

Uzorkovanje, čuvanje uzorka, priprema uzorka za analizu

Uzorak i uzorkovanje

Uzorkovanje je deo analitičkog procesa kojim se izdvaja jedna ili više porcija iz materijala dobijenog na analizu.

Uzorak (U) je deo materije o kojoj je potrebna određena analitička informacija.

Uzorci su najčešće deo smeša.

Postoje dve osnovne klase smeša:

- ✓ **homogene:** nemaju vidljive granice između komponenti, uniforman im je sastav
- ✓ **heterogene:** imaju jednu ili više uočljivih granica (faznih) između komponenti, njihov sastav nije uniforman

Osnovni problem kod uzorkovanja: **uzorak mora biti reprezentativan** tako da je rezultat analize relevantan za predmet analize u celini.

Homogenost predmeta analize na određivani konstituent (analit) je jako važan faktor pri uzorkovanju zato je potrebno tečne uzorke homogenizovati mućkanjem a čvrstu supstancu izmrviti i izmešati.

Instrumentalne metode mogu biti **destruktivne** i **nedestruktivne**. Klasične analitičke metode (gravimetrija i volumetrija) su destruktivne

Ponekad je predmet analize istovremeno i uzorak i tada se nedestruktivnost naravno podrazumeva (komadi nakita, arheološki i umetnički predmeti i slično).

Kad govorimo o uzimanju uzorka (tj. uzorkovanju) podrazumeva se da je predmet analize veliki tako da se za analizu uzima samo jedan mali deo tj. uzorak je mali deo predmeta analize.

Na neke konstituente predmet analize može biti homogen a na druge ne (npr. jezerska voda je mnogo homogenija u odnosu na sastav alkalnih elemenata nego npr. na sastav nekih površinski aktivnih molekula).

Neki predmeti analize mogu biti tako veliki da se podrazumeva prostorno ili površinsko “mapiranje” (npr. analiza sastava jalovišta nekog rudnika, analiza sastava neke veće vodene površine...): Uzorkuje se sa više mesta i rezultati se prikazuju po tim mestima.

Uzorci se obično nose u laboratorije na analizu ali ponekad se analiza provodi *in situ uz pomoć prenosivih analitičkih* instrumenata (kontrola koncentracije hlora u bazenima za plivanje: uzorak vode se uzima u epruvetu, dodaju reagensi te se dobijena boja upoređuje s referentom skalom boja na licu mesta)

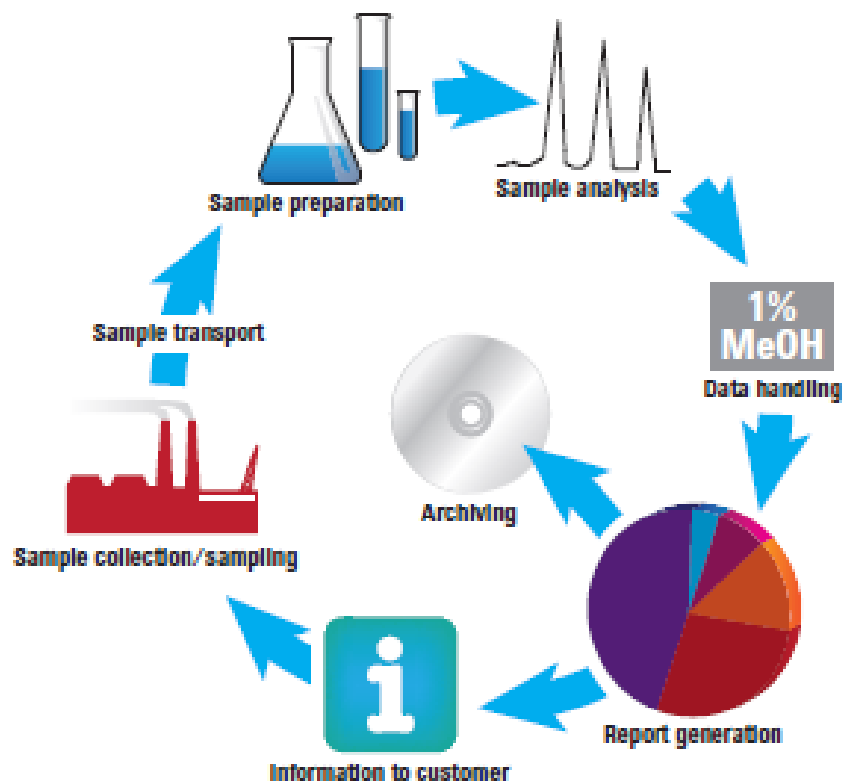
Priprema uzorka treba da bude:

- ✓ jednostavna
- ✓ iz minimalne količine uzorka
- ✓ uz minimalnu količinu rastvarača
- ✓ brza
- ✓ precizna
- ✓ isplativa

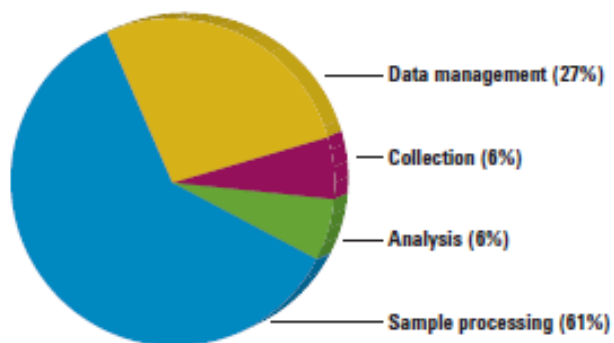
Mora se voditi računa o sledećim osobinam uzoraka:

- isparljivost
- fotoosetljivost
- termička stabilnost/nestabilnost
- biorazgradljivost
- hemijska reaktivnost

Tokom svih ovih postupaka mora se paziti da ne dođe do kontaminacije ili gubitka analita (npr. potrebno je temeljno ispiranje posude s tečnim ili gasovitim uzorkom da bi se izbegli gubici zbog adsorpcije na zidovima posude).

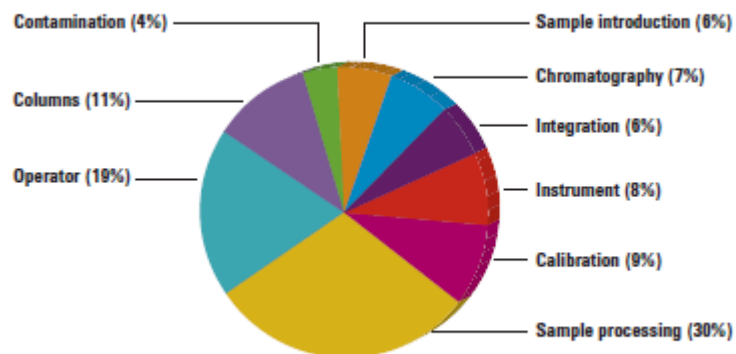


Time Spent on Typical Chromatographic Analysis



Data taken from Agilent Technologies survey

Sources of Error Generated During Chromatographic Analysis



Data taken from Agilent Technologies survey

Statistika uzorkovanja: koliki broj uzoraka, kolika veličina uzorka

Kad je predmet analize nehomogen onda greška uzorkovanja može biti uporediva ili čak veća od greške daljeg postupka analize (greške u pripremi uzorka i greške merenja)

Ukupna relativna greška analize:

$$s^2 = s_u^2 + s_a^2$$

predstavlja zbir **greške uzorkovanja** i **greška ostalog postupka analize**.

