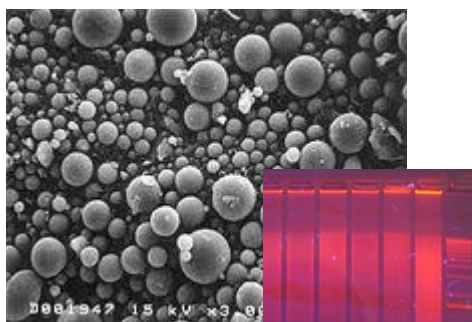

Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Zavod za analitičku kemiju

Kolegij
KARAKTERIZACIJA MATERIJALA

Preddiplomski studij
KEMIJA I INŽENJERSTVO MATERIJALA



Laboratorijske vježbe

Interna skripta

Priredila:
Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Zagreb, 2014.

VJEŽBE IZ KARAKTERIZACIJE MATERIJALA

1. vježba: Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije Fe^{3+} -iona ili Cr(VI) -iona

Metoda vanjskog standarda

Zadatak: 2. Iz otopina poznatih koncentracija Fe^{3+} -iona i Cr(VI) -iona izraditi baždarni dijagram.

3. Iz baždarnog dijagrama odrediti koncentracije $\gamma(\text{Fe}^{3+})$, $\gamma[\text{Cr(VI)}]$ u $\mu\text{g mL}^{-1}$ u uzorku nepoznatog sastava.

1. Princip određivanja

Intenzitet elektromagnetskog zračenja I_0 smanjuje se prolazom kroz otopinu koja može apsorbirati zračenje. Smanjenje intenziteta ovisi o koncentraciji tvari (c) koja apsorbira zračenje, debljini sloja, svjetlosnom putu kroz uzorak (b), molarnom apsorpcijskom koeficijentu, specifičnom za svaku tvar, a mijenja se s valnom duljinom (ϵ). Odnos intenziteta prije i poslije prolaza kroz uzorak definirali su Lambert, Beer i Bourguer zakonom apsorpcije EMZ:

$$\log \frac{I_0}{I} = A = \epsilon \cdot c \cdot b \quad (2.4.)$$

Molekularna apsorpcijska spektrometrija u UV i VID dijelu EMZ koristi se za kvantitativna određivanja organskih i anorganskih tvari. Često se primjenjuje za određivanje metala u otopinama (mogu biti u otopini prisutni kao kationske vrste, anionske ili metalni kompleksi).

Slijedeći primjeri opisuju spektrofotometrijsko određivanje iona u vodenim otopinama. Određivanja se osnivaju na reakcijama nastajanja kompleksnih vrsta između metalnih iona i anorganskih ili organskih liganada ili na apsorpciji EMZ samog iona (aniona).

Željezo u obliku Fe^{3+} -iona reagira u kloridno kiselom mediju sa SCN^- -ionom i stvara kompleksni ion $[\text{Fe}(\text{SCN})_6]^{3-}$ koji je crveno obojen. Nastali kompleksni ion ima maksimum apsorpcije elektromagnetskog zračenja kod valne duljine $\lambda = 480 \text{ nm}$.

Krom(VI) reagira s difenilkarbazidom u kiselj otopini dajući intenzivno obojeni kompleks. Nastali produkt ima apsorpcijski maksimum kod $\lambda = 545 \text{ nm}$.

Nitrati se određuju spektrofotometrijski u UV-području kod valne duljine $\lambda = 220 \text{ nm}$. Međutim ukoliko voda sadrži neka organska onečišćenja (npr. huminske kiseline) apsorpcija kod 220 nm je suma apsorpcije nitrat-ionu i organskih tvari. Stoga se određuje apsorpcija na dvije valne duljine, 220 nm i 275 nm . Pri valnoj duljini 275 nm apsorbiraju samo organske tvari a nitrati ne. Apсорpcija nitrata u tom slučaju odgovara razlici apsorpcije pri 220 i 275 nm .

Ukoliko je uzorak vode zamućen, suspendirane čestice iz uzorka uklanjaju se filtriranjem, a zakiseljavanjem sa 1 M HCl uklanjaju se smetnje uzrokovane prisustvom anorganskih hidroksida ili karbonata. Određivanju nitrata ne smeta prisutnost klorida, ali smetaju nitriti i fosfati.

2. Eksperimentalni dio

2.1. Potrebne otopine

Određivanje Fe^{3+} -iona

- otopina poznate koncentracije Fe^{3+} -iona
 $\gamma(Fe^{3+}) = 10 \mu g mL^{-1}$
- otopina H_2O_2 ; $w(H_2O_2) = 3\%$
- otopina KSCN; $w(KSCN) = 15\%$
- HCl konc.

