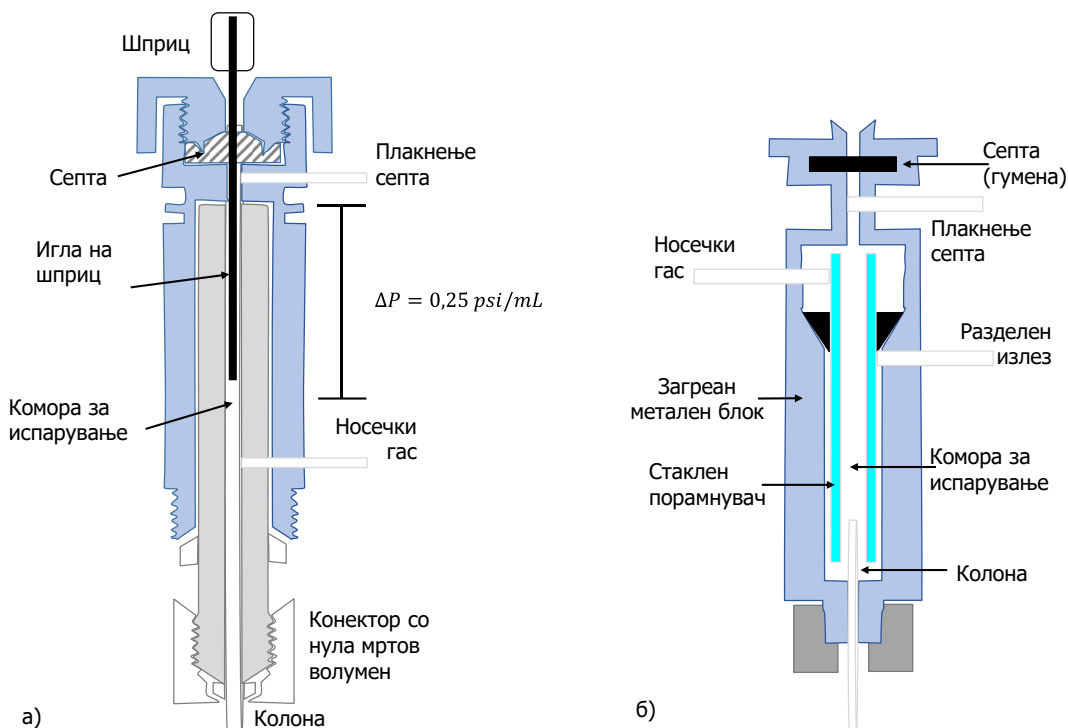


Слика 16.2 Шематски приказ на составни елементи на гасен хроматограф

Протокот вообичаено се контролира со регулатор на притисок на две нивоа кај цилиндарот за гас и кај регулаторот на притисок во хроматографот. Влезниот притисок обично изнесува од 10 до 50 psi (над собниот притисок), што дава проток од 25 до 150 mL/min кај пакуваните колони и 1 до 25 mL/min за отворено-тубуларни капиларни колони. Општо, се претпоставува дека протокот ќе биде константен, доколку влезниот притисок е константен. Протокот може да се одреди со ротометар на главата од колоната, но овој уред не е прецизен колку и едноставниот мерен инструмент базиран на меур од сапуница, лоциран на крајот од колоната (прикажано на Слика 16.1). Модерните комерцијални гасни хроматографи се опремени со електронски сензори, како и мерачи на проток, што се контролираат со компјутер за да се одржи протокот на саканата вредност.

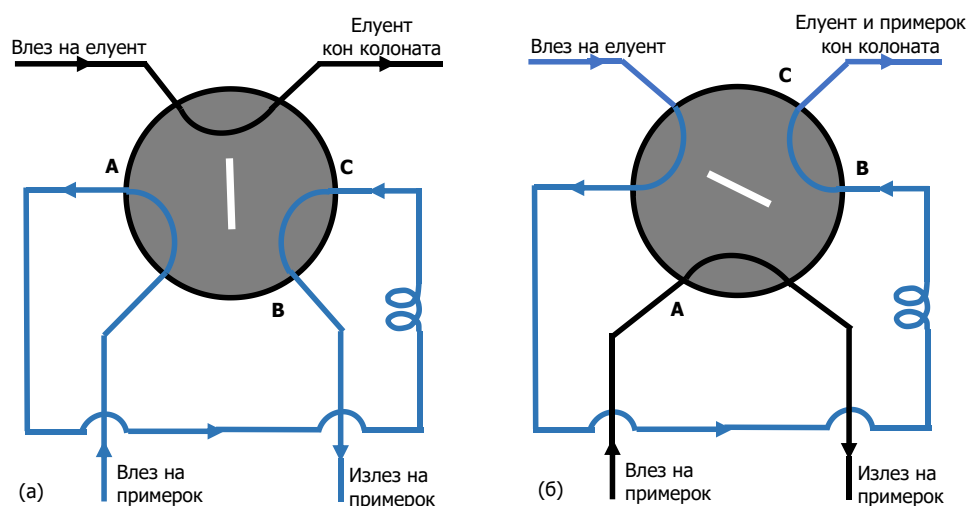
Систем за инјектирање на примерокот

За добра ефикасност на колоната потребно е примерокот да биде со соодветна големина и внесен во облик на „чеп“ од пареа. Бавно инјектирање на преголеми примероци предизвикува ширење на лентите и слаба резолуција. Највообичаен (најчест) метод за внес на примерок е со примена на микрошприц за инјектирање течен или гасовит примерок преку самолеплива, силикон-гумена дијафрагма или септум во испарувачка порта, лоцирана на главата од колоната. Портата вообичаено е загреана околу 50°C над температурата на вриење на најмалку испарливата компонента во примерокот. Слика 16.3 претставува шематски приказ на вообичаените инјекциски порти. За обични, аналитички колони, големината на примерокот варира неколку десетини на микролитар до 20 µl. За капиларните колони потребни се многу помали примероци (0,1-1,0 µl). За оваа цел се вклучува систем на разделување, што овозможува внес на само мала фракција од инјектираниот примерок во главата на колоната, а остатокот се исфрла.



Слика 16.3 Приказ на напречен пресек на (а) директен инјектор со микроплазен испарувач (*microflash vaporizer direct injector*) и (б) инјектор со систем на разделник (*split/splitless injector*)

За квантитативна анализа, порепродуцибилна големина на примерок и за гасните и на течните примероци, се добива со ротирачки вентил, прикажан на Слика 16.4. Со овој вентил се намалуваат грешките што се должат на големината на примерокот. Јамката за земање примерок (Слика 16.4 а) се полни со примерок во вишок. Со ротација на вентилот за 45 степени се внесува репродуцибилен волумен ACB во мобилната фаза.



Слика 16.4 Ротирачки вентил (*valve*): позиција на вентилот, а) за полнење на јамката ACB со примерок и б) за внес на примерокот во колоната

Конфигурација на колони и на колонски печки

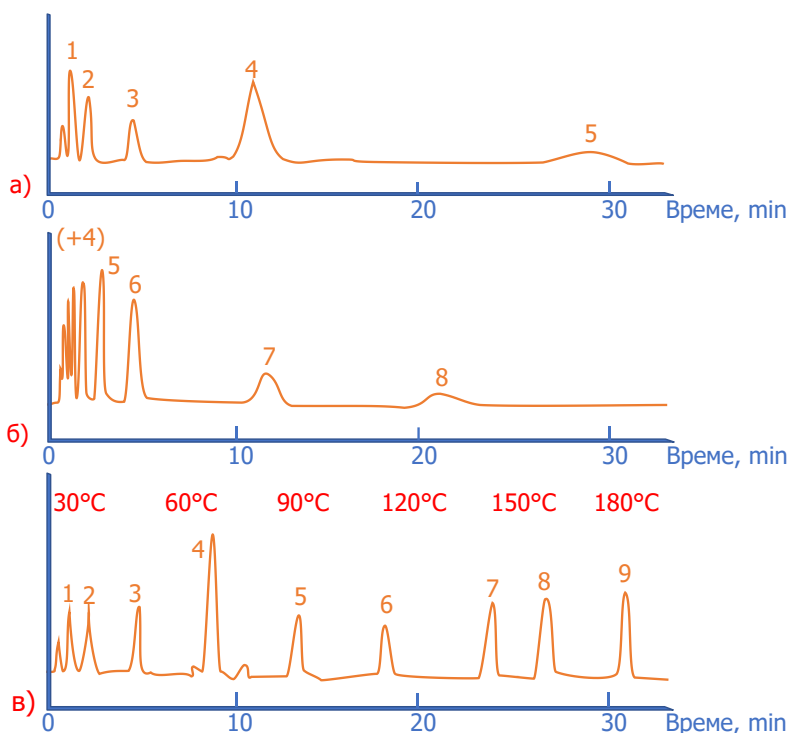
Постојат два типа колони што се употребуваат за гасна хроматографија, *пакувана* и *отворена цевка* или *капилара*. До денес најмногу анализи се изведуваат

на пакувани колони. Но, сега, овој тренд нагло се менува, и се чини дека пакуваните колони ќе бидат целосно заменети со поефикасните и побрзи отворени колони, освен за одредена специјална примена.

Хроматографските колони варираат во должина, од 2 m до 50 m и повеќе. Конструирани се од нерѓосувачки челик, стакло, фузирана силика или тefлон. За да може да бидат собрани во термостатираната печка, обично се во форма на макара со дијаметар од 10 cm до 30 cm.

Температурата на колоните е важна варијабла што мора да се контролира со прецизност до неколку десетинки од степен. Затоа колоните обично се монтираат во термостатирана печка. Оптималната температура на колоната зависи од температурата на вриење на примерокот и бараниот степен на разделување. Примена на температура што е еднаква или малку над просечната точка на вриење на примерокот, резултира со разумно време на елуирање (2 до 30 минути). За примероци со широк опсег на вриење, често е пожелно да се примени температурно програмирање, при што температурата на колоната се зголемува или континуирано или во чекори, како што се одвива разделувањето. На Слика 16.5 е прикажано подобрувањето на хроматограмот што се должи на температурното програмирање.

Генерално, оптималната резолуција е поврзана со најниска температура, но, со намалување на температурата, се зголемува времето на елуирање, а со тоа и времето потребно за извршување на анализата (Сликите 16.5 а и 16.5 б).



Слика 16.5 Влијание на температурата на гасните хроматограми: а) изотермално на 45°C, б) изотермално на 145°C, в) температурен програм од 30°C до 180°C

Детекторски системи

Карактеристики на идеален детектор

Идеалниот детектор за гасна хроматографија ги има следните карактеристики:

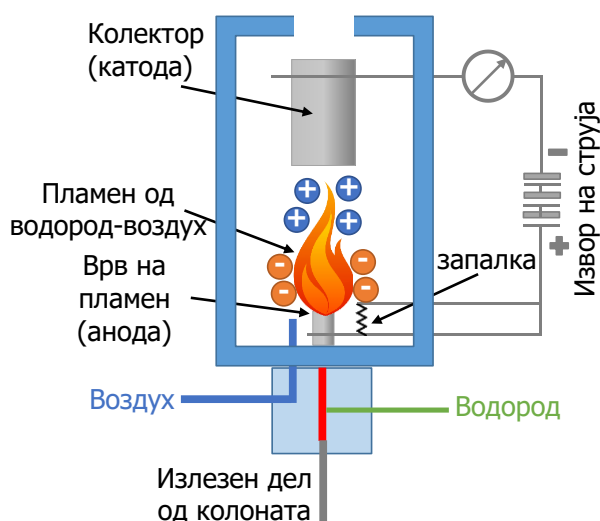
1. Соодветна осетливост. Поимот соодветна осетливост не може да се опише со квантитативни термини. На пример, осетливоста на детекторите се

- разликува за фактор 10^7 . Вообичаено осетливоста се движи во опсег од 10^{-8} до 10^{-15} g растворена супстанција/s;
2. Добра стабилност и репродуцибилност;
 3. Линеарен одговор на растворени супстанции што надминува неколку реда величини;
 4. Температурен опсег од собна температура до најмалку 400°C ;
 5. Кратко време за одговор, независно од брзината на протокот;
 6. Веродостојност на резултатите и лесен за употреба;
 7. Сличност во одговорот за сите растворени супстанции или, алтернативно, предвидлив и селективен одговор кон една или повеќе класи на растворени супстанции;
 8. Да биде недеструктивен за примерокот.

Пламен-јонизациски детектор (*Flame Ionization Detectors, FID*)

Пламен-јонизацискиот детектор е најшироко употребуван детектор за гасна хроматографија. Ефлуентот од колоната се меша со водород и воздух, а потоа се запалува електрично со индукциски калем за палење, запалка (систем со филамент што се зажарува во дел од секунда) прикажан на Слика 16.6. При пиролиза на најголем број органски компоненти, на температура што ја има пламенот водород/воздух, се создаваат јони и електрони што може да спроведуваат електрицитет низ пламенот. Вообичаено, потенцијал од $+300\text{ V}$ постои меѓу двете колекторски електроди лоцирани над пламенот за да се насочат јоните/електроните. Резултирачката струја ($\approx 10^{-12}\text{ A}$) се насочува во засилувач (оперативен отпорник) за мерење.

Јонизацијата на јаглеродните компоненти во пламен е слабо објаснет процес, иако е забележано дека бројот на создадените јони е грубо пропорционален со бројот на редуцираните јаглеродни атоми во пламенот. Бидејќи пламен-јонизацискиот детектор реагира на бројот на јаглеродни атоми што влегуваат во детекторот за единица време, тој уред е зависен од масата, а не од концентрацијата.



Слика 16.6 Вообичаен пламен-јонизациски детектор

Функционалните групи, како на пример карбонилна, алкохолна, халогена и аминоксидна, даваат само неколку јони или пак воопшто не даваат јони во пламен. Детекторот не е осетлив кон незапаливи гасови, како на пример H_2O , CO_2 , SO_2 и NO_x . Овие карактеристики го прават пламен-јонизацискиот детектор

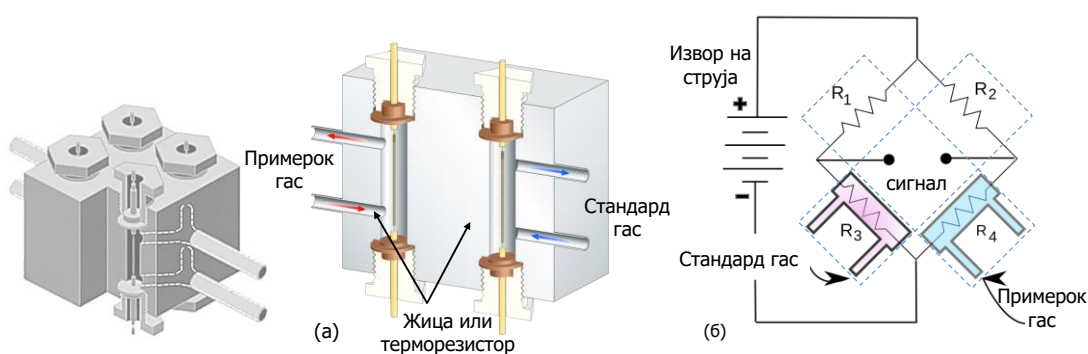
најупотребуван детектор за анализа на најголемиот број органски примероци, вклучувајќи ги оние онечистени со вода, како и оксиди на азот и сулфур. Неосетливоста на вода го прави овој детектор особено корисен за детекција на онечистувања на примероци од природна вода.

Пламен-јонизацискиот детектор покажува висока осетливост ($\sim 10^{-13}$ g/s), широк опсег на линеарен одговор ($\sim 10^{-7}$) и низок шум. Генерално е отпорен и лесен за употреба. Недостаток на овој тип детектор е деструкцијата на примерокот.

Детектор што работи на принцип на мерење на тоplotна проводливост (Thermal Conductivity Detectors, TCD)

Еден од првите детектори за гасна хроматографија, што сè уште наоѓа широка примена, се базира на промените во тоplotната проводливост на гасно струење под дејство на присутните молекули од анализот. Овој уред понекогаш се нарекува *катарометар*. Осетливиот елемент на катарометарот е електрично загреан елемент, чија температура на константна електрична струја зависи од тоplotната проводливост на околниот гас. Загреаниот елемент може да биде платина, злато, волфрамова жица или полупроводен термистор. Отпорот на жицата или термисторот дава мерка за гасната тоplotна проводливост. За разлика од жицата, термисторот има негативен температурен коефициент.

Слика 16.7 а, претставува приказ на напречен пресек на еден од температурно-осетливите елементи во детекторски систем на принцип на тоplotна проводливост, а Слика 16.7 б прикажува поставеност на детекторски елементи во вообичаена детекторска единица. Применети се два пара на елементи (R_1 , R_2 , R_3 , R_4), еден пар е лоциран во насока на струењето на ефлуентот од колоната (стандард), а вториот во правец на гасното струење пред инјекторскиот дел (примерок). Алтернативно, гасното струење може да се раздели како што е покажано на Сликата 16.7 а. Во двата случаи, ефектот на тоplotната проводливост на носечкиот гас се губи, а ефектот од варирање на брзината на протокот, притисок и електрична сила се намалува.



Слика 16.7 Шематски приказ на а) детекторска ќелија што работи на принцип на мерење на тоplotна проводливост и б) поставеност на две детекторски ќелии-примерок и две детекторски стандардни ќелии

Топлотната проводливост на хелиумот и на водородот се од 6 до 10 пати поголеми од проводливоста на повеќето органски компоненти. Така, во присуство дури и на мала количина на органски материјал, се случува релативно големо намалување на тоplotната проводливост на ефлуентот од колоната, а со тоа и детекторот бележи раст на температурата. Проводливоста на други носечки гасови е послична на органските компоненти, заради што е потребна употреба на водород и хелиум за да се постигне добра осетливост на детекторот.

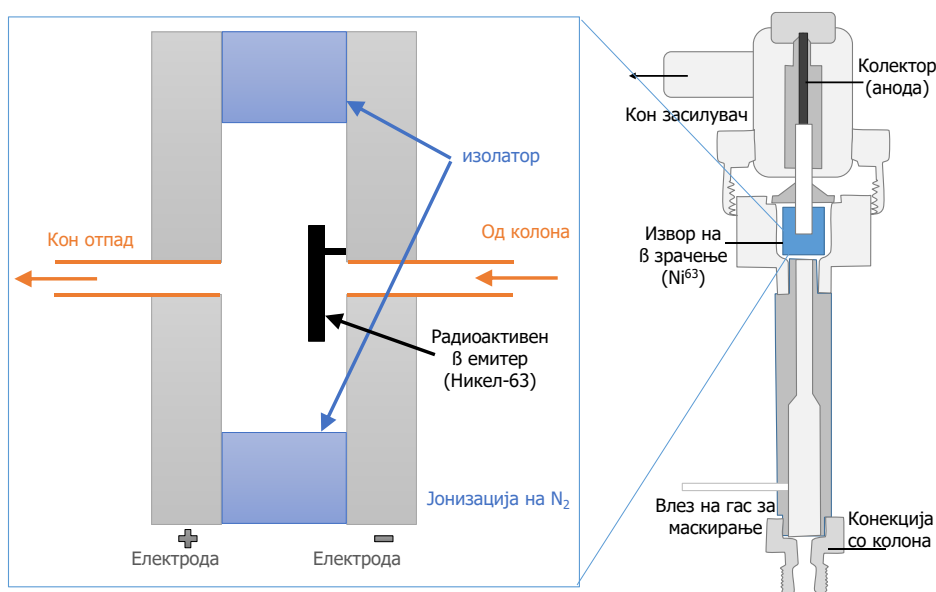
Предност на овој детектор е неговата едноставност, голем линеарен динамичен опсег ($\sim 10^5$), одговор и на органски и на неоргански видови, недеструктивен карактер, што овозможува собирање на растворените супстанции по детекцијата. Недостаток на катарометарот е релативно ниската осетливост ($\sim 10^{-8}$ g растворена супстанција /mL носечки гас). Други детектори ја надминуваат оваа осетливост за фактор од 10^4 до 10^7 . Треба да се нагласи дека ниската осетливост ја ограничува примената на капиларните колони со овој детектор, заради многу малите примероци што се аплицираат.