Grešku ostalog postupka analize možemo da procenimo iz standardne devijacije višestrukog merenja nad istim uzorkom (po potrebi predhodno homogenizovanim)

Ukupnu grešku sad možemo da procenimo iz standardne devijacije merenja više uzoraka sa istog predmeta analize.

npr. Za ukupnu standardnu devijaciju smo našli 3.2% a za postupak analize bez uzorkovanja 1%. Primenjujući gornju formulu nalazimo da je greška uzorkovanja 3,04%.

Greška uzorkovanja je dominantna i u ovom slučaju se mogu koristiti manje precizna analitička metoda (bilo da je reč o obradi ili merenju), što znači brža i jeftinija metoda.

Greška uzorkovanja: greška koja potiče od samog uzorkovanja (nedovoljan broj nedovoljno reprezentativnih uzoraka) usled raspodele analizirane komponente u predmetu analize kad ona nije uniformna.

Veličina analiziranog uzorka

Što veći uzorak manja je greška usled nehomogenosti uzorka.

Kako naći razumnu veličinu uzorka?

$$W = k_s / s_s^2$$

gde je W minimalna masa uzorka, s_s^2 je ovde devijacija sastava uzorka a k_s je masa uzorka koja reprezentuje uzorak sa nesigurnošću od 1% i intervalom poverenja od 66%.

Broj uzoraka

$$n = (zs_s/s_u)^2$$

gde je z faktor poverenja, s_s devijacija sastava uzorka a s_u greška uzorkovanja pri n ponovljenih uzorkovanja.

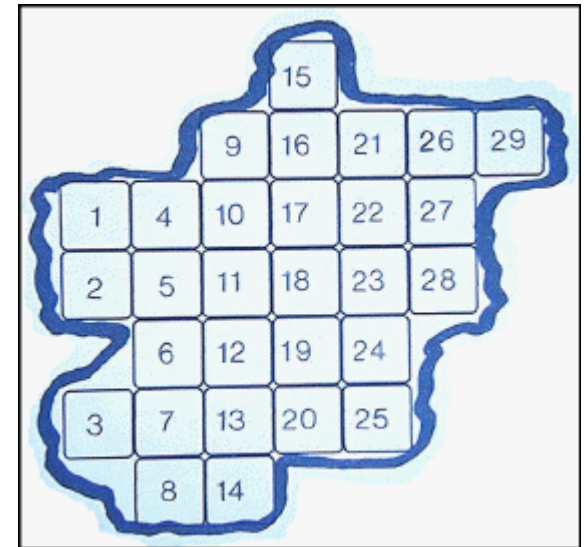
Dakle, ako je procenjeno da je s_s devijacija sastava uzorka a želi se greška uzorkovanja od s_u sa faktorom poverenja z (1 za 66%, 2 za 95%, 3 za 99.7%...), Broj potrebnih uzoraka dat je gornjom formulom.

Primer: ako se sastav uzorka varira sa standardnom devijacijom 2.1% a želi se da uzorkovanje ima relativnu grešku sadržaja analita od 1.6% sa intervalom poverenja od 95% ($z=2$), dobija se 6.9 odnosno 7 uzorkovanja

Načini uzorkovanja

Metoda slučajnog uzorkovanja

Prikupljanje uzoraka bez plana uzorkovanja. Mogu ako je u pitanju nehomogen uzorak da dovedu do velikih grešaka ili do grešaka usled lošeg izbora uzorka od strane istraživača. U ovom slučaju najbolje je dati uzorak podeliti u jednake delove, dodeliti im broj i nasumično odabrati broj.

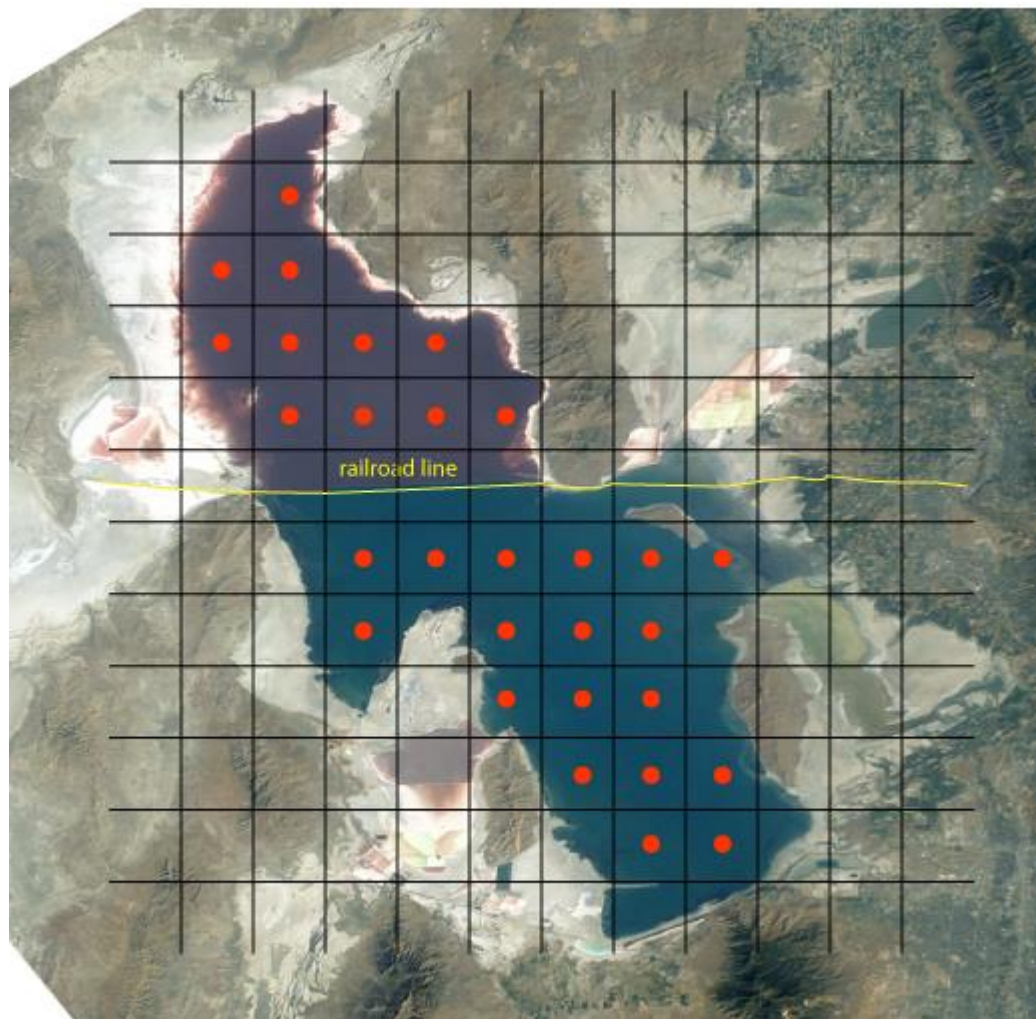


Metoda selektivnog uzorkovanja

Koriste se prethodne informacije kako bi se odredilo šta će se uzorkovati npr. proučavanje bioakumulacije polihlorovanog bifenila (PCB) u ribi mogu da se izuzmu ribe koje su suviše male ili bolesne. Koristi se kada hoćemo da ograničimo broj nezavisnih promenljivih koji utiču na rezultat analize.