Određivanje Cr(VI)-iona

- otopina poznate koncentracije Cr(VI)-iona
 $\gamma(Cr) = 40 \mu g mL^{-1}$
- otopina H_2SO_4 ; $w(H_2SO_4) = 2\%$
- otopina difenilkarbazida; $w(dfk) = 1\%$

Određivanje NO_3^- -iona

- otopina poznate koncentracije NO_3^- -iona
 $\gamma(NO_3^-) = 44,3 \mu g mL^{-1}$
- otopina HCl, $c(HCl) = 1 M$

2.2. Instrumenti

Uvjeti mjerenja na spektrofotometru Perkin Elmer 124

- snimanje apsorpcijskog spektra u području valne duljine $\lambda = 800-190 nm$
- izvor zračenja; volframova ili deuterijska lampa
- svjetlosni put radne i referentne kivete $b = 1 cm$
- brzina zapisne sprave; $10 mm min^{-1}$

Uvjeti mjerenja na spektrofotometru Perkin Elmer Lambda 20

- snimanje apsorpcijskog spektra u području valne duljine $\lambda = 190-800 nm$
- izvor zračenja; volframova i deuterijska lampa
- svjetlosni put radne i referentne kivete $b = 1 cm$
- zapis na zaslonu PC-a, printer ili ploter

Uvjeti mjerenja na spektrofotometru VSU-1 Carl Zeiss, Jena

- u UV području elektromagnetskog zračenja:
- valna duljina $\lambda = 267 nm$, $TT = 1016,7$ (jedinice na skali noniusa na bubnju monokromatora koje odgovaraju valnoj duljini prema tablici proizvođača)
- prerez optičkog klina; $p = 3.5 mm$
- širina pukotine; $d = 0.2 mm$
- debljina sloja; $b = 0.5 cm$ (kivete od taljenog SiO_2 za UV zračenje)

Uvjeti mjerenja na spektrofotometru MA 9525 - SPECOL 21

- valna duljina $\lambda = 480$ ili $545 nm$
- širina pukotine; $d = 0.5 mm$ (oznaka na instrumentu)
- svjetlosni put radne i referentne kivete; $b = 1 cm$

Uvjeti mjerenja na spektrofotometru Perkin Elmer Lambda 1

- valna duljina $\lambda = 480$ ili $545 nm$
 - širina pukotine; $d = 0.5 mm$ (oznaka na instrumentu)
 - svjetlosni put radne i referentne kivete; $b = 1 cm$
-

2.3. Postupak

Pažljivo pročitajte upute koje ste dobili uz vježbu. Ukopčajte instrument i dozvolite da se zagrije na radnu temperaturu. Vrlo je važno da se koristi pažljivo oprano posuđe da bi se dobili dobri rezultati. Upotrebljavajte samo čistu deioniziranu vodu za pranje staklenog posuđa i za sva razrjeđenja.

Priprema otopina za određivanje Fe^{3+} , $Cr(VI)$ i NO_3^- iona:

Pripremite standardne otopine razrjeđenjem temeljne standardne otopine.

Pripremite 5 otopina koncentracija: od 1 - 5 $\mu\text{g/mL}$ računato na Fe, 1 - 5 $\mu\text{g/mL}$ računato na Ni, 0,25 - 2 $\mu\text{g/mL}$ računato na Cr te 1 - 8 $\mu\text{g/mL}$ računato na nitrat-ion dodavajući u odmjerne tikvice od 25,00 mL iz birete potrebne volumene standardnih otopina.

Zatim za određivanje:

Fe - u odmjerne tikvice s uzorkom dodajte do polovice volumena deioniziranu vodu i u sve dodajte 1,0 mL HCl konc. i 2,5 mL otopine KSCN, w (KSCN) = 15 %. Ako je u uzorku prisutno i Fe(II) potrebno je dodati 0,5 mL H_2O_2 ($w=3\%$) u svaku tikvicu prije dodatka reagensa.

Cr - u odmjerne tikvice s kromatom dodajte 2 mL 2%-tne otopine H_2SO_4 i 4 mL otopine difenilkarbazida u acetonu.

NO_3^- - u odmjerne tikvice s nitratom dodati 0,5 mL 1 M HCl.

Sve odmjerne tikvice nadopunite deioniziranom vodom do oznake (25 mL), dobro promućkajte i izmjerite apsorbancije za svaku otopinu.

Temeljne standardne otopine su pripremljene ranije a radne standardne otopine mogu se pripremati zajednički za cijelu grupu.

Priprema nepoznatog uzorka:

Nepoznati uzorak izdaje voditelj laboratorija ili demonstrator u čistu odmjernu tikvicu od 25,00 mL. Nadopunite do oznake deioniziranom vodom.

Priprava otopine za određivanje valne duljine maksimuma apsorpcije:

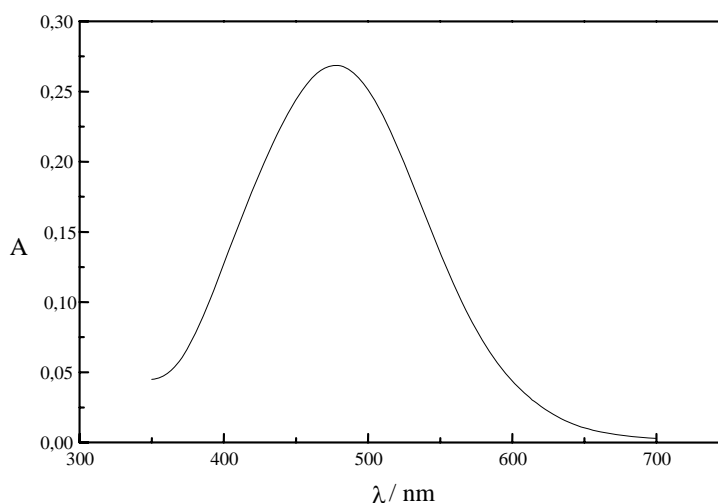
Za snimanje spektara uzmite najkoncentriraniju otopinu iz niza otopina pripremljenih za izradu baždarnog dijagrama, snimite spektar i odredite valnu duljinu maksimuma apsorpcije.

