

ANALITIČKA KEMIJA 2

➤ EKSTRAKCIJA, KROMATOGRAFIJA - OSNOVE

➤ ELEKTROANALITIČKE METODE - PREGLED

EKSTRAKCIJA, KROMATOGRAFIJA - OSNOVE

✚ ODVAJANJE SASTOJAKA (ANALITA)

- taloženjem
- destilacijom
- ekstrakcijom
- kromatografijom

SEPARACIJSKE TEHNIKE I GLAVNE PRIMJENE

tehnika	temelj	glavne primjene
tankoslojna kromatografija	diferencijalne brzine kretanja analita kroz stacionarnu fazu gibanjem tekuće ili plinovite mobilne faze	kvalitativna analiza smjesa
plinska kromatografija		kvalitativno i kvantitativno određivanje hlapljivih spojeva
tekućinska kromatografija		kvalitativno i kvantitativno određivanje nehlapljivih spojeva
elektroforeza	diferencijalno kretanje analita kroz puferirani medij pod djelovanjem električnog polja	kvalitativno i kvantitativno određivanje organskih spojeva i biomolekula

EKSTRAKCIJA

- ⇒ analitička separacijska tehnika
- ⇒ temelji se na razdiobi tvari između dva otapala koja se međusobno ne miješaju

zakon razdiobe → razdioba tvari između dvije faze koje se međusobno ne miješaju

- ⇒ ravnoteža:



- ⇒ idealan slučaj: ponašanje vrste A je konstantno i neovisno o ukupnoj količini A – tj. pri svakoj temperaturi:

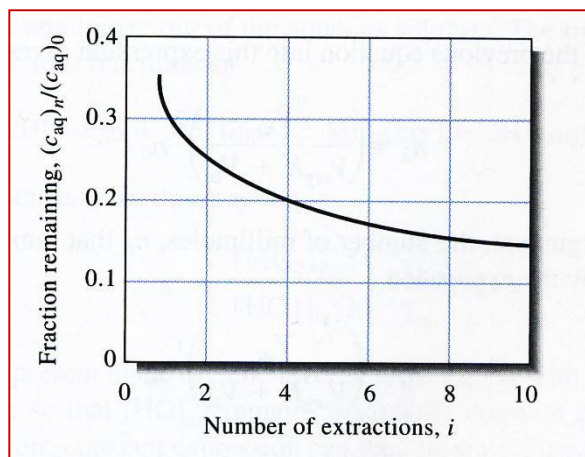
$$K = \frac{(a_A)_{org}}{(a_A)_{aq}} \approx \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}}$$

K = konstanta razdiobe (raspodjele; distribucije)

→ u jednostavnom ekstrakcijskom sustavu koncentracija vrste A koja zaostaje u vodenoj fazi nakon i ekstrakcija organskim otapalom iznosi:

$$[A]_i = \left(\frac{V_{\text{aq}}}{V_{\text{org}}K + V_{\text{aq}}} \right)^i [A]_0$$

→ višekratna ekstrakcija (preporuka: efikasnije od jedne ekstrakcije velikim volumenom)



→ povećana djelotvornost višekratnih ekstrakcija naglo opada nakon 5-6 dijelova dodanog otapala

Primjer:

Konstanta razdiobe joda između organskog otapala i vode iznosi 85. Koja koncentracija joda ostaje u vodenom sloju nakon ekstrakcije 50,0 ml $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ I}_2$ sa sljedećim količinama organskog otapala: a) 50,0 ml; b) 2 puta po 25,0 ml; c) 5 puta po 10,0 ml?

$$[A]_i = \left(\frac{V_{\text{aq}}}{V_{\text{org}}K + V_{\text{aq}}} \right)^i [A]_0$$

a)
$$[\text{I}_2]_1 = \left(\frac{50,0}{50,0 \cdot 85 + 50,0} \right)^1 \cdot 1,00 \cdot 10^{-3} = 1,16 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$$

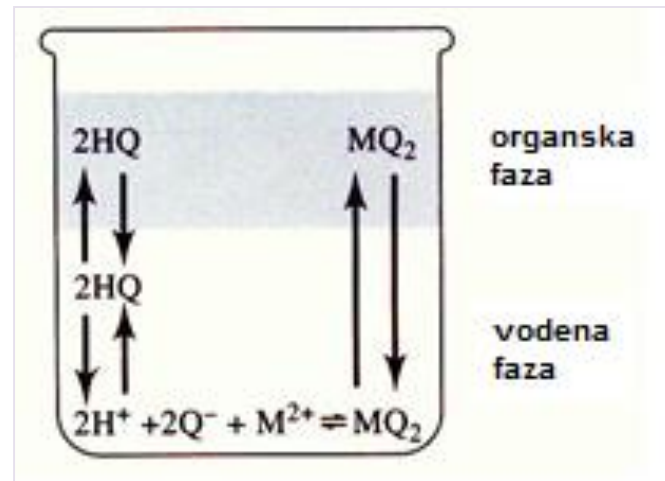
b)
$$[\text{I}_2]_2 = \left(\frac{50,0}{25,0 \cdot 85 + 50,0} \right)^2 \cdot 1,00 \cdot 10^{-3} = 5,28 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$$

c)
$$[\text{I}_2]_5 = \left(\frac{50,0}{10,0 \cdot 85 + 50,0} \right)^5 \cdot 1,00 \cdot 10^{-3} = 5,29 \cdot 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$$

analitička primjena – ekstrakcija anorganskih vrsta

→ primjer: ekstrakcija metalnih iona kao kelata

- ⇒ mnogi kelatni agensi su slabe kiseline te reagiraju s metalnim ionima
- ⇒ nastaju neutralni kompleksni spojevi, topljivi u organskim otapalima a skoro netopljivi u vodi



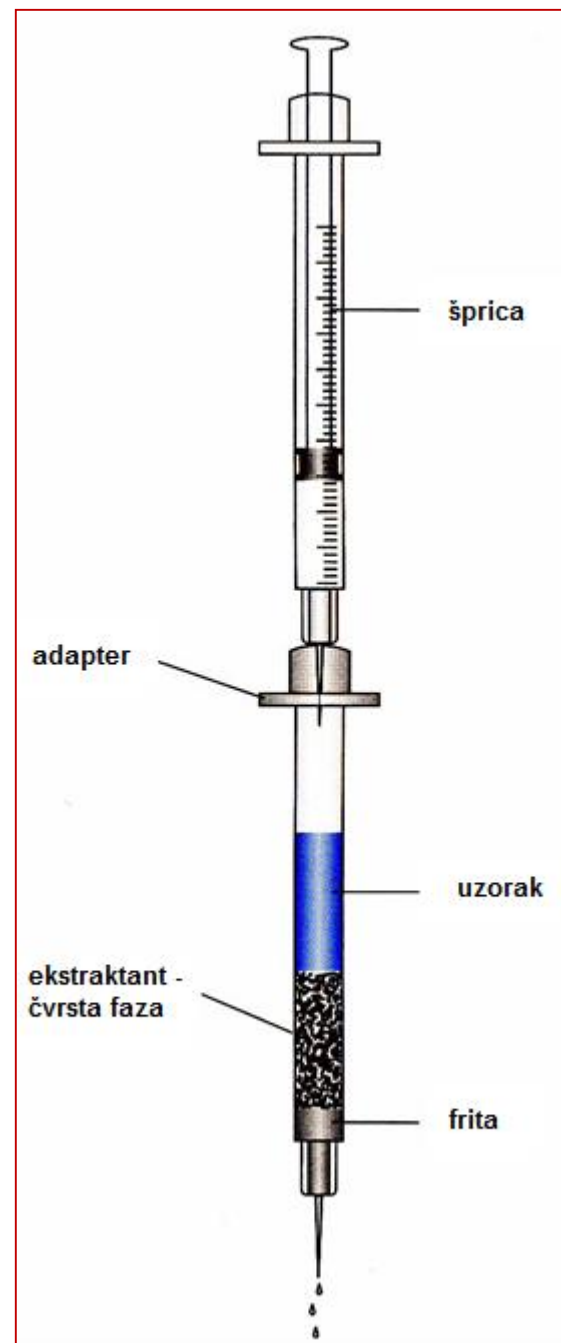
- ⇒ postoje ograničenja u tekućinsko-tekućinskoj ekstrakciji
- ⇒ odabir otapala koje se ne miješa s vodom (ne smije tvoriti emulziju)
- ⇒ relativno velike količine otapala (problem zbrinjavanja otpada)
- ⇒ ručna izvedba – sporo i zamorno





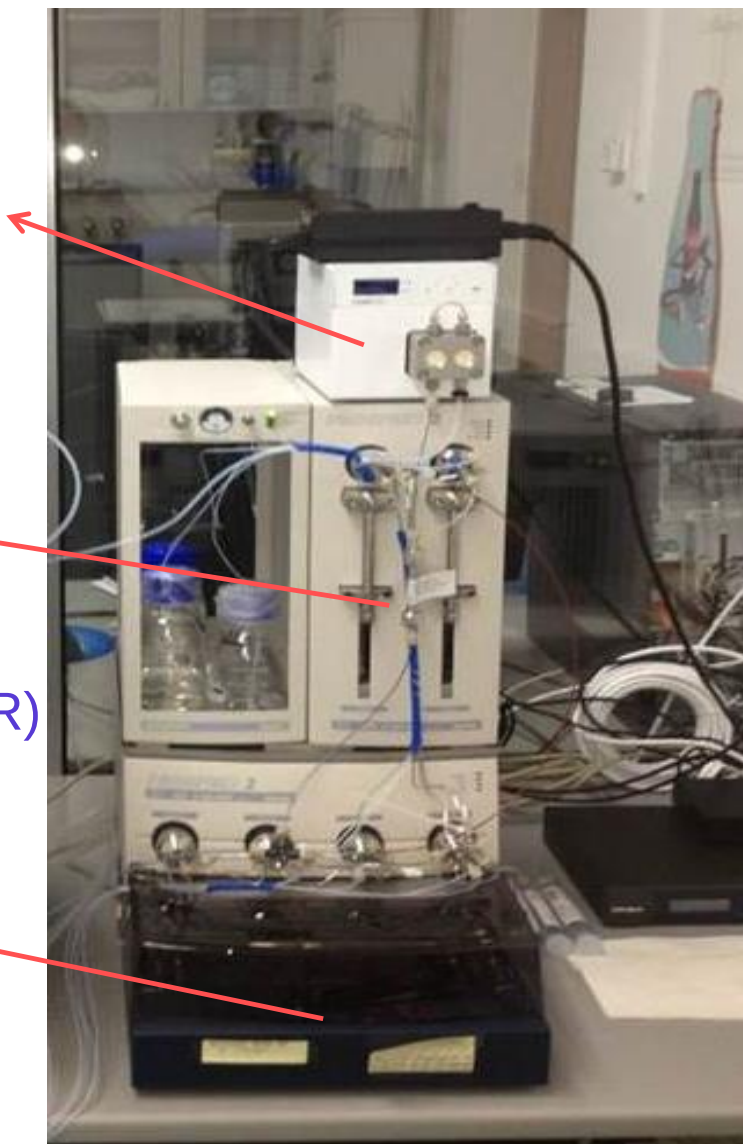
ekstrakcija na čvrstoj fazi (tekućinsko-krutinska ekstrakcija)

- ⇒ koriste se membrane ili male kolone s injekcijama
- ⇒ hidrofobni organski spoj je prevučen ili kemijski vezan na praškasti slikagel = čvrsta ekstrakcijska faza
- ⇒ organske molekule ekstrahiraju se iz složenog uzorka i vežu se na čvrstu fazu
- ⇒ isperu se sa čvrste faze drugim otapalom, npr. metanolom



Ekstrakcija na čvrstoj fazi-SPE

Dodatna HPLC pumpa
„Make-up” pumpa



Visokotlačni
Dispenser, HPD
Pipetiranje protoniranog
(kondicioniranje kolona) i
deuteriranog otapala (NMR)

Automatski izmjenjivač
SPE-kolona
(Automatic Cartridge
Exchanger, ACE)

SPE-kolone
(SPE-cartridges)



KROMATOGRAFIJA



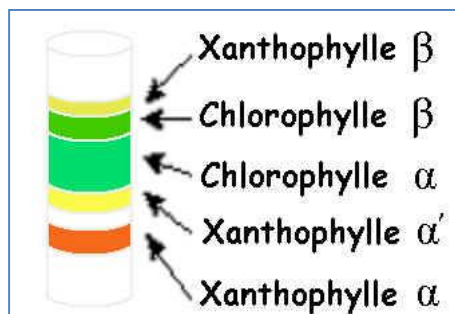
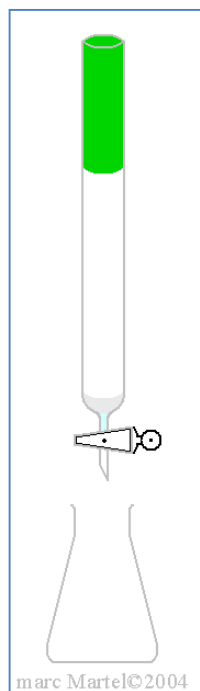
Kromatografija – tehnika kojom se odjeljuju sastojci smjese ovisno o njihovoj raspodjeli između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, dok se druga kreće u određenom smjeru (pokretna faza).