Sistematsko uzorkovanje

Uzorkovanje se vrši u pravilnim intervalima prostora ili vremena.



Sistematsko uzorkovanje

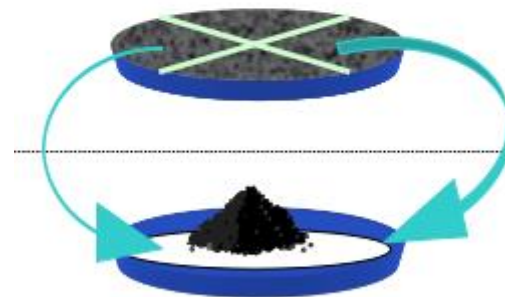
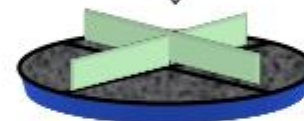
Ako je predmet analize nehomogen svakako moramo uzeti više uzoraka, odakle i kako to se odlučuje na osnovu poznavanja predmeta analize.

Kad smo uzeli uzorke, imamo dva puta do konačnog rezultata analize:

- ✓ da od uzetih uzoraka spajanjem i homogeniziranjem napravimo jedan uzorak pa da ga dalje obrađujemo i izmerimo
- ✓ da obrađujemo i merimo sve uzete uzorke pa da na kraju uradimo srednju vrednost rezultata i nju uzmemo kao reprezentativnu

Koji put ćemo odabrati zavisi od toga koliko je proces homogenizacije zahtevan u odnosu na sam proces obrade uzorka i merenja.

Ako je uzorak **tečan** ili **gasovit** a uz to je po analiziranom konstituentu i homogen, dovoljno je promućkati ga pre nego što se uzme deo uzorka.



Ako je uzorak **čvrst** potrebno je homogenizovati ga, podeliti na 4 četvrtine, odabrati dve suprotne četvrtine i spojiti ih i ponovo homogenizovati. Druge dve četvrtine izbacujemo iz razmatranja. Postupak ponavljamo sve dok ne ostane približno onoliko koliko nam je potrebno za odvagu: **metoda četvrtanja uzorka**.

Vrste uzoraka

Čvrsti uzorci:

- rude
- zemljišta
- sedimenati
- farmaceutski proizvodi (tablete, kapsule, ...)
- polimerni materijali
- prehrambeni proizvodi
- biološki uzorci (uzorci tkiva, ...)

Tečni uzorci:

- pića (mleko, sokovi, ...)
- prirodne vode (potoka, jezera, reka, mora, kišnica)
- telesne tečnosti (krv, urin)
- suspenzije (oralni medikamenti, ...)
- emulzije

Gasovi:

- izduvni gasovi automobila
- emisija gasova iz industrijskih postrojenja
- ostali gasovi u atmosferi

Čvrsti uzorci

Kod čvrstih materijala veličina uzorka zavisi od:

- ✓ tražene preciznosti analize
- ✓ heterogenosti materijala
- ✓ veličine čestica

Posebnu pažnju zahtevaju **čvrsti uzorci koji imaju u sebi vodu** (zemljište, biološki uzorci, ...)

Količina vode može da utiče na ukupnu koncentraciju analita koji se određuje. Zato se takvi uzorci najčešće analiziraju prvo na ukupan sadržaj vode pre analize .

Uzorci se mere, suše (u peći) a potom ponove mere. Kod ovakvih uzoraka mora se voditi računa takođe o:

- ✓ isparljivim komponentama
- ✓ komponentama koje se mogu raspadati na visokim temperaturama

Rizici mehaničkog usitnjavanja čvrstih uzorka:

- ✓ usitnjavanjem uzorka može doći do značajnih promena u sastavu analita
- ✓ smanjenjem veličine čestica povećava se površina a time i porast rizika od gubitka isparljivih komponenti
- ✓ povećanje temperature uzorka usled trenja (prilikom usitnjavanja) doprinosi gubitku isparljivih komponenti
- ✓ povećanje površine uzorka omogućava se lakša oksidacija u atmosferskim uslovima a time opet može doći do promene sastava
- ✓ kontaminacija analita usled mehaničke abrazije
- ✓ usitnjavanja uzorka
- ✓ javljanje razlike u veličini čestica (neke se lakše redukuju a neke teže što nosi opasnost od gubitka manjih čestica u vidu prašine)
- ✓ to dalje dovodi do neuniformne raspodele čestica različitih veličina

Tečni uzorci

- pića (mleko, sokovi, ...)
- prirodne vode (potoka, jezera, reka, mora, kišnica)
- telesne tečnosti (krv, urin)
- suspenzije (oralni medikamenti, ...)
- emulzije

Kontejneri od plastike i stakla (pyrex – borosilikatna stakla) ,

Stakleni kontejneri mogu da se steriliju, lako se čiste ali su takođe lomljivi.

Stakleni kontejneri se uvek koriste za čuvanje:

- pesticida
- ulja i masti
- organskih jedinjenja

Plastični kontejneri se prave od:

- polietilena
- polikarbonata
- PVC
- teflona (politetrafluoroetilen)

Plastični kontejneri se koriste za čuvanje:

- uzoraka metala u tragovima (zbog adsorpcije na staklu)

GASOVI

- ✓ Izduvni gasovi automobila
- ✓ Emisija gasova iz industrijskih postrojenja
- ✓ Ostali gasovi u atmosferi

Kontejneri od nerđajućeg čelika ili teflona. Gasovi se upumpavaju pumpama.

Mora se voditi računa o adsorpciji na zidovima kontejnera.

Mora se voditi računa i o prisustvu reaktivnih gasova kao što su ozon ili oksidi azota.

Gasovi se mogu i hladiti tako da pređu u tečno stanje (kriogeno hlađenje).