Kalibracijski postupak:

Postavite instrument na nulu sa slijepom probom. Izmjerite i zapišite vrijednosti apsorbancija svih standardnih otopina Ni, ili Fe ili Cr ili NO_3^- otopine nepoznatog uzorka. Odredite točnost i ponovljivost mjerenjem standardnih otopina barem tri (pet) puta. Mjerite u rastućem nizu koncentracija kod izrade baždarnog dijagrama.

Rezultati i obrada podataka mjerenja:

Nacrtajte blok sheme instrumenata na kojima ste mjerili. Priložite rezultatima snimljeni spektar (na slici 2.13. primjer je spektra Fe-tiocijanata),



Slika 2.13. Apsorpcijski spektar $[\text{Fe}(\text{SCN})_6]^{3-}$ -iona u vidljivom dijelu EMZ

- Nacrtajte i statistički obradite baždarni dijagram za izmjerene standardne otopine. Nacrtajte odnos apsorbancije prema masenoj koncentraciji g (Fe, Cr i/ili NO_3^-) u $\mu\text{g/mL}$,
- Izračunajte i izrazite u $\mu\text{g/mL}$ sadržaj (Fe, Cr ili NO_3^-) u nepoznatom uzorku.

Zbrinjavanje otpadnih kemikalija i pranje suđa i pribora:

Ovi eksperimenti ne proizvode opasan otpad. Sve otopine iz ove vježbe mogu se baciti u izljev nakon čega je potrebno izljev isprati i vodom.

Literatura

1. Instrumentalna i procesna analiza, (Radni materijal za internu uporabu), Zavod za analitičku kemiju FKIT, Zagreb, 2005.
 2. D. Maljković, Spektrometrije, Tehnička enciklopedija, Svezak 12., Leksikografski zavod Zagreb, 1985, str. 150-178.
 3. D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, Osnove analitičke kemije, 6. izdanje (1. izdanje hrvatsko), Školska knjiga, Zagreb 1999.
 4. B. Petz, Osnovne statističke metode za nematematičare, Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, 4. izdanje, Naklada Slap Jastrebarsko, 2002.
 5. M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga Zagreb, 2003.
-

Studij: Kemija i inženjerstvo materijala

VJEŽBE IZ KARAKTERIZACIJE MATERIJALA

1A. vježba: Turbidimetrijsko određivanje koncentracije SO_4^{2-} -iona

Metoda vanjskog standarda

- Zadatak:** 1. Izraditi baždarni dijagram za određivanje sulfat-iona
2. Iz baždarnog dijagrama odrediti koncentraciju SO_4^{2-} -iona u uzorku vode.

1. Princip određivanja

Turbidimetrija i nefelometrija su metode kojima se određuje koncentracija čestica u suspenziji. Osniva se na elastičnom raspršivanju EM zračenja na suspendiranim česticama u otopini. Mjeri se smanjenje intenziteta prolaznog zračenja ili intenzitet raspršenog zračenja kao posljedicu sruza s česticama. Raspršivanje EMZ na suspendiranim česticama često se naziva i Tyndallov efekt. Raspršenje može biti Rayleighovog, Debyeovog ili Mieovog tipa, ovisno o veličini čestica.

Ako je dimenzija čestica reda veličine valne duljine upadnog zračenja ili manja, zračenje će se raspršivati no ako je veća doći će do refleksije. Optimalna veličina čestica da bi došlo do raspršenja je 100–1000 nm, dakle veličina koloida.

Kod **turbidimetrijskih** mjerenja pravocrtno usmjereno zračenje prolazi iz izvora kroz otopinu uzorka do detektora, a mjeri se smanjenje intenziteta prolaznog zračenja. Turbidimetrijski se određuje zamućenje vode u ekološkom okruženju ili koncentracija u sustavima u kojima reakcijom nastaje talog koji se teško filtrira zbog malih čestica ili želatinozne prirode taloga. Turbidimetrija često zamjenjuje dugotrajno gravimetrijsko određivanje.

U turbidimetriji mjeri se transmitancija primarne zrake:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.5)$$

gdje je I_0 intenzitet ulaznog zračenja nakon prolaska kroz slijepu probu, a I je intenzitet zračenja nakon prolaska kroz uzorak. Propušteno zračenje je proporcionalno koncentraciji suspendirane tvari prema izrazu koji je analogan Beerovom zakonu:

$$S = \log \frac{I_0}{I} = kbc \quad (2.6)$$

gdje je S zamućenje, k je konstanta proporcionalnosti, koji puta nazvana koeficijentom zamućenja, b je duljina puta kroz uzorak a c je koncentracija.