Mihail Semenovič Cvet, 1906

Mihail Semenovič Cvet (1872-1919) – ruski botaničar

→ objasnio načela kromatografije na stupcu

→ biljni pigmenti na koloni od praškaste glinice – nastale obojene vrpce → naziv “kromatografija”



(od grč. *chrôma*, boja i *graphein*, pisati, crtati)

(M. Tswett, *Ber. Deutsch. Bot.* **24** (1906) 384)

definicija:

metoda odjeljivanja, pri čemu se smjese tvari ***rastavljaju*** na svoje komponente, razdiobom ***između dvije faze*** (koje se međusobno ne miješaju)

faze:

stacionarna (nepokretna)

mobilna (pokretna, koja struji)

Nepokretna faza

- čvrsta tvar, gel ili tekućina
 - ispunjava usku cijev ili je nanesena na ravnoj plohi
- = ***sorbens*** (lat. *sorbere* – upijati)

Pokretna faza

- tekućina, plin ili fluid
 - prolazi kroz ili uzduž nepokretne faze u određenom smjeru
- = ***eluens*** (lat *eluere* – ispirati; ispiranje = eluiranje)

primjena:

- ⇒ odjeljivanje
- ⇒ identifikacija
- ⇒ kvantitativna analiza sastojaka prisutnih u složenim smjesama

podjela prema:

- ⇒ *agregatnom stanju faza*
- ⇒ *fizičko-kemijskim svojstvima i procesima*
(koji dominiraju pri odvajanju)
- ⇒ *izvedbenoj tehnici*

podjela prema **agregatnom stanju faza:**

stacionarna faza:	mobilna faza:
• krutina • tekućina (tanki film otapala na krutom poroznom nosaču)	• tekućina • plin

<i>mobilna faza</i>	<i>stacionarna faza</i>	<i>postupak</i>
tekućina (<i>liquid</i> , L)	krutina (<i>solid</i> , S)	LSC
tekućina (<i>liquid</i> , L)	tekućina (<i>liquid</i> , L)	LLC
plin (<i>gas</i> , G)	krutina (<i>solid</i> , S)	GSC
plin (<i>gas</i> , G)	tekućina (<i>liquid</i> , L)	GLC

podjela prema *fizičko-kemijskim svojstvima*:

<i>fiz.-kem. svojstvo</i>	<i>mobilna faza: plin (plinska krom.)</i>	<i>mobilna faza: tekućina (tekućinska krom.)</i>
vrelište	sve vrste GC	-
adsorpcija	GSC	LSC
topljivost	GLC	LLC
oblik molekule	GSC s molekul. sitima	gelna kromatografija, afinitetna kromatografija
reverzibilna kem. reakcija	GLC uz tvorbu kompleksa	kromatografija ionske izmjene

podjela prema *izvedbenim tehnikama*:

kromatografija na stupcu	
tankoslojna kromatografija	TLC
papirna kromatografija	PC
plinska kromatografija	GC

postupci

⇒ **tekućinska:** kolona
ravna ploha

⇒ **plinska:** kolona

PLINSKA KROMATOGRAFIJA (*Gas Chromatography, GC*)

- pokretna faza plin
- u koloni

TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA (*Liquid Chromatography, LC*)

- pokretna faza tekućina
- u koloni i na plohi
- sitne čestice nepokretne faze uz visoki ulazni tlak pokretne faze

⇒ tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (nekad: visokih tlakova)

(*High-Performance Liquid Chromatography, HPLC*)

FLUIDNA KROMATOGRAFIJA PRI SUPERKRITIČNIM UVJETIMA

(*Supercritical-Fluid Chromatography, SFC*)

- pokretna faza fluid (plin ili tekućina) iznad ili blizu kritične temperature i tlaka fluida
- u koloni
- za spojeve koji se ne mogu određivati ni plinskom ni tekućinskom kromatografijom

Fluid	Kritična temperature/°C	Kritični tlak/10 ⁶ Pa
CO ₂	31,3	7,39
N ₂ O	36,5	7,27
NH ₃	132,5	11,4
metanol	239,4	8,10
n-butanol	152,0	3,80
Dietil-eter	195,6	3,64

KOLONSKA KROMATOGRAFIJA – KROMATOGRAFIJA ISPIRANJEM

osnovni pojmovi:

eluiranje: proces u kojemu mobilna faza ispire analizirane sastojke sa stacionarne faze

eluens: otapalo koje nosi sastojke smjese kroz stacionarnu fazu

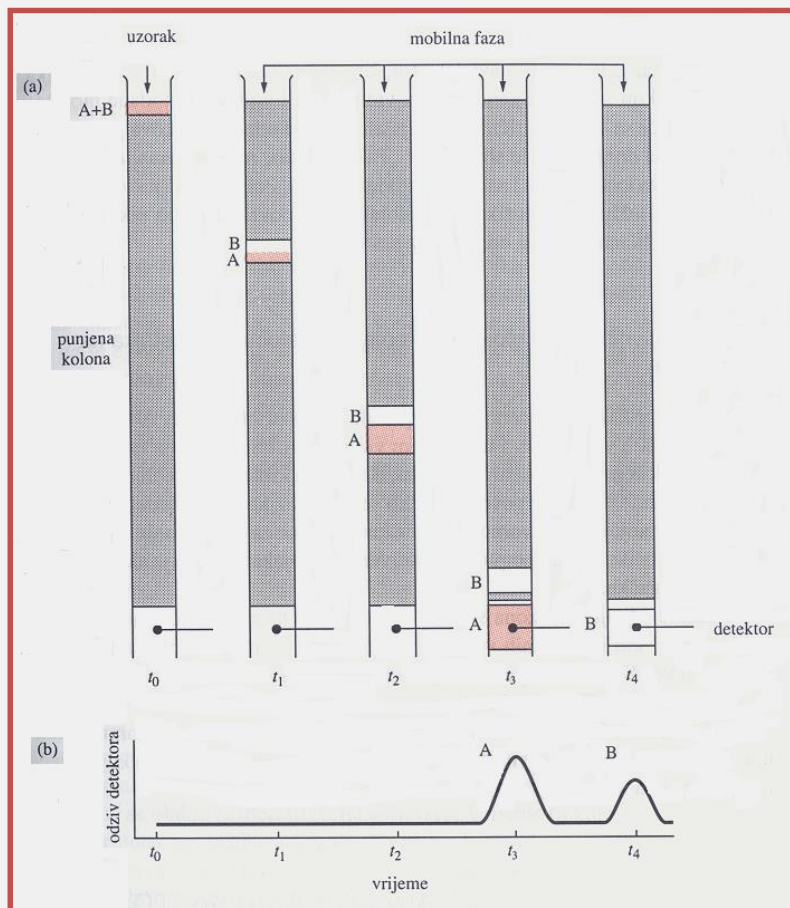
kromatogram: ispis bilo koje funkcije analizirane tvari u ovisnosti o vremenu eluiranja ili o volumenu eluensa

sastojci uzorka kreću se samo u mobilnoj fazi

⇒ prosječna **brzina** kojom se sastojak kreće kroz kolonu ovisi o **vremenu** koje provede u mobilnoj fazi

– sastojci se odjeljuju zbog različitih brzina gibanja i duž kolone nastaju **vrpce** ili **zone**

tijek kromatografije i izlazni zapis



→ Uzorak otopljen u pokretnoj fazi nanosi se na vrh kolone.

→ Dodavanjem pokretne faze uzorak se kreće niz kolonu.

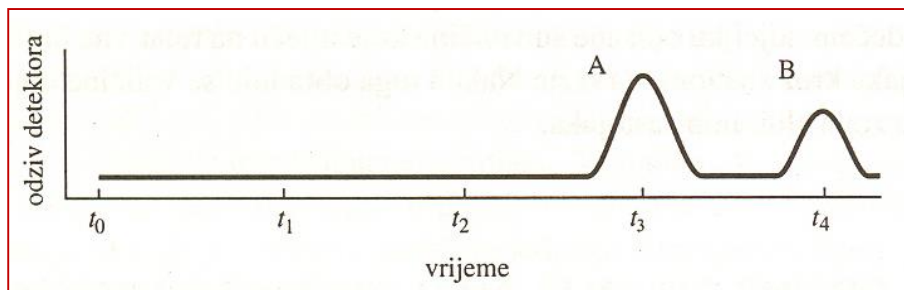
→ Sastojci se raspodjeljuju između pokretne i nepokretne faze.

Različita brzina gibanja $\Rightarrow$
odjeljivanje sastojaka $\Rightarrow$
vrpce ili *zone* na koloni

→ *Kromatografske krivulje*
(kromatogrami; krivulje eluiranja,
"pikovi")

Kromatogram – grafički prikaz odziva detektora (funkcija koncentracije analita) u ovisnosti o vremenu ili o volumenu eluiranja

- položaj vrška („pika”) $\Rightarrow$ kvalitativna analiza (identifikacija sastojka)
- visina ili površina vrška („pika”) $\Rightarrow$ kvantitativna analiza (količina sastojka)



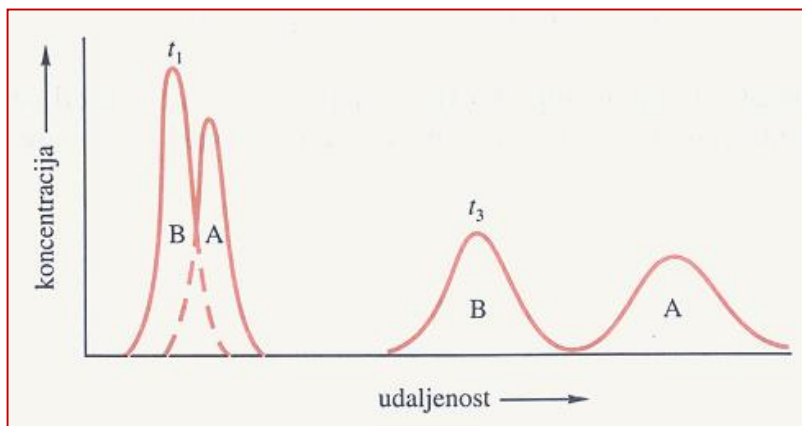
Djelotvornost kolone određuju:

- relativna brzina eluiranja sastojaka $\Rightarrow$ klasična teorija
- širenje zona eluiranih sastojaka $\Rightarrow$ kinetička teorija