Gasovi se hvataju pomoću raznih sorbenata ili filtriranjem

Sorbenti hvataju:

- isparljive gasove (napona pare oko 10^{-6} atm) i
- poluisparljive (napona pare oko 10^{-6} - 10^{-12} atm)

Organski polimeri su obično sorbenti. Polimerne smole se koriste za isparljive gasove. Ovi materijali imaju mali afinitet ka vodi i vrlo efiksno sakupljaju isparljive organske komponente

Ugljenik je superiorni sorbent u odnosu na polimerne smole. To može da bude i otežavajuća okolnost zbog teške desorpcije.

Sorbenti imaju ograničenu adsorpciju analita (kapacitet sorbenta)

Uzorkovanje gasova

Gasovi su homogeni.

Ako se analizira gasovita komponenta, uzima se gasoviti uzorak pomoću boce sa ventilima. Zapremina zavisi od očekivane koncentracije analita i osetljivosti metode određivanja.

Uzorkovanje iz boca ili cisterni pod pritiskom: čelične boce za uzorkovanje, jedna strana se poveže sa bocom, reducir ventilom se postavi pritisak u boci za uzorkovanje, pusti se gas radi ispiranja, a potom se boca napuni. Zatim se zatvori ventil preko koga je boca bila spojena na bocu iz koje se uzorkuje.

Uzorkovanje vazduha za analizu gasnih komponenti: vazduh se upumpava u boce ili kese za uzorkovanje koje su hermetički zatvorene, a predhodno su bile evakuisane.

Ako će se analizirati komponente iz gasa koje nisu gasovite čvrste ili tečne (čestice čvrstih aerosola (dim, prašina) ili sitne kapi) ne mora se uzimati gasoviti uzorak već se pumpama odgovarajuća zapremina vazduha propušta kroz pogodne filtre koji zadržavaju komponente koje nisu gasovite: dalje se analizira sadržaj na filtru.

Uzorkovanje tečnosti

U odnosu na rastvorljive komponente tečnosti su homogene.

U odnosu na nerastvorne komponente lakše od tečnosti i na površinski aktivne komponente tečnosti nisu homogene.

Uzet uzorak se lako homogenizuje mućkanjem.

Za uzorkovanje tečnosti na različitim dubinama postoje posude čiji se poklopac može otvoriti pomoću dugačkih poluga: posuda se potopi na željenu dubinu, otvori se poklopac, napuni se a zatim se zatvori i izvuče na površinu.

Drugačije, tečnost se sa odgovarajuće dubine može izvući crevom i pumpom.

Uzorkovanje čvrstih uzoraka

- ✓ Zemljište, sedimenti, stene: sa različitih dubina...
- ✓ Metali i legure: bušilicom se vade opiljci sa različitih mesta.

Kod čvrstih uzoraka veliki problem je homogenizacije odnosno nehomogenosti.

Često potrebno predhodno sušenje ili čak žarenje da se dobije oblik koji može da se spraši: sušnice i peći za žarenje.

Homogenizacija: prevođenje u prah koji onda može da se meša.

- Sprašivanje u avanu: samo male količine uzorka.
- Mešanje tj. homogenizacija prahova pomoću posudica sa staklenom kuglicom.
- Mlevenje i mešanje u mlinovima sa čeličnim i ahatnim kuglicama: tako se mogu homogenizovati veće količine uzorka.

Čuvanje uzorka

Neka merenja tj. neki parametri se moraju meriti na licu mesta, kao npr. T, pH ili vlažnost.

Vlažnost uzorka je važno meriti jer smanjenje ili povećanje vlažnosti utiče na odvag u a time i na rezultat a teško je vlažnost držati konstantnom. Merenje vlažnosti: uzorak se izmeri a zatim suši na 105 – 110 °C par sati pa se ponovo meri masa i definiše se gubitak adsorbovane vode. Nadalje se uzorci drže zatvoreni ili u eksikatoru ili se o tome ne vodi računa ali se pre sledećeg koraka uzorak ponovo osuši.

Pravilnim čuvanjem uzorka sprečavamo da se dese promene koje će promeniti sastav analita.

npr. isparavanje ili adsorpcija analita ili povećanje koncentracije analita ispiranjem sa zidova suda (npr. rastvaranje stakla pod uticajem kiselina)

Naročito su tragovi analita osetljivi na gubitke isparavanjem ili adsopcijom ili kontaminacijom.

Gubici su mogući usled hemijskih promena npr. fotohemijski procesi usled delovanja sunčeve svetlosti, oksidacija pod uticajem kiseonika iz vazduha.

Biološki uzorci: enzimska i bakterijska degradacija.

Mere konzervacije

- ✓ Za analite biomolekule: sterilizacija uzorka i suda za čuvanje, držanje na niskim temperaturama
- ✓ Izbor inertnih posuda (PVC, teflon, prohrom...), hermetičko zatvaranje, kontrola pH, po potrebi zatamnjene boce.
- ✓ Uzorci se mogu “zalivati” inertnim tečnostima i gasovima, držati pod vakuumom...

PRIPREMA UZORKA ZA ANALIZU

(prevođenje analita ili celog uzorka u rastvor)

Prevođenje analita u rastvor

Prevođenje analita ili celog uzorka iz čvrstog oblika u rastvor je važan deo pripreme uzorka za analizu.

Pod prevođenjem uzorka u pogodan rastvor podrazumevamo prosto **rastvaranje** u pogodnom rastvaraču, **ekstrakciju** pogodnim rastvaračem ili potpuno ili delimično **razaranje (digestiju)** uzorka i njegovo prevođenje u rastvoran oblik.

Kako će se odvijati prevođenje u rastvor zavisi od toga kakav je uzorak (organski ili neorganski) i da li će se uzorak analizirati na sastav atoma metala, na neorganske molekule ili pak na organske molekule.

Najlakše je raditi sa onim uzorcima koji se lako rastvaraju u nekom od rastvarača (voda za neorganske soli ili organski rastvarači kao što su metanol, etanol, hloroform, toluen,....)

Veoma često rastvaranje nije lako. Tada se pristupa **DIGESTIJI** - razlaganju kiselinama ili bazama na povišenoj temperaturi.

Digestija se najčešće izvodi u otvorenim posudama koje se zagrevaju na plotni. Metoda je jeftina i ne zahteva posebnu opremu.

Postoji opasnost od gubitka isparljivih komponenti što dovodi do greške u određivanju analita ukoliko su isparljive komponente deo analita

Prevođenje atoma metala iz čvrstog uzorka u rastvor

Kad je u pitanju analiza na sastav **elemenata**, njihova molekulska forma u uzorku nije važna tako da se na uzorak može delovati ekstremnim metodama (izlaganje koncentrovanim kiselinama, visokoj temperaturi...).

Sa druge strane, koncentracija atoma metala je često veoma niska, pogotovu u biološkim uzorcima, tako je posebno potrebno voditi računa o kontaminaciji: hemikalije koje se dodaju u postupku razaranja moraju biti vrlo čiste jer je njihov dodatak obično nekoliko desetina do stotina puta veći od mase uzorka, i male nečistoće mogu uneti veliku kontaminaciju.