Parametri koji utječu na određivanja su:

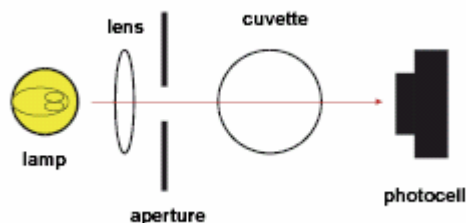
- koncentracija čestica,
- odnos indeksa loma čestice i okolnog medija,
- veličina, oblik i raspodjela čestica.
- valna duljina ulaznog zračenja.

Vrijednosti zamućenja ovise i o orijentaciji čestica u suspenziji obzirom da sve čestice nisu sferične.

Plavo svjetlo se raspršuje efikasnije nego crveno (zbog čega je i boja neba plava). Kroz obojene suspenzije propušta se zračenje iste boje, opet zbog smanjenja apsorpcije.

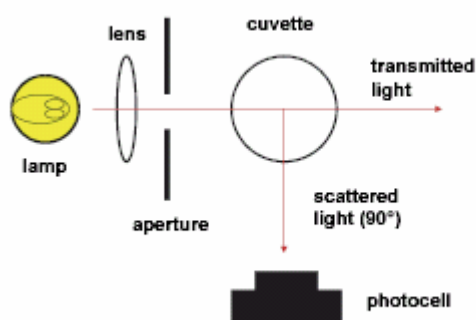
Instrumenti koji se koriste u turbidimetriji su vrlo slični spektrometrima za UV/VIS područje (spektrofotometri), a mogu se koristiti i obični spektrofotometri ili čak kolorimetri. Izvori zračenja su živin luk s filtrima za odabir samo jedne valne duljine ili volframova lampa u kombinaciji s monokromatorima ili filtrima. Monokromatsko svjetlo je nužno kod

turbidimetrijskih određivanja da se smanji apsorpcija EMZ na česticama, te da je smanjenje intenziteta posljedica uglavnom raspršenja (prividna apsorpcija). Detektori su u turbidimetriji kao i u spektrofotometriji, fotoćelije, a fotomultiplikatori su potrebni kod nefelometrijskih instrumenata. Kivete za tekuće uzorke su u turbidimetriji iste kao i za spektrofotometrijska određivanja.



Slika 2.14. Blok shema turbidimetra (fotometra s filterima i okruglim kivetama)

U **nefelometriji** mjeri se intenzitet elastično raspršenog zračenja na koloidnim česticama pod kutem, uglavnom od 90° , na smjer inicijalne zrake. Intenzitet raspršenog zračenja proporcionalan je zamućenju otopine. Instrumenti za nefelometrijska mjerenja su posebni instrumenti s vrlo stabilnim izvorima zračenja, kivete su ili okrugle gdje zračenje dolazi kroz dno a mjeri se raspršeno kroz stijenku cilindra, ili slične kao kod molekularne luminiscencije, a detektori su fotomultiplikatorske cijevi.



Slika 2.15. Blok shema nefelometra s okruglim kivetama

Nefelometrijska mjerenja su pogodna za analizu otopina slabog zamućenja.

Sustavi se, ukoliko se određuje zamućenje, kalibriraju sa suspenzijama formazina (polimerni spoj, primarni standard za kalibraciju) ili sa sekundarnim standardima koji mogu biti stakleni štapovi raznog stupnja neprozirnosti i na taj način simuliraju zamućene sustave. Suspenzije formazina su po boji slične mlijeku. **Opresz!** Za formazin postoji vjerojatnost da je kancerogen. Ako je mjerenje zamućenja u funkciji zamjene dugotrajnog gravimetrijskog određivanja, sustav se kalibrira kao i svako relativno instrumentalno određivanje jednim od naprijed objašnjenih postupaka kalibracije.



Rezultati mjerenja s ove dvije tehnike ne mogu se direktno uspoređivati kada se određuje zamućenje otopina. Jedinice u kojima se izražava zamućenje su NTU (nephelometric turbidity units), FTU (formazine turbidity units) ukoliko se mjeri nefelometrijski, a FAU (formazine attenuation units) ako se mjeri smanjenje intenziteta u prolaznom zračenju (turbidimetrijski). Svi propisi i standardi za vodene ekosustave traže nefelometrijska određivanja i rezultate daje u NTU jedinicama. U literaturi postoje podaci da 1 NTU odgovara ekvivalentu od 1 mg/mL suspendiranog SiO_2 .

Metode koje se osnivaju na raspršenju EMZ kao što je gore navedeno upotrebljavaju se najčešće za određivanje koncentracije u suspenzijama (turbidimetrija i nefelometrija), ili za određivanje stupnja zamućenja u ekosustavima ali primjena nije ograničena samo na ta određivanja. Raspršenjem EMZ može se odrediti veličina čestica, raspodjela i molekulska

masa (posebno za polimerne čestice). Ta određivanja, iako se osnivaju na istim principima nisu tako jednostavna.