Сулфур-хемилуминисцентен детектор (Sulfur Chemiluminescence Detector, SCD)

Сулфур-хемилуминисцентниот детектор се базира на реакцијата помеѓу одредени сулфурни соединенија и озонот. Интензитетот на резултирачката луминисценција е пропорционален со концентрацијата на сулфурот. Детекторот е многу практичен за определување на загадувачи, како на пример меркаптани. Кај овој детектор ефлуентот се меша со водород и воздух и се запалува како кај пламен-јонизацискиот детектор. Добиените гасови потоа се мешаат со озон и се мери интензитетот на добиената емисија.

Електрон-врзувачки детектор (Electron-Capture Detectors, ECD)

Електрон-врзувачкиот детектор е еден најупотребуваниот детектори при анализи на примероци од животната средина поради неговата селективност за компоненти што содржат халогени, како што се пестицидите и полихлорираните бифенили. Овој тип детектор работи на ист начин како и пропорционалниот бројач за мерење на рентген (X) зрачењето. Ефлуентот поминува покрај β емитер, вообичаено никел-63 (Слика 16.8). Електронот од емитерот предизвикува јонизација на носечкиот гас (обично азот) и експлозија од електрони. Во отсуство на органски компоненти, од овој јонизациски процес се добива константна струја помеѓу пар од електроди. Но, струјата се намалува нагло во присуство на органските молекули што имаат функционални групи што ги врзуваат електроните. Одговорот не е линеарен, освен ако потенцијалот низ детекторот не е пулсирачки.

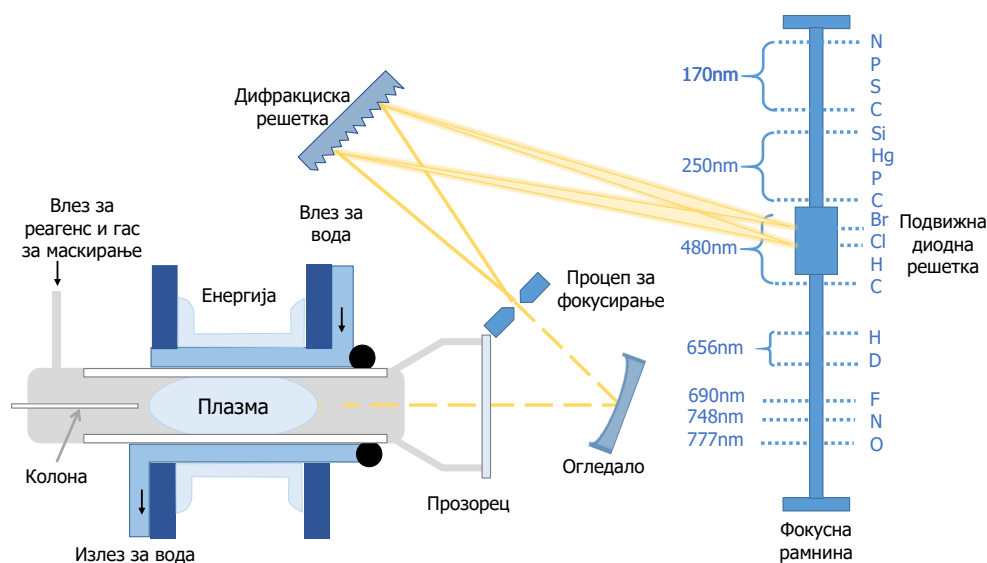


Слика 16.8 Шематски приказ на електрон-врзувачки детектор

Електрон-врзувачкиот детектор е селективен во одговорот и многу осетлив на молекули што содржат електронегативни функционални групи, како што се: халогени, пероксиди, квинони и нитро групи. Детекторот не е осетлив на функционални групи како што се амините, алкохолите и јаглеродородите. Овој детектор има важна примена за детекција и определување хлорирани инсектициди. Предност на овој тип детектори е што не го менуваат примерокот (за разлика од пламениот детектор). Од друга страна, линеарниот опсег на одговор е ограничен на два реда величина.

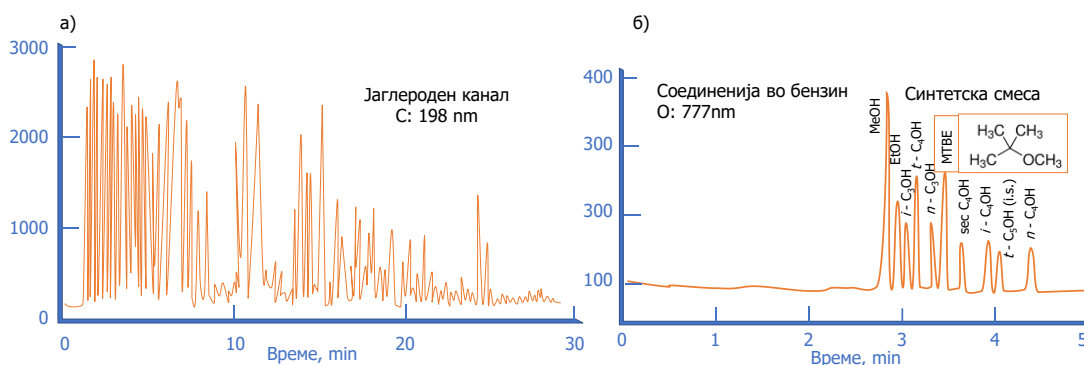
Атомски емисиски детектор (Atomic Emission Detectors, AED)

Елуентот се внесува во хелиумова плазма, наелектризирана со помош на микробранови, која е сврзана со оптички емисиски спектрометар со диодна низа (Слика 16.9). Плазмата е доволно наелектризирана за да ги атомизира сите елементи во примерокот и да се добијат нивните карактеристични атомски емисиски спектри. Овие спектри потоа се набљудуваат со спектрометар, чија подвижна рамна диодна низа може да го детектира емитираното зрачење од околу 170 до 780 nm. Како што е прикажано на десниот дел од сликата, со подвижната диодна низа може да се следат истовремено два до четири елементи. Со соодветен софтверски програм може да се мери концентрација на 15 елементи, а во иднина, софтверските програмите би можеле да се развиваат за детектирање на поголем број елементи.



Слика 16.9 Атомски емисиски детектор

На Сликата 16.10 е претставен пример од хроматограм добиен со примена на атомски-емисиски детектор, што ја покажува моќноста на овој тип на детектори. Примерокот се состои од бензин, што содржи мала концентрација на метил терц-бутил етер (МТВЕ), како и неколку алифатични алкохоли во мали концентрации. Спектарот добиен со следење на јаглеродната емисиска линија на 198 nm содржи мноштво пикови, што е невозможно да се сортираат и да се идентификуваат (Сликата 16.10 а). За разлика од тоа, кога се употребува кислородната линија на 777 nm се добива хроматограм (долниот дел од сликата), со јасно разделени пикови за различните алкохоли и МТВЕ, што е лесно да се идентификуваат (Сликата 16.10 б).



Слика 16.10 Хроматограми за примерок од бензин што содржи мала концентрација на метил терц-бутил етер (MTBE) и неколку алифатични алкохоли: а) следење на јаглеродната линија б) следење на кислородната линија

Термијонски детектор (*Thermionic Detectors, TID*)

Термијонски детектор е селективен за органските молекули што содржат фосфор и азот. Одговорот за фосфорниот атом е приближно 10 пати поголем отколку одговорот за азотниот атом и 10^4 до 10^6 поголем од јаглеродниот атом. Споредено со пламен-јонизацискиот детектор, овој детектор има приближно 500 пати поголема осетливост за компоненти што содржат фосфор и 50 пати поголема осетливост за компоненти што содржат азот. Поради овие својства е особено корисен за детекција и определување на многу фосфорни пестициди.

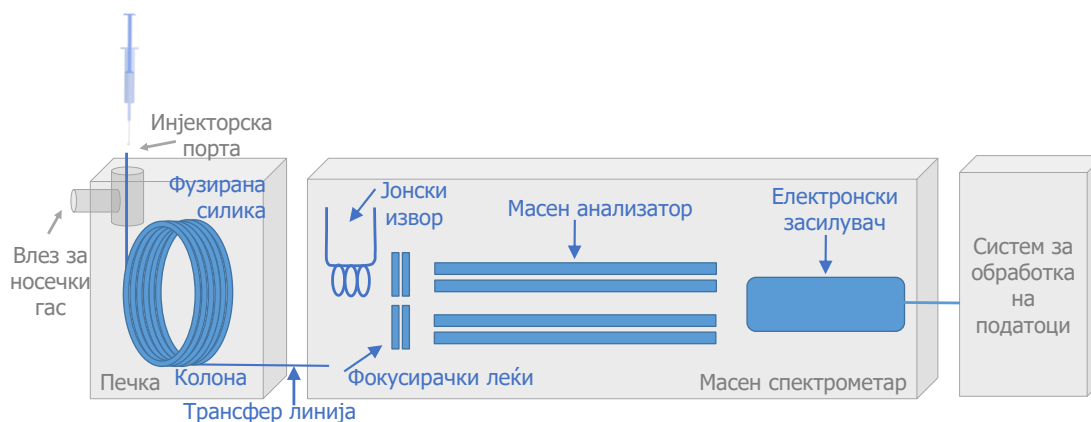
По структура е сличен на пламен-јонизацискиот детектор. Ефлуентот од колоната се меша со водород, поминува покрај врвот на запалката и се запалува. Топлиот воздух потоа се движи кон загреана перла од рубидиум силикат, што се одржува на околу 180 V во однос на колекторот. Загреаната перла формира плазма што има температура од 600°C до 800°C. Не е целосно објаснето што точно се случува во плазмата за да се создадат невообичаено голем број јони од молекулите што содржат фосфор или азот, но добиената јонска струја овозможува определување компоненти што ги содржат овие два елемента.

Други типови детектори

Пламен-фотометриски детектор (Flame photometric detector, FPD) се употребува за анализа на загадувачи на воздух и вода, пестициди и продукти на хидрогенација на јаглерод. Селективен е и дава одговор примарно на компоненти што содржат сулфур и фосфор. Кај овој детектор, елуентот поминува во пламен од воздух и воздух со ниска температура, при што дел од фосфорот што го содржат компонентите се трансформира во НРО видови, а сулфурот што се трансформираат во S_2 што емитираат хемилуминисценција на специфична бранова должина од 510 и 526 nm (НРО), односно 394 nm (S_2). Се применуваат соодветни филтри за изолирање на овие ленти, а нивниот интензитет се мери фотометриски. Други елементи што може да се детектираат со овој детектор вклучуваат халогени, азот и неколку метали, како на пример калај, хром, селен и германиум. Сулфур-луминисцентниот детектор овозможува пониски граници на детекција и поширок линеарен опсег за сулфур, отколку пламен-фотометрискиот детектор.

Фотојонизацискиот детектор (Photoionization detector) се базира на озрачување на елуентот од колоната со интензивен сноп од ултравиолетово зрачење со променлива енергија, од 8,3 до 11,7 eV (λ од 149 до 106 nm), што предизвикува јонизација на молекулите. Со примена на потенцијал низ ќелијата што ги содржи јоните, се добива јонска струја, што се засилува и се снима.

Други детектори што имаат голема важност за гасната хроматографија се масен спектрометар (Слика 16.11) и инфрацрвен спектрометар со Фуриерова трансформација. Примената на овие детектори е објаснета во соодветните поглавја 8 и 6.



Слика 16.11 Масен спектрометар како детектор во гасна хроматографија

Колони и стационарни фази за гасна хроматографија

При пионерската примена на гасната хроматографија беа употребувани пакувани колони, кај кои стационарната фаза со одредена димензија на честичките е спакувана во колони (метална или стаклена) со одредени димензии (должина: 1-3 m, дијаметар: 0,5 cm). Но, теоретски, со примена на неспакуваните колони, со внатрешен дијаметар од неколку десетинки од милиметар, би се добило подобро разделување, како и поголема брзина и подобра ефикасност на колоната. Кај овие капиларни колони, стационарната фаза претставува воедначен филм од течност, тенок неколку десетини од микрометар, што ја обвиткува внатрешноста на капиларната цевка.

Малата примена на првите произведени отворени цевчести колони¹, се должи на: мал капацитет за примерок, кршливост на колоните, механички проблеми при инјектирање на примерок и поврзување на колоната со детекторот, потешкотии за постигнување на репродукцибилност при производство на колоните, кратко времетраење на колоната, зачепување на колоните. Со тек на време, овие проблеми се надминати и денес постојат релативно евтини цевчести колони со добри перформанси, што придонесе за нивна широка употреба.

Отворени цевчести колони

Постојат два типа отворени цевчести, или капиларни, колони: отворена цевчеста колони со обложени ѕидови (*wall-coated open tubular, WCOT*) и отворена цевчеста со обложена подлога (*support-coated open tubular, SCOT*). Првите се едноставни капиларни цевки обложени со тенок слој на стационарна фаза, а кај вторите, на внатрешната површина на капиларата е нанесен тенок филм ($\approx 30\mu\text{m}$) на подлога, како, на пример, дијатомејска земја. На овој начин се зголемува

¹ Во 1987 година, компанијата Хромпак (*Chrompack International Corporation*), Холандија, постави светски рекорд за должина на отворена цевчеста колони и број на теоретски подови во Гинисовата книга на рекорди. Колоната беше произведена од едно парче, од фузирана силика, со внатрешен дијаметар од 0,32 mm и должина од 2100 m. Колоната била обвиткана со 0,1 μm полидиметил силоксански филм. На дел од 1300 m, колоната имала 2 милиони подови.

количината на стационарната фаза, со што се добива и поголем капацитет за примерок. Ефикасноста на SCOT колони е помала од ефикасноста на WCOT колоните, но значително поголема од ефикасноста на пакуваните колони.

WCOT колоните се изработувале од нерѓосувачки челик, алуминиум, бакар или пластика, а потоа и од стакло. Често стаклото се обработува со пареи од хлороводородна киселина, водена хлороводородна киселина со голема концентрација или калиум хидроген флуорид за да се добие рапава површина, што ќе ја врзе појакно стационарната фаза. Најновите WCOT колони се изработуваат од фузирана силика (*Fused silica open tubular, FSOT*). Капиларите од фузирана силика се произведуваат од специјално обработена силика што содржи минимални количества на метални оксиди. Овие капилари имаат многу потенки сидови од стаклените. Јачината на капиларата се зголемува преку надворешно обложување со заштитен слој од полиамид. Добиените колони се флексибилни и може да се свиткаат во калапи до дијаметар од десетина центиметри. Предности на силика колоните се физичка сила, многу мала реактивност кон компонентите од примерокот и флексибилност, поради што речиси целосно ги заменува стаклените WCOT колони.

Со цел подобрување на резолуцијата при разделување на отворени цевчести силика колони, се намалува внатрешниот дијаметар (најчесто околу 300 μm , до дури 150 μm). Поради тоа, се јавуваат проблеми при инјектирање на примерок и детекција, што се решаваат со примена на разделен систем за намалување на големината на инјектираниот примерок.

Во Табелата 16.1 и Слика 16.12 се споредени карактеристиките и својствата на отворените цевчести колони од фузирана силика со другите типови отворени цевчести и пакувани колони.

Пакувани колони

Пакуваните колони се изработуваат од стаклени, метални (нерѓосувачки челик, бакар, алуминиум) или тефлонски цевки, обично долги од 2 до 3 m и со внатрешен дијаметар од 2 до 4 mm.

Пакувањето, односно цврстата подлога кај пакуваните колони, претставува носач на течната стационарна фаза. Површината на носачот треба да е што е можно поголема за да се постигне што поголема изложеност кон мобилната фаза. Идеално, носачот се состои од мали, воедначени сферични честички со добра механичка јачина и специфична површина од најмалку 1 m²/g. Дополнително, материјалите од коишто се изработени носачите мора да се отпорни на високи температури, како и да имаат својство на воедначено натопување со течната стационарна фаза. Материјали што се користеле при почетното производство на носачите се добиваат од природната дијатомејска земја. Овие материјали се користат често и денес.

Во однос на големина на честичките на носачите на стационарна фаза, целта е да се постигне што е можно помал дијаметар на честичките за да се постигне посакуваната ефикасност на хроматографската колона (Слика 13.10 а). Од друга страна, притисокот потребен да се оддржи посакуваниот проток на носечкиот гас зависи обратно пропорционално од дијаметарот на честичките во пакувањето. Како резултат на тоа, вообичаена големина на честичките се движи во опсег од 170-250 μm или 149-170 μm .

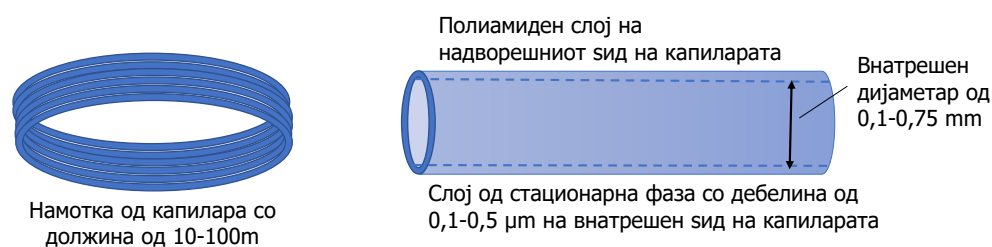
Табела 16.1 Својства и карактеристики на вообичаени гасно-хроматографски колони

	Тип на колона*			
	FSOT	WSOT	SCOT	Пакувана
Должина (m)	10-100	10-100	10-100	1-6
Внатрешен дијаметар (mm)	0,1-0,53	0,25-0,75	0,5	2-4
Ефикасност, подови/m	2000-4000	1000-4000	600-1200	500-1000
Вкупно подови	(20-400)x10 ³	(10-400)x10 ³	(6-120)x10 ³	(1-10)x10 ³
Големина на примерок (ng)	10-75	10-1000	10-1000	10-10 ⁶
Релативен заднински притисок	низок	низок	низок	висок
Релативна брзина	брзо	брзо	брзо	споро
Хемиска инертност	најдобра	—————>		најслаба
Флексибилност	да	да	не	Не

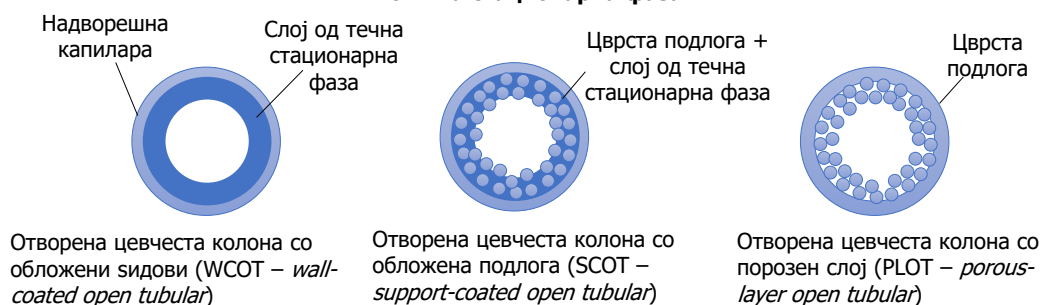
* FSOT - Фузирана силика, отворена цевчеста колона

WSOT - Обложени сидови, отворена цевчеста колона

SCOT - Обложена подлога, отворена цевчеста колона



Типови на стационарна фаза



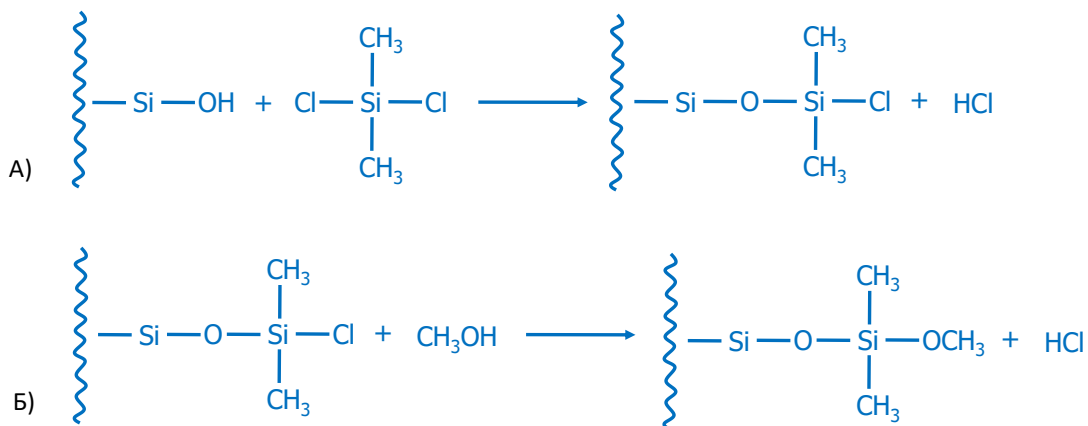
Слика 16.12 Карактеристики и димензии на вообичаени гасно-хроматографски колони

Атсорпција на пакувањето или на капиларните сидови

Еден од главните проблеми поради коишто не била постигната очекуваната примена на оваа техника во нејзините зацетоци, поврзан со колоните за гасна хроматографија, бил физичката атсорпција на поларните или на јонизирани аналити врз силанолните групи од стационарната фаза. Како последица на атсорпцијата, се појавуваат искривени пикови, широки и често со опашка.