Kod analize bioloških i organskih uzoraka na neorganski sastav, pre svega na sastav atoma metala, neophodna je predhodna oksidacija organske komponente do CO_2 i vode, pri čemu neorganska komponenta ostaje u sudu.

Razaranje organskog materijala

Suvo spaljivanje organskog materijala se vrši najčešće u porcelanskim, platinskim ili kvarcnim tiglovima, u pećima za žarenje, na temperaturama od 400 do 700 °C, uz prisustvo kiseonika iz vazduha kao oksidacionog sredstva. Ovim putem se iz uzorka uklanjaju organske komponente ostavljajući pepeo odn. neorganski ostatak koji se dalje može analizirati

C u uzorku se oksiduje do CO_2 , a H, S i N se uklanjaju kao H_2O , SO_2 i N_2 . Gasovi se mogu hvatati i meriti radi utvrđivanja njihovog sadržaja.

Ova metoda omogućava spaljivanje većih količina organskog materijala što je važno za analizu niskih koncentracija analita, na taj način se vrši koncentrovanje.

Ne dodaju se druge hemikalije kao kod drugih metoda, zato manja mogućnost kontaminacije.

Problem: neki elementi na tim temperaturama isparavaju (Hg, B, Pb, Zn, Cd, Ca, In, Te, As, Sb, Fe, Cr, Cu, Se, Sb, P, S, halogenidi...).

Problem: vezivanje (hemisorpcija) za zidove tigla.

Ukoliko materijal burno gori, uz puno dima, čađi ili ako prska, zagrevanje se mora sprovoditi postepeno da bi se izbegli gubici analita.

Isparljivost elementa zavisi od oksidacionog stanja i od hemijske veze.

Da bi se izbegli gubici kod nekih isparljivih elemenata dodaju se supstance koje povećavaju efikasnost spaljivanja, npr. magnezijum nitrat: minimizira gubitke za Cu, Ag, Pb, Zn, Co, As, Sb, Cr, Mo, Sr, Fe...

Ostatak spaljivanja se lako rastvara u toploj HNO_3

Ako deo uzorka ipak neće da se rastvori, dalja procedura je kao za razaranje neorganskih materijala.

Niskotemperatursko spaljivanje, temperatura se održava ispod 100 stepeni tako da su gubici minimalni.

Uzorak se oksiduje kiseoničnim radikalima koji se proizvode radiofrekventnim pražnjenjem.

Gubici usled isparavanja se mogu izbeći spaljivanjem u zatvorenom sistemu.

Mokra digestija organskog materijala se vrši smešom **azotne i sumporne** kiseline (4 do 5 : 1), uz zagrevanje. Azotna kiselina oksidiše najveći deo organskog materijala ali ne može da ga oskidiuje do kraja. Kad azotna kiselina ispari ostaje samo sumporna, temperatura rastvora se diže i oksidacija se završava. Kad ostane samo sumporna kiselina izdvajaju se guste bele pare. Ako zaostane ugljenisane organike postupak se ponavlja dok se ne dobije bistar rastvor.

Mokra digestija se vrši u digestoru.

Smesa **azotne, perhlorne i sumporne kiselinu** u odnosu 3:1:1 je još efikasnija a uz to su gubici isparljivih elemenata manji.

Perhlorna kiselina eksplozivna kad je sama u dodiru sa organskim materijalom ili kad se uparava do suva, jer je ekstremno jako oksidaciono sredstvo za organiku.

Sa perhlornom kiselinom se mora raditi uz veliki oprez, početnicima se ne savetuje da rade sa njom u kombinaciji sa organikom: nikad je ne izlagati direktno organskom ili biološkom materijalu. Najveći deo predhodno mora biti oksidisan azotnom.

Azotna kiselina pogodna za digestiju jer ne gradi nerastvorne soli kao npr. hlorovodonična ili sumporna kiselina. Kao oksidaciono sredstvo dodaje se često vodonik peroksid

Prednost suvog spaljivanja je u tome što se ne dodaje velika količina drugih hemikalija, što smanjuje kontaminaciju, mana je visoka potrebna temperatura što povećava gubike isparljivih elemenata.

Mana mokre digestije je dodatak velikih količina kiselina u odnosu na uzorak. P.a. kiseline su vrlo čiste a nisu skupe.

Razaranje neorganskog materijala

Mokra digestija neorganskih materijala, uzorak se razara kombinacijom kiselina, uz zagrevanje.

Oksidacija nije na prvom mestu, ipak, dodaju se oksidaciona sredstva (azotna, perhlorna, vodonikperoksid) da razore eventualno prisutnu organiku. Zbog intenzivnog isparavanja korozivnih supstanci (kiselina), postupak se sprovodi u digestoru

Postupak se ponavlja više puta, svaki put skoro do potpunog uparavanja do suva, sve dok ostatak ne postane potpuno rastvorljiv u razblaženoj HCl ili azotnoj kiselini.

Voda (po potrebi vruća) rastvara rastvorljive soli.

Rastvor (% w/w)	Za šta se koristi /osobine
HCl (37 %)	rastvara metale koji se lakše redukuju od H_2 ($E^0 < 0$) - rastvara nerastvorne karbonate, sulfide, fosfate, fluoride, sulfate, i mnoge okside
HNO ₃ (70 %)	jako oksidujuće sredstvo - rastvara većinu metala osim Al i Cr - razlaže organske i biološke uzorke (wet ashing)
H ₂ SO ₄ (98 %)	rastvara mnoge metale i rude - razlaže organske supstance oksidacijom i dehidratacijom
HF (50 %)	razlaže silikate formirajući isparljiv SiF₄ - teflonske posude kad se radi sa HF
HClO ₄ (70 %)	vrući i koncentrovani rastvori su jako oksidujuće sredstvo - rastvara mnoge metale i rude - razlaže organske supstance (te smeše su obično eksplozivne pa su potrebne mere opreza)
HCl : HNO ₃ (3:1, v/v)	“carska voda” (aqua regia) -rastvara Au i Pt
NaOH	rastvara Al i amfoterne okside Sn, Pb, Zn, Cr

Kombinacija kiselina, azotna, hlorovodonična ili fluorodonična u kombinaciji za oksidacionim osobinama azotne, perhlorne ili sumporne.

Carska voda $\text{HCl}:\text{HNO}_3$ (3:1, v/v) rastvara plemenite metale ali ne i silikate, alumosilikate...

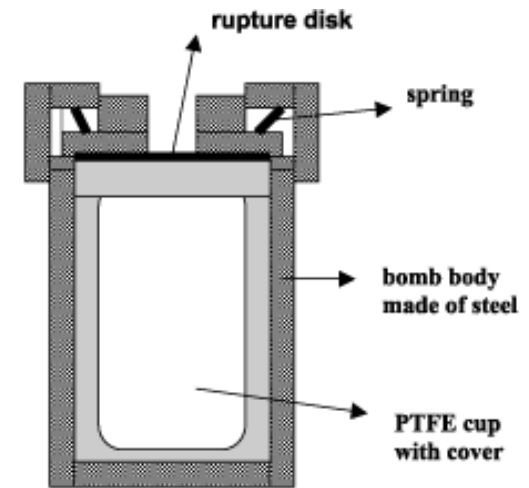
Dodaci kiselina ne menjaju sastav metala jer su p.a. kiseline u velikoj meri čiste. Ipak, zbog velikih količina dodatih kiselina u odnosu na količinu uzorka moguće su kontaminacije u odnosu na neke elemente.