2. Eksperimentalni dio

Instrumenti:

 A white photometer with a circular scale and three vertical slots for filters. The text 'MA 9502 FOTOMETAR' is visible on the front panel.	a) fotometar MA 9502, MA 9507 Iskra; Kranj, Slovenija fotometar s obojenim filterima
 A black and blue turbidimeter with a circular scale and a 'HACH' logo. The text 'MODEL 2100A TURBIDIMETER' is visible on the front panel.	b) turbidimetar 2100A Hach, USA

Slika 2.16. Slika fotometra s okruglim kivetama i obojenim filterima /a) i nefelometra s okruglim kivetama (b)

Kivete

Čistoća kiveta za mjerenje zamućenja vrlo je važna. Otisci prstiju, prljavština ili ogrebotine smetaju pri određivanju jer mogu uzrokovati dodatno raspršenje ili mogu apsorbirati dio zračenja.

Uvjeti mjerenja:

fotometar MA 9502, MA 9507 Iskra; Kranj

Filtar: obojeni (plavi)

turbidimetar 2100A Hach, USA

Skala: 1-100 NTU

Potrebne otopine i reagensi:

- otopine poznate koncentracije SO_4^{2-} - iona (otopina Na_2SO_4):
 - temeljna standardna otopina (TSO) – $\gamma(\text{SO}_4^{2-})=1000,00 \mu\text{g/mL}$
 - standardna otopina – $\gamma(\text{SO}_4^{2-})=200,00 \mu\text{g/mL}$
- otopina za kondicioniranje:

glicerol 50 mL, HCl konc. 30 mL, etanol 95 %-ni ili *izo*-propanol 100 mL, NaCl 75 g , H₂O 300 mL; dobro promiješati

- BaCl₂, p.a.

Priprema otopina:

Pripremite radnu standardnu otopinu (200 µg/mL) razrjeđenjem temeljne standardne otopine (1,0 mg/mL).

Pripremite u odmjernim tikvicama od 25 mL otopine SO₄²⁻ iona za izradu baždarnog dijagrama tako da koncentracija bude između 0 – 180 µg/mL za mjerenja turbidimetrijski a 0-40 µg/mL za mjerenja nefelometrijski. U svaku odmjernu tikvicu dodajte 2,5 mL otopine za kondicioniranje, nadopunite do oznake (25 mL) deioniziranom vodom i dobro promućkajte.

Pripremite standarde u pažljivo očišćenom staklenom posuđu. Upotrebljavajte samo čistu deioniziranu vodu za ispiranje staklenog posuđa i za sva razrjeđenja.

Temeljna standardna otopina je pripremljena ranije a radne standardne otopine mogu se pripremati zajednički za cijelu grupu.

Priprema uzorka:

Uzorak je vodovodna voda. Priprema se pod istim uvjetima kao i standardne otopine za izradu baždarnog dijagrama. **Ne zaboravite na faktor razrjeđenja.**

Kalibracijski postupak:

Otopine sulfata za izradu baždarnog dijagrama staviti u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL i dodati na vrhu spatule krutog BaCl₂. Miješati na magnetskoj miješalici 60 sekundi. Na isti način pripremiti slijepu probu. Prenijeti slijepu probu i otopine sulfata u kivete, staviti u držač na fotometru i kad se kazaljka umiri, očitati otklon na skali apsorbancije fotometra pet puta (5). Očitane otklone kazaljke fotometra (intenzitet raspršenog zračenja u NTU ili prividna apsorpcija na skali fotometra E ili A) prema koncentraciji SO₄²⁻-iona u otopini i prikazati grafički.

Zbrinjavanje otpadnih kemikalija i pranje suđa i pribora

Ovi eksperimenti ne proizvode opasan otpad. Sve otopine iz ove vježbe mogu se baciti u izljev nakon čega treba pustiti vodu.

Stakleno posuđe i pribor na kraju rada dobro isperite vodovodnom vodom i zatim nekoliko puta deioniziranom vodom.

Rezultati i obrada podataka mjerenja:

- Skicirajte (blok shema) instrument na kojem ste mjerili,
 - Nacrtajte i statistički obradite baždarni dijagram za izmjerene standardne otopine, zamućenje (S) prema masenoj koncentraciji SO₄²⁻-iona, i/ili intenzitet raspršenog zračenja (otklon na skali nefelometra) prema masenoj koncentraciji SO₄²⁻-iona,
 - Izračunajte i izrazite u µg/mL sadržaj SO₄²⁻ -iona u vodovodnoj vodi.
-

2.7. Literatura

6. A. J. M. Horvat, K. Margeta, Instrumentalna i procesna analiza, (Radni materijal za internu uporabu), Zavod za analitičku kemiju FKIT, Zagreb, 2009.
7. D. Maljković, Spektrometrije, Tehnička enciklopedija, Svezak 12., Leksikografski zavod Zagreb, 1985, str. 150-178.
8. D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, Osnove analitičke kemije, 6. izdanje (1. izdanje hrvatsko), Školska knjiga, Zagreb 1999.
9. B. Petz, Osnovne statističke metode za nematematičare, Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, 4. izdanje, Naklada Slap Jastrebarsko, 2002.
10. M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga Zagreb 2003