Силанолните групи се формираат како последица на реакција помеѓу влагата и силикатите од површината на стационарна фаза, што може да резултира до целосно хидролизирана површина со структура дадена на Слика 15.8. Овие групи имаат афинитет кон поларни органски молекули и ги задржуваат по пат на адсорпција.

Со примена на помошни материјали, како диметилхлоросилан (*dimethylchlorosilane*, DMCS) силанолните групи може да се деактивираат (реакција А). Кога стационарната фаза ќе се измие со метанол, хлоридниот атом ќе се замени со метокси група (реакција Б).



Постои можност од појава на резидуална адсорпција поради присуство на метални оксиди како онечистувања на дијатомејската земја. Овие онечистувања може да се отстранат со постапка на миене со киселина. Фузираната силика, што се користи за производство на капиларните колони, не содржи онечистувања од овој тип, поради што и не се јавуваат проблеми со адсорпција кај овој тип колони.

Стационарна фаза

Имобилизираната течна стационарна фаза кај колони за гасна хроматографија треба да ги има следните карактеристики: (1) *мала испарливост* (идеално, точка на вриење на течноста треба да е најмалку 100°C над максималната точка на работа со колоната), (2) *термална стабилност*, (3) *хемиска инертност*, (4) *соодветни карактеристики на солвентот* што овозможуваат вредностите на факторот на ретенција (k') и факторот на селективност (α) да бидат во посакуваниот опсег.

За време на развојот на стационарни фази за гасна хроматографија, биле предложени многу течности, но моментално се користат само десетина различни типови. За успешна сепарација на аналити со слични карактеристики, неопходен е соодветен избор на стационарна фаза. Аналитот мора да има соодветна ретенција во стационарната фаза, што зависи од „сличноста“ на поларноста на аналитот со поларноста на имобилизираната течност. Поларните стационарни фази содржат функционални групи како: - CN, - CO, -OH. Стационарните фази од јаглеводороден тип, како и диалкил силоксани се неполярни, додека полиестерските фази се многу поларни.

Поларност	Стационарна фаза
	Јаглеводород
	Полисилоксан
	R = метил: Полидиметил силоксан
	R = метил, фенил: x% Фенил-полидиметил силоксан
	R = метил, трифлуоропропил: x% Трифлуоропропил-полидиметил силоксан
	R = метил, цианопропил: x% Цианопропил-полидиметил силоксан
Полиетилен гликол : $\text{H} - (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n - \text{OH}$	
Полиестер : $\text{H} - (\text{O} - \text{RO} - \text{CO} - \text{R}' - \text{CO})_n - \text{OH}$	

Вообичаено, поларни аналити се: алкохоли, киселини и амини; аналити со умерена поларност се: етери, кетони и алдехиди; неполарни аналити се: заситени јаглеводороди. Генерално, поларноста на стационарната фаза треба да се совпаѓа со поларноста на аналитите од интерес; на тој начин, редот на елуирање зависи од точката на вриење на елуентите.

Во Табела 16.2 прикажани се некои од најчесто користените стационарни фази кај гасно-течна хроматографија (пакувани и капиларни), како и вообичаените апликации поврзани со нивната примена. Овие шест типа (од кои 5 се полидиметил силоксани) покриваат примена за определување на повеќе од 90% од аналитите.

Табела 16.2 Вообичаени (течни) стационарни фази кај гасна хроматографија

Стационарна фаза	Вообичаени заштитени имиња	Максимална температура,	Вообичаени апликации
Полидиметил силоксан	OV-1, SE-30, HP-1, AT-1, DB-1, ZB-1, RTx-1, PB-1, SPB-1, CP-Sil 5 CB	300 - 350 °C	Неполарна фаза за општа примена, јаглеводороди, полиароматични системи, стероиди, полихлорирани бифеноли
5% фенил, полидиметил силоксан	OV-3, SE-52, HP-5, CP-Sil 8, CB	350 °C	Метил естри на масни киселини, алкалоиди, лекови, халогенирани соединенија
50% фенил, полидиметил силоксан	OV-17	250 °C	Лекови, стероиди, пестициди, глицероли
50% трифлуоропропил полидиметил силоксан	OV-210	200 °C	Хлорирани ароматични молекули, нитроароматични соединенија, алкил-супституирани бензени
Полиетилен гликол	Carbowax 20M, DB-WAX, HP-20M, BP-20, CP-Wax 52 CB	250 °C	Киселини, алкохоли, етри, есенцијални масла, гликоли
50% цианопропил-полидиметил силоксан	OV-275	240 °C	Полинезаситени масни киселини, киселини, алкохоли

Полидиметилсилоксан претставува релативно неполарна течност, каде сите функционални групи од полисилоксанот се метил групи (-CH₃). Кај другите полидиметилсилоксани прикажани во табелата, фракција од метилните групи е заменета со други функционални групи, како: фенил (-C₆H₅), цианопропил

(-C₃H₆CN) и трифлуоропропил (-C₃H₆CF₃). Процентуалниот опис го дефинира степенот на супституција на групата со метилните групи, со што се зголемува и степенот на поларноста на стационарната фаза (од горе кон долу во табелата). Полиетилен гликол, наведен како петти тип на стационарна фаза во табелата, е најчесто користена стационарна фаза за разделување на поларни аналити.

Постојат и голем број комерцијално достапни стационарни фази со вкрстено поврзување на стационарна фаза, со цел зголемување на нивната трајност и отпорност на високи температури, односно надминување на честиот проблем на „крвавење“ на стационарната фаза. Вкрстеното поврзување се изведува на самото место (*in-situ*), откако е нанесена стационарната фаза во колоната. Најчесто ова се постигнува со инкорпорирање пероксид во оригиналната течност, со последователно загревање на филмот. На овој начин започнува реакција на слободни радикали, при што метилните групи од стационарната фаза се вкрстуваат со јаглерод-јаглерод врски. Филмот добиен на овој начин е поотпорен на растворање и има поголема термална стабилност. Вкрстено поврзување на стационарната фаза може да се иницира и со примена на гама зрачење.

Капацитетот на разделување на колоните и нивната ефикасност во голема мера зависи од дебелината на нанесениот филм на стационарна фаза. Вообичаено, дебелината на филмот се движи во опсег од 0,1 до 5 μm . Подебелите филмови се користат за лесно испарливите аналити, затоа што дебелиите филмови подолго ги задржуваат растворените аналити, што придонесува за подолга ретенција, односно подолго време за разделување. Тенките филмови се корисни при разделување на потешко испарливи аналити. За најчесто користените колони со дијаметар од 0,25 до 0,32 mm, се препорачува дебелина на филм од 0,25 μm . Кај пошироките колони, вообичаено се користи дебелина на филм во опсег од 1 до 1,5 μm . Постојат и колони со дебелина на филм до 8 μm .

Примена на гасно-течната хроматографија

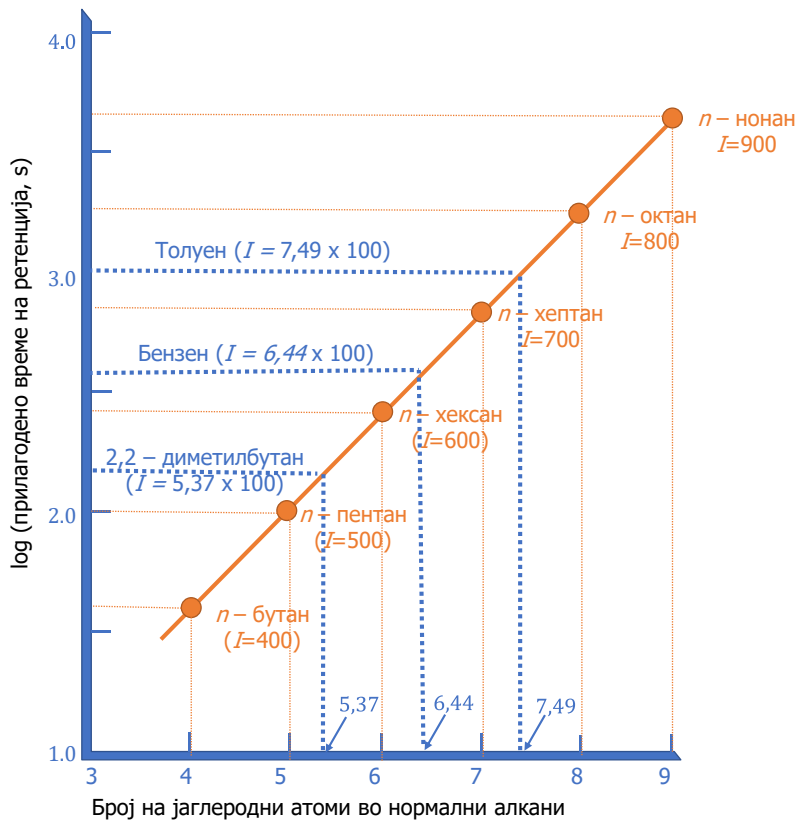
Квалитативна анализа

Како сепаративна техника, гасната хроматографија има ограничена примена за квалитативна анализа. Идентификацијата на аналит од интерес се заснова на споредба на времето на ретенција или волуменот на ретенција, доколку под идентични хроматографски услови е познато времето на ретенција или волумен на ретенција на аналитот од стандардниот раствор. Дополнителни квалитативни информации за разделените аналити од смеса може да се добијат доколку како детектор се користи некоја од спектроскопските техники соодветни за таа намена, како на пример: масена спектроскопија, инфрацрвена спектроскопија, нуклеарна магнетна резонанција и сл.

Индекс на ретенција

Индексот на ретенција I се користи за идентификација на аналити во хроматограм. За прв пат е воведен од страна на Коватс (*E.Kovats*) во 1958 година. Индексот на ретенција за било кој аналит може да се пресмета од хроматограмот добиен од смеса на аналитот од интерес со најмалку два нормални алкани што имаат ретенција пред и после ретенцијата на аналитот од интерес. Според дефиницијата, индексот на ретенција за нормален алкан изнесува 100 пати поголем од бројот на јаглеродните атоми во компонентата независно од пакувањето на колоната, температурата или други хроматографски услови. Индексите на ретенција на сите други компоненти различни од нормалните алкани варираат во опсег од неколку илјади единици во зависност од променливите на колоната.

Во рамки на хомологна серија, постои линеарна зависност помеѓу логаритамот од приспособено време на ретенција ($t'_R = t_R - t_M$) и бројот на јаглеродни атоми, под услов да се исклучат членовите со најмал број атоми (Слика 16.13).



Слика 16.13 Графички приказ на методот за определување на индексите на ретенција за три компоненти (2,2-диметилбутан, бензен, толуен). Стационарна фаза: сквален. Температура: 60°C.

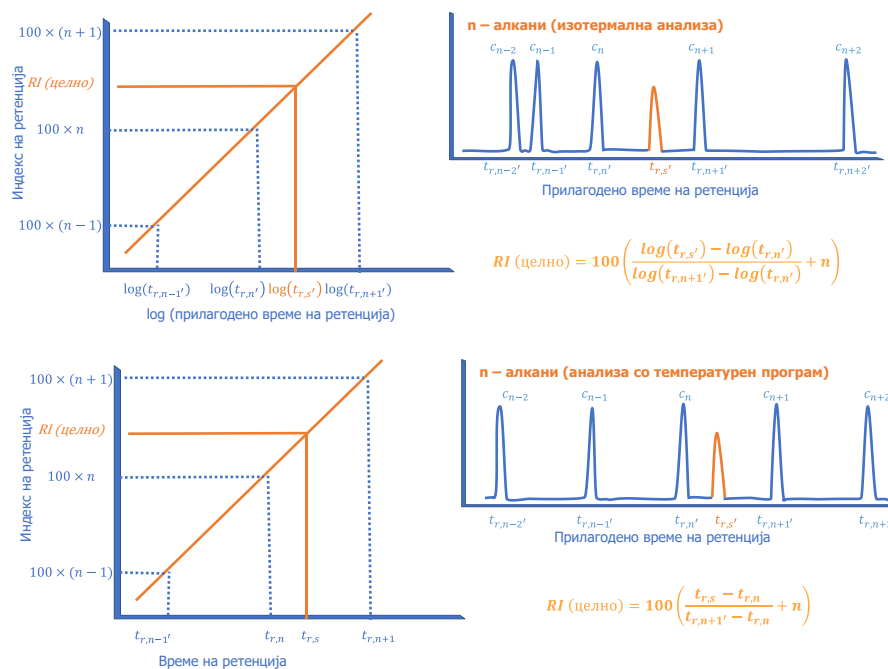
За определување индекс на ретенција не е неопходно да се конструира график; може да се пресмета од податоците добиени со интерполација од хроматограм добиен од смеса на анализот од интерес и стандардни супстанции на два или на повеќе алкани.

Пиковите од n-алкани се појавуваат во воедначени интервали и при примена на температурна програма. Индексот на ретенција добиен на овој начин се нарекува линеарен индекс на ретенција (*linear retention index, LRI*). Овој начин на определување има предност во однос на индексот на ретенција при изотермална анализа: не е потребна логаритамска пресметка и приспособување на времињата на ретенција (Слика 16.14).

Важно е да се напомене дека индексот на ретенција за нормални алкани е независен од температурата и пакувањето на колоната. Така, I за n-хептан, по дефиниција секогаш изнесува 700. Спротивно на ова, индексите на ретенција за сите други анализи може да варираат во голема мера од една до друга колона. На пример, I за аценафтен на полидиметил силоксан на 140°C изнесува 1460. Со 5% фенил-полидиметил силоксан како стационарна фаза, на истата температура, изнесува 1500, а со полипропилен глокол како стационарна фаза, I изнесува 2084.

Системот за определување индекс на ретенција има големо практично значење. Определувањето е едноставно, засновано на примена на лесно достапни референтни материјали што покриваат широк опсег на температури на вриење, а температурната зависност на индексите е релативно мала. Во 1984 година, *Sadtler*

Research Laboratories објави база на податоци со определени индекси на ретенција на четири типа отворени цевчести колони од фузирана силика. Компјутерската програма овозможува пребарување низ индексите на ретенција и можна идентификација на непознати анализи врз основа на совпаѓање на измерените индекси под исти хроматографски услови со индексите од базата на податоци. Врз основа на определување на индексите на ретенција, креиран е и систем на класификација на колони за гасна хроматографија, наречена шема за класификација на стационарни фази според *Rohrshneider-McReynolds*.



Слика 16.14 Графички приказ на методот за определување на индексите на ретенција при анализа со примена на изотермална (горе) и температурна програма (долу)

Квантитативна анализа

Принципите за квантитативна анализа на хроматографските методи дадени во поглавјето 13 важат и за гасна хроматографија. Точноста зависи од контрола на различните варијабли што влијаат на површината под крива на елуираните анализи (на пр. проблеми при инјектирање, задоволување на критериумите за соодветност на хроматографски систем и сл.). Вообичаен метод за квантитативно определување анализи кај гасна хроматографија претставува методот на внатрешен стандард.

Гасно-Цврста хроматографија

Гасно-цврста хроматографија се заснова на адсорпција на гасни супстанции врз цврста површина. Константите на дистрибуција кај гасно-цврста хроматографија се многу поголеми отколку кај гасно-течна хроматографија. Како последица, гасно-цврста хроматографија се користи само за разделување на компоненти што не се задржуваат на течните стационарни фази, како што се компонентите на воздух, водород сулфид, јаглерод дисулфид, азотни оксиди, јаглерод моноксид, јаглерод диоксид и ретки гасови.

Колони за гасно-цврста хроматографија

Гасно-цврста хроматографија се изведува и на пакувани и на капиларни колони. Капиларните колони се добиваат со нанесување тенок слој на адсорбент на внатрешниот ѕид на капиларата, наречени отворени цевчести капилари со порозен слој (*Porous-layer open tubular, PLOT*).

Молекуларни сита

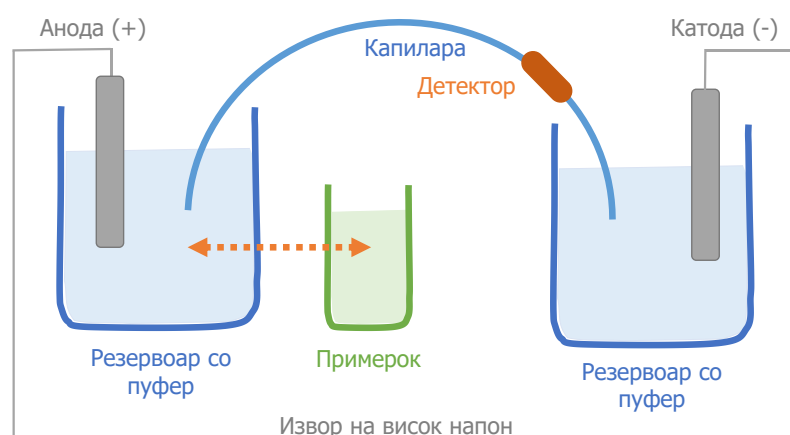
Молекуларно сито претставува јонски изменувач изработен од алуминиум силикат. Големината на порите зависи од присутниот катјон. Ситата се класифицираат врз основа на големина на дијаметарот на молекулите што може да поминат низ порите. Вообичаено достапни молекулски сита имаат пори со големина од 4, 5, 10 или 13 Å. Служат за разделување на мали од големи молекули, често во комбинација со уште една вообичаена колона за гасна хроматографија.

Порозни полимери

Порозни полимери во облик на мали зрнца со воедначена големина се добиваат од стирен вкрстено поврзан со дивинилбензен. Големината на порите се контролира со степенот на вкрстеното поврзување. Вообичаено се користат за разделување на гасовити поларни аналити, како на пример: водород сулфид, оксиди на азот, вода, јаглерод диоксид, метанол и винил хлорид.

КАПИЛАРНА ЕЛЕКТРОФЕРЕЗА И КАПИЛАРНА ЕЛЕКТРОХРОМАТОГРАФИЈА

Капиларната електрофореза и капиларната електрохроматографија се релативно нови сепаративни методи. Овие методи се изведуваат во капиларна цевка исполнета со пуфер, со димензии од 10 до 100 μm внатрешен дијаметар и од 40 до 100 cm во должина. Цевката се протега помеѓу два резервоара наполнети со пуфер во коишто се вронети и платински електроди. Примерокот се внесува во едниот крај на цевката, а потоа се пушта потенцијал во опсег од 20 до 30 kV помеѓу двете електроди, за цело време дури трае разделувањето. Разделените аналити се детектираат со детектор што е поставен на спротивниот крај од цевката. Сликата 17.1 претставува шематски приказ на типичен инструмент што може да се примени и за капиларната електрофореза и за капиларната електрохроматографија.



Слика 17.1 Шематски приказ на систем за капиларна електрофореза

И покрај сличностите во опремата, принципите на коишто се базираат овие две сепаративни техники се фундаментално различни. Кај капиларната електрофореза, разделувањето зависи од разликите во степенот со кој јоните од аналитот патуваат под дејство на електричното поле. Така, оваа техника може да се примени само на аналити што создаваат јони во пуферскиот систем присутен во капиларата. Спротивно на ова, капиларната електрохроматографија се применува и на јонски и на неутрални аналити. Овде електроосмотскиот проток на пуферскиот раствор работи како пумпа со помош на којашто се движат молекулите на аналитот низ втората фаза што е одговорна за задржување на молекулите на аналитите во различен степен. Така, разделувањето се заснова на разликите во дистрибуциската рамнотежа, како кај течната хроматографија.