Neki elementi isparavaju u otvorenoj digestiji, mada temperatura nije previsoka (Hg, Se...)

Mokru digestiju pogodno izvoditi u sudovima sa visokim grlom.

Digestija u hermetički zatvorenim sudovima: sprečavaju se gubici usled isparavanja, sudovi se otvaraju nakon hlađenja na sobnu temperaturu.

Teflonski sud se umetne u otvor u metalnom bloku koji odgovara njegovim dimenzijama: drugačije sudovi ne bi izdržali visoki pritisak: pritisak raste jer male zapremine tečnosti pri isparavanju daju velike zapremine gasa. Toplota se generiše uz pomoć električnih grejača a do uzorka se prenosi preko metalnog bloka.



Digestija pod povišenim pritiskom dozvoljava mnogo višu temperaturu jer je tačka ključanja kiselina viša na višim pritiscima.

Viša temperatura i pritisak, efikasnija (brža) digestija

Mikrotalasna (MT) digestija

Analiza bioloških uzoraka i uzoraka iz životne sredine.

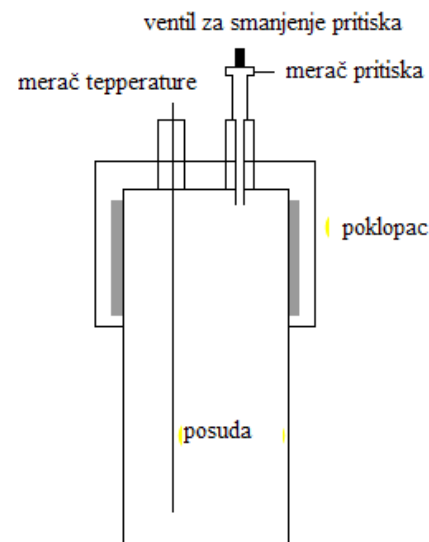
Mnoge digestije se izvode i u zatvorenim posudama uz pomoć MT zračenja kao izvora zagrevanja rastvora

Posude za MT digestiju su od teflona (ili neki drugi fluoro-polimer)

Materijal posude:

- termički i hemijski stabilan
- propusan za MT zračenje
- stabilan na visokim p

Posuda se stavlja u MT peć uz kontrolu T i p



Mikrotalasno zračenje prenosi energiju na tečnosti ili čvrste supstance drugačije od klasičnog grejanja (konvekcija i kondukcija toplote sa zida suda koji se greje): preko električnog polja mikrotalasnog zračenja energija se prenosi direktno na molekule.

Prednosti MT digestije:

- rad na visokim T i p (200–300 °C) (40–100 bar)
- što ima za posledicu krće vreme analize (do 30 minuta)
- nema gubitka isparljivih komponenata jer se radi u zatvorenim posudama

Nedostatci MT digestije:

- rad na visokim T i p, manja bezbednost metode
- nemogućnost dodatka reagensa
- analiza male količine uzorka (1g ili manje)

Mikrotalasna digestija se vrši različitim kombinacijama kiselina, zavisno od uzorka: kiseline se za razliku od otvorene digestije dodaju samo jednom u određenoj zapremini koja zavisi od zapremine posude: od dodate zapremine zavisiće i maksimalni pritisak.

Mikrotalasna digestija traje obično 10-15 minuta, zatim se sačeka da temperatura padne na sobnu pa se onda otvara posuda.

Prednost brzina i manja potrošnja kiselina što daje manju kontaminaciju.

Najčešće se koristi azotna kiselina u kombinaciji sa vodonik peroksidom ili azotnom, hlorovodoničnom, perhlornom, fluorovodoničnom ili sumpornom kiselinom

Npr: 500 mg sprašenog uzorka, 5 ml azotne i 1 ml sumorne kiseline

Mikrotalasna digestija u otvorenom sudu

Mikrotalasnim zračenjem se uzorak zagreva mnogo efikasnije: brže i uz manje gubitke energije: to je prednost mikrotalasne u odnosu na klasičnu mokru digestiju u otvorenom sudu.

Mikrotalasna digestija pod povišenim pritiskom

Slično predhodnoj digestiji u zatvorenom sistemu, koriste se teflonske posude koje se mogu hermetički zatvoriti i koje se stavljaju u čelične čaure ili metalne blokove kako bi mogle da izdrže visoke pritiske.

Pritisak i temperatura se kontrolišu tokom procesa digestije.

Ako su posude za digestiju teflonske, temperatura ide do 200 stepeni (pritisak do 15 atmosfera) a ako su od kvarca onda mogu da idu znatno više (pritisak i do 150 atmosfera).

Prevođenje u rastvor stapanjem

Neki mineralni uzorci se ne mogu potpuno rastvoriti pri otvorenoj digestiji kiselinama. Takvi uzorci se prevode u rastvor mešanjem sa velikim količinama soli alkalnih metala (fluks).

Fino usitnjen uzorak se dobro pomeša sa smešom za stapanje koja se dodaje tako da je bude 10-20 puta više od uzorka, smesa se stavi u Pt, grafitni, Ni ili Zr tigl i greje u peći za žarenje ili na plamenu, na temperaturi 300-1000 °C dok se ne dobije bistar rastop. Nakon toga rastop se ohladi u rastvori u kiselini.

Najčeće se dodaju hidroksidi i soli, na taj način se unosi 1-2 elementa metala ali ove supstance ni izbliza nisu tako čiste kao kiseline.

Problem kontaminacije nekim elementima.

Visoka ukupna koncentracija suve materije u finalnim rastvorima može biti problem u nekim metodama.

Uobičajeni fluksevi za razgradnju neorganskih uzoraka

fluks	tept. topljenja (°C)	retorta	uzorci
Na_2CO_3	851	Pt	silikati, oksidi, fosfati, sulfidi
$\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (Li-borat)	930	Pt	
LiBO_2 (Li-metaborat)	845	Pt, grafit	alumosilikati, karbonati
NaOH	318	Pt, grafit	
KOH	380	Au, Ag	silikati, silikonski kabidi
Na_2O_2 (Na -peroksid)	-	Ni	silikati, hromirani čelik, Pt rude
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_7$ (K-pirosulfat)	300	Pt, porcelan	oksidi
B_2O_3 (B-trioksid)	577	Pt	silikati, oksidi

NaOH , KOH : rastvoriti u 12M HCl .

Na_2CO_3 ., rastvoriti u HCl .

Litijum metaborat, litijum tetraborat: rastvoriti u HF .