KLASIČNA TEORIJA KROMATOGRAFIJE

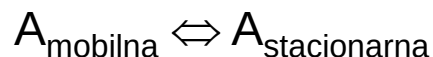
Klasična teorija kromatografije – odjeljivanje sastojaka ovisi o njihovim relativnim brzinama istjecanja iz kolone

konstanta razdjeljenja (koeficijent raspodjele)



koncentracijski profil; razlučivanje

kromatografska odjeljivanja temelje se na različitoj razdiobi sastojaka između mobilne i stacionarne faze:

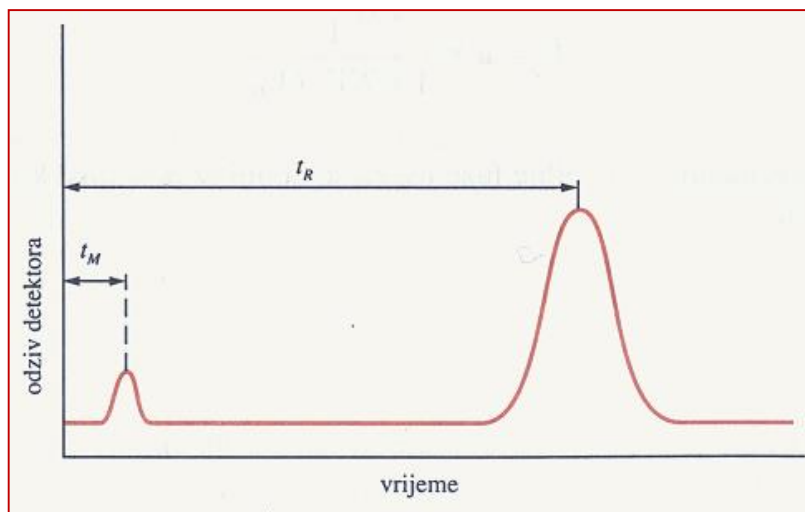


Konstanta razdjeljenja, K – odnos koncentracija odjeljivanog sastojka u nepokretnoj i pokretnoj fazi za ravnotežno stanje

$$K = \frac{c_s}{c_M}$$

K (konst. rav.) = **omjer razdjeljenja** ili **koeficijent razdjeljenja**

- koncentracija sastojka u nepokretnoj fazi, c_s
- koncentracija sastojka u pokretnoj fazi, c_M



⇒ **vrijeme zadržavanja (t_R)**: vrijeme od unošenja uzorka u kolonu do pojave sastojka u detektoru smještenome na izlazu iz kromatografske kolone

⇒ **mrtvo vrijeme (t_M)**: vrijeme potrebno da sastojak koji se ne zadržava na koloni prođe kroz kolonu

⇒ **prilagođeno vrijeme zadržavanja, t_R'** $t_R' = t_R - t_M$

- u GC analogno V_R , V_M , V_R'

⇒ **faktor kapaciteta (k')**: opisuje brzinu kretanja analita u koloni (V_S i V_M = volumeni faza)

$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

⇒ **koeficijent selektivnosti (α)**: pokazuje moć odjeljivanja sastojaka na koloni (uvijek >1)

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

⇒ djelotvornost kromatografske kolone može se izraziti pomoću dvije srodne veličine (L = duljina punila kolone):

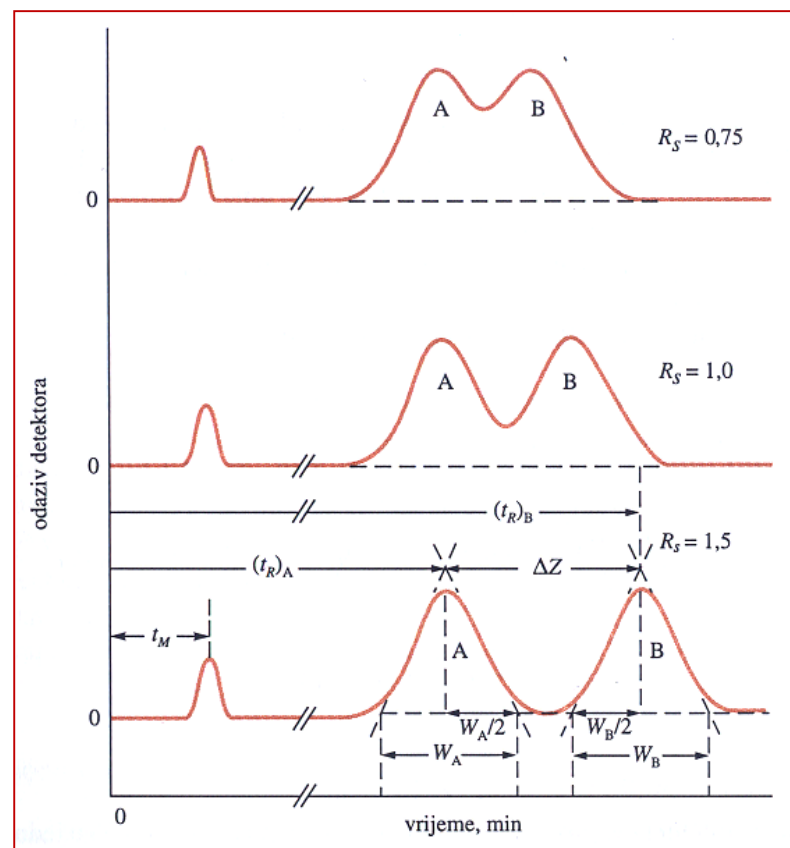
⇒ **visina tavana, H**

⇒ **broj teorijskih tavana, N**

$$\Rightarrow N = L / H$$

⇒ **razlučivanje kolone,**

R_s : mjera kojom se izražava sposobnost odjeljivanja dva analita na koloni



VAŽNE EKSPERIMENTALNE KROMATOGRAFSKE VELIČINE I ODNOSI

Naziv	Oznaka za eksperimentalnu veličinu	Izvedeno iz
Vrijeme kretanja nezadržavanog spoja	t_M	Kromatogram (slika 26-11)
Vrijeme zadržavanja, sastojci A i B	$(t_R)_A, (t_R)_B,$	Kromatogram (slika 26-11)
Ispravljeno vrijeme zadržavanja, sastojak A	$(t'_R)_A$	$(t'_R)_A = (t_R)_A - t_M$
Širina pikova, sastojci A i B	W_A, W_B	Kromatogram (slika 26-11)
Duljina punila kolone	L	mjerjenje duljine
Brzina protoka	F	mjerjenje protoka
Volumen stacionarne faze	V_S	Podaci iz pripreme punila
Koncentracija sastojka u mobilnoj i stacionarnoj fazi	c_M, c_S	Podaci iz analize i pripreme

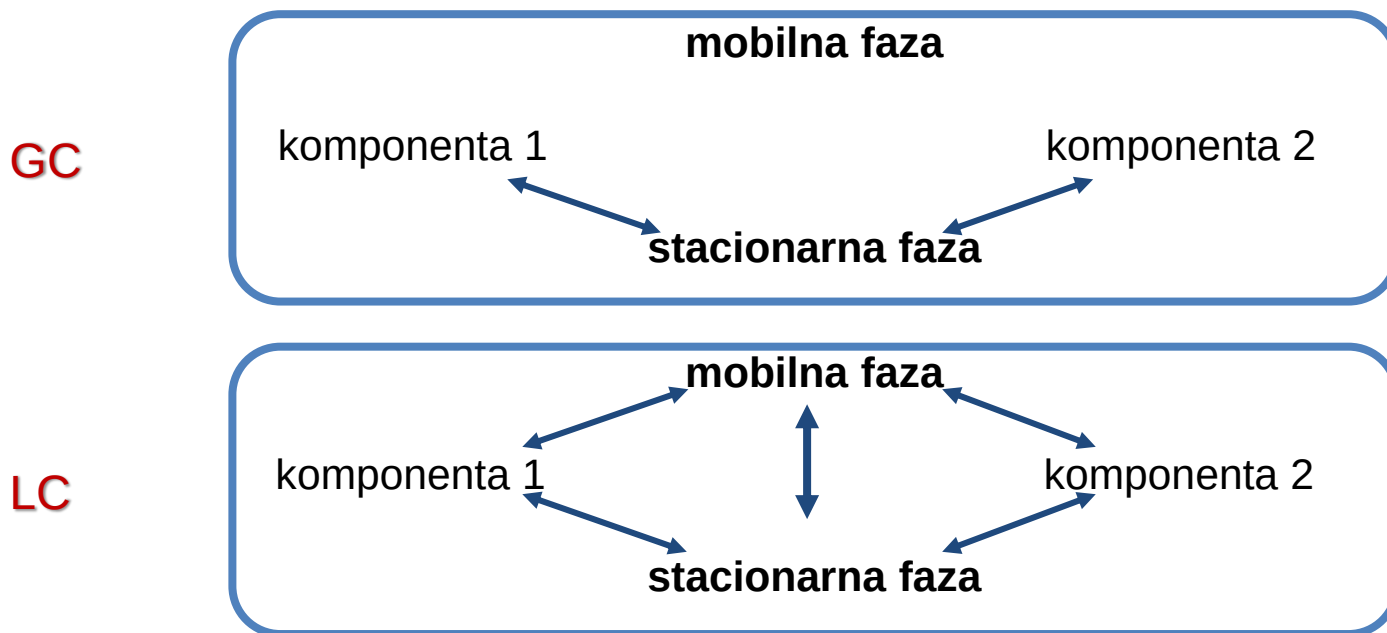
VAŽNE IZRAČUNATE VELIČINE I ODNOSI

Naziv	Izračunavanje izvedenih veličina	Veza s ostalim veličinama
Linearna brzina mobilne faze	$u = L/t_M$	
Volumen mobilne faze	$V_M = t_M F$	
Faktor kapaciteta	$k' = (t_R - t_M) / t_M$	$k' = \frac{KV_S}{V_M}$
Koeficijent raspodjele	$K = \frac{k'V_M}{V_S}$	$K = \frac{c_S}{c_M}$
Koeficijent selektivnosti	$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$	$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{K_B}{K_A}$
Razlučivanje	$R_S = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$	$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_B}{1 + k'_B} \right)$
Broj tavana	$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$	$N = 16 R_S^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)^2$
Visina tavana	$H = L/N$	
Vrijeme zadržavanja	$(t_R)_B = \frac{16 R_S^2 H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \frac{(1 + k'_B)^3}{(k'_B)^2}$	

PLINSKA KROMATOGRAFIJA, GC

- ⇒ ***mobilna faza***: plinovita (**plin nosač**)
- ⇒ ***uzorak smjese se ispari*** bez raspada (zbog prijenosa plinom)
- ⇒ ***eluiranje***: protok inertne plinovite mobilne faze
 - ⇒ međudjelovanje molekula plina nosača i uzorkovih para, kao i plina nosača i stacionarne tekuće faze je zanemarljivo (zbog niske gustoće plina) ⇒ jedina funkcija plina nosača je ***prijenos*** analita kroz kolonu
- ⇒ dva tipa plinske kromatografije: **GSC** i **GLC**

⇒ usporedba GC i LC:



plinovi nosači:

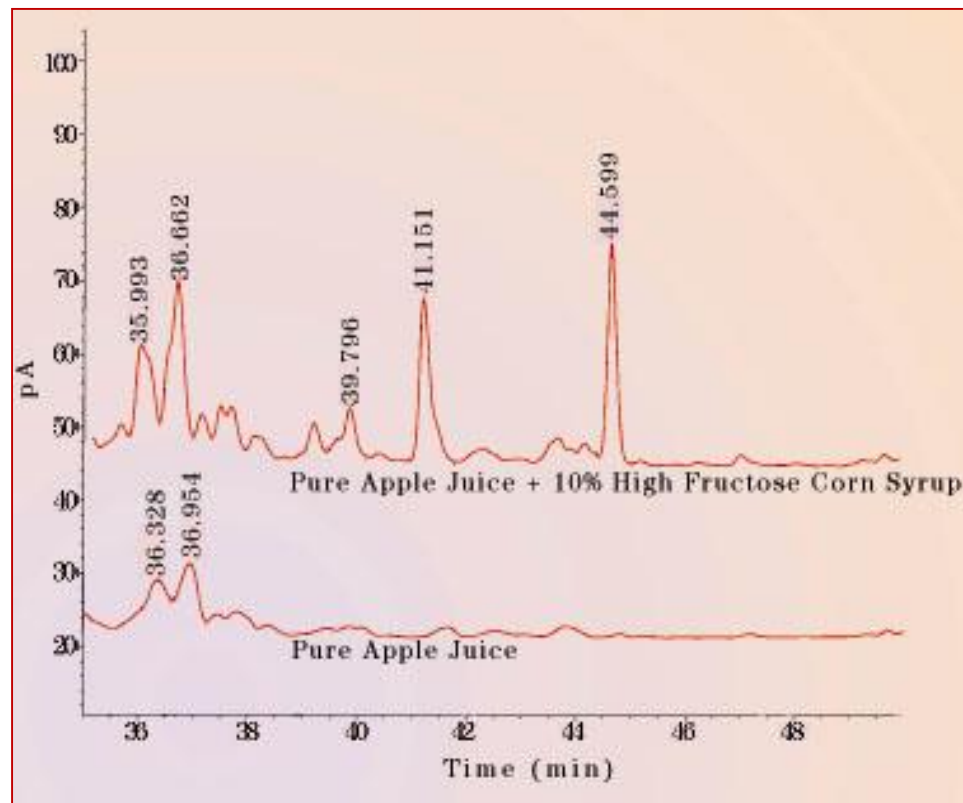
- ⇒ **helij** – uz detektore s toplinskom vodljivošću
- ⇒ **dušik** – uz detektor s plamenom ionizacijom (jeftiniji od He)
- ⇒ **vodik** – bolje odjeljivanje (osobito uz kapilarne stupce)
zbog niske viskoznosti prikladan za dugačke stupce

OPASNOST OD EKSPLOZIJE!

GC

primjer:

jabučni sok se “onečišćuje” dodatkom tržišno dostupnih sladila koja su po ugljikohidratnom sastavu slična jabučnom soku



analiza čistog jabučnog soka i soka kojemu je dodano 10 % fruktoze žitnog sirupa

TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI, *HPLC*

⇒ (high pressure liquid chromatography → raniji naziv)

⇒ **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography

HPLC ⇒ *mobilna faza*: tekuća

stacionarna faza: punila vrlo finih zrna

tlak: nekoliko milijuna

Pa (do 4×10^7 Pa – 400 bara)

⇒ tlačna pumpa (sisaljka)

⇒ **UPLC** (stacionarna faza; čestice ispod $2\mu\text{m}$, tlak ~ 1000 bara, brže odjeljivanje, manji volumeni)

tehnika normalnih faza

- nepokretna faza polarna (silikagel)
- pokretna faza nepolarna (heksan, diklormetan, kloroform..)

tehnika obrnutih faza

- nepokretna faza nepolarna (silikagel s C8 ili C18 lancima)
- pokretna faza polarna (voda, acetonitril, metanol..)



detektori:

- ⇒ za skupna svojstva (mjere promjene fizikalnih veličina)
- ⇒ za specifična svojstva (mjere pojedinačna svojstva)

vrste:

- ⇒ diferencijalni refraktometar
- ⇒ UV-detektor
- ⇒ fluorimetar
- ⇒ IR-detektor
- ⇒ elektrokemijski detektor
- ⇒ konduktometar (vodljivost)
- ⇒ spektrometar masa

HPLC

primjer: purinski alkaloidi

Column: SepaxBio-C18, 4.6x150mm, 5 mm

Eluent: 0.10 M Phosphate buffer, pH 3.1

Flow rate: 0.75 mL/min

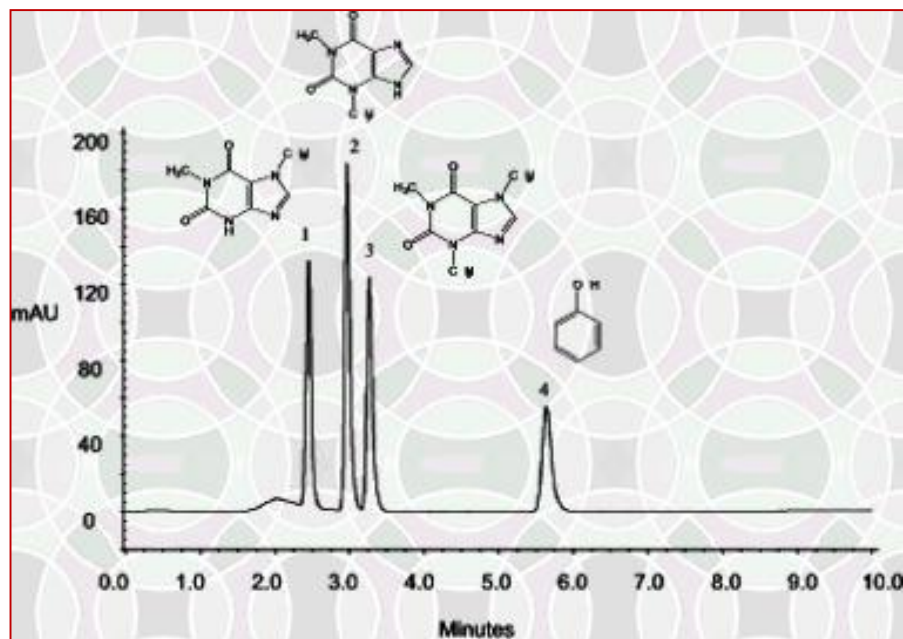
Detection: UV 254 nm

Injection: 5 mL

Temperature: Ambient (23°C)

Compounds:

1. Theobromine (1 mM)
2. Theophylline (1 mM)
3. Caffeine (1 mM)
4. Phenol (7 mM)



TANKOSLOJNA KROMATOGRAFIJA (TLC)

(planarna, plošna kromatografija)

pravokutne ploče → staklo, plastika, aluminij
sloj → slikagel (uz moguće dodatke); 100-200 μm =
stacionarna faza

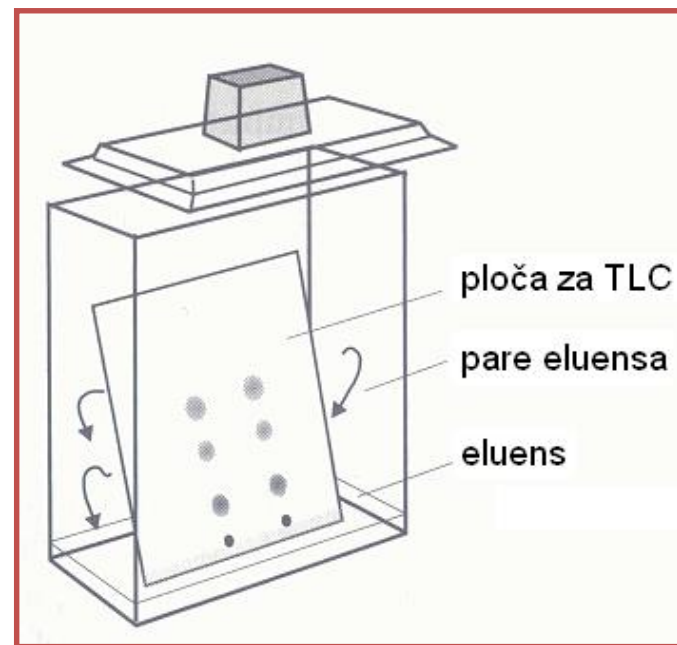
uzorak → nanosi se oko 1 cm od donjeg ruba
ploče

volumen → nekoliko nL do nekoliko μL

mrlija → promjer 1-3 mm

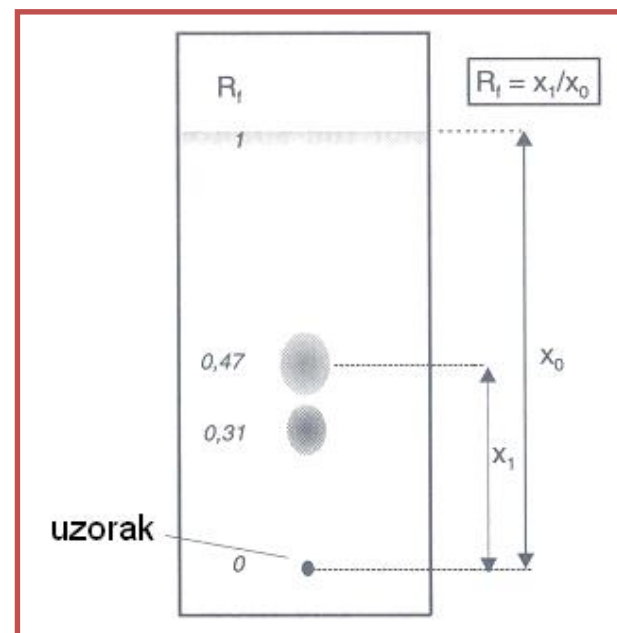
mobilna faza → neko otapalo (eluens)

nakon završetka putovanja otapala (nekoliko cm)
ploča se suši (otapalo upari)



→ ploče

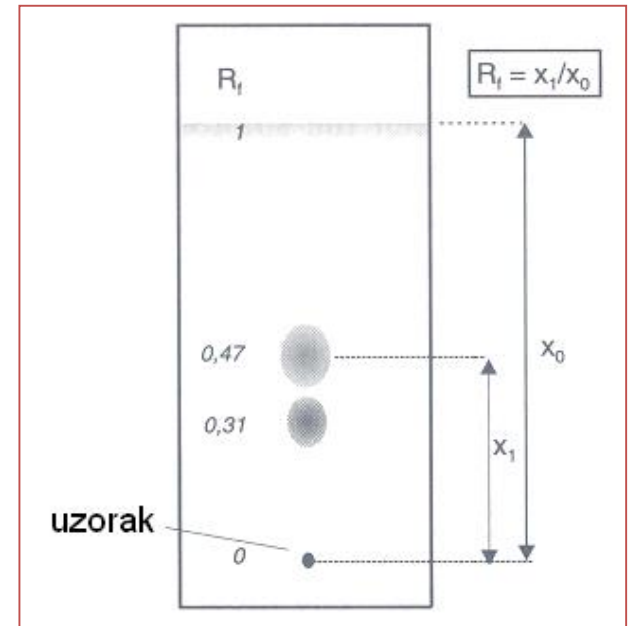
- obojene mrlje (spojevi) → izravna detekcija
- bezbojni spojevi → razvijanje ploče:
 - na tržištu postoje ploče s dodanom cinkovom soli → obasjavanjem živinom lampom pojavljuju se tamne mrlje na fluorescentnoj pozadini
 - zagrijavanje ploče nakon prskanja sumpornom kiselinom → karbonizacijom spojeva mrlje postaju vidljive (nije prikladno za kvantitativnu analizu)
 - prskanje ploče reagensima – općenitim (fosfomolibdenska kiselina) ili specifičnim (ninhidrin u alkoholu za aminokiseline) – opisane su stotine takvih reagenasa



→ komponente su definirane s vrijednošću R_f

→ R_f = **faktor zadržavanja (retencijski faktor)** – veličina migracije u odnosu na otapalo

$$R_f = \frac{\text{udaljenost koju je prešao sastojak}}{\text{udaljenost koju je prešla fronta otapala}} = \frac{x}{x_0}$$