Принцип на електрофорезата

Електрофорезата претставува сепаративен метод, базиран на различните брзини на патување на јонизирани видови во пуферски раствор, низ којшто протекува електрично поле (dc). Оваа сепаративна техника прв пат е развиена од шведскиот хемичар Арне Тиселиус (*Arne Tiselius*) во 1930 година за време на студија за серумски протеини. Тој забележал дека протеините во пуферски раствор низ кој протекува електрично поле, патуваат во еден правец и со брзина одредена со нивниот полнеж и големина. За својата работа во 1948 година добил Нобелова награда. На почеток од примената на електрофорезата, разделувањето се изведувало на антиконвективни подлоги, како што се агароза и полиакриламиден гел, со цел намалување на ширењето на зоните предизвикано од термалната

дифузија и конвекција. Во 1970-те се воведени отворени цевчести колони, со што значајно се подобрила ефикасноста на разделувањето, а во 1980-те се решени многу проблеми од аспект на внесување на примерокот и детектирање на анализите, со што е воспоставена капиларната зонска електрофореза.

Исклучителна моќ на електрофорезата претставува нејзината можност за разделување на јонизирани макромолекули што се од интерес за биотехнолошката индустрија, како и биохемиски и биолошки истражувања. Електрофорезата е метод од избор за разделување на протеини (ензими, хормони, антитела) и нуклеински киселини (ДНК, РНК). На пример, за да се секвенционира ДНК, неопходно е да се направи разлика помеѓу полинуклеотидите со долги ланци, со молекулски маси во опсег од 200 до 500, коишто се разликуваат во само еден нуклеотид. Само електрофорезата има доволна моќ на резолуција, да се справи со ваков проблем.

Електрофоретската сепарација се изведува така што се аплицира мала лента од примерокот во тенка цевка или на рамен порозен медиум, како хартија или полуцврст гел, потопен во воден пуфериран раствор. Потоа, се вклучува висок електричен потенцијал по должина низ пуферот со помош на пар електроди лоцирани на двата краја од пуферот. Овој потенцијал предизвикува придвижување на јоните присутни во примерокот од едната кон другата електрода. Брзината на патувањето зависи од набојот и од големината на јоните. Разделувањето се заснова на разликите во односот набој/големина за различните анализи во примерокот. Колку е поголем овој однос, толку побрзо се движат јоните во електричното поле.

Начини на изведување на електрофорезата

Електрофоретските разделувања се изведуваат на два, сосема различни начини: тенкослојна (гел) електрофореза и капиларна електрофореза.

Тенкослојната (гел) електрофореза е класичен метод што се употребува многу одамна за разделување сложени молекули со голема молекулска маса, од биолошки и од биохемиски интерес. Се изведува на тенок, рамен слој од порозен гел, што содржи воден пуферски раствор во порите. Вообичаено, димензиите на гелот изнесуваат неколку сантиметри од сите страни и, како и кај тенкослојните хроматографски плочи, на гелот може да се разделуваат неколку примероци истовремено. Примероците се аплицираат како петна или во бунарчиња на тенкиот слој, а потоа се пушта потенцијал (dc) долж тенкиот слој за одреден период. Кога ќе се процени дека разделувањето е завршено, струјата се исклучува и разделените компоненти се гледаат со обележување на петната, на начин опишан кај тенкослојната хроматографија.

Капиларната електрофореза претставува инструментална верзија на електрофорезата. Во многу случаи, овој нов метод во целост ја заменува тенкослојната електрофореза, а дополнително има и неколку важни предности, што ќе бидат изложени подолу во текстот.

Теорија на електрофоретските разделувања

Брзината на движење v на јон, изразена во сантиметри на секунда, во електрично поле е еднаква на производ од јачината на полето E ($V \cdot cm^{-1}$) и електрофоретска подвижност μ_e ($cm^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$).

$$v = \mu_e E \quad (17.1)$$

Електрофоретската подвижност, пак, е пропорционална на јонскиот полнеж на анализот и обратно пропорционална на задржувањето, предизвикано од факторите на триење. Електричното поле дејствува само на јоните. Ако две

компоненти се разликуваат или по полнежот или по силите на триење на кои се изложени во пуферот, ќе се разделат една од друга. Неутралните компоненти не се разделуваат. Силите на триење што дејствуваат на задржување на анализот се одредени од големината и обликот на јонот и вискозноста на средината низ којашто се движат. За јони со иста големина, колку е поголем полнежот, поголема е силата на придвижување и поголема е брзината на движење. За јони со ист полнеж, колку е помал јонот, помали се силите на триење и поголема е брзината на движење. Односот полнеж/големина на јонот ги комбинира овие два ефекта. Потребно е да се забележи дека, за разлика од хроматографијата, само една фаза е вклучена во електрофоретското разделување.

Капиларна електрофореза

Колку и да е корисна конвенционалната тенкослојна електрофореза, овој тип на разделување вообичаено е бавен, макотрпен, сложен за автоматизирање и не дава доволно прецизни квантитативни информации. За време на средните и на доцните 1980-ти, експлозивно се зголемуваше развојот и примената на капиларната електрофореза, а се појавија и неколку комерцијално достапни инструменти. Капиларната електрофореза нуди брзи разделувања со голема резолуција на исклучително мали волумени од примерокот (0,1 до 10 nL, наспроти тенкослојната електрофореза, за која се потребни примероци со големина опсег на μL). Дополнително, разделените компоненти се елуираат од едниот крај на капиларата, каде може да се употребат разни детектори за квантитативно разделување, како кај HPLC.

Брзина на патување во капиларната електрофореза

Како што може да се види од равенката (1), брзината на патување v на јонот зависи од силата на електрично поле. Електричното поле, пак, е одредено од големината на применетиот потенцијал (V , изразено во волти) и должината L низ која се применува потенцијалот.

$$v = \mu_e \cdot \frac{V}{L} \quad (17.2)$$

Ова равенство покажува дека е потребна примена на високи потенцијали за да се добие брзо движење на јоните и брзо разделување. Пожелни се брзи разделувања, но ушто поважно е да се добие разделување со голема резолуција. Од таа причина, потребно е да се разгледаат факторите што ја одредуваат резолуцијата во електрофорезата.

Фактори што влијаат на ефикасноста

Најголемо влијание врз зголемувањето на ширината на пикот, или со други зборови, должината на растворената зона, има феноменот на дифузија. Дополнително, кај капиларната зонска електрофореза, ширењето на зоните е предизвикано од термалните ефекти, електродисперзијата или атсорптивните ефекти. Овие, како и други причинители на ширење на зоните се прикажани во Табела 17.1.

Табела 17.1 Причинители на ширење на зоните

Причинител	Коментар
Лонгитудинална дифузија	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ја дефинира основната граница на ефикасноста ▪ растворените супстанции со помали коефициенти на дифузија формираат потесни зони
Џулско загревање	<ul style="list-style-type: none"> ▪ предизвикува температурни градиенти и ламинарен проток
Должина на инјекторот	<ul style="list-style-type: none"> ▪ должините на инјекторите треба да се помали од должината на зоната контролирана со дифузија ▪ проблемите со лимитот на детекција обично бараат инјектори подолги од идеалните
Атсорпција на примерокот	<ul style="list-style-type: none"> ▪ интеракциите помеѓу растворените супстанции со капиларните сидови вообичаено предизвикуваат опашки на пиковите
Несоодветност помеѓу кондуктивноста на примерокот и пуферот (електродисперзија)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ растворените супстанции со поголема кондуктивност од кондуктивноста на пуферот даваат фронтални пикови ▪ растворените супстанции со помала кондуктивност од кондуктивноста на пуферот даваат пикови со опашка
Ненивелирани пуферските резервоари	<ul style="list-style-type: none"> ▪ произведува ламинарен проток
Големина на детекторската ќелија	<ul style="list-style-type: none"> ▪ треба да е мала во споредба со ширината на пикот

Висина на подовите во капиларната електрофореза

Под идеални услови, кога не би постоело џулско загревање и интеракции помеѓу растворот и сидовите, дифузијата би била единствен предизвикувач на ширењето на зоните.

Кај хроматографијата, и лонгитудиналната дифузија и отпорот при масениот трансфер придонесуваат за ширење на зоните. Но, бидејќи кај електрофорезата е вклучена само една фаза, потребно е да се разгледа само лонгитудиналната дифузија. За електрофорезата, бројот на теоретските подови (N) е даден со равенката:

$$N = \frac{\mu_e \cdot V}{2 \cdot D} \quad (17.3)$$

каде што D е коефициент на дифузија на растворената супстанција, со единици $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Бидејќи резолуцијата се зголемува со зголемување на бројот на теоретските подови, пожелно е да се применуваат високи напони за да се постигне подобра резолуција при разделувањето. Треба да се нагласи дека кај електрофорезата, за разлика од хроматографијата, бројот на подовите не се зголемува со зголемување на должината на колоната.

Кај тенкослојната електрофореза, џулското загревање ја ограничува примената на високите напони до околу 500 V. Оттука произлегува и една од предностите на капиларната електрофореза во споредба со тенкослојната електрофореза. Поради должината на капиларата и малата површина на пресекот, отпорот на растворот низ капиларата е многу голем. Бидејќи губењето на силата е обратно пропорционално со отпорот, може да се примени многу поголем електричен потенцијал. Дополнително, големиот однос од површината и волуменот на капиларата овозможува соодветно ладење. Како последица на овие два фактори, не се појавува ширење на зоните во значителен степен. Вообичаено се користат потенцијали од 20000 до 60000 V, и овие високи потенцијали ја подобруваат брзината и резолуцијата во споредба со тенкослојната електрофореза. Добиените пикови често имаат ширина блиска до теоретската

граница утврдена од лонгитудиналната дифузија. Со капиларната електрофореза се постигнува број на подови во опсег од 100000 до 200000, во споредба со вообичаените од 5000 до 20000 кај HPLC.

Дијаметар на капилара

Ефикасноста на единица должина, е обратно пропорционална на дијаметарот на капиларата, односно, со намалување на дијаметарот на капиларата, се намалува висината на теоретските подови. На тој начин се зголемува ефикасноста на единица должина. Така, капиларите со помали дијаметри, може да бидат со помала должина, со што се намалува и времето на разделување.

Во поново време, сè повеќе се работи на воведување чипови за електрофоретски разделувања, со што би се добила зголемена ефикасност за намалено време на анализа, како резултат на минијатуризацијата. Главни предности на чип-електрофорезата се намалена потрошувачка на примерок, реагенси, мобилна фаза, со што се намалува и цената и отпадот, а се зголемува бројот на анализи за исто време.

Резолуција

Спротивно на хроматографијата, електрофорезата е сепаративна техника кај којашто предност е високата ефикасност, а не селективноста. Разлика во подвижност од само 0,01% може да е доволна за комплетна резолуција на соседни пикови.

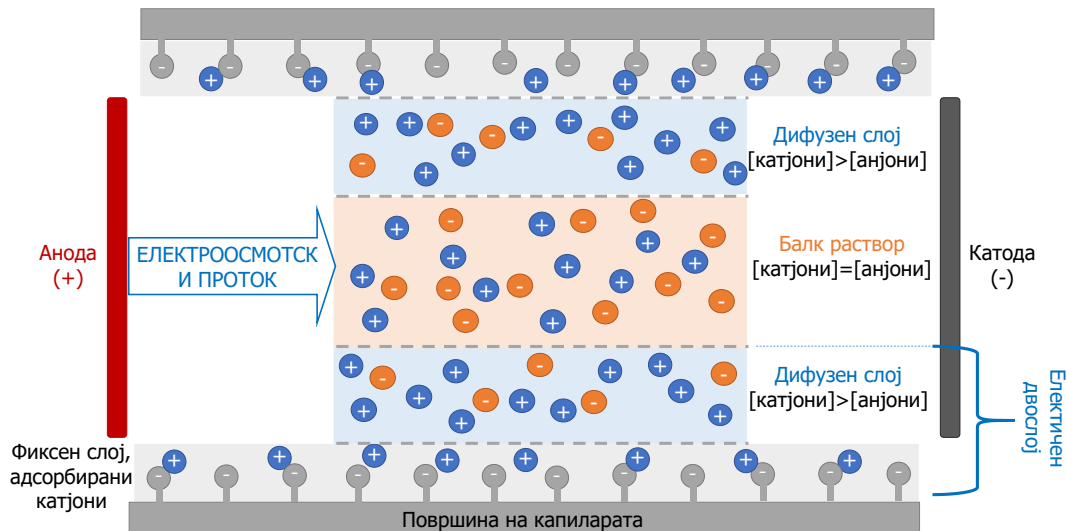
Високата резолуција резултира од примената на висок напон. Зголемување на напонот четири пати, ја зголемува резолуцијата двојно.

На резолуцијата влијае и електроосмотскиот проток, на начин објаснет подолу.

Електроосмотски проток

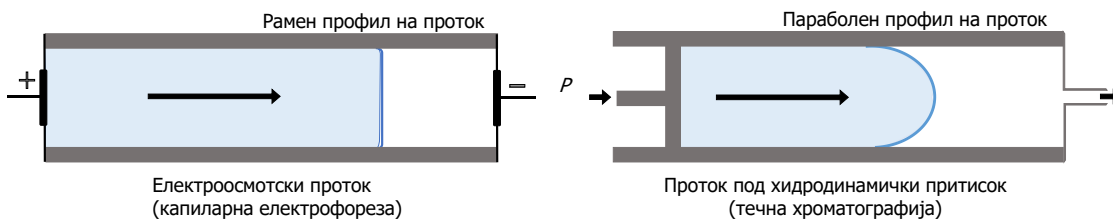
При примена на висок потенцијал низ капиларна цевка што содржи пуферски раствор, вообичаено се појавува електроосмотски проток, што го движи растворувачот кон катодата или кон анодата, со брзината на движење што може да биде со значителна големина. На пример, при примена на потенцијал од 25 kV, пуферот (50 mM, pH=8) протекува низ 50 cm долга капилара со брзина од приближно 5 cm/min кон катодата.

На Слика 17.2 е прикажана дистрибуцијата на полнежот на капиларната силика-површина, од каде се гледа дека причина за појава на електроосмотски проток е електричниот двоен слој што се појавува на допирната површина силика/раствор. За вредности на pH поголеми од 3, внатрешниот ѕид на капиларата од силика, има негативен набој поради јонизацијата на силанолните групи (Si-OH). Пуферските катјони формираат електричен двослој, што граничи со негативната површина на силика-капиларата. Катјоните во дифузниот надворешен слој од двослојот се привлекуваат кон катодата, а бидејќи анјоните се солватизирани, движејќи се, го носат со себе и растворувачот.



Слика 17.2 Приказ на дистрибуцијата на полнежот на површината на силика-капиларата и на резултирачкиот електроосмотски проток

Електроосмотската предизвикува протокот на растворот низ цевката да има рамен профил, за разлика од параболниот профил кај течната хроматографија што се јавува поради проточниот притисок (Слика 17.3). Бидејќи профилот на протокот е рамен, електроосмотскиот притисок нема значително влијание на ширењето на зоните, како што притисокот на протокот влијае во хроматографијата.



Слика 17.3 Профил на протокот на течност под а) електроосмотски притисок и б) хидродинамички притисок

Брзината на електроосмотскиот проток вообичаено е поголема од електрофоретското движење на поединечните јони и станува ефективна пумпа на мобилна фаза кај зонската капиларна електрофореза. Иако анализите се движат во согласност со нивните полнежи во капиларата, брзината на електроосмотскиот проток вообичаено е доволна за да ги истурка сите позитивни, неутрални, па дури и негативни видови кон истиот крај на капиларата, па така може да се детектираат сите наеднаш. Резултирачкиот електроферограм изгледа исто како хроматограм.

Брзината на електроосмотскиот проток v е дадена со равенка слична на равенката 17.1 Така,

$$v = \mu_{e0} \cdot E \quad (17.4)$$

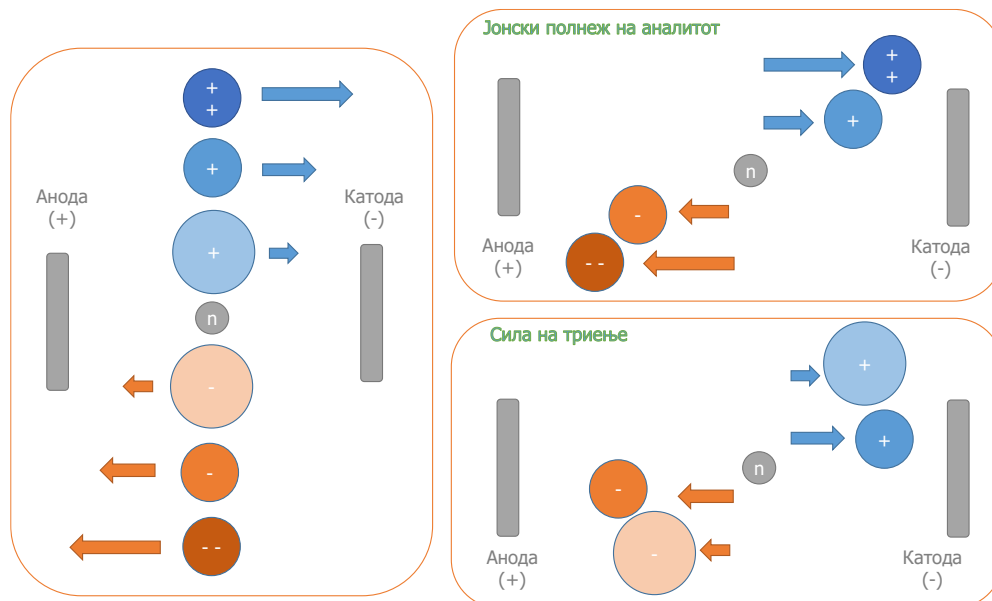
Во присуство на електроосмоса, брзината на еден јон претставува збир на неговата брзина на движење и брзината на електроосмотскиот проток. Така,

$$v = (\mu_e + \mu_{e0}) \cdot E \quad (17.5)$$

треба да се нагласи дека μ_e на анјон има негативен предзнак.

При разделување по пат на капиларна електрофореза, како резултат на електроосмотската, во редоследот на елуција први се најбрзите катјони, ги следат побавните катјони, потоа сите неутрални видови во единечна зона, а на крај

најбавните анјони, последователно следени од побрзи анјони (види Слика 17.4). Во некои случаи, брзината на електроосмотскиот проток може да не е доволно голема за да ја надмине брзината со којашто некои анјони одат кон анодата, во тој случај овие анјони се движат кон анодата.



Слика 17.4 Брзина на движење на јоните во присуство на електроосмотски проток. Должината на стрелката до јонот ја покажува големината на брзината; насоката на стрелката ја покажува насоката на движењето. Негативната електрода е од десна страна, а позитивната електрода на левата страна

Со додавање катјонски сурфактант во пуферот, можно е да се смени правецот на нормалниот електроосмотски проток. Сурфактантот се апсорбира на капиларниот ѕид и го прави позитивно наелектризиран. Сега пуферските анјони се собираат во близина на ѕидот и се движат кон катодата, односно позитивната електрода. Овој трик често се користи за да се забрза разделувањето на анјоните.

Електроосмотската е често посакувана кај одредени типови капиларна електрофореза, но не кај сите. На пример, многу висок електроосмотски проток може да ја намали резолуцијата, особено при разделување катјони со слична подвижност. За некои типови електрофоретски разделувања, како кај капиларна изотахофореза, капиларно изоелектрично фокусирање и капиларна гел електрофореза, неопходно е електроосмотскиот проток да има вредност нула.

Електроосмотскиот проток може да се отстрани со обложување на внатрешниот ѕид со реагенс како на пример триметилхлоросилан, со цел отстранување на површинските силанолни групи, или пак со адсорпција на катјонски сурфактанти, како на пример цетил-трибутил-амониум-бромид. Друг начин за намалување на електроосмотскиот проток е преку зголемување на вискозноста на пуферот. Ова вообичаено се постигнува со полнење на капиларата со полимерни гелови. Електроосмотскиот проток може да се промени и со примена на надворешно електрично поле низ радиусот на капиларата, како и со примена на заднински притисок. Во Табела 17.2 се прикажани методите за контролирање на електроосмотскиот проток.