Kalijum pirosulfat: rastvara gotovo sve, rastvoriti u H_2SO_4 .

Nepotpuna digestija uzorka za analizu metala

Za neke svrhe nije neophodno potpuno razoriti uzorak tj. isterati sav analit iz uzorka. Npr. kad se rade elementi dostupni biljkama ili elementi koji se mogu izdvojiti u organima za varenje tu je važnije ekstrahovati tražene metale pod uslovima koji su realni: rezultat koji se dobija uz dejstvo jakih kiselina na visokim temperaturama ovde nije relevantan.

Uzorak se uzastopno tretira različitim kombinacijama kiselina različite jačine i tako dobijeni ekstrakti se razdvajaju i posebno analiziraju.

Uzorak se usitni mlevenjem, kiseline deluju uz pomog ultrazvuka ili stalnog mešanja, da se bolje razdvoje rastvorljivi od nerastvorljivih delova uzorka. Pojedinačna ekstrakcija može trajati više časova.

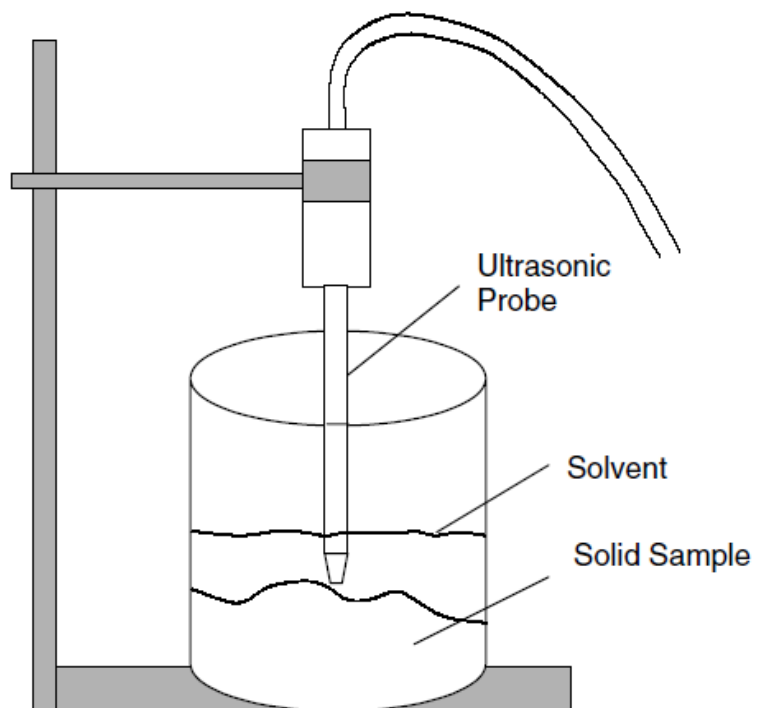


Figure 3.3. Schematic diagram of an ultrasonic extraction device.



Ultrazvučno kupatilo ili sto za mućkanje: potspešuju proces ekstrakcije

Sekvencijalna ekstrakcija metala iz čvrstih uzoraka

Primer: - ekstrakcije iz zemljišta i sedimenata

- carska voda za pseudo ukupan sadržaj različitih metala, rezultat relevantan za primenu taloga, sedimenata, mulja... kao zemljišta za gajenje biljaka

- sirćetna kiselina ili EDTA za ispitivanje mobilnosti u upotrebljivosti tragova metala za ishranu biljaka

- rastvor kalcijum hlorida ili nitrata, sadržaj tako ekstrahovanih elemenata relevantan za plodnost zemljišta

- ekstrakcija amonijum hloridom pruža mogućnost da se razlikuje sadržaj tragova elemenata koji potiče od čovekovog uticaja

Koncentrovanje i separacija analita

- **Prekoncentrovanje**, povećavanje koncentracije analita kako bi se prilagodila osetljivosti metode: smanjuje se količina rastvarača u kome je data količina analita rastvorena.
- **Uparavanje**, povećanje koncentracije isparavanjem rastvarača: obično se na taj način postiže povećanje koncentracije za 10 do 20 puta. Uparavanje pod sniženim pritiskom znatno ubrzava proces i snižava temperaturu ključanja. Rastvor ne sme da ključa. Problem isparljivosti analita.
- **Ekstrakcija** pogodnim rastvaračem koji se posle delimično ili potpuno može ukloniti uparavanjem. Problem ekstrakcije katjona metala iz vodenih rastvora nepolarnim rastvaračima. Helatni ligandi sa katjonima formiraju hidrofobni kompleks koji je onda rastvorljiviji u nepolarnom rastvaraču.

Koncentrovanje na koloni: analit i deo rastvorene supstance se veže za kolonu odakle se posle prevede u rastvor pomoću manje količine drugog rastvarača. Kiseli vodeni rastvori katjona metala izmenjuju pojedine katjone sa jonoizmenjivačkim kolonama: katjoni se sa kolone spiraju manjim zapreminama razblažene kiseline, najčešće HCl, definisane koncentracije.

Ekstrakcija i koncentrovanje na koloni su istovremeno i separacione metode odnosno deo rastvorene supstance se može odvojiti od analita na taj način.

Rastvorene komponente se mogu razdvojiti pre analize i različitim vrstama hromatografije.

Potrebu za separacijom analita od ostatka uzorka obično uzrokuje nedovoljna selektivnost metode: što je selektivnost manja potreba za separacijom je veća tj. sve veći broj komponenti smeta određivanju koncentracije analita .

Hemijska vrsta koja smeta se može onemogućiti i hemijskim putem: dodatkom reagenska koji će je oboriti u talog nakon čega je obično potrebno centrifugiranje, filtriranje... Zbog potrebnog vremena i truda nepopularna metoda.

Drugi način upotrebe hemijske reakcije je dodavanjem maskirajućeg agensa koji se hemijski veže sa komponentom koja smeta i tako je imobilize.

Teorija efikasnosti razdvajanje analita od inerferirajućih komponenata

Cilj analitičkog razdvajanja je efikasno razdvajanje analita ili inerferenata od matriksa.

Razdvajanje podrazumeva postojanje bar jedne fizičke ili hemijske osobine analita koja se razlikuje od iste osobine interferenta .