Studij: Kemija i inženjerstvo materijala

VJEŽBE IZ KARAKTERIZACIJE MATERIJALA

2. vježba: Određivanje koncentracije Cu^{2+} - iona i Zn^{2+} - iona atomskom apsorpcijskom spektrometrijom (AAS)

Metoda standardnog dodatka

Zadatak: 1. Odrediti koncentraciju $\gamma(\text{Cu}^{2+})/\mu\text{g mL}^{-1}$ i $\gamma(\text{Zn}^{2+})/\mu\text{g mL}^{-1}$ u uzorku grafički i računski iz kalibracije metodom standardnog dodatka

1. Princip određivanja

Atomska apsorpcijska spektrometrija je kvantitativna metoda spektrometrijske analize. Zasniva se na apsorpciji vidljivog ili ultravioletnog zračenja koje prolazi kroz atomnu paru uzorka. Karakterizirana je eksponencijalnim zakonom smanjenja intenziteta upadnog zračenja poslije prolaza kroz apsorpcijski sloj koji sadrži slobodne atome ispitivanog uzorka. Za apsorpciju zračenja osnovni nivo atoma treba biti dovoljno zaposjednut odnosno veliki broj atoma se treba nalaziti u osnovnom stanju. Budući da samo atomi u osnovnom stanju daju odziv, uvjeti isparavanja i dekompozicije moraju biti takvi da uzrokuju njegovu minimalnu ionizaciju a maksimalnu atomizaciju. Koncentracija ispitivanih atoma direktno je proporcionalna razlici upadnog i izlaznog zračenja.

2. Eksperimentalni dio

2.1. Potrebne otopine

- temeljna otopina bakra - $\gamma(\text{Cu}^{2+}) = 1 \text{ g/L}$ (1000 mg/L, 1 mg/mL, 1000 $\mu\text{g/mL}$)
 - $\gamma(\text{Zn}^{2+}) = 1 \text{ g/L}$ (1000 mg/L, 1 mg/mL, 1000 $\mu\text{g/mL}$)
- standardna otopina - $\gamma(\text{Cu}^{2+}) = 10,0 \text{ mg/L}$
 - $\gamma(\text{Zn}^{2+}) = 10,0 \text{ mg/L}$

2.2. Instrumenti

Spektrometar Perkin Elmer Model 3110 opremljen je za očitavanje apsorbancije, koncentracije ili intenziteta emisije zračenja uzorka unesenog u plamen.

Tablica 1. Uvjeti mjerenja na AAS

Uvjeti mjerenja	Cu^{2+}	Zn^{2+}
Izvor zračenja:	Cu šuplja katoda	Zn šuplja katoda
rezonantna linija:	$\lambda=324.8$ nm	$\lambda=213,9$ nm
radna struja katode	15 mA	15 mA
Širina pukotine:	d=0,7 mm	d=0,7 mm
Smjesa plinova u plameniku:	zrak i acetilen	zrak i acetilen
protok:		
zraka	55 Lmin ⁻¹	55 Lmin ⁻¹
acetilena	33 Lmin ⁻¹	33 Lmin ⁻¹
Vrijeme integracije	2 s	2 s

2.3. Postupak

Pažljivo pročitajte upute koje ste dobili uz vježbu. Ukopčajte instrument i dozvolite da se zagrije na radnu temperaturu. Upotrebljavajte samo čistu deioniziranu vodu za pranje staklenog posuđa i za sva razrjeđenja.

2.3.1. Priprema otopina za određivanje Cu^{2+} -iona i Zn^{2+} -iona

Pripremite standardne otopine razrjeđenjem temeljnih standardnih otopina.

Pripremite otopine u 3 tikvice (25 mL) na slijedeći način:

1. U svaku tikvicu stavite isti alikvot analita
2. U drugu i treću tikvicu dodajte određeni alikvot pripremljenih standardnih otopina Cu^{2+} -iona i Zn^{2+} -iona
3. Nadopunite tikvice deioniziranom vodom do oznake (25 mL) i dobro promućkajte

2.4. Kalibracijski postupak – Metoda standardnog dodatka

Pripremiti 3 otopine uzorka sa standardnim dodatkom. Koncentracija analita u dodatku trebala bi biti u linearnom području odnosa A prema koncentraciji, što će se vidjeti iz grafa.

2.5. Zbrinjavanje otpadnih kemikalija i pranje suđa i pribora

Ovi eksperimenti ne proizvode opasan otpad. Sve otopine iz ove vježbe mogu se baciti u izljev nakon čega je potrebno izljev isprati i vodom. Stakleno posuđe i pribor na kraju rada dobro isperite s vodovodnom vodom i zatim nekoliko puta deioniziranom vodom.

2.6. Literatura

11. A. J. M. Horvat, K. Margeta, Instrumentalna i procesna analiza, (Radni materijal za internu uporabu), Zavod za analitičku kemiju FKIT, Zagreb, 2009.
12. D. Maljković, Spektrometrije, Tehnička enciklopedija, Svezak 12., Leksikografski zavod Zagreb, 1985, str. 161.