Табела 17.2 Методи за контролирање на електроосмотскиот проток (ЕОП)

Варијабла	Резултат	Коментар
Електрично поле	Пропорционална промена на ЕОП	<ul style="list-style-type: none"> ▪ со намалување се намалува ефикасноста и резолуцијата ▪ со зголемување може да дојде до џулско загревање
pH на пуферот	ЕОП се намалува на ниски pH, а се зголемува на високи pH вредности	<ul style="list-style-type: none"> ▪ најпогоден и корисен метод за промена на ЕОП ▪ може да го промени полнежот или структурата на растворената супстанција
Јонска сила или концентрација на пуферот	Со нивно зголемување се намалува зета потенцијалот и ЕОП	<ul style="list-style-type: none"> ▪ висока јонска сила произведува висока струја и можно џулско загревање ▪ ниска јонска сила е проблематична од аспект на адсорпција на примерокот ▪ ако кондуктивноста се разликува од кондуктивноста на примерокот, се искривува обликот на пикот ▪ ако се намали се ограничува подредувањето (<i>stacking</i>) на примерокот
Температура	Намалување на вискозноста од 2 до 3% за секој °C	<ul style="list-style-type: none"> ▪ често користен, бидејќи температурата се контролира со инструментот
Органски модификатор	Менување на зета потенцијалот и вискозноста (обично намалување на ЕОП)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ комплексни промени, ефектот најлесно се одредува експериментално
Сурфактант	Се адсорбира на ѕидовите на капиларата преку хидрофобни и/или јонски интеракции	<ul style="list-style-type: none"> ▪ може да ја промени селективноста ▪ анјонски сурфактанти може да го зголемат ЕОП ▪ катјонски сурфактанти може да го намалат ЕОП или да го сменат правецот на ЕОП ▪ може значајно да ја промени селективноста
Неутрален хидрофилен полимер	Се адсорбира на ѕидовите на капиларата преку хидрофобни интеракции	<ul style="list-style-type: none"> ▪ се намалува ЕОП со штитење на површинскиот полнеж и зголемување на вискозноста
Ковалентно обвивање	Хемиски врски со ѕидовите на капиларата	<ul style="list-style-type: none"> ▪ можни се многу модификации (хидрофилност или полнеж) ▪ стабилноста е често проблематична

Инструменти за капиларна електрофореза

Инструментот за изведување на капиларната електрофореза е едноставен (Слика 17.1). Фузираната капилара наполнета со пуфер, што вообичаено има внатрешен пречник од 10 до 100 μm и должина од 40 до 100 cm, се протега помеѓу два резервоари за пуфер, во коишто се наоѓаат и платинските електроди. Примерокот се внесува од едниот крај, а детекцијата се врши на другата страна од капиларата. Поларноста на изворот на напојување под висок напон може да биде што е прикажано на сликата или, пак, да биде со спротивна поларност за да се овозможи брзо разделување на анјоните.

Иако концептот на инструментот е едноставен, постојат значајни експериментални потешкотии при внесување на примерокот, како и проблеми при детекцијата поради малите волумени на апликација. Бидејќи волуменот на нормална капилара изнесува од 4 до 5 μL , волуменот на инјектирање и детекција мора да бидат од ред величина на неколку нанолитри или помалку.

Внесување на примерокот

Најчесто употребувани методи за внесување на примерокот се електрокинетско инјектирање и инјектирање под притисок.

При електрокинетското инјектирање, едниот крај од капиларата и соодветната електрода се отстрануваат од пуферскиот резервоар и се ставаат во мал сад што го содржи примерокот. Потоа се пушта потенцијалот за одредено време, со што се овозможува влез на примерокот во капиларата со помош на комбинација на јонско движење и електроосмотски проток. Овој крај на капиларата и електродата потоа се враќаат во пуферскиот резервоар, каде што стојат за време на разделувањето. Недостаток на оваа техника на инјектирање е инјектирање на поголема количина на поподвижни јони, за сметка на бавнодвижечките јони.

Исто и кај инјектирањето под притисок, инјекторскиот крај на капиларата краткотрајно се става во сад што го содржи примерокот, а потоа се применува разлика во притисоци за придвижување на растворот од примерокот низ капиларата. Разликата меѓу притисоците се постигнува или со примена на вакуум на детекторскиот крај на капиларата, или со примена на притисок врз примерокот, или, пак, со подигнување на инјекторскиот дел на капиларата. Инјектирањето под притисок нема недостаток од аспект на селективност за јонското движење, но не може да се применува кај капилари наполнети со гел.

Кај двете техники на инјектирање, волуменот на инјектирање се контролира со времето на инјектирањето. Вообичаени се инјектирања на волумени од 5 до 50 nL , а можни се и инјектирања и на волумени помали од 100 pL . За пуфер со густина и вискозност блиски до вредностите на водата, при висинска разлика од 5 cm и внатрешен дијаметар на капиларата од 75 μm , за време од 10 s , се инјектира волумен од 6 nL .

Со примена на микроинјекторски додатоци, конструирани од капилари, со многу мали внатрешни дијаметри, се овозможува земање примерок од пиколитарски количини, како што се единечни клетки или супструктури во една клетка. Оваа техника се применува за анализа на аминокиселини и на невротрансмитери од единечна клетка.

Детекција

Разделените аналити поминуваат низ одредена точка од капиларата кај повеќето типови на капиларна електрофореза, поради што детекторите имаат сличен дизајн и функции како детекторите опишани кај HPLC. Постои само една разлика, која се јавува поради тоа што кај капиларната електрофореза секој јон се движи со брзина што е одредена од неговата електрофоретска подвижност. Така, зоните од аналитите поминуваат низ детекторот со различни брзини, поради што површините под пиковите се зависни од времето на ретенција. Спротивно, кај HPLC, сите компоненти поминуваат низ детекторот со брзина на мобилната фаза, па површините под пиковите се независни од времињата на ретенција. Вообичаено, оваа временска зависност е незначајна.

Во Табела 17.3 е прикажана листата на техниките на детекција што се употребуваат за капиларна електрофореза и соодветните граници на детекција за овие детектори.

Табела 17.3 Детектори развиени за капиларна електрофореза

Принцип на детекција	Репрезентативен лимит на детекција ¹ (детектирани молекули)
Спектрометрија	
Апсорпција ²	10^{-15} - 10^{-13}
Флуоресценција	
Претколонска дериватизација	10^{-17} - 10^{-20}
Колонска дериватизација	8×10^{-16}
Постколонска дериватизација	2×10^{-17}
Индиректна флуоресценција	5×10^{-17}
Термални леќи ²	4×10^{-17}
Раман ²	2×10^{-15}
Масена спектрометрија	1×10^{-17}
Електрохемиски	
Кодуктивност ²	1×10^{-16}
Потенциометрија	Не е објавен
Амперометрија	7×10^{-19}
Радиометрија ²	1×10^{-19}

1) Цитираните лимити на детекција се одредени со различни волумени на инјектирање (од 18 pL до 10 nL)

2) Лимити на детекција, изразени како маса чијашто вредност е добиена со претварање на концентрациските лимити на детекција, одредени со волумен на инјектирање од 1 nL

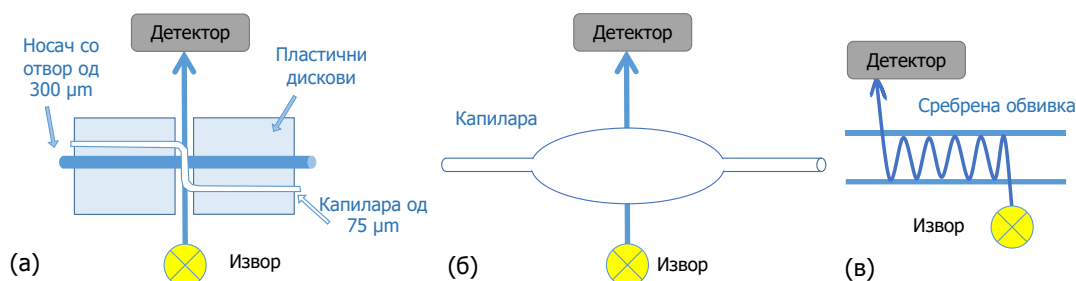
Апсорпциски методи. Флуоресцентните и апсорпционите детектори се употребуваат многу во капиларната електрофореза, иако апсорпциските се почести, заради нивната поширока применливост. За да се задржи волуменот при детектирање во нанолитарски опсег или помалку, детекцијата се изведува во колоната. Во овој случај, мал сегмент од заштитниот полиамиден слој се отстранува од надворешноста на капиларата, по пат на горење, растворање или гребене. Овој сегмент од капиларата потоа служи како детекторска ќелија. За жал, должината на патеката за мерењето не е подолга од 50 до 100 μm , што го ограничува лимитот на детекција на пониски концентрации. Но, бидејќи се употребуваат мали волумени, лимити на детекција изразени како маса, се еднакви или дури и помали од оние кај HPLC.

За да се подобри осетливоста на апсорпциските мерења, може да се применат неколку техники за зголемување на должината на патеката за спроведување на мерењето. На Слика 17.5 се прикажани три вакви техники. Една од техниките, којашто е комерцијално достапна, вклучува извиткување на капиларата во форма на латиничната буква Z, како што е прикажано на Слика 17.5 а, со што се добива должина на патот од 3 m. За жал, подобрувањето на осетливоста со оваа техника е многу помала отколку што се очекува, веројатно поради несоодветното фокусирање на светлината.

Слика 17.5 б ја покажува втората стратегија за зголемување на должината на патеката. Овде се формира меур пред крајот од капиларата. Во комерцијалната верзија на оваа техника, за капилара со внатрешен дијаметар од 50 μm , меурот

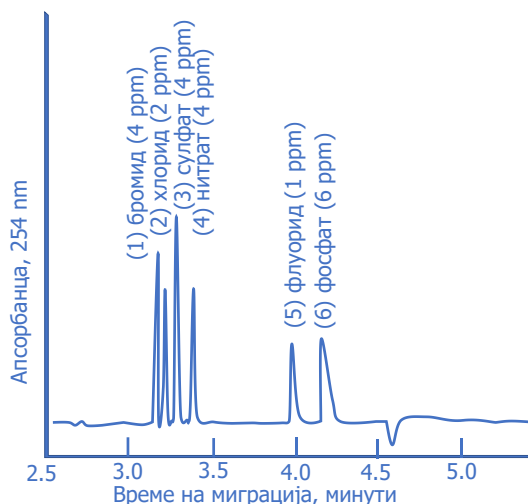
има внатрешен дијаметар од 150 μm , што овозможува тројно зголемување на должината на патеката.

Третата техника за зголемување на должината на патеката на зрачењето е со помош на рефлексија и е прикажана на Слика 17.5 в. Кај оваа техника, крајот на капиларата се обложува со сребрена рефлективна обвивка. Во овој случај, снопот зрачење подлежи на бројни рефлексии пред да излезе од капиларата.



Слика 17.5 Три типа ќелии за подобрување на осетливоста на детекција со мерење на апсорпцијата: а) ќелија од 3 mm б) мешеста ќелија од 150 mm в) мултирефлективна ќелија

Индиректна детекција. Детекцијата со индиректна апсорпција се употребува за видови коишто е тешко да се детектираат поради малата моларна апсорптивност без претходна дериватизација. Јонскиот хромофор се става во електрофоретскиот пуфер. Потоа детекторот прима константен сигнал поради присуство на оваа супстанција. Анализот заменува некои од јоните, исто како кај јоноизменувачката хроматографија, па детекторскиот сигнал се намалува за време на поминувањето на анализот низ детекторот. Анализот потоа се одредува преку падот на апсорбанцијата. Електроферограмот на Слика 17.6 е добиен со употреба на индиректна апсорпциска детекција со 4 mM хроматен јон како хромофор. Овој јон силно апсорбира на 254 nm.



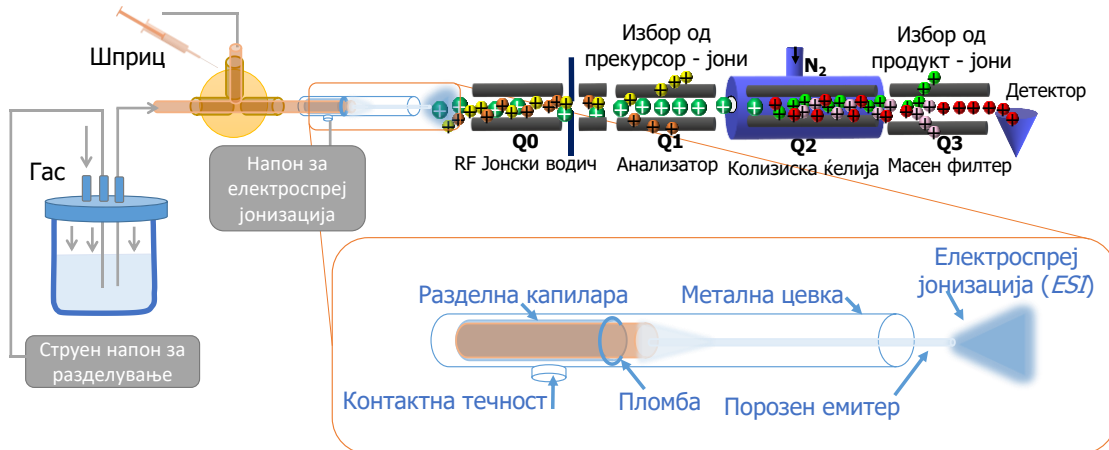
Слика 17.6 Електроферограм добиен од смеса на шест анјони со индиректна детекција со 4 nM хроматен јон на 254 nm.

Флуоресцентна детекција. Исто како кај HPLC, флуоресцентната детекција води кон зголемена осетливост и селективност за флуоресцентни анализи или флуоресцентни деривати. Инструментите со ласер се моќни бидејќи овозможуваат фокусирање на ексцитациското зрачење на малите капилари и постигнување

ниски граници на детекција од интензивни извори. Ласерската флуоресцентна детекција овозможува детекција на само 10 зептомоли или 6000 молекули.

Електрохемиска детекција. За капиларната електрофореза се употребуваат два типа електрохемиска детекција: кондуктометрија и амперометрија. Еден од проблемите при електрохемиско детектирање претставува изолацијата на детекторските електроди од високиот потенцијал потребен за разделувањето. Еден од методите за изолација вклучува внесување порозна чаша или графитен спој помеѓу едната капилара и втората капилара што ги содржи детекторските електроди.

Детекција со масена спектрометрија. Протоците низ електрофоретските капилари имаат многу мали брзини, помали од $1 \mu\text{L}/\text{min}$, што овозможува спојување на ефлуентот од капиларата на електрофоретскиот систем директно на јонизационскиот извор од масениот спектрометар. Моментално, внесениот примерок најчесто се јонизира со електроспреј, иако може да се употреби и бомбардирање со брзи атоми. Капиларната електрофореза со масена детекција се користи релативно краток период, но е од најголем интерес за биолозите и за биохемичарите за одредување големи молекули присутни во природата, како протеини, ДНК фрагменти и пептиди. На Слика 17.7 е претставува шематски приказ на вообичаен електроспреј - јонизациски дел поврзан со квадриполен масен спектрометар.



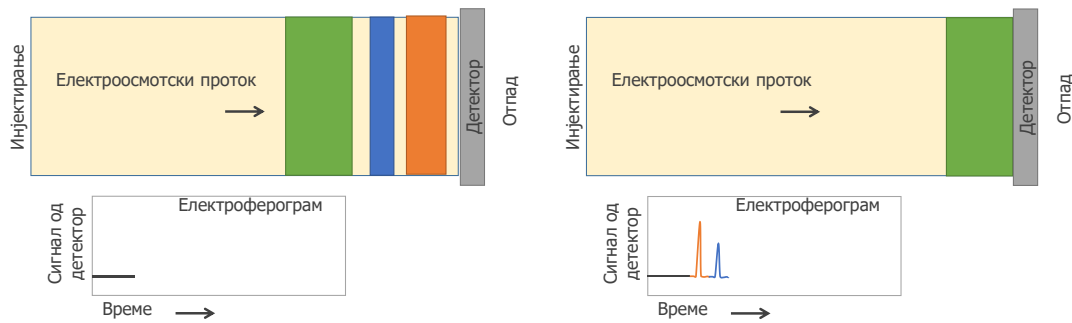
Слика 17.7 Инструмент за капиларна електрофореза/масена спектрометрија

Кај молекули со поголема молекулска маса, често постојат јони со десетина или со повеќе полнежи. Поради ова е возможно да се детектираат аналити со висока молекулска маса со квадриполен инструмент дури и со скроман масен опсег. Вообичаени граници на детекција за капиларна електрофореза/масена спектрометрија (CE/MS) се од редот на неколку десетини од фемтомоли за молекули со молекулска маса од 100000 и повеќе.

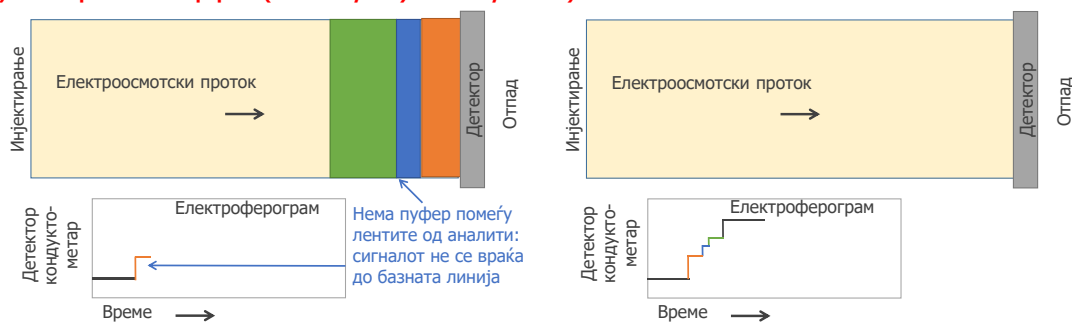
Модови на капиларна електрофореза

Капиларните електрофоретски разделувања се изведуваат на неколку начини, наречени модови. Овие модови првпат се употребени кај тенкослојната електрофореза, а потоа се приспособени и на капиларната. Тука спаѓаат следните модови: зонската капиларна електрофореза (CZE), капиларната гел-електрофореза (CGE), капиларното изоелектрично фокусирање (CIEF) и капиларната изотахофореза (CITP). Подолу се илустрирани вообичаените примени на секоја од овие техники (Слика 17.8).

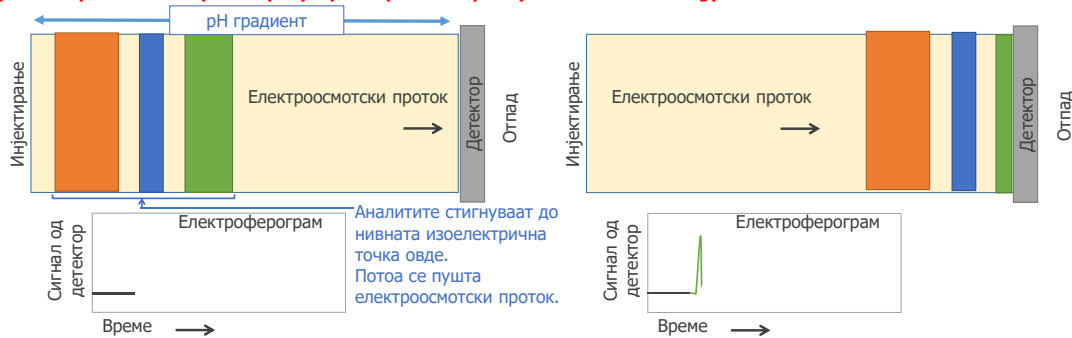
а) Зонска капиларна електрофореза (CZE – capillary zone electrophoresis)



б) Капиларна изотахофореза (CITP - Capillary Isotachopheresis)



в) Капиларно изоелектрично фокусирање (CIEF - Capillary Isoelectric Focusing)



Слика 17.8 Три мода на електрофоретско разделување

Зонска капиларна електрофореза

Кај зонската капиларна електрофореза (CZE), составот на пуферот е постојан низ регионот за разделување. Применетиот потенцијал предизвикува движење на секоја од различните јонски компоненти од смесата со сопствена брзина, како и разделување во зони што може комплетно да се одделат или пак да се делумно преклопени. Комплетно одделените зони имаат пуферски региони помеѓу нив (види Слика 17.8 а). Оваа ситуација е аналогна на елуциската

хроматографија на колона, каде што регионите на мобилна фаза се лоцирани помеѓу зоните што ги содржат разделените аналити.