→ ostali izrazi:

$$N = 16 \frac{x^2}{w^2}$$

x = duljina puta
 w = promjer mrlje

$$H = \frac{x_0}{N}$$

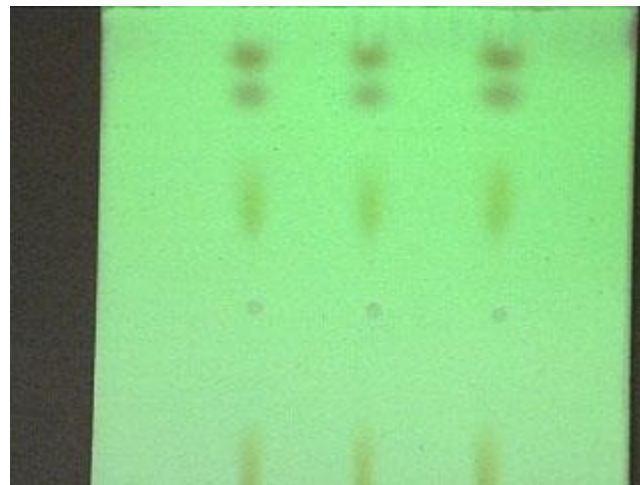
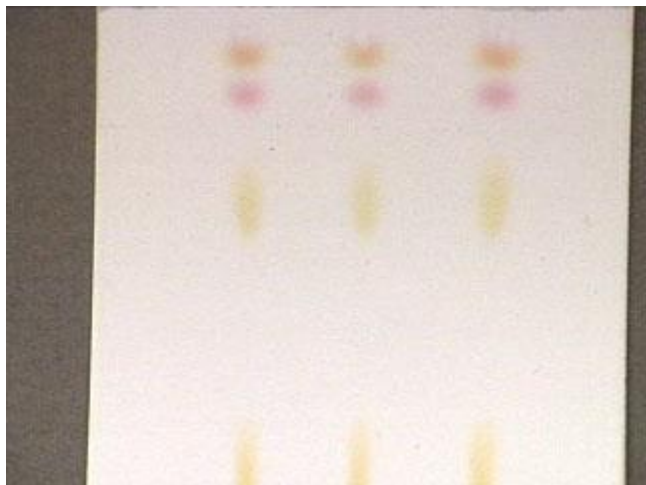
$$R = 2 \frac{x_2 - x_1}{w_1 + w_2}$$

$$R_f = \frac{x}{x_0} = \frac{\bar{u}}{\bar{u}_0} = \frac{t_0}{t} = \frac{1}{k+1}$$

$$k = \frac{1}{R_f} - 1$$

k = retencijski faktor
 u = migracijske brzine
 t = migracijsko vrijeme

TLC

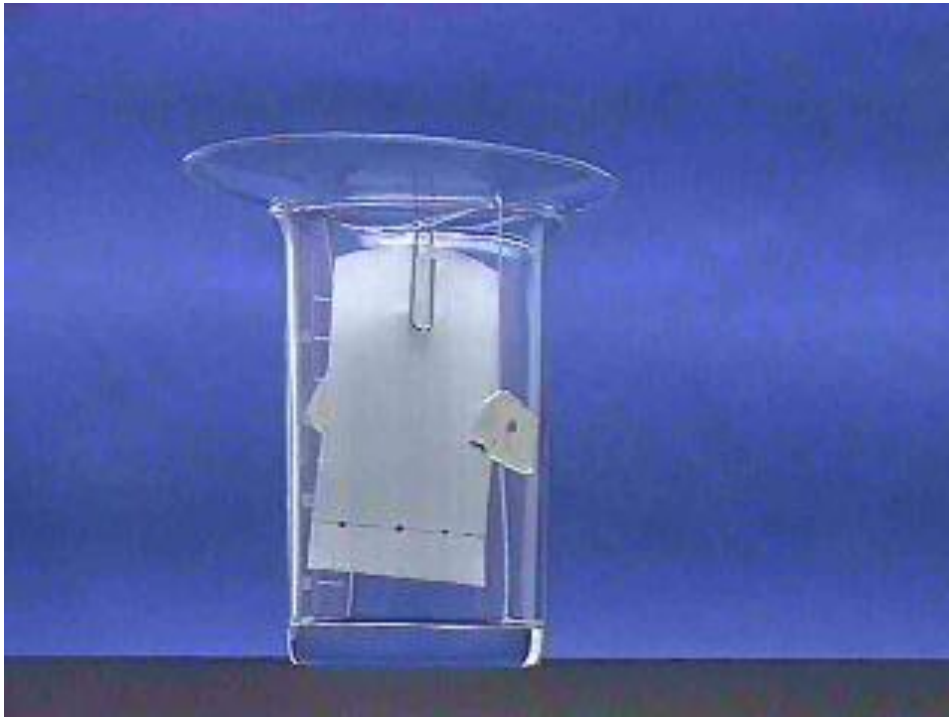


*tržišna TLC ploča pod normalnim
osvjetljenjem*

ista TLC ploča osvijetljena UV-lampom

PAPIRNA KROMATOGRAFIJA

- čistoća supstancija
- identifikacija supstancija
- relativno brza
- male količine materijala

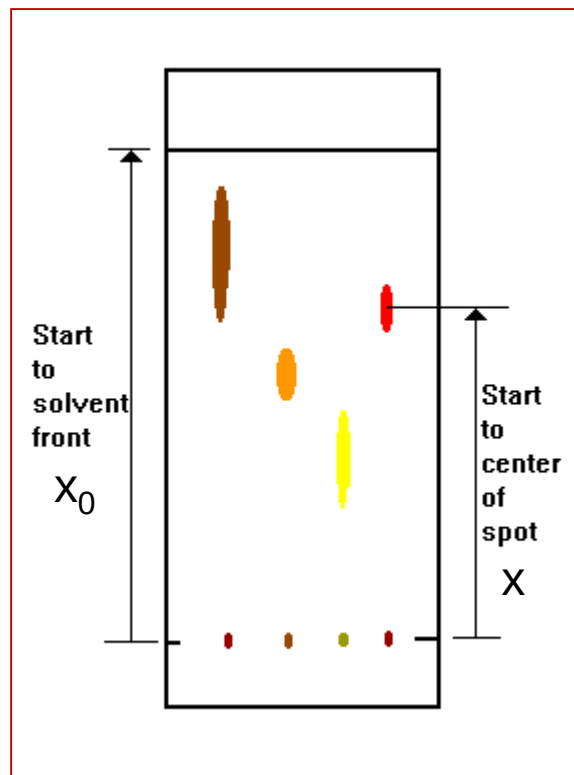


- isti princip kao tankoslojna kromatografija
- stacionarna faza: visokokvalitatni filter papir
- mobilna faza: otopina “razvijača”

→ određuje se vrijednost retencijskog faktora, R_f (može se naziv pripisati i “omjeru fronta” → “ratio of fronts”)
→ karakteristika svakog spoja – služi za **identifikaciju**

$$R_f = \frac{\text{udaljenost koju je prešao sastojak}}{\text{udaljenost koju je prešla fronta otapala}} = \frac{x}{x_0}$$

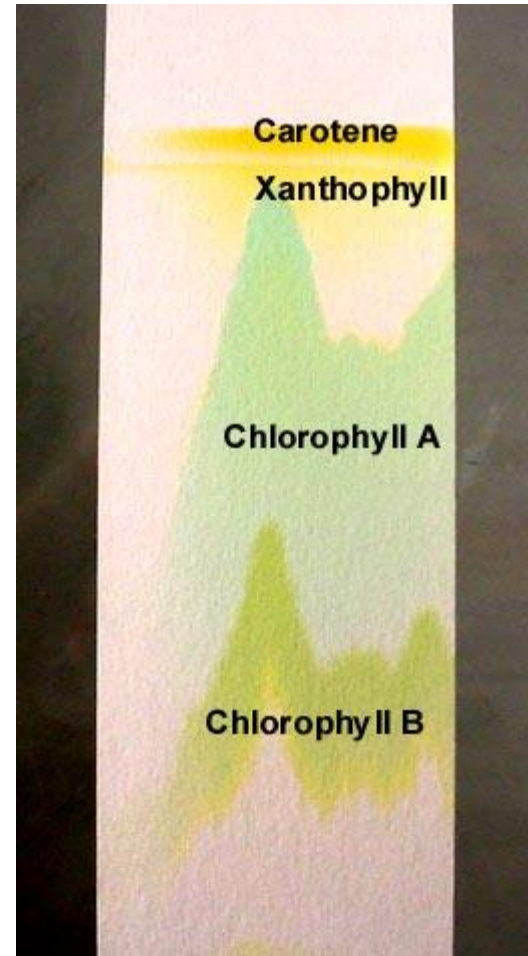
čistoća uzorka može se odrediti iz kromatograma → smjesa pokazuje dvije ili više mrlja, čisti uzorak ima samo jednu mrlju





papirna kromatografija

primjer: biljni pigment



1. Neka smjesa spojeva stavljena je u Erlenmayerovu tikvicu u kojoj je bilo 6 mL silikagela i 40 mL otapala s otopljenih 100 mg nehlapljivog spoja. Nakon miješanja smjesa je ostavljena stajati neko vrijeme, te je iz smjese izvučen alikvot od 10 mL koji je potom uparen do suhoga. Ostatak je izvagan i masa je iznosila 12 mg.

Izračunajte adsorpcijski koeficijent, $K = C_S/C_M$, spoja u ovom pokusu.

- u ravnotežnim uvjetima eluens sadrži:

$$12 \times 40 / 10 = 48 \text{ mg spoja}$$

- u stacionarnoj fazi je stoga:

$$100 - 48 = 52 \text{ mg spoja}$$

- K predstavlja omjer masa u 1 mL svake od faza u ravnoteži, te je:

$$K = (52 / 6) / (48 / 40) = 7,2$$

2. Izračunajte separacijski faktor (ili faktor selektivnosti) između dva spoja, 1 i 2, čiji retencijski volumeni iznose 6 odnosno 7 mL. Mrtvi volumen kolone je 1 mL.
Pokažite da je taj faktor jednak omjeru distribucijskih koeficijenata K_2 / K_1 tih spojeva (pretpostavka: $t_{R(1)} < t_{R(2)}$).

- separacijski faktor (ili faktor selektivnosti) se obično računa iz retencijskih vremena.

- V_R i t_R su povezani protokom mobilne faze D:

$$V_R = D \times t_R$$

- zato je:

$$\alpha = (t_{R(2)} - t_M) / (t_{R(1)} - t_M) = (V_{R(2)} - V_M) / (V_{R(1)} - V_M)$$

$$\rightarrow \alpha = 1,2$$

3. Sljedeći podaci odgovaraju koloni za tekućinsku kromatografiju:

duljina punila	24,7 cm
brzina protoka	0,313 mL/min
V_M	1,37 mL
V_S	0,164 mL

Na kromatogramu smjese sa sastojcima A, B, C i D mogu se očitati sljedeći podaci:

	vrijeme zadržavanja, min	širina osnovice pika, min
nezadržavani	3,1	-
A	5,4	0,41
B	13,3	1,07
C	14,1	1,16
D	21,6	1,72

Izračunajte:

- (a) broj tavana za svaki pik
- (b) standardno odstupanje srednje vrijednosti za N
- (c) visinu tavana za kolonu.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$



a)

$$N_A = 2775$$

$$N_B = 2472$$

$$N_C = 2364$$

$$N_D = 2523$$

b) $N = 2534 \pm 174 = 2,5(\pm 0,2) \times 10^3$ tavana

$$H = L/N$$



c)

$$H = 0,0097 \text{ cm}$$

4. Pomoću podataka iz prethodnog zadatka izračunajte za A, B, C i D:

- a) faktor kapaciteta,
- b) koeficijent razdiobe.

$$k' = (t_R - t_M) / t_M$$

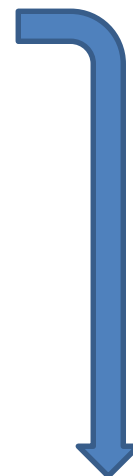
$$K = \frac{k' V_M}{V_S}$$



		A	B	C	D
(a)	k'	0,74	3,3	3,5	6,0
(b)	K	6,2	28	29	50

5. Iz kromatograma smjese butilnih alkohola (korekcije osjetljivosti detektora dobivene su u odvojenim pokusima s poznatim količinama čistih alkohola) dobiveni su sljedeći podaci o površinama.

alkohol	površina pika, cm ²	faktor odziva detektora	reducirana površina, cm ²
<i>n</i> -butil	2.74	0.603	4.54
<i>i</i> -butil	7.61	0.530	14.36
<i>s</i> -butil	3.19	0.667	4.78
<i>t</i> -butil	1.66	0.681	2.44
			Σ = 26.12



Odredite sastav analizirane smjese.