Studij: Kemija i inženjerstvo materijala

VJEŽBE IZ KARAKTERIZACIJE MATERIJALA

3. vježba: HPLC-DAD određivanje sulfonamidnih antibiotika u otpadnim vodama

Metoda unutarnjeg standarda

- Zadatak:**
1. Nacrtati grafičku ovisnost površine kromatografskih krivulja o masenoj koncentraciji za pojedini antibiotik ($A-\gamma$, mg/L).
 2. Nacrtati grafičku ovisnost normalizirane površine kromatografskih krivulja o masenoj koncentraciji za pojedini antibiotik ($A(\text{STDi})/A(\text{US})-\gamma$, mg/L).
 3. Metodom unutarnjeg standarda odrediti koncentraciju pojedinih antibiotika u nepoznatom uzorku, te izračunati faktor razlučivanja (R_s) pojedinih kromatografskih krivulja ispitivanih antibiotika u nepoznatom uzorku.

1. Princip određivanja

Kromatografija je najučinkovitija separacijska tehnika, što je čini primjenljivom u brojnim analitičkim postupcima. Danas se kromatografija upotrebljava za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju vrlo različitih spojeva i grupa spojeva u različitim uzorcima oko nas. Kromatografske tehnike se koriste u različitim područjima djelovanja ljudi, no njezina najveća primjena je u analizi okoliša (voda, tlo, sediment, zrak).

Kromatografski sustav čine nepokretna i pokretna faza, te ispitivani spoj. Tijekom kromatografskog procesa ispitivani spoj se nalazi u dinamičkoj ravnoteži između tih dviju faza. Nepokretna faza odabire se tako da zadržavanje molekula u njoj bude selektivno, tj. izbor faze uvjetovan je prirodom ispitivanog spoja, prirodom ravnoteže kromatografskog procesa i vrstom veze između ispitivanog spoja i kromatografske podloge. Čvrsta tvar ili kapljevina na inertnom nosaču predstavlja nepokretnu fazu.

Na temelju sastava pokretne faze kromatografske tehnike se mogu dalje podijeliti na plinsku kromatografiju gdje je pokretna faza inertni plin, tekućinsku kromatografiju pokretna faza je kapljevina male viskoznosti i fluidna kromatografija u superkritičnim uvjetima gdje je to tekućina iznad svoje kritične temperature i tlaka.

Kako bi se omogućio optimalan izbor kromatografskog sustava u tekućinskoj kromatografiji za razdvajanje željene smjese, uzevši u obzir i nepokretnu fazu, treba izabrati pogodan sustav otapala koji čini pokretnu fazu. Izbor pogodnog otapala, odnosno smjese otapala, obavlja se obzirom na sposobnost otapala da stvaraju vodikove veze (odjeljivanje hidrofiličnih, odnosno hidrofobnih spojeva). Otapala moraju biti kromatografski čista, što znači da ne smiju sadržavati nečistoće koje mogu smetati kromatografskom određivanju.

Priroda veze koja se ostvaruje između ispitivanog spoja te nepokretne i pokretne faze važan je čimbenik realnog kromatografskog procesa.

Obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze, kromatografske se tehnike mogu podijeliti na:

- a) razdjelnu kromatografiju, kada se ravnoteža uspostavlja između dviju kapljevina, što znači da je i nepokretna faza kapljevina vezana na inertni čvrsti nosač
 - b) adsorpcijsku kromatografiju, pri kojoj se ravnoteža uspostavlja između kapljevine ili plina u pokretnoj fazi i površine čvrste nepokretne faze, pri čemu se ispitivane molekule izravno vežu na površinu adsorbensa
 - c) afinitetnu kromatografiju, pri kojoj se na površini čvrste faze nalaze različite funkcionalne skupine s definiranim prostornim rasporedom, a vezanje nastaje zbog
-

specifičnih interakcija molekula s kemijski vezanim ligandom na površini nepokretne faze

- d) kromatografiju isključenjem, pri kojoj je nepokretna faza materijal s porama definiranih dimenzija i slabo izraženim adsorpcijskim svojstvom, a razdvajanje se molekula zbiva zbog razlike u molekularnoj masi i obujmu

Uzorak koji želimo kromatografski odijeliti i dokazati unosi se u vrlo malom volumenu u pokretnu fazu, kad je riječ o kromatografiji na stupcu, ili na nepokretnu fazu, ako primijenimo plošnu kromatografiju. Nakon stanovitog vremena uspostavljanja kromatografskog procesa dolazi do razdvajanja sastojaka smjese, a parametri kromatografskog razdvajanja, koji bitno utječu na optimizaciju kromatografske separacije, su: zadržavanje, koje se izražava vremenom zadržavanja, t_R ; protok kroz porozni medij, koji je definiran Darcyjevom zakonom i brzinom pokretne faze $v(x)$; širenje kromatografske zone. Cilj je postići što bolju separaciju što se provjerava faktorom razlučivanja, R_s , prema izrazu (1) za dvije susjedne kromatografske krivulje kromatograma:

$$R_s = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} \quad (1)$$

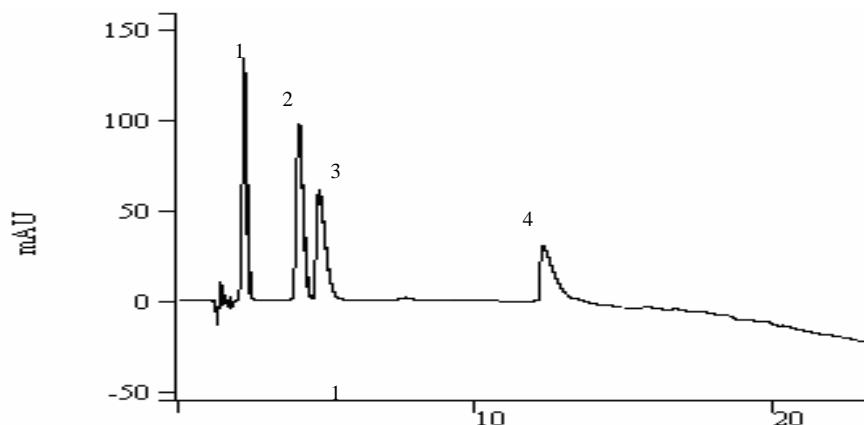
2. Eksperimentalni dio

2.1. Kromatografski uvjeti

Pokretna faza za razvijanje kromatograma sastoji se od 0,01 M oksalne kiseline i acetonitrila (ACN) uz gradijentnu separaciju pri čemu se tijekom vremena mijenja i udio organske faze i protok kao što je prikazano u tablici 1. Vrijeme analize traje 30 minuta na LiChrosphere 100 CN koloni (Merck, Njemačka) dimenzija 125 mm x 4 mm, 5 μ m. Kromatogrami se snimaju na Varian ProStar 500 kromatografu s detektorom s nizom dioda (DAD), rezultati se očitavaju na 270 nm. Radi se na temperaturi od 30 °C. Kromatogram standardne otopine smjese antibiotika i trimetoprima prikazan je kromatogramom na slici 1. Standardne otopine smjese farmaceutika pripremaju se otapanjem odgovarajuće mase antibiotika i unutarnjeg standarda u metanolu HPLC čistoće.

Tablica 1. Prikaz mijenjanja udjela pokretne faze i protoka u gradijentnoj separaciji

Vrijeme, min	0,01 M H ₂ C ₂ O ₄	ACN	Protok, mL/min
0	100	0	1,0
6	100	0	1,0
25	50	50	0,8



Slika 1. Kromatogram za smjesu antibiotika sniman kod $\lambda=270$ nm uz gradijent protoka od 0,8-1 mL/min i temperature kolone 30 °C (CN kolona, Merck) Pokretna faza: 0,01 M H₂C₂O₄:acetonitril, gradijent
1-sulfagvanidin; 2-sulfadiazin; 3-sulfadimidin; 4-trimetoprim

2.2. Instrument

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti izvedena je upotrebom Varian ProStar 500, USA) sustava koji se sastoji od ProStar 330 detektora s nizom dioda (DAD), ProStar 230 tercijarne pumpe, ProStar 410 uređaja za automatsko dodavanje uzoraka, ProStar 500 termostatiranog držača kolone i odabrane kolone, svi dijelovi kromatografskog sustava spojeni su kao što je prikazano na slici 2.



Slika 2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (Varian ProStar 500) korišten u laboratorijskom radu

Za obradu kromatograma koristio se je računalni program za modularni kromatograf Varian ProStar 360 Star Chromatography WorkStation verzija 5.5. Kromatografom se upravlja preko računala. Za svaku analizu potrebno je bilo unaprijed zadati parametre separacije u nizu putem računalnog programa.

2.3. Kalibracijski postupak – Metoda unutarnjeg standarda

Pripremljene standardne otopine smjese antibiotika s unutarnjim standardom, kao i nepoznati uzorak čije su koncentracije prikazane u tablici 2, snimiti na kromatografu, te očitati površine kromatografske krivulje za sve dobivene kromatograme. Svaka standardna otopina, kao i nepoznati uzorak injektira se tri puta, te je potrebno računati sa srednjom vrijednosti površine kromatografskih krivulja.

Tablica 2. Sastav standardnih otopina smjese antibiotika za određivanje metodom unutarnjeg standarda (trimetoprim) HPLC-DAD metodom

Antibiotik	STD1, mg/L	STD2, mg/L	STD3, mg/L	NU, mg/L
Sulfagvanidin	10	20	30	?
Sulfadiazin	10	20	30	?
Sulfametazin	10	20	30	?
Trimetoprim	30	30	30	30

2.4. Zbrinjavanje otpadnih kemikalija i pranje suđa i pribora

Ovim eksperimentom dobivaju se kao otpad pokretna faza kontaminirana antibioticima koja se zbrinjava u posebne plastične kanistre, ništa se ne ispušta u izljev.

2.5. Literatura

13. D. Ašperger, Doktorska disertacija: Razvoj kromatografskih metoda za analizu veterinarskih antibiotika u okolišu, Zavod za analitičku kemiju, FKIT, Zagreb, 2007.
 14. M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga Zagreb 2003
-