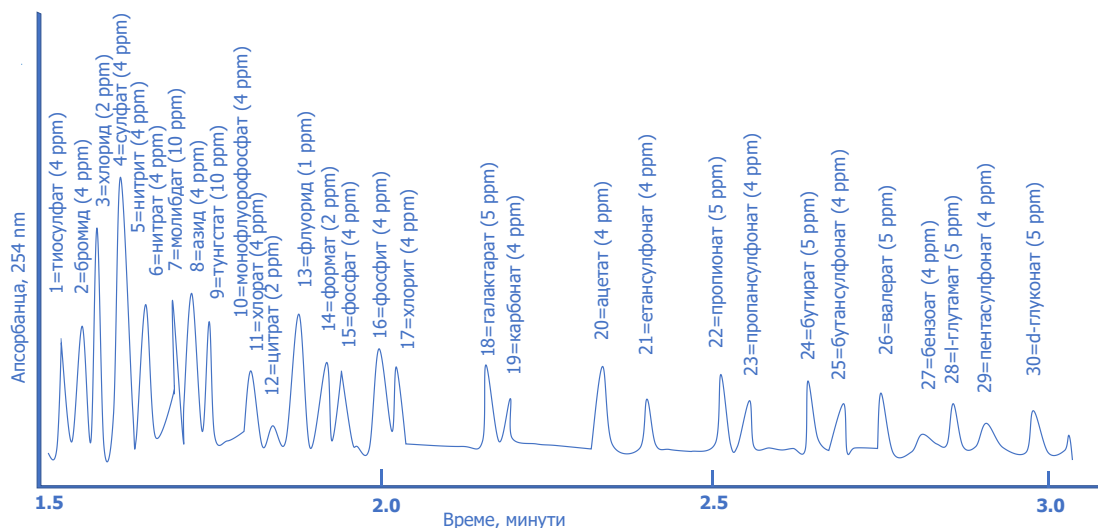
Разделување на мали јони

За најголем број електрофоретски разделувања на мали јони, од аспект на намалување на времето, најдобро е јоните на аналитот да се движат во ист правец со електроосмотскиот проток. Така, за разделување катјони, не се третираат сидовите на капиларата, а електроосмотскиот проток и движењето на катјоните е во насока на катодата. Од друга страна, за разделување на анјоните, правецот на електроосмотскиот проток обично е обратен поради обработката на сидот на капиларата со алкил-амониумови соли, како што е цетил-триметиламониум бромид. Позитивно наелектризираните амониумови јони се прикачуваат за негативно наелектризираната површина на силиката и создаваат негативно наелектризиран двослој од растворот, привлекуван кон анодата, со што се менува правецот на електроосмотскиот проток.

Во минатото, јоно-изменувачката хроматографија била најчест метод за анализа на мали јони. Техника од избор за катјони, била атомската апсорпциска спектроскопија и емисиската спектроскопија со индуктивно спрегната плазма. Во поново време, методите на капиларна електрофореза претставуваат конкуренција на овие традиционални методи за анализа на мали јони. Постојат неколку големи причини за прифаќање на електрофоретските методи: поевтина опрема, помали димензии на примерокот, многу поголема брзина и подобра резолуција.

Големината на примерокот потребна за електрофореза е во рамките на нанолитарска скала, додека за другите видови анализа на мали јони вообичаено се потребни примероци во микролитри или поголеми примероци. Според тоа, електрофоретските методи се поосетливи од другите методи од аспект на маса (но не и од аспект на концентрација).

Сликата 17.9 ја илустрира брзината и резолуцијата на електрофоретското разделување на мали јони. Овде, 30 анјони се разделени за само три минути. Кај јоноизменувачката хроматографија, за толку кратко време би можеле да се разделат само три до четири анјони.



Слика 17.9 Електроферограм кој покажува разделување на 30 анјони. Внатрешен дијаметар на капиларата: 50 μm (фузирана силика). Детекција: индиректно UV, 254 nm.

Разделување на молекули

Различни мали синтетички хербициди, пестициди и фармацевтски супстанции, што се јони или може да се дериватизираат за да дадат јони, може да се разделат и анализираат со CZE. Протеини, аминокиселини и јаглехидрати се разделуваат за најкратко време со CZE. Во случај на неутрални јаглехидрати, разделувањето се изведува со формирање негативно наелектризиран боратни комплекси. Овие комплекси лесно се формираат ако се користи боратен пуфер како медиум за разделување.

Капиларна гел-електрофореза

Капиларната гел-електрофореза (CGE) се изведува на порозен полимерен гел-матрикс, чии пори се полни со пуферска смеса во која се врши разделувањето. Во раните студии на тенкослојната електрофореза, примарна цел на полимерниот медиум била да се намали дисперзијата на анализот, со помош на конвекција и дифузија, како и да се обезбеди медиум што може да се употребува при детекцијата и скенирањето. Ова довело до сознание дека овој тип на медиум може да обезбеди молекуларно сееење, со што анализите ќе се задржуваат во различна мера во зависност од големината на порите на полимерот и големината на јоните на анализот. Овој тип на сееење е особено корисен при разделување на макромолекули, како што се протеини, ДНК фрагменти и олигонуклеиди што имаат ист полнеж, а се разликуваат во големината. Моментално, најголем број електрофоретски разделувања се изведуваат на тенок слој гел. Некои капиларни електрофоретски разделувања на видови што се разликуваат во големина, исто така, се изведуваат на гелови со коишто се наполнети капиларите.

Најчест тип гел што се употребува при електрофореза е полиакриламиден полимер, формиран со полимеризација на акриламид ($CH_2 = CH - CO - NH_2$) во присуство на агенс за вкрстено поврзување. Големината на порите на полимерот зависи од односот на мономерот и агенсот за вкрстено поврзување. Зголемување на количината на агенсот за вкрстено поврзување резултира со мала големина на порите. Други гелови што се употребуваат за капиларна гел електрофореза вклучуваат агароза, полисахарид екстрахиран од морска алга, метилцелулоза и полиетилен гликол.

Капиларна изотахофореза

Кај капиларната изотахофореза (CITP) сите зони на анализи патуваат со иста брзина. Така, името потекнува од зборовите *iso*, за исто и *tach*, за брзина. Со една апликација, може да се разделат или катјони или анјони, но не и двата типа јони во исто време. При разделувањето, примерокот се инјектира помеѓу два пуфера, водечкиот пуфер содржи јони со поголема подвижност, отколку било кој јон на анализот, а терминалниот пуфер содржи јони со помала подвижност од јоните на анализот. На пример, при разделување на анјони, брзодвижечки хлоридни јони се содржани во водечкиот пуфер, а бавнодвижечки хептаноатни јони во терминалниот пуфер. За разделување на анјони, водечкиот електролитен раствор е поврзан со анодата, а терминалниот пуферски раствор за катодата.

При изотахофоретското разделување, по аплицирање на потенцијал, јоните на анализот патуваат, како кај зонската електрофореза. Притоа, секој јон има единствена брзина, дадена со производот $\mu_e \cdot E$. Оваа разлика во брзината на движење резултира со разделување на различни анализи во соседни зони, при што најбрзите видови се лоцирани во зона директно приспособена за водечкиот пуфер, а најбавните веднаш пред терминалниот пуфер. Откако ќе се формираат зоните, се движат со иста брзина. Зоните имаат иста брзина поради тоа што полето на

потенцијалот се намалува за поподвижните зони, а се зголемува за побавните, за да се овозможи струјата да биде иста во сите делови на пуферот. Јонската струја што резултира од протокот на јоните во пуферот е аналогна на струјата во коло составено од неколку отпорници поврзани на серија батерии. Овде, струјата мора да биде идентична кај сите отпорници. Така, потенцијалот низ секој отпорник мора да варира на таков начин, за да се задоволи Омовиот закон.

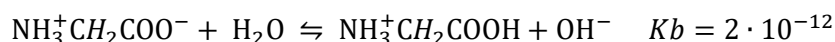
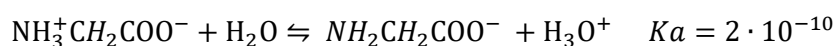
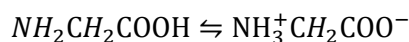
Со постигнување на рамнотежата кај изотахофоретскиот експеримент, постигнати се условите да може секоја компонента од примерокот да се движи во зона што се наоѓа помеѓу зона со малку побрзи и зона со малку побавни јони, како што е прикажано на Слика 17.8 б. Границите помеѓу зоните се јасни. Ако растворените јони почнат да дифундираат во следната побрза зона, се намалува полето што ја намалува брзината сè додека не се врати во сопствената оригинална зона. На Слика 17.8 б може да се забележи дека, за разлика од зонската електрофореза или елуциската хроматографија, зоните со аналити се приспособени директно едни со други, а не се разделени со зони од пуферот.

Капиларно изоелектрично фокусирање

Капиларното изоелектрично фокусирање (CIEF) се користи за разделување амфипротични видови, како аминокиселини и протеини што содржат слабо кисела карбоксилна група и слабо базна аминокгрупа (Слика 17.8 в).

Карактеристики на амфипротични соединенија

Амфипротично соединение е соединение што во раствор може да биде и протон-донор и протон-акцептор. Вообичаена аминокиселина, како глицин, е амфипротично соединение. Кога ќе се раствори глицинот во вода, значајни се три реакции:



Првата реакција претставува еден вид внатрешна реакција помеѓу киселина и база, аналогна на реакција помеѓу едноставна карбоксилна киселина и амин. Вообичаен алифатичен амин има базна константа на дисоцијација од 10^{-4} до 10^{-5} , додека многу карбоксилни киселини имаат кисели константи на дисоцијација со приближно иста вредност. Последица на ова е протекување на првата реакција кон десно, со доминантни продукт/и во растворот.

Аминокиселинскиот продукт од првата реакцијата, кој содржи и позитивен и негативен полнеж, се нарекува цвистер-јон. Како што е прикажано со втората и третата реакција, цвистер-јонот на глицин е појака киселина, отколку база. Така, воден раствор на глицин има слабо кисели својства.

Цвистер-јонот на аминокиселина, што содржи и позитивен и негативен полнеж, нема тенденција да патува во електрично поле, додека поединечно наелектризираните катјонски и анјонски соединенија се привлекуваат од електродите со спротивен полнеж. Во електричното поле кога рН на растворувачот е такво да се подеднакво застапени и анјонските и катјонските форми, не се појавува нето-миграција на аминокиселини (миграција на јоните кон електродите во зависност од нивниот нето полнеж). рН вредноста на која не се појавува нето-миграцијата се нарекува изоелектрична точка (pI) и претставува важна физичка константа за карактеризација на аминокиселините и зависи од константите на јонизација на соединенијата.

Така, за глицин:

$$K_a = \frac{[H_3O^+] \cdot [NH_2CH_2COO^-]}{[NH_3^+CH_2COO^-]}$$

$$K_b = \frac{[OH^-] \cdot [NH_3^+CH_2COOH]}{[NH_3^+CH_2COO^-]}$$

Во изоелектричната точка,

$$[NH_2CH_2COO^-] = [NH_3^+CH_2COOH]$$

Ако се подели K_a со K_b и се преуреди во равенката, за изоелектрична точка се добива:

$$\frac{K_a}{K_b} = \frac{[H_3O^+] \cdot [NH_2CH_2COO^-]}{[OH^-] \cdot [NH_3^+CH_2COOH]} = \frac{[H_3O^+]}{[OH^-]}$$

Со замена на $K_w / [H_3O^+]$ за $[OH^-]$ и преуредување се добива:

$$[H_3O^+] = \sqrt{\frac{K_a \cdot K_w}{K_b}}$$

Како што е прикажано со следните равенки, изоелектричната точка (pI) за глицин, се јавува на pH 6,0.

$$[H_3O^+] = \sqrt{\left(\frac{2 \cdot 10^{-10}}{2 \cdot 10^{-12}} \cdot 1 \cdot 10^{-14}\right)} = 1 \cdot 10^{-6}$$

$$pI = -\log(1 \cdot 10^{-6}) = 6$$

Разделување на амфипротични соединенија

Кај изоелектричното разделување на амфипротични соединенија, разделувањето се врши во пуферска смеса, во која континуирано се менуваат pH вредностите по должина на патувањето. Овој pH градиент се подготвува од смеса на неколку различни амфолити во воден раствор. Амфолити се амфотерични соединенија, што вообичаено содржат карбоксилна и аминок група. Комерцијално се достапни амфолитни смеси што имаат различни pH вредности.

За да се изведе експеримент со изоелектрично фокусирање во капиларна цевка, смеса од анализи се раствора во разреден раствор на амфолити, кој потоа се пренесува во цевката. Едниот крај на цевката потоа се вртнува во раствор на јака база, како натриум хидроксид, каде што се наоѓа и катодата. Другиот крај на цевката се вртнува во раствор на јака киселина, како, на пример, фосфорна киселина, каде што се наоѓа анодата. При аплицирање на потенцијал, водородните јони почнуваат да се движат од анодата кон катодата. Хидроксидните јони се движат во обратен правец, од катодата кон анодата. Ако амфолитот или анализот имаат нето-негативен полнеж, мигрираат кон позитивната анода. При патувањето, тие минуваат низ региони со континуирано сè помали pH вредности, каде што се случува прогресивна протонација на соединенијата, со што се намалува нивниот негативен полнеж. На крај, јоните стигнуваат до pH вредност каде што нето полнежот (однос помеѓу негативен и позитивен полнеж) е нула (нивната изоелектрична точка). Тогаш престанува движењето на соединението. Овој процес, што се одвива за секој амфолит овозможува континуиран pH градиент низ

целата цевка. Јоните на анализот, исто така, се движат додека не стигнат до нивните изоелектрични точки. Овие процеси резултираат со разделување на секој анализ во тесна лента, што е лоцирана на рН вредност на неговата изоелектрична точка (Слика 17.9 в). Во вакви системи се добива многу остро фокусирање. Треба да се нагласи дека разделувањата со изоелектрично фокусирање се засноваат на разликите во карактеристиките на анализите (K_a , K_b), а не на разликите во брзините на движењето. Кога анализот ќе стигне до регион каде што е неутрален, позициите на лентите стануваат константни и не се менуваат со време.

Мобилизација на фокусираните ленти

За да се детектираат фокусираните ленти при разделувањето со капиларното изоелектрично фокусирање, неопходно е да се премести, односно да се мобилизира, содржината од капиларата, така што лентите да поминат низ детекторот лоциран на едниот крај на капиларата. Оваа мобилизација може да се постигне со примена на разлика во притисоците, како што се прави при аплицирање на примерокот, или пак, може едноставно да се смени растворот во одделот на електродата. При чекорот фокусирање, еднаков број водородни и хидроксидни јони влегуваат на спротивните краеви од капиларата, при што рН градиентот останува стабилен. Под претпоставка дека, во растворот на натриум хидроксид се додава натриум хлорид, откако е завршено фокусирањето, хлоридните и хидроксидните јони ќе се движат кон крајот на колоната потпоен во натриум хидроксид и збирот на концентрациите на двата вида јони се балансира со водородните јони што влегуваат на спротивниот крај. Ова значи дека сега има помалку хидроксидни отколку водородни јони што се движат во капиларата. рН-вредноста на катодниот крај опаѓа. рН-градиентот веќе не е стабилен и се движи кон катодниот крај, а заедно со него се движат и фокусираните ленти. Лентите што први поминуваат низ детекторот соодветствуваат на протеините со најмногу алкални изоелектрични точки.

Капиларна електрохроматографија

Електрохроматографијата претставува хибрид помеѓу капиларната електрофореза и HPLC, што ги нуди сите предности од двете техники. Постојат два типа капиларна електрохроматографија: електрохроматографија на пакувана колона и мицеларна електрокинетичка капиларна хроматографија. Вториот тип има поширока примена.

Капиларната електрохроматографија (CEC) има неколку предности над двете основни техники: се применува за разделување на неутрални видови, како и HPLC и овозможува високо ефикасно разделување на микроволумени од растворот на анализ како и капиларната електрофореза, без потреба од пумпа за создавање на висок притисок. Кај електрохроматографија, мобилната фаза се пренесува преку стационарната фаза по пат на електроосмотски проток, наместо со механичко пумпање, со што значајно се поедноставува системот. Дополнително, електроосмотскиот проток дава рамен профил, како што е прикажано на Слика 17.3 а, наместо хидродинамичен профил прикажан на Слика 17.3 б. Како последица на тоа, се постигнува подобро разделување.

Електрохроматографија на пакувана колона

Електрохроматографијата на пакувана колона е најнова од сите електросепаративни техники. Кај оваа техника, поларниот растворувач се движи со помош на електроосмотски проток низ капилара со реверзно-фазно HPLC

пакување. Разделувањето зависи од дистрибуцијата на аналитите помеѓу мобилната фаза и течната стационарна фаза во капиларата.

Мицеларна електрокинетичка капиларна хроматографија

Долго време се сметало дека капиларната електрофореза не може да се примени за разделување на неутрални молекули. Но во 1984 година, Терабе (*Terabe*) и соработниците опишале модификација на метод што овозможува разделување на ароматични феноли и нитро соединенија со мала молекулска маса, на опрема прикажана на Слика 17.1. Кај оваа техника се употребува сурфактант, како на пример натриум додецил сулфат во концентрација на којашто се создаваат мицели. Мицелите се формираат во водени раствори кога концентрацијата на јонските видови, што имаат опашка од долги јаглеводородни ланци, се зголемува над одредено ниво, наречено критична мицеларна концентрација. Во оваа точка, јоните почнуваат да создаваат сферни агрегати, составени од 40 до 400 јони, чии јаглеводородни опашки се во внатрешноста на агрегатот, а наелектризираните краеве се изложени кон надворешната страна, во водата. Мицелите претставуваат стабилна секундарна фаза, што е способна да апсорбира неполярни компоненти во внатрешноста на честичките со јаглеводородните ланци, при што се солубилизираат неполярните видови.

Капиларната електрофореза што се изведува во присуство на мицели се нарекува мицеларна електрокинетска капиларна хроматографија (МЕСС или МЕКС). Кај оваа техника, во пуферот се додаваат сурфактанти во количина што ја надминува критичната мицеларна концентрација. Најчесто применуван сурфактант е натриум додецил сулфат. Површината на јонската мицела од овој тип има голем негативен набој, што дава голема електрофоретска подвижност кон позитивната електрода. Но, многу пуфери покажуваат висок електроосмотски проток кон негативната електрода, така што анјонските мицели исто така се движат кон таа електрода, но со помала брзина. За време на анализата, пуферска смеса се состои од водена фаза што се движи брзо и мицеларна фаза, што се движи побавно. Кога ќе се внесе примерок во ваков систем, компонентите се дистрибуираат помеѓу водената фаза и јаглеводородната фаза во внатрешноста на мицелата. Позицијата на резултирачката рамнотежа зависи од поларноста на растворените супстанции. Поларните супстанции ја фаворизираат водената средина, а неполярните супстанции јаглеводородната.

Опишаниот систем е многу сличен како кај течната партициска хроматографија на колона. Различно е тоа што „стационарната фаза“ се движи по должина на колоната, но многу побавно отколку мобилната фаза. Механизмот на разделување е идентичен во двата случаја и зависи од разликите на коефициентите на дистрибуција на аналитите помеѓу водената фаза и јаглеводородна псевдостационарна фаза. Овој процес е хроматографски, па оттаму и хроматографија во името на оваа техника.

Една од предностите на капиларната хроматографија во присуство на мицели, како хибридна техника, над HPLC е многу повисоката ефикасност на колоната (100000 подови или повеќе). Дополнително, промената на втората фаза кај МЕСС е едноставно, со промена на мицеларниот состав во пуферот. Додека кај HPLC, втората фаза може да се смени само со промена на типот на пакување на колоната.