(**reducirana površina** = površina pika / faktor odziva detektora)

rješenje:

$$\% \text{ n-Bu} = (4.54 / 26.12) \times 100 = 17.38 \%$$

$$\% \text{ i-Bu} = (14.36 / 26.12) \times 100 = 54.98 \%$$

$$\% \text{ s-Bu} = (4.78 / 26.12) \times 100 = 18.30 \%$$

$$\% \text{ t-Bu} = (2.44 / 26.12) \times 100 = \underline{9.34 \%}$$

$$\Sigma = 100.00 \%$$

6. Relativne površine pikova dobivenih iz plinskog kromatograma smjese metil acetata, metil propionata i metil *n*-butirata iznosile su 17.6, 44.7, odnosno 31.1. Izračunajte postotni sastav smjese navedena tri spoja, ako su relativni odzivi detektora iznosili 0.65, 0.83, odnosno 0.92.

rel. površine	odziv det.	red. površina
17.6	0.65	27.08
44.7	0.83	53.86
31.1	0.92	33.80

$$\Sigma = 114.74$$

rješenje:

$$\begin{aligned}\text{metil acetat} &= 27.08 / 114.74 = 23.60 \% \\ \text{metil propionat} &= 53.86 / 114.74 = 46.94 \% \\ \text{metil n-butirat} &= 33.81 / 114.74 = \underline{29.46 \%} \\ \Sigma &= 100.00 \%\end{aligned}$$

7. Smjesa spojeva A i B putuje od ishodišta i tvori mrlje sljedećih karakteristika:

$x_A = 27 \text{ mm}$	$w_A = 2,0 \text{ mm}$
$x_B = 33 \text{ mm}$	$w_B = 2,5 \text{ mm}$

$$\left(\begin{array}{l} x = \text{duljina puta} \\ w = \text{promjer mrlje} \end{array} \right)$$

Fronta mobilne faze iznosi 60 mm od ishodišne linije.

- Izračunajte faktor zadržavanja R_f , djelotvornost N i visinu tavana H za svaki od spojeva.
- Izračunajte faktor razlučivanja između dva spoja A i B.
- Utvdite odnos između faktora selektivnosti i R_f za dva spoja. Izračunajte njegovu numeričku vrijednost.

$$R_f = \frac{x}{x_0}$$

$$N = 16 \frac{x^2}{w^2}$$

$$H = \frac{x_0}{N}$$

$$R = 2 \frac{x_2 - x_1}{w_1 + w_2}$$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

rješenje:

$$a) R_{f(A)} = 27 / 60 = 0,45; R_{f(B)} = 33 / 60 = 0,55$$

$$N_A = 16 \times 27^2 / 2^2 = 2916; N_B = 16 \times 33^2 / 2,5^2 = 2788$$

$$H_A = x_A / N_A = 9,26 \times 10^{-4} \text{ cm}; H_B = x_B / N_B = 1,18 \times 10^{-3} \text{ cm}$$

$$b) R = 2 (33 - 27) / (2 + 2,5) = 2,67$$

$$c) \alpha = (R_{f(B)} / R_{f(A)}) \times (1 - R_{f(A)}) / (1 - R_{f(B)}) = 1,49$$

8. Koji je redoslijed eluiranja smjese sljedećih kiselina iz HPLC kolone čija je stacionarna faza tipa C18 dok je mobilna faza formijatni pufer $c = 200 \text{ mM}$, pH 9.

Smjesa:

- | | |
|-------------------------|--|
| 1. linoleinska kiselina | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$ |
| 2. arahidna kiselina | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}_2\text{H}$ |
| 3. oleinska kiselina | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$ |

rješenje:

- pri pH 9 kiseline su u obliku svog odgovarajućeg karboksilatnog iona
- polarna vodena faza snažno ih privlači
- hidrofobni dijelovi (ugljikovodični lanac) određuje kontakt sa stacionarnom fazom
 - polarnost tog lanca opada u nizu: $1 > 3 > 2$
 - redoslijed eluiranja spojeva je stoga: 1, 3, 2

Dodatni zadaci i pitanja

9. Za određivanje metanola plinskom kromatografijom u uzorcima metanol-voda, učinjeni su kromatogrami četiri standardne smjese koje su sadržavale 20.0, 40.0, 60.0 i 80.0 % v/v metanola. Odgovarajući metanolni i vodeni pikovi na filter papiru škarama su izrezani, te su im određene mase m_m i m_v . Pomoću sljedećih podataka izračunajte postotni sadržaj metanola u otopini A.

c (CH ₃ OH), % v/v	m_m , g
20.0	0.0430
40.0	0.0692
60.0	0.1098
80.0	0.1107
A	0.1124

rezultat:

$$w = 74.0 \% \text{ CH}_3\text{OH}$$

10. Plinsko-tekućinskom kromatografijom (GLC) analizirana je smjesa *n*-pentana, *n*-heksana, *n*-heptana i *n*-oktana, uz primjenu detektora termičke vodljivosti. Analiza se temelji na oksidaciji eluiranih ugljikovodika u CO₂ i H₂O, te propuštanju CO₂ kroz detektor nakon uklanjanja H₂O. Dobiveni su sljedeći podaci:

spoj	površina, relativne jedinice
<i>n</i> -pentan	10.0
<i>n</i> -heksan	24.0
<i>n</i> -heptan	42.0
<i>n</i> -oktan	64.0

Izračunajte sastav smjese u:
a) molnim postotcima;
b) masenim postotcima.

rješenje:

	molni %	maseni %
<i>n</i> -pentan	7.1	5.0
<i>n</i> -heksan	17.2	14.5
<i>n</i> -heptan	30.0	29.4
<i>n</i> -oktan	45.7	51.1

11. Definirajte pojmove:

- eluiranje;
- stacionarna faza;
- vrijeme zadržavanja.

12. Objasnite pojmove:

- kromatogram;
- eluat;
- eluens;
- stacionarna faza;
- koeficijent raspodjele.

13. Navedite tekućinske kolonske kromatografske metode, vrste pripadnih stacionarnih faza i ravnoteža.

14. Na kojim se parametrima temelji kvalitativna, a na kojima kvantitativna kromatografska analiza?

15. Koeficijenti raspodjele dvije tvari A i B u kromatografskoj koloni iznose 180, odnosno 225. Koja od dvije tvari će se prva eluirati iz kolone?

ELEKTROANALITIČKE METODE - PREGLED

ANALITIČKI SIGNAL	ANALITIČKA METODA TEMELJENA NA TOM SIGNALU
električni potencijal	potenciometrija,
	kronopotenciometrija
električni naboj	kulometrija
električna struja	polarografija, amperometrija,
električni otpor	konduktometrija

ANALITIČKE TEHNIKE I GLAVNE PRIMJENE

tehnika	mjereno svojstvo	glavne primjene
elektrokemijska analiza	Električna svojstva analita u otopini.	Kvalitativna i kvantitativna analiza sastojaka od razine glavnog do tragova.



Ivan Piljac, SENZORI FIZIKALNIH VELIČINA I ELEKTROANALITIČKE METODE, Media Print, Zagreb, 2010.

Udžbenik Sveučilišta u Zagrebu

Iz recenzije:

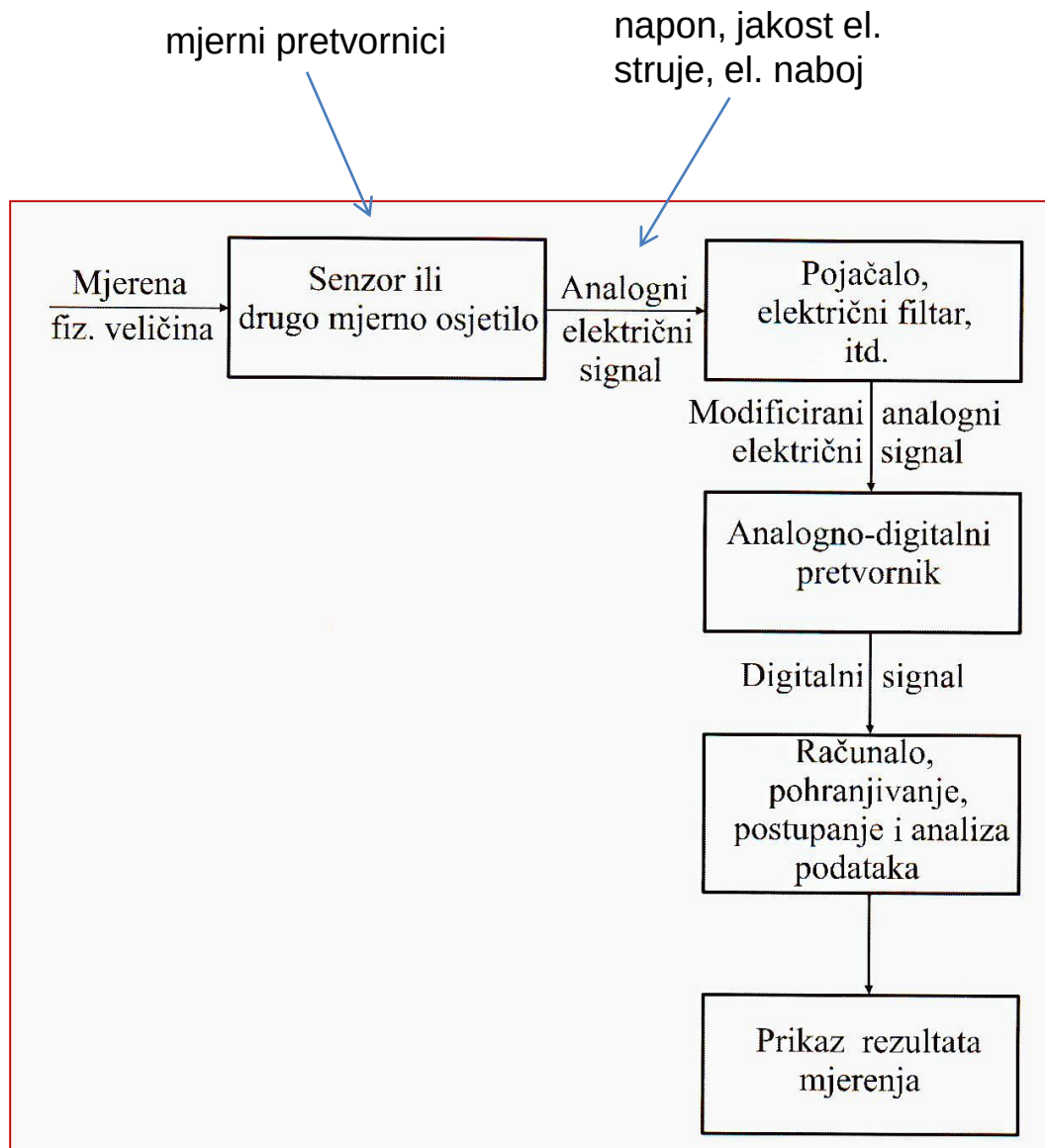
“... ona tumačenjem najsuvremenijih elektrokemijskih metoda i tehnika, poput analize ubrizgavanjem u protok ili načela rada i primjene mnogovrsnih senzora, uvelike nadmašuje cjelovitost najpoznatijih svjetskih udžbenika analitičke kemije koji obrađuju tu problematiku. Pojedina su poglavlja knjige, osim za svladavanje temeljnih prirodoslovnih i tehničkih kolegija, izvrstan izvor znanja o mjerenju, regulaciji i vođenju tehnoloških i biotehnoloških procesa, analognim i digitalnim elektroničkim elementima i sklopovima, što je usporedivo s inozemnim specifičnim udžbenicima koji znanstveno obrađuju elektroniku.