Ред.бр. Образложение на слика / табела

ПОГЛАВЈЕ 1. СТАТИСТИЧКА ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ	
<i>Сл.1.1</i>	Хистограм (ја прикажува дистрибуцијата на 50 резултати прикажани во Таб.1.1)
<i>Сл.1.2</i>	Гаусова распределба (крива на нормална распределба)
<i>Сл.1.3</i>	Крива на нормална распределба со различни стандардни девијации
<i>Сл.1.4</i>	Отстапување од вистинската вредност
<i>Сл.1.5</i>	Приказ на регресиона права во случај кога степенот на зависност помеѓу променливите $r = 1$
<i>Сл.1.6</i>	Приказ на регресиона права во случај кога степенот на зависност помеѓу променливите $r = 0$
<i>Сл.1.7</i>	Прецизност и точност на резултати
<i>Сл.1.8</i>	Графички приказ на метод на стандардни додатоци
<i>Таб.1.1</i>	Измерени вредности за апсорпција од примероци што содржат Fe^{3+} јони
<i>Таб.1.2</i>	Вредности на Студентовиот коефициент t
<i>Таб.1.3</i>	Вредности на коефициентот Q
<i>Таб.1.4</i>	Вредности за F за 95% веројатност ($P' = 0,05$)
ПОГЛАВЈЕ 2. ОСНОВИ НА СПЕКТРОСКОПСКИТЕ МЕТОДИ	
<i>Сл.2.1</i>	Приказ на зрак на монохроматска, планарно поларизирана светлина: а) насока на простирање на зракот и правец на простирање на електричното и на магнетното поле (трансферзална поставеност); б) дводимензионален приказ на векторот на електричното поле
<i>Сл.2.2</i>	Влијание на промената на медиумот врз монохроматската светлина
<i>Сл.2.3</i>	Подрачја на електромагнетскиот спектар
<i>Сл.2.4</i>	Електронски премин кај атоми
<i>Сл.2.5</i>	Карактеристични ултравиолетови апсорбциони спектри: а) атомски спектар, б) и в) молекулски спектар, г) континуиран спектар
<i>Сл.2.6</i>	Добивање на лентест спектар. Електронски премин кај молекул
<i>Сл.2.7</i>	Дијаграм на енергетски нивоа за органска молекула што покажува флуоресценција
<i>Сл.2.8</i>	Емисионен спектар на солена вода
<i>Сл.2.9</i>	Дијаграм на енергетски нивоа за: а) атом на натриум (линиски емисиски спектар), б) едноставен молекул (лентест емисиски спектар)
<i>Сл.2.10</i>	X-зраци емисиски спектар добиен од металот молибден
<i>Сл.2.11</i>	Зрачење од црно тело
<i>Сл.2.12</i>	Ослабување зрак на зрачење од страна на раствор (со концентрација c) што апсорбира зрачење при премин низ кивета (должината на патеката b)
<i>Сл.2.13</i>	Апсорпциски спектар
<i>Сл.2.14</i>	Поместување на положбата и на интензитетот на апсорпциониот максимум
<i>Сл.2.15</i>	Хемиско отстапување од Беровиот закон за индикатор
<i>Сл.2.16</i>	Инструментално отстапување од Беровиот закон при примена на полихроматска светлина
<i>Таб.2.1</i>	Спектроскопски методи зановани на електромагнетно зрачење
ПОГЛАВЈЕ 3. АТОМСКА СПЕКТРОМЕТРИЈА	
<i>Сл.3.1</i>	Приказ на ефективна ширина на линија
<i>Сл.3.2</i>	Видови на пнеуматски небулизатори
<i>Сл.3.3</i>	Процеси што се одвиваат за време на атомизација на примерокот
<i>Сл.3.4</i>	Делови на пламен
<i>Сл.3.5</i>	Пламеник со ламинарен проток
<i>Сл.3.6</i>	а) Пресек на електротермален атомизер, б) Платформа по Л'вов и нејзина позиција во графитната цевка
<i>Сл.3.7</i>	Атомизација со хидриден систем за атомска апсорпциска спектрометрија
<i>Сл.3.8</i>	Апсорпција на резонантни линии на атоми
<i>Сл.3.9</i>	Пресек на ламба со шуплива катода
<i>Сл.3.10</i>	Ламба со електрично празнење

Ред.бр.	Образложение на слика / табела
<i>Сл.3.11</i>	Приказ на метален диск - сечкач (chopper) на патот на снопот на зрачење меѓу изворот и атомизерот
<i>Сл.3.12</i>	Пламен спектрофотометар: а) со еден снап на зрачење, б) со два снопа на зрачење
<i>Сл.3.13</i>	Шематскиот приказ на изворот на индуктивно спрегната плазма
<i>Сл.3.14</i>	Приказ на небулизатор за внесување примерок во изворот на плазма
<i>Сл.3.15</i>	Триканален фотометар за определување на емисијата на калиум, на натриум и на литиум
<i>Таб.3.1</i>	Карактеристики на пламените
<i>Таб.3.2</i>	Лимити на детекција (ng/mL) за различни елементи
ПОГЛАВЈЕ 4. УЛТРАВИОЛЕТОВА И ВИДЛИВА СПЕКТРОМЕТРИЈА	
<i>Сл.4.1</i>	Распределба на електрони во σ и p молекулски орбитали
<i>Сл.4.2</i>	Видови молекулски орбитали кај формалдехид
<i>Сл.4.3</i>	Дијаграм на енергетски нивоа на четирите типа на електронски премини
<i>Сл.4.4</i>	Апсорпциски спектар на бензофен во неполарен (циклохексан) и поларен (етанол) растворувач
<i>Сл.4.5</i>	Апсорпциски спектар на 1,2,4,5-тетразин во: а) гасна фаза, б) растворен во хексан, в) воден раствор
<i>Сл.4.6</i>	UV спектри на <i>cis</i> и <i>trans</i> - стилбен
<i>Сл.4.7</i>	UV/Vis спектри на полиени
<i>Сл.4.8</i>	Апсорпциски спектри на фенол црвено при различни pH вредности
<i>Сл.4.9</i>	Емисиски спектар на деутериумова ламба и на волфрамова халоген-ламба
<i>Сл.4.10</i>	Монохроматори со дисперзивна решетка
<i>Сл.4.11</i>	а) Фотомултипликаторска туба, б) Фотодиода
<i>Сл.4.12</i>	Шематски приказ на спектрофотометар со еден зрак
<i>Сл.4.13</i>	Шематски приказ на спектрофотометар со диодна низа
<i>Сл.4.14</i>	Шематски приказ на спектрофотометар со два зрака
<i>Сл.4.15</i>	Шематски приказ на спектрофотометар со имерзиска сонда
<i>Сл.4.16</i>	Деривативни спектри
<i>Сл.4.17</i>	Апсорпциски спектар на етанолан раствор на ретинол ацетат: а) спектар од нулти-ред, б) петти извод на деривативен спектар добиен со последователно деривирање на спектар од нулти-ред, в) петти извод на деривативен спектар добиен директно од спектар од нулти-ред
<i>Таб.4.1</i>	Растворувачи за ултравиолетово и видливо подрачје
<i>Таб.4.2</i>	Апсорбирани бранови должини на зрачење и боја на материјата
ПОГЛАВЈЕ 5. МОЛЕКУЛСКА ЛУМИНИСЦЕНТНА СПЕКТРОМЕТРИЈА	
<i>Сл.5.1</i>	Електронски спин состојби на молекули.
<i>Сл.5.2</i>	Дијаграм на енергетски нивоа на фотолуминисцентен систем
<i>Сл.5.3</i>	Стоксова флуоресценција
<i>Сл.5.4</i>	Апсорпциски и емисиски спектри на родамин 6G во етанол и 4-(дицианометил)-2-метил-6-(4-диметиламиностирил)-4H-пиран во 0,1 M сулфурна киселина
<i>Сл.5.5</i>	Побудувачкиот спектар и флуоресцентниот спектар на хипотетичко соединение
<i>Сл.5.6</i>	Структурна формула на флуорен и бифенил
<i>Сл.5.7</i>	Структурна формула на комплекс на 8-хидроксихинолинот со цинк
<i>Сл.5.8</i>	Резонантни форми на анилиноот
<i>Сл.5.9</i>	Шематски приказ на составни делови на флуориметар или на спектрофлуориметар
<i>Сл.5.10</i>	Составни делови на флуориметар
<i>Сл.5.11</i>	Составни делови на спектрофлуориметар
<i>Сл.5.12</i>	Структура на најчесто употребувани реагенси

Ред.бр. Образложение на слика / табела

ПОГЛАВЈЕ 6. ИНФРАЦРВЕНА И РАМАНСКА СПЕКТРОСКОПИЈА	
Сл.6.1	Дипол на врските во молекулите на: хлороводород [(а) распределбата на полнежите, (б) шематска ознака на електричниот дипол на ковалентната врска]; јаглерод диоксид (в); вода [(г) диполи на врските во вода, (д) нето дипол на вода]
Сл.6.2	Типови молекулски вибрации
Сл.6.3	Дијаграм на потенцијална енергија на (а) хармониски осцилатор и (б) нехармониски осцилатор
Сл.6.4	Вибрациски модови на молекула на: а) вода и б) јаглерод диоксид
Сл.6.5	Спектрална дистрибуција на енергијата добиена од Нернстов извор при температура од околу 2200К
Сл.6.6	Шематски дијаграм на термопар
Сл.6.7	Интеракции помеѓу зраци: а) конструктивна интерференца се јавува кога зраците се во фаза, б) деструктивна интерференца се јавува кога зраците се надвор од фаза
Сл.6.8	Шематски приказ на Микелсонов интерферометар и на составни делови на FTIR инструмент
Сл.6.9	Шематски приказ на Микелсонов интерферометар осветлен од извор на монохромтско зрачење.
Сл.6.10	Создавање интерферограми на излез од Микелсонов интерферометар
Сл.6.11	Шематски дијаграм на двозрачен, дисперзивен IR спектрометар
Сл.6.12	Шематски приказ на IR спектрометар наменет за анализа на гасови
Сл.6.13	Растворувачи што се користат при IR спектрометрија
Сл.6.14	Расчленет приказ на составните делови на IR ќелија за течни примероци
Сл.6.15	Спектар добиен од етанол: а) нанесен како тенок филм помеѓу KBr плочки и б) пареи од етанол
Сл.6.16	Определување на висина на апсорпциски пик – метод на базна линија
Сл.6.17	Комплементарност меѓу инфрацрвениот и Раманскиот спектар на метил естер на линолеинската киселина
Сл.6.18	Дијаграм за потекло на Рејлиево, на Стоксово и на анти-Стоксово Раманско расејување
Сл.6.19	Поедноставен дијаграм Рамански спектрометар
Сл.6.20	Шематски приказ на дисперзивен Рамански спектрометар
Сл.6.21	Шематски приказ на FT Рамански спектрометар
Таб.6.1	Инфрацрвени спектрални области
Таб.6.2	Просечни вредности на силовата константа k
Таб.6.3	Скратена листа на фреквенции на органски функционални групи
ПОГЛАВЈЕ 7. НУКЛЕАРНО-МАГНЕТНА РЕЗОНАНТНА СПЕКТРОСКОПИЈА	
Сл.7.1	Аголен (I) и магнетен момент (μ) кај: а) атомско јадро, б) неспарен електрон
Сл.7.2	Прецеско движење на спин-активно јадро под дејство на магнетно поле B_0
Сл.7.3	Магнетниот момент на јадрото со $I = 1/2$, под дејство на B_0 , може да завземе две ориентации: а) паралелна ($m_I = 1/2$) и б) антипаралелна ориентација ($m_I = -1/2$)
Сл.7.4	Дозволени ориентации на магнетните моменти на јадро со $I = 1$ (пример ^2H и ^{14}N) и распоред на соодветните енергетски нивоа (во услови $B_0 \neq 0$)
Сл.7.5	Приказ на ориентација на магнетен момент на јадро
Сл.7.6	Магнетни моменти и енергетски нивоа на јадро со спин квантен број $\pm 1/2$
Сл.7.7	Модел на апсорпција на зрачење од страна на јадро што прецесира
Сл.7.8	Ширина на спектрална линија ($\Delta\nu$)
Сл.7.9	Ефективното магнетно поле околу разгледуваното јадро под дејство на околината: а) зголемено и б) намалено
Сл.7.10	^1H NMR спектар на t-бутанол

Ред.бр. Образложение на слика / табела

Сл.7.11	Обележување на NMR скалата и положба на некои карактеристични видови протони
Сл.7.12	Магнетна анизотропија кај: а) етилен (протонот е во незаштитен простор), б) ацетилен (протонот е во заштитен простор)
Сл.7.13	Магнетна анизотропија кај ароматично јадро (протоните се надвор од заштитениот простор)
Сл.7.14	Распоред на дијамагнетни (+) и парамагнетни (-) дејства околу единечна C-C врска
Сл.7.15	Циклохексан во конформација столица
Сл.7.16	Влијание на аклил супституенти врз δ вредноста
Сл.7.17	Области на хемиско поместување на одредени класи на органски соединенија
Сл.7.18	Спин-спин спрегнување на протоните А и В
Сл.7.19	NMR спектар на етилбромид
Сл.7.20	Разложување на резонантниот пик во мултиплицитети согласно правилото $n + 1$ (n – број на соседни водородни атоми)
Сл.7.21	1,1,2-трихлороетан (еквивалентните протони не стапуваат во спин-спин спрегнување едни со други, односно не даваат мултиплицитети)
Сл.7.22	Етил ацетат (спин-спин спрегнување настанува помеѓу H_b и H_c протоните)
Сл.7.23	Хемиско поместување и спин-спин спрегнување кај едноставни органски молекули
Сл.7.24	Шематскиот приказ на главните делови на NMR спектрометар
Сл.7.25	NMR спектар на етанол
Сл.7.26	NMR спектар на ацеталдехид
Сл.7.27	NMR спектар на пропанска киселина (CH_3CH_2COOH)
Сл.7.28	Шематски приказ на NMR-томограф (MRI скенер)
Сл.7.29	NMR томографска слика на мозок
Таб.7.1	Карактеристики на одредени значајни спин-активни јадра
Таб.7.2	Спин-квантните броеви и магнетните квантни броеви на некои поважни атомски јадра
ПОГЛАВЈЕ 8. НУКЛЕАРНО-МАГНЕТНА РЕЗОНАНТНА СПЕКТРОСКОПИЈА	
Сл.8.1	Масен спектар на етил бензен
Сл.8.2	Шематски приказ на деловите на масен спектрометар
Сл.8.3	Шематски приказ на систем за внесување на примерок
Сл.8.4	Масен спектар на 1-деканол добиен од тврд извор на јонизација
Сл.8.5	Масен спектар на 1-деканол добиен од мек извор на јонизација
Сл.8.6	Извор на електронска јонизација
Сл.8.7	Јонски извор на хемиска јонизација
Сл.8.8	Електроспреј јонски извор
Сл.8.9	Принцип на MALDI јонизација
Сл.8.10	MALDI спектар од матрикс со никотинска киселина, со примена на ласер со $\lambda = 266\text{nm}$
Сл.8.11	Шематски приказ на масен анализатор со магнетен сектор
Сл.8.12	Шематски приказ на двојно-фокусирачки масен спектрометар (дизајн на Нир Џонсон, <i>Nier-Johnson</i>)
Сл.8.13	Шематски приказ на квадрипол масен спектрометар
Сл.8.14	Геометрија на металните прачки
Сл.8.15	Шематски приказ на TOF масен анализатор
Сл.8.16	Шематски приказ на рефлектрон TOF масен анализатор
Сл.8.17	Шематски приказ на тандем MS инструмент
Сл.8.18	Шематски приказ на квадрипол јонска замка
Сл.8.19	Шематски приказ на FTICR
Сл.8.20	Шематски приказ на електронскиот мултипликатор со одвоени диноди

Ред.бр.	Образложение на слика / табела
<i>Сл.8.21</i>	Шематски приказ на електронскиот мултипликатор со континуирана динода
<i>Сл.8.22</i>	Масен спектар
<i>Сл.8.23</i>	Масен спектар на ацетон
<i>Сл.8.24</i>	Метастабилни јони во масен спектар
<i>Сл.8.25</i>	Видови јони во масен спектар
<i>Таб.8.1</i>	Јонски извори за масена спектрометрија
<i>Таб.8.2</i>	Најчесто употребувани матрикси за MALDI со брановите должини на кои се користат
ПОГЛАВЈЕ 9. РЕФРАКТОМЕТРИЈА	
<i>Сл.9.1</i>	Прекршување на светлината на гранична површина на две средини
<i>Сл.9.2</i>	Приказ на: а) рефрактирактан зрак, б) зрак што упаѓа под критичен агол и в) рефлектиран зрак
<i>Сл.9.3</i>	Мерење на критичен агол
<i>Сл.9.4</i>	Оптика на анализаторот на рефрактометарот
<i>Сл.9.5</i>	Шематски приказ на Амичи призма
<i>Сл.9.6</i>	Шематски приказ на составните делови на Абеов рефрактометар
<i>Сл.9.7</i>	Шематски приказ на дигитален рефрактометар
<i>Сл.9.8</i>	Шематски приказ на рачен рефрактометар
<i>Сл.9.9</i>	Шематски приказ на Бриксова скала
<i>Сл.9.10</i>	Приказ на зависноста помеѓу индексот на рефракција и концентрацијата на растворот
<i>Таб.9.1</i>	Физички константи изведени од индексот на рефракција
ПОГЛАВЈЕ 10. ПОЛАРИМЕТРИЈА	
<i>Сл.10.1</i>	Компоненти на електромагнетното зрачење
<i>Сл.10.2</i>	Дијаграм на: а) неполаризирано и б) поларизирано зрачење
<i>Сл.10.3</i>	Ориентација на векторите на брановите на поларизираната светлина
<i>Сл.10.4</i>	Приказ на два рефрактирани зрака што поминуваат низ кристал и се поларизирани нормално еден на друг
<i>Сл.10.5</i>	Конфигурација на асиметрична молекула (бромохлорофлуорометан)
<i>Сл.10.6</i>	Ротација на планарно поларизирана светлина
<i>Сл.10.7</i>	Конфигурација на симетрична молекула (дихлорофлуорометан)
<i>Сл.10.8</i>	S-2-бутанол е <i>d</i> -енантиомерна форма, R-2-бутанол е <i>l</i> -енантиомерна форма
<i>Сл.10.9</i>	Шематски приказ на составните делови на полариметар
<i>Сл.10.10</i>	Шематски приказ на вкрстено поставени поларизатор и анализатор
<i>Сл.10.11</i>	Шематски приказ на а) рачен полариметар и б) дигитален полариметар
ПОГЛАВЈЕ 11. ОСНОВИ НА ОПТИЧКА И НА ЕЛЕКТРОНСКА МИКРОСКОПИЈА	
<i>Сл.11.1</i>	Електромагнетен спектар и логаритамска скала на должина (опсег од 1 nm до 0,1 nm)
<i>Сл.11.2</i>	Светлосен микроскоп, исправен
<i>Сл.11.3</i>	Принцип на Кохлерова илуминација
<i>Сл.11.4</i>	Калибрирање на микроскоп
<i>Сл.11.5</i>	Шематски приказ на оптичките елементи кај стереомикроскоп
<i>Сл.11.6</i>	Ефекти на амплитуди и фазни предмети врз бран од светлината. (а) Референтен зрак со карактеристична амплитуда, бранова должина и фаза. (б) Амплитуден предмет апсорбира енергија и ја намалува амплитудата, но не ја менува фазата на зракот. (в) Фазен предмет ја менува брзината и ја менува фазата, но не и амплитудата на зракот.
<i>Сл.11.7</i>	Шематски приказ на оптички елементи кај микроскопија на темно поле
<i>Сл.11.8</i>	Шематски приказ на оптичките елементи кај поларизациона микроскопија
<i>Сл.11.9</i>	Шематски приказ на оптичките елементи кај флуоресцентен микроскоп
<i>Сл.11.10</i>	Шематски приказ на конфокалниот скенирачки дел на микроскопот и комуникацијата до објективот на микроскоп
<i>Сл.11.11</i>	SEM vs TEM

Ред.бр.	Образложение на слика / табела
<i>Сл.11.12</i>	Клучни концепти за суперрезолутивно отсликување – RESOLFT принцип
<i>Таб.11.1</i>	Видови микроскопи (избор на техники; листата не е сеопфатна)
ПОГЛАВЈЕ 12. ЕЛЕКТРОАНАЛИТИЧКИ МЕТОДИ	
<i>Сл.12.1</i>	Најчесто употребувани електроаналитички методи
<i>Сл.12.2</i>	Електрохемиска ќелија
<i>Сл.12.4</i>	Галванска ќелија без течна фазна граница
<i>Сл.12.5</i>	Шематски приказ на апаратура за потенциометриските методи
<i>Сл.12.6</i>	Апарат за директно потенциометриско определување на концентрација на јони во раствор
<i>Сл.12.7</i>	Шематски приказ на каломелова електрода
<i>Сл.12.8</i>	Шематски приказ на Сребро/сребро хлоридна електрода
<i>Сл.12.9</i>	Електроден систем за мерење на рН вредноста
<i>Сл.12.10</i>	Кристална мембранска електрода
<i>Сл.12.11</i>	Определување на концентрација на флуоридни јони со метод на директна калибрација
<i>Сл.12.12</i>	Определување на концентрација на јони со примена на метод на стандардни додатоци
<i>Сл.12.13</i>	а) Определување на завршната точка на титрација од крива на титрација, б) Определување на завршната точка на титрација од крива на титрација, в) Определување на завршната точка на титрација од крива на титрација
<i>Сл.12.14</i>	Апарат за електрогравиметрија без контрола на потенцијалот на катодата
<i>Сл.12.15</i>	а) Шематски дијаграм на апаратура за кулометричка титрација; б) Ќелија за кулометричка титрација
<i>Сл.12.16</i>	Експлицитни сигнали во волтаметрија
<i>Сл.12.17</i>	Шематски приказ на инструмент за волтаметрија
<i>Сл.12.18</i>	Типови на живина микроэлектрода
<i>Сл.12.19</i>	Волтамограм со линеарна промена на потенцијалот за редукција на вид А во производ Р
<i>Сл.12.20</i>	Амперометриски криви на титрација
<i>Сл.12.21</i>	Поларограм
<i>Таб.12.1</i>	Вредности на k за различни температури
ПОГЛАВЈЕ 13. ВОВЕД ВО ХРОМАТОГРАФИЈАТА	
<i>Сл.13.1</i>	(а) Дијаграм кој покажува разделување на смеса од компоненти А и В по пат на хроматографија на колона со елуирање, (б) Детекторски сигнал во различни етапи на елуирањето прикажани во (а).
<i>Сл.13.2</i>	На левата страна од сликата се прикажани профилите на концентрација на лентите што ги содржат анализите А и В на две различни времиња (t_1 и подоцна t_2) при патување низ колоната. Дијаграмите на десната страна од сликата прикажуваат хроматограми добиени при разделување на двокомпонентната смеса, каде што се илустрирани методи за подобрување на сепарацијата
<i>Сл.13.3</i>	Типичен хроматограм добиен од раствор на двокомпонентна смеса
<i>Сл.13.4</i>	Изглед на хроматографските пикови во зависност од вредноста на константа на дистрибуција.
<i>Сл.13.5</i>	Дефиниција на висина на под
<i>Сл.13.6</i>	Определување на број на теоретски подови преку ширина на хроматографски пик
<i>Сл.13.7</i>	Влијание на брзината на протокот на мобилна фаза врз висината на подот за а) течна хроматографија и б) гасна хроматографија.
<i>Сл.13.8</i>	Вообичаени патишта на две молекули за време на нивното елуирање
<i>Сл.13.9</i>	Вандемтерова крива за пакувана колона за течна хроматографија
<i>Сл.13.10</i>	Влијание на големината на честичките врз висината на подот кај пакувана колона за (а) гасна хроматографија и (б) течна хроматографија.
<i>Сл.13.11</i>	Разделување, во услови на три различни резолуции

Ред.бр.	Образложение на слика / табела
<i>Сл.13.12</i>	Ефект на факторот на ретенција врз резолуцијата и времето на елуирање
<i>Сл.13.13</i>	Промена на растворувачите во составот на мобилната фаза (поларност) со цел оптимизација на k'
<i>Сл.13.14</i>	Приказ на општиот проблем на елуирањето во хроматографијата
<i>Таб.13.1</i>	Поделба на хроматографските методи на колона
<i>Таб.13.2</i>	Променливи што имаат влијание врз ефикасноста на колоната
<i>Таб.13.3</i>	Кинетички процеси што влијаат на ширењето на пиковите
<i>Таб.13.4</i>	Важни хроматографски, експериментални мерки и равенки
<i>Таб.13.5</i>	Важни изведени мерки и зависности
ПОГЛАВЈЕ 14. ТЕНКОСЛОЈНА ХРОМАТОГРАФИЈА	
<i>Сл.14.1</i>	Плоча за тенкослојна хроматографија
<i>Сл.14.2</i>	(а) Силика-гел стационарна фаза, (б) модификација на површината на силика гелот со дихлородиметилсилан
<i>Сл.14.3</i>	Стационарни фази со различен степен на поларност
<i>Сл.14.4</i>	Уреди за апликација на примерок: а) микропипетор, б) микрошприц, в) капиларни пипети, г) механички диспанзер
<i>Сл.14.5</i>	Приказ на шема на означување на аплицирани раствори: S1 и S2 - референтни раствори; A1 и A2 - примероци за анализа
<i>Сл.14.6</i>	Хроматографски комори за хоризонтално развивање плочи
<i>Сл.14.7</i>	Комори за вертикално развивање: а) комора со нормално заситување со пари б) комора обложена со филтер хартија, заситена со пари на мобилната фаза
<i>Сл.14.8</i>	Шематски приказ на развивање на TLC плоча
<i>Сл.14.9</i>	Комори за детекција на дамките во UV/флуоресцентни анализи
<i>Сл.14.10</i>	Техники за воведување на реагенс за дериватизација: а) со прснување; б) со потопување; в) со изложување на пари
<i>Сл.14.11</i>	Топлинска плоча за TLC
<i>Сл.14.12</i>	Шематски приказ на TLC хроматограм
<i>Сл.14.13</i>	Шематски приказ на: а) TLC плоча по развивање (примерокот содржи два анализи А и Б), TLC хроматограм
<i>Сл.14.14</i>	Полуквантитативно определување на хидрокортизон во хидрокортизон ацетат
<i>Сл.14.15</i>	Шематски приказ на дводимензионална TLC на аминокиселини
<i>Сл.14.16</i>	Приказ на квантитативно определување со примена на TLC скенери
ПОГЛАВЈЕ 15. ВИСОКОПЕРФОРМАНСНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЈА	
<i>Сл.15.1</i>	Примена на течна хроматографија
<i>Сл.15.2</i>	Шематски приказ на HPLC систем
<i>Сл.15.3</i>	Разлика помеѓу а) градиентно и б) изократно елуирање на смеса
<i>Сл.15.4</i>	Шематски приказ на јамка за инјектирање на систем за HPLC
<i>Сл.15.5</i>	Шематски приказ на UV детектор во систем за HPLC
<i>Сл.15.6</i>	Апсорпциски спектар на елуент од смеса на три компоненти снимен во интервал од 5 секунди
<i>Сл.15.7</i>	Шематски приказ на детектор базиран на индекс на рефракција
<i>Сл.15.8</i>	Хемиски реактивни силанолни групи
<i>Сл.15.9</i>	Добивање силоксани
<i>Сл.15.10</i>	Поврзаност помеѓу поларноста на анализот (поларност $1 > 2 > 3$) и времето на елуирање за: а) нормално-фазна хроматографија со мобилна фаза со мала поларност, б) реверзно-фазна хроматографија и мобилна фаза со висока поларност, в) нормално фазна хроматографија со мобилна фаза со средна поларност и г) реверзно-фазна хроматографија и мобилна фаза со средна поларност
<i>Сл.15.11</i>	Влијание на должината на ланецот на реверзно-фазна силоксан стационарната фаза со големина честици од 5 μm , пакувана во колона
<i>Таб.15.1</i>	Својства на детектори во системите за HPLC

Ред.бр.	Образложение на слика / табела
	ПОГЛАВЈЕ 16. ГАСНА ХРОМАТОГРАФИЈА
<i>Сл.16.1</i>	Шематски приказ на гасен хроматограф
<i>Сл.16.2</i>	Шематски приказ на составни елементи гасен хроматограф
<i>Сл.16.3</i>	Приказ на напречен пресек на (а) директен инјектор со микромлазен испарувач и (б) инјектор со систем на разделник
<i>Сл.16.4</i>	Ротирачки вентил (valve): позиција на вентилот а) за полнење на јамката АСВ со примерок и б) за внес на примерокот во колоната.
<i>Сл.16.5</i>	Влијание на температурата на гасните хроматограми: а) изотермално на 45°C; б) изотермално на 145°C; в) програмирано од 30°C до 180°C.
<i>Сл.16.6</i>	Вообичаен пламен-јонизационен детектор
<i>Сл.16.7</i>	Шематски приказ на а) детекторска ќелија што работи на принцип на мерење на топлотна проводливост и б) поставеност на две детекторски ќелии-примерок и две детекторски стандардни ќелии.
<i>Сл.16.8</i>	Шематски приказ на електрон-врзувачки детектор
<i>Сл.16.9</i>	Атомски емисиски детектор
<i>Сл.16.10</i>	Хроматограми за примерок од бензин што содржи мала концентрација на метил терц-бутил етер (МТВЕ) и неколку алифатични алкохоли: а) следење на јаглеродната линија б) следење на кислородната линија.
<i>Сл.16.11</i>	Масен спектрометар како детектор во гасна хроматографија
<i>Сл.16.12</i>	Карактеристики и димензии на вообичаени гасно-хроматографски колони
<i>Сл.16.13</i>	Графички приказ на методот за определување на индексите на ретенција за три компоненти (2,2-диметилбутан, бензен, толуен)
<i>Сл.16.14</i>	Графички приказ на методот за определување на индексите на ретенција при анализа со примена на изотермална анализа (горе) и температурна програма (доле).
<i>Таб.16.1</i>	Својства и карактеристики на вообичаени гасно-хроматографски колони
<i>Таб.16.2</i>	Вообичаени (течни) стационарни фази кај гасна хроматографија
	ПОГЛАВЈЕ 17. КАПИЛАРНА ЕЛЕКТРОФОРЕЗА И КАПИЛАРНА ЕЛЕКТРОХРОМАТОГРАФИЈА
<i>Сл.17.1</i>	Шематски приказ на систем за капиларна електрофореза
<i>Сл.17.2</i>	Приказ на дистрибуцијата на полнежот на силика-капиларата и на резултирачкиот електроосмотски проток
<i>Сл.17.3</i>	Профил на протокот на течност под а) електроосмотски притисок и б) хидродинамички притисок
<i>Сл.17.4</i>	Брзина на движење на јоните во присуство на електроосмотски проток
<i>Сл.17.5</i>	Три типа на ќелии за подобрување на осетливоста на детекција со мерење на апсорпцијата: а) ќелија од 3 mm; б) мешеста ќелија од 150 mm; в) мултирефлективна ќелија.
<i>Сл.17.6</i>	Електроферограм добиен од смеса на шест анјони со индиректна детекција со 4 nM хроматен јон на 254 nm
<i>Сл.17.7</i>	Инструмент за капиларна електрофореза/масена спектрометрија.
<i>Сл.17.8</i>	Три мода на електрофоретско разделување.
<i>Сл.17.9</i>	Електроферограм кој покажува разделување на 30 анјони
<i>Таб.17.1</i>	Причинители на ширење на зоните
<i>Таб.17.2</i>	Методи за контролирање на електроосмотскиот проток (ЕОП)
<i>Таб.17.3</i>	Детектори развиени за капиларна електрофореза

ЛИТЕРАТУРА

1. Book Series Comprehensive analytical chemistry, Editor Dr Damia Barcelo, Series, ISSN: 0166526X, Elsevier (Coverage: 1991-1992, 1996, 1999-2009, 2011-2020)
2. David G. Watson, Pharmaceutical analysis, Elsevier (2005)
3. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Principles of Instrumental Analysis, Sixth edition – Thomson Brooks / Cole (2007)
4. Douglas B. Murphy, Michael W. Davidson - Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging, Second Edition-Wiley-Blackwell (2012)
5. European Pharmacopoeia 10.0, EDQM, Strasbourg, France (2020)
6. Francis Rouessac, Annick Rouessac - Chemical Analysis, Modern Instrumental Methods and Techniques, Fourth edition, English ed – John Wiley & Sons, Ltd (2007)
7. G.E. Tranter, 8.21 Spectroscopic Analysis: Polarimetry and Optical Rotatory Dispersion, Comprehensive Chirality, Elsevier, 2012, 411-421
8. Horst Freibolin – Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy, Fifth edition – Wiley-VCH (2011)
9. James W. Robinson, Eileen M. Skelly Frame, Jorge M. Frame II - Undergraduate Instrumental Analysis, Sixth edition – Marcel Dekker (2005)
10. Joseph Sherma, Bernard Fried - Handbook of Thin-Layer Chromatography, Third edition - CRC Press (2003)
11. MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG. Basic principles of TLC (2018)
12. M. W. Dong, HPLC and UHPLC for Practicing Scientists, John Wiley, & Sons Hoboken, New Jersey, 2nd ed. (2019)
13. Muhammad Akhyar Farruk ed. Atomic Absorption Spectroscopy, InTech, Rijeka, Croatia, ISBN:978-953-307-817-5

-
14. Peter E. Wall - Thin-Layer Chromatography: A Modern Practical Approach The Royal Society of Chemistry's (2005)
 15. Pomeranz Y., Meloan C.E. Refractometry and Polarimetry. In: Food Analysis. Springer, Boston, MA (1994)
 16. Slobodan M. Milosavljević – Structurne instrumentalne metode – Hemiski Fakultet, Beograd, Srbija (1994)

Користена литература за сликите

Поглавје	Реден број на слика	Користена литература (Сликите се преработени и приспособени)
1. Статистичка обработка на резултатите	1.1 - 1.4	Doglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Principles of Instrumental Analysis, Sixth edition – Thomson Brooks / Cole (2007)
2. Основи на спектроскопските методи	2.1 - 2.5 2.7 - 2.11 2.15 - 2.16	Doglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Principles of Instrumental Analysis, Sixth edition – Thomson Brooks / Cole (2007)
	2.6	David G. Watson, Pharmaceutical analysis, Elsevier (2005)
3. Атомска спектрометрија	3.1 - 3.4 3.8 3.10 3.12 3.14 3.15	Doglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Principles of Instrumental Analysis, Sixth edition – Thomson Brooks / Cole (2007)
	3.5 - 3.7 3.9 3.11	Muhammad Akhyar Farruk ed. Atomic Absorption Spectroscopy, InTech, Rijeka, Croatia, ISBN:978-953-307-817-5 (2012)
	3.13	www.wikimedia.org
	4.4	Fuat Bayrakceken, „Triplet–triplet optical energy transfer from benzophenone to naphthalene in the vapor phase“ (2007)
4. Ултравioletова и видлива спектрометрија	4.5	Doglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Principles of Instrumental Analysis, Sixth edition – Thomson Brooks / Cole (2007)
	4.6	Beale, R. N. Roe, E. M. F. “Ultra-violet absorption spectra of trans- and cis-stilbenes and their derivatives. Part I. trans- and cis-Stilbenes”, J. Chem. Soc. (1953)
	4.7	William Reusch, https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/Spectrpy/UV-Vis/spectrum.htm#uv1

Поглавје	Реден број на слика	Користена литература (Сликите се преработени и приспособени)
	4.8	Luigi Rovati, Paola Fabbri, Luca Ferrari, Francesco Pilati, Plastic Optical Fiber pH Sensor Using a Sol-Gel Sensing Matrix (2012) DOI: 10.5772/26517
	4.9 - 4.15	Francis Rouessac, Annick Rouessac, Chemical Analysis, Modern Instrumental Methods and Techniques, Fourth edition, English ed – John Wiley & Sons, Ltd (2007)
	4.16	David G. Watson, Pharmaceutical analysis, Elsevier (2005)
5. Молекулска луминисцентна спектрометрија	5.1	www.wikimedia.org
	5.3	
	5.6	
	5.2 5.5 5.9 - 5.11	Doglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Principles of Instrumental Analysis, Sixth edition – Thomson Brooks / Cole (2007)
	5.4	https://www.edinst.com/blog/what-is-the-stokes-shift/
6. Инфрацрвена спектроскопија	6.2	Doglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Principles of Instrumental Analysis, Sixth edition – Thomson Brooks / Cole (2007)
	6.3	
	6.5	
	6.9	
	6.11	
	6.13	
	6.14	
	6.16	
7. Нуклеарно-магнетна резонантна спектроскопија	7.1	Slobodan M. Milosavljević – Structurne instrumentalne metode – Hemiski Fakultet, Beograd, Srbija (1994)
	7.3 - 7.11	
	7.14 - 7.19	
	7.24	
	7.27	http://www.orgchemboulder.com/Spectroscopy/nmrtheory_protonchemshift.shtml / https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/nmr/nmr1.htm
	7.12	
	7.13	
	7.20 - 7.23	
	7.27	chem.libretext.org
	7.2	www.wikimedia.org
7.25		
7.26		
7.28		
7.29		

Поглавје	Реден број на слика	Користена литература (Сликите се преработени и приспособени)
8. Масена спектроскопија	8.1 - 8.5 8.11 8.12 8.19	Doglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Principles of Instrumental Analysis, Sixth edition – Thomson Brooks / Cole (2007)
9. Рефрактометрија	9.1 - 9.5 9.6 9.8	www.wikimedia.org http://www.refractometer.pl/Abbe-refractometer http://epgp.inflibnet.ac.in/epgpdata/uploads/epgp_content/food_technology/food_analysis_and_quality_control/10.refractometry_food_analysis/er/2615_et_m10.pdf
10. Полариметрија	10.1 10.2 10.9 10.3 10.4 10.6	Doglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Principles of Instrumental Analysis, Sixth edition – Thomson Brooks / Cole (2007) www.wikimedia.org G.E. Tranter, Spectroscopic Analysis: Polarimetry and Optical Rotatory Dispersion, Comprehensive Chirality, Elsevier, 2012, 411-421 https://www.physicsclassroom.com/class/light/Lesson-1/Polarization Pomeranz Y., Meloan C.E. Refractometry and Polarimetry. In: Food Analysis. Springer, Boston, MA (1994)
11. Основи на оптичка и на електронска микроскопија	11.1 11.3 11.4 11.6 11.7 11.10 11.12 11.5 11.8 11.9 11.11	Douglas B. Murphy, Michael W. Davidson - Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging, Second Edition-Wiley-Blackwell (2012) www.wikimedia.org http://cnx.org/contents/ba27839d-5042-4a40-afcf-c0e6e39fb454@25.2 https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Bruslind)/02%3A_Microscopes https://www.britannica.com

Поглавје	Реден број на слика	Користена литература (Сликите се преработени и приспособени)
12. Електроаналитички методи	12.1 12.9 12.16 12.19 - 12.21	Doglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Principles of Instrumental Analysis, Sixth edition – Thomson Brooks / Cole (2007)
	12.4 12.15 12.19	D. A. Scoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, Вовед во Аналитичка хемија, 7th edition (2000)
	12.7 12.8	https://glossary.periodni.com/glossary.php?en=silver%2Fsilver-chloride+electrode
	12.14	https://glossary.periodni.com/glossary.php?en=electrogravimetry
13. Основи на хроматографијата	13.1 - 13.14	Doglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Principles of Instrumental Analysis, Sixth edition – Thomson Brooks / Cole (2007)
14. Тенкослојна хроматографија	14.13 14.16	Doglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Principles of Instrumental Analysis, Sixth edition – Thomson Brooks / Cole (2007)
15. Високоперформансна течна хроматографија	15.1 - 15.3 15.5 - 15.11	Doglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Principles of Instrumental Analysis, Sixth edition – Thomson Brooks / Cole (2007)
	15.4	M. W. Dong, HPLC and UHPLC for Practicing Scientists, (John Wiley, & Sons Hoboken, New Jersey, 2nd ed. (2019)
16. Гасна хроматографија	16.1 16.3 - 16.5 16.8 - 16.11 16.13	Doglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Principles of Instrumental Analysis, Sixth edition – Thomson Brooks / Cole (2007)
	16.7	www.wikimedia.org
	17.3 17.5 17.6 17.9	Doglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - Principles of Instrumental Analysis, Sixth edition – Thomson Brooks / Cole (2007)

Ниту еден дел од оваа публикација не смее да биде репродуциран на било кој начин без претходна писмена согласност на авторот

Е-издание: http://www.ukim.edu.mk/mk_content.php?meni=53&glavno=41