Autor s pravom knjigu drži svojim životnom djelom, jer je u njoj prikupio i obradio sva znanja i višedesetljetno iskustvo bavljenja elektroanalitičkim metodama. Izvornim, sveobuhvatnim, preglednim i interdisciplinarnim pristupom ona je jedinstven sveučilišni udžbenik i u svjetskim razmjerima...”

Marija Kaštelan-Macan

načelno → vrijednost fizikalne veličine mjeri se usporedbom sa standardom koji sadrži istu fizikalnu veličinu

mjerena fizikalna veličina pretvara se u električnu fizikalnu veličinu → mjerni pretvornici (elektrode, senzori i drugi mjerni osjetnici)



POTENCIOMETRIJA

- mjeri se razlika potencijala između elektroda elektrokemijske ćelije uz ravnotežne uvjete
- razlika potencijala mjeri se pomoću potencijometara i voltmetara (pH-metri, plon-metri)
- dvije elektrode: referentna → potencijal ne ovisi o aktivitetima vrsta u ćeliji
 indikatorska → potencijal ovisi o aktivitetu (koncentraciji) jedne ili više vrsta u ćeliji

⇒ **indikatorske elektrode** → razlika potencijala na dodirnoj površini elektroda-otopina

⇒ kovinske elektrode – redoks reakcija

⇒ selektivne (membranske elektrode) – reakcija prijelaza iona (ionska izmjena, adsorpcija, ekstrakcija na međusloju membrana-otopina i dr.)

⇒ staklena elektroda

⇒ ion-selektivna elektroda sa čvrstom membranom

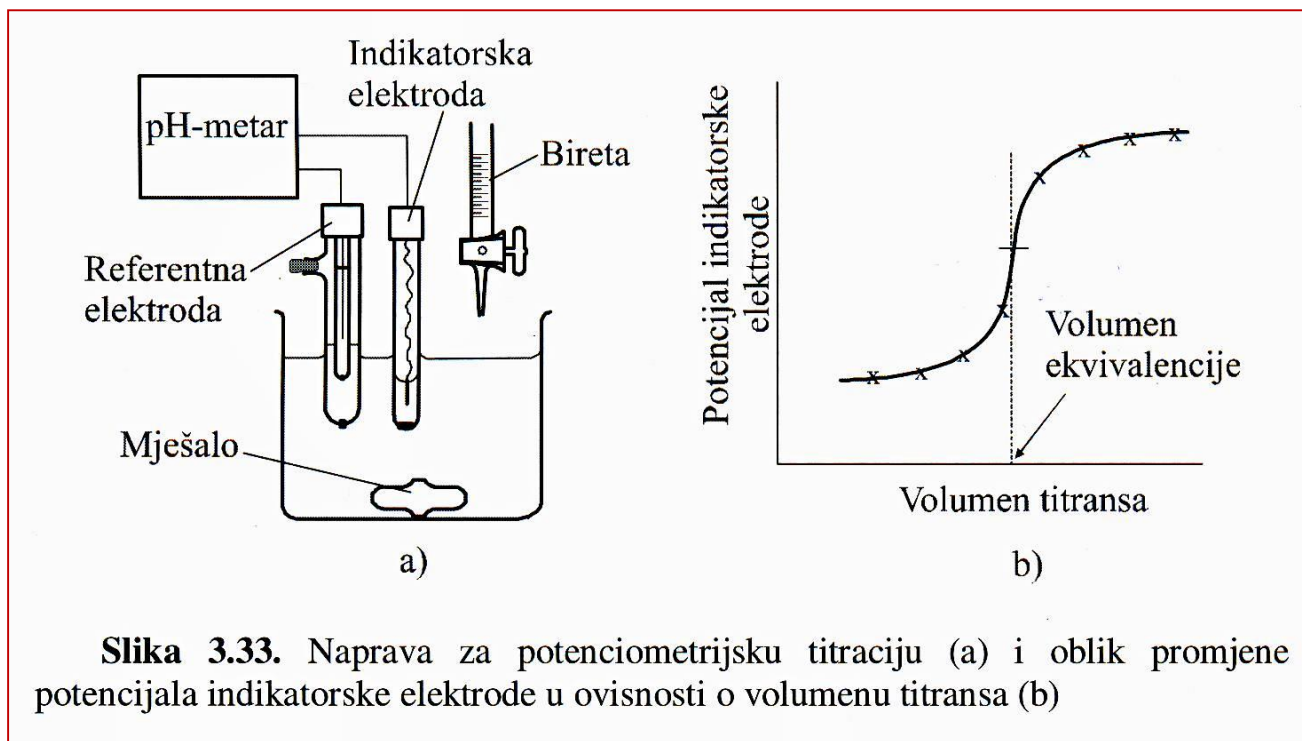
⇒ ion-selektivna elektroda s tekućom membranom

⇒ univerzalna selektivna elektroda

⇒ elektroda za plinove

⇒ enzimске potencijometrijske elektrode (bio-senzori)

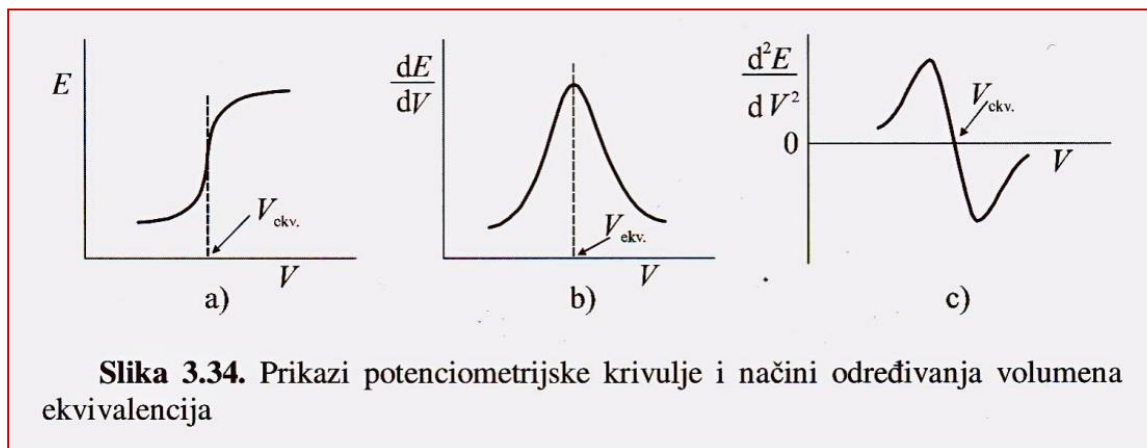
potenciometrijska titracija → u elektrokemijsku se ćeliju dodaje titrans – on reagira s određivanom tvari u ćeliji i mijenja aktivitet molekulske vrste a time i potencijal indikatorske elektrode (postoji automatski titrator)



Određivanje točke ekvivalencije (završne točke)

infleksija prva derivacija druga derivacija

↓ ↓ ↓

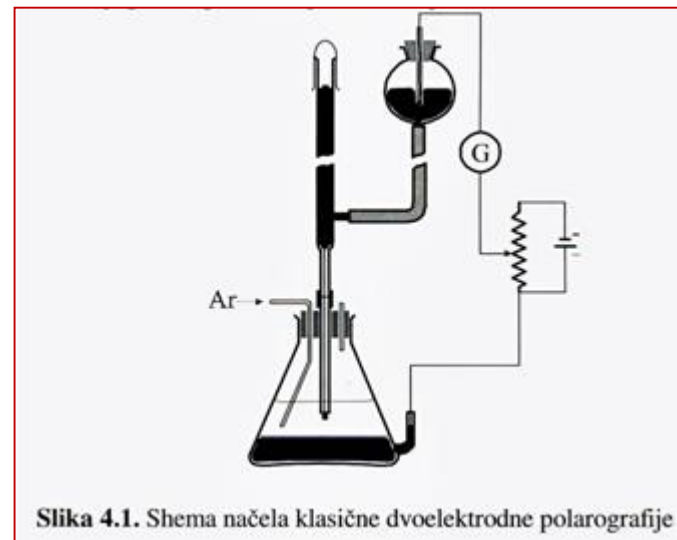


Vrste titracija

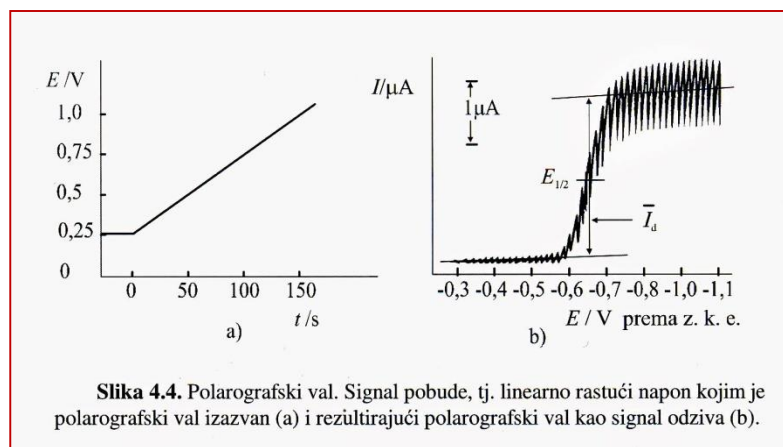
- ⇒ kiselinско-bazne
- ⇒ kiselinско-bazne u nevodenim medijima
- ⇒ taložne
- ⇒ kompleksometrijske
- ⇒ redoks

POLAROGRAFIJA

- klasična polarografija (dc-polarografija) → 1922. god; Jaroslav Heyrovský (Čehoslovačka; 1890-1967.)
radna elektroda → kapajuća živina elektroda
referentna elektroda → zasićena kalomelova elektroda; živa
- pobudni signal → električni napon
- mjerena fizikalna veličina → električna struja ćelije
- mjerena struja ćelije kao funkcija narinutog napona ima karakterističan sigmoidni oblik ("S" oblik)
- krivulja struja-napon → polarografski val



Slika 4.1. Shema načela klasične dvoelektrodne polarografije

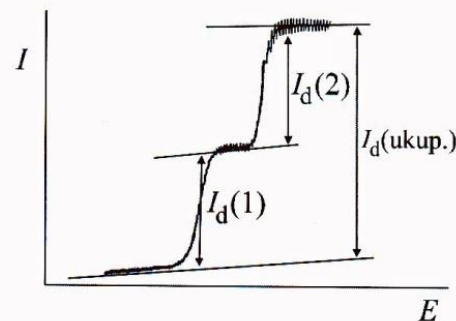


1959. – Nobelova nagrada za otkriće i razvoj polarografskih analitičkih metoda – uručio švedski kralj Gustav Adolf VI

- ⇒ ako se između kapajuće i referentne elektrode narine dovoljno velik napon, on izaziva trenutnu redukciju ili oksidaciju elektroaktivnih čestica na površini elektrode
- ⇒ tada je struja elektrode, tj. struja kroz ćeliju odnosno vanjski strujni krug, određena brzinom difuzije elektroaktivnih čestica iz otopine do površine elektrode → difuzijska struja, I_d
- ⇒ difuzijska struja je neovisna o potencijalu ako je on dovoljno velik da prouzroči trenutnu redukciju ili oksidaciju svih elektroaktivnih čestica pridošlih na površinu elektrode

primjena:

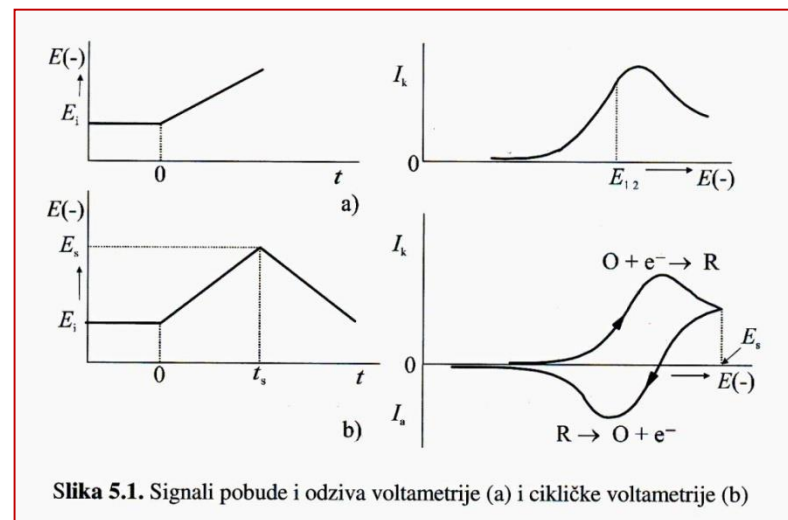
- ⇒ određivanje sastava i konstanta stabilnosti kompleksnih vrsta
- ⇒ određivanje smjese više elektroaktivnih tvari



Slika 4.11. Polarogrami dvaju elektroreduktanda kojima se formalni elektrodni potencijali znatno razlikuju

VOLTAMMETRIJA

- ⇒ signal pobude → električni napon
 - ⇒ signal odziva → električna struja kao funkcija narinutog napona
 - ⇒ voltametrija = skraćenica volt-amper-metrija
 - ⇒ napon se linearno mijenja kao funkcija vremena
-
- ⇒ potencijal radne elektrode → znatno pozitivniji od formalnog elektrodnog redoks sustava elektroaktivne vrste → kroz ćeliju protječe samo osnovna struja
 - ⇒ negativiranjem potencijala elektrode raste brzina elektrodne reakcije redukcije
 - ⇒ blizu formalnog potencijala brzina znatno naraste → počinje teći mjerljiva struja ćelije → uzlazni dio krivulje odziva
 - ⇒ ciklička voltametrija:
 - signal pobude mijenja smjer
 - signal odziva → karakterističan oblik s katodnim i anodnim vrhom



Slika 5.1. Signali pobude i odziva voltametrije (a) i cikličke voltametrije (b)

primjena:

- ⇒ istraživanje elektrokemijskih procesa (mehanizmi reakcija)
- ⇒ analiza pomoću elektrokemijskih senzora, npr.
 - ⇒ u medicini *in vivo* praćenje koncentracije nekih molekulskih vrsta u organima
 - ⇒ istraživanje adsorpcije te nastanka i reakcija nekih oksidnih slojeva na površinama metala

ELEKTROGRAVIMETRIJA

⇒ jedna od najstarijih elektroanalitičkih metoda (dulje od 130 god.)

⇒ primjena: kvantitativno određivanje metala u legurama i rudama

⇒ temelj: kvantitativno taloženje produkta elektrodne reakcije na radnoj elektrodi ćelije

⇒ količina određivane tvari utvrđuje se mjerenjem mase istaložene tvari

⇒ radne elektrode velikih površina

⇒ otopina se miješa → pospješuje prijenos elektroaktivnih čestica na površinu radne elektrode

⇒ vrijeme trajanja: od nekoliko minuta do nekoliko sati

⇒ tijekom elektrodne reakcije na radnoj elektrodi provodi se uz regulaciju potencijala ili uz regulaciju jakosti struje radne elektrode

⇒ većina postupaka → proces redukcije iona metala iz otopine i taloženje na površini radne elektrode; rijetko oksidacija

⇒ radne elektrode: platinska (od tantala, srebra, bakra, mjedi... metala koji se taloži)

Tablica 6.I. Pregled važnijih elektrogravimetrijskih određivanja

Ion	Elektrolit	Mjeri se masa izlučenog	Može se odijeliti od
Ag ⁺	alkalijski cijanidi	Ag	Cu, Bi, Pb, Cd, Zn i drugih metala
Bi ³⁺	HCl + oksalna kis.	Bi	Sn, Pb, Cd, Zn
Cd ²⁺	alkalijski cijanidi	Cd	Zn
Cu ²⁺	HNO ₃ + H ₂ SO ₄	Cu	Bi, Sb, Pb, Sn, Ni, Cd, Zn
Ni ²⁺	NH ₄ Cl	Ni	Mn, Cr, Al
Pb ²⁺	HNO ₃	PbO ₂	Cd, Sn, Ni, Zn, Mn, Al, Fe
Sb ³⁺	H ₂ SO ₄	Sb	Pb, Sn
Sn ²⁺	(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ + H ₂ C ₂ O ₄	Sn	Cd, Zn, Mn, Fe
Zn ²⁺	NaOH	Zn	

KULOMETRIJA

- ⇒ eletroanalitička metoda u kojoj se količina (koncentracija) određivane tvari utvrđuje mjerenjem električnog naboja potrebnog za kvantitativnu promjenu oksidacijskog stanja određivane supstancije (oksidacija ili redukcija)
- ⇒ **izravna** kulometrijska analiza → el. naboj s radne elektrode se izravno prenosi na čestice određivane tvari
- ⇒ **neizravna** kulometrijska analiza → druga molekulska vrsta sudjeluje u elektrodnoj reakciji a produkt elektrodne reakcije reagira s određivanom tvari → kulometrijska titracija
- ⇒ elektrodna reakcija → regulacija potencijala radne elektrode ili regulacija jakosti struje
- ⇒ elektrodna reakcija mora teći uz 100 %-tno iskorišćenje struje

⇒ temeljna zakonitost: Faradayev zakon

$$Q = zFn = zF \frac{m}{M}$$

- n = količina (mol)
- m = masa (g)
- Q = količina naboja (C; Coulomb)
- z = broj elektrona po čestici elektroaktivne tvari
- F = Faradayeva konstanta (96500 C/mol)
- M = molarna masa

Faraday



22.09.1791. – 25.08.1867.
engl. fizičar i kemičar
elektromagnetizam i
elektrokemija

Coulomb



14. 07.1736. – 23. 08.1806.
franc. fizičar

Tablica 7.I. Pregled važnijih kulometrijskih određivanja uz regulaciju potencijala radne elektrode

Određivana tvar	Radna elektroda	Elektrolit	Elektrodna reakcija
Bi	Hg	H-tartarat	$\text{Bi}^{3+} + 3\text{e}^- + \text{Hg} \rightarrow \text{Bi}(\text{Hg})$
Br	Pt	HAc + NaAc	$2\text{Br}^- \rightarrow \text{Br}_2 + 2\text{e}^-$
Cd	Hg	KCl	$\text{Cd}^{2+} + 2\text{e}^- + \text{Hg} \rightarrow \text{Cd}(\text{Hg})$
Cr	Pt	H_2SO_4	$\text{Cr}(\text{VI}) + 3\text{e}^- \rightarrow \text{Cr}^{3+}$
Cu	Hg	NH_3	$\text{Cu}^{2+} + 2\text{e}^- + \text{Hg} \rightarrow \text{Cu}(\text{Hg})$
Fe	Pt	H_2SO_4	$\text{Fe}(\text{III}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Fe}(\text{II})$
Hg	Hg ili Pt	HNO_3	$\text{Hg}^{2+} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Hg}$
I	Pt	H_2SO_4	$2\text{I}^- \rightarrow \text{I}_2$
Pb	Hg	KCl	$\text{Pb}^{2+} + 2\text{e}^- + \text{Hg} \rightarrow \text{Pb}(\text{Hg})$
Pu	Pt	H_2SO_4	$\text{Pu}(\text{III}) \rightarrow \text{Pu}(\text{IV}) + \text{e}^-$
U	Hg	H_2SO_4	$\text{U}(\text{VI}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{U}(\text{IV})$
Te	Hg	NaOH	$\text{Te}^{2-} \rightarrow \text{Te} + 2\text{e}^-$
Askorbinska kiselina	Pt	Ftalatni pufer, pH 6	Oksidacija, $z = 2$
DDT	Hg		Redukcija, $z = 2$
Aromatski ugljikovodici	Hg ili Pt	TBAP u DMF ¹	$\text{Ar} + \text{e}^- \rightarrow \text{Ar}^-$
Aromatski nitro spojevi	Hg	LiCl u DMSO ²	$\text{ArNO}_2 + \text{e}^- \rightarrow \text{ArNO}_2^-$
Li	Hg	TBAP u CH_3CN ³	$\text{Li}(\text{I}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Li}$

¹ Tetrabutilamonij-perklorat u dimetilformamidu

² Dimetilsulfoksid

³ Tetrabutilamonij-perklorat u acetonitrilu

KONDUKTOMETRIJA

- ⇒ mjeri se **električna vodljivost** ⇒ brzina prijenosa električnog naboja
- ⇒ **ioni** ⇒ slobodni pokretljivi nositelji električnog naboja u otopinama i talinama
- ⇒ **električna vodljivost elektrolitnih otopina** ⇒ **koncentracija** i **pokretljivost iona** pod utjecajem električnog polja ⇒ **svi prisutni ioni u otopini sudjeluju u električnoj vodljivosti** ⇒ konduktometrija nije selektivna metoda
- ⇒ **izravno** konduktometrijsko određivanje koncentracije ⇒ ograničena primjena
- ⇒ **konduktometrijska titracija** ⇒ šira primjena (određivanje točke ekvivalencije) → razrijeđene otopine – kiselo-bazne, taložne, kompleksometrijske titracije

osnovni princip:

- ⇒ dvije metalne elektrode na koje je iz vanjskog izvora doveden električni napon uronjene u elektrolitnu otopinu
 - između elektroda uspostavlja se električno polje
 - putovanje (migracija) iona prema suprotno nabijenim elektrodama = električna struja kroz otopinu
- ⇒ jakost električne struje (***I***) kroz otopinu ovisi o narinutom naponu (***E***) i o električnom otporu (***R***) otopine (Ohmov zakon): **$I = E / R$**

- ⇒ **električna vodljivost** otopine (***G***) = recipročna vrijednost električnog otpora: **$G = \frac{1}{R} = \frac{I}{E}$**

jedinica = Siemens ⇒ $S = \Omega^{-1}$

električna vodljivost otopine u konduktometrijskoj ćeliji ovisi o:

- koncentraciji iona,
- pokretljivosti iona,
- presjeku stupca otopine između elektroda (tok električne struje),
- razmaku između elektroda ćelije:

$$G = \kappa \frac{A}{l}$$

električna provodnost ili **električna konduktivnost** = κ (kappa, grč.)

A = ploština presjeka otopine kroz koji se odvija tok struje

l = razmak između elektroda ćelije

$l/A \Rightarrow$ određuje se eksperimentalno = **konstanta ćelije, C** (mjenjem vodljivosti otopine točno poznate električne provodnosti – najčešće otopina KCl – kontrolirana temperatura)

$$\kappa = G \cdot C$$

jedinica (SI) $\Rightarrow$ $S \cdot m^{-1}$ ($S \cdot m^{-1} = \Omega^{-1} \cdot m^{-1}$) $\Rightarrow$ najčešće $S \cdot cm^{-1}$

molarna provodnost elektrolita (Λ) povezuje električnu provodnost i koncentraciju otopine:

$$\Lambda = \frac{\kappa}{c}$$

c = koncentracija elektrolita koja se izražava u ekvivalentnim jedinkama po električnom naboju (jedinka je dio iona koji ima jedinični nabojni broj)