Efiksano razdvajanja interferenta od analita može da rezultuje gubitkom analita. Efiksano razdvajanje analita od interferenata se “meri” veličinom koja se naziva FAKTOR RAZDVAJANJA, S

$C_{A/I}$ – koncentracija analita /interferenta koja je preostala
posle razdvajanja

$(C_{A/I})_0$ – početna koncentracija analita /interferenta

$$S_{I,A} = \frac{\frac{C_I}{(C_I)_0}}{\frac{C_A}{(C_A)_0}} = \frac{R_I}{R_A}$$

$S_{I,A} = 0$ – IDEALNO RAZDVAJANJE

$S_{I,A} = 10^{-7}$ (za kvantitativnu analizu kada je analit u tragovima a interferent u velikom višku)

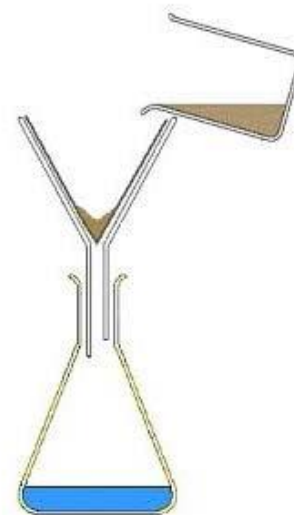
$S_{I,A} = 10^{-3}$ (kada su analit i interferent prisutni u približno istim količinama)

Metode razdvajanja analita od inerferirajućih komponenata

Osnova razdvajanja	Tehnika razdvajanja
veličina čestica	filtriranje Dijaliza
masa i gustina	centrifugiranje
formiranje kompleksa	maskiranje
promena fizičkog stanja	destilacija sublimacija rekristalizacija
promena hemijskog stanja	taloženje izmena jona elektrodepozicija
raspodela između faza	ekstrakcija hromatografija

Filtriranje

- filtriranjem se komponente smeše razdvajaju na bazi razlike u veličini čestica
- najčešće se koristi da se razdvoji tečnost od čvrstog



Kristalizacija

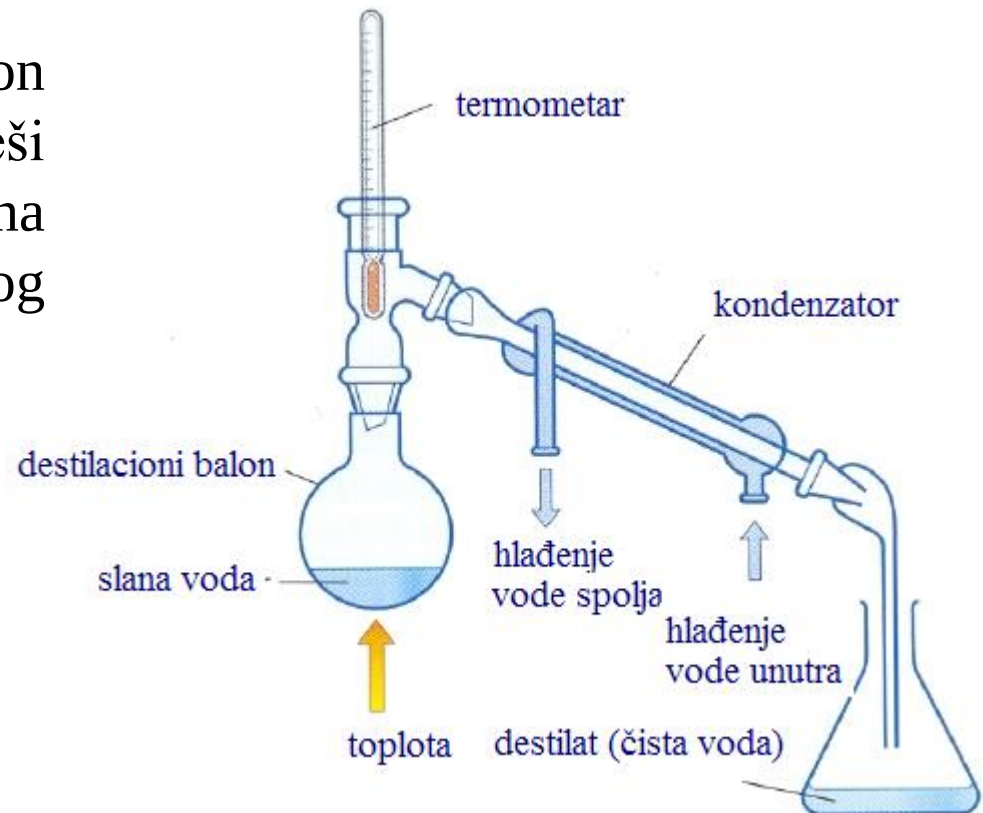
- difuziona operacija kojom se iz rastvora izdvajaju čiste kristalne supstance
- bazira se na razlici rastvorljivosti
- ima za cilj izdvajanje čvrstog rastvorka iz rastvora kao i prečišćavanje supstance njenim rastvaranjem, zatim iskristalisavanjem
- većina supstanci ima veću rastvorljivost u toploj nego u hladnoj vodi
- prečišćena supstanca kristališe hlađenjem



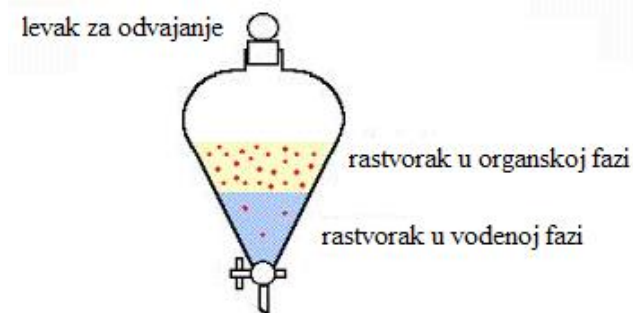
Destilacija

Destilacija je procedura razdvajanja komponenti na bazi njihove različite isparljivosti

Raulov zakon: parcijalni napon pare jedne komponente u smeši jednak je proizvodu napona pare čiste komponente i njenog molskog udela $p_A = x_A \times p_{A0}$



Ekstrakcije



Metode razdvajanja komponenata iz smeše u cilju prečišćavanja, a radi lakše identifikacije ili određivanja sadržaja.

Može biti izuzetno komplikovana zbog velike sličnosti komponenata i složenosti sastava uzorka.

Zasnivaju na razlici u rastvorljivosti. Jedna supstanca rastvara se u dva međusobno nemešljiva rastvarača. Da bi ekstrakcija bila moguća, potrebno je da postoji znatna razlika u rastvorljivosti u ta dva rastvarača, na konstantnoj temperaturi .

Nernst-ov koeficijent raspodele definiše se kao: $K = c_1/c_2$
- što je K bliže vrednosti 1 (100%) ekstrakcija će biti uspešnija

Metode ekstrakcije

Čvrsto-tečna ekstrakcija

Ubrzana ekstrakcija rastvaračem
(*accelerated solvent extraction, ASE*)

Ekstrakcija superkritičnom tečnošću
(*supercritical fluid extraction, SFE*)

Ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima
(*microwave-assisted extraction, MAE*)

Ekstrakcija iz čvrste faze
(*solid-phase extraction, SPE*)

Čvrsto-tečna ekstrakcija

Najjednostavniji tip ekstrakcije.

Uzorak se stavlja u posudu i u nju se dodaje rastvarač da rastvori komponente.

Posuda se mućka izvesno vreme i nerastvorne supstance se odvoje filtriranjem ili centrifugiranjem.

Ubrzana ekstrakcija rastvaračem

(accelerated solvent extraction, ASE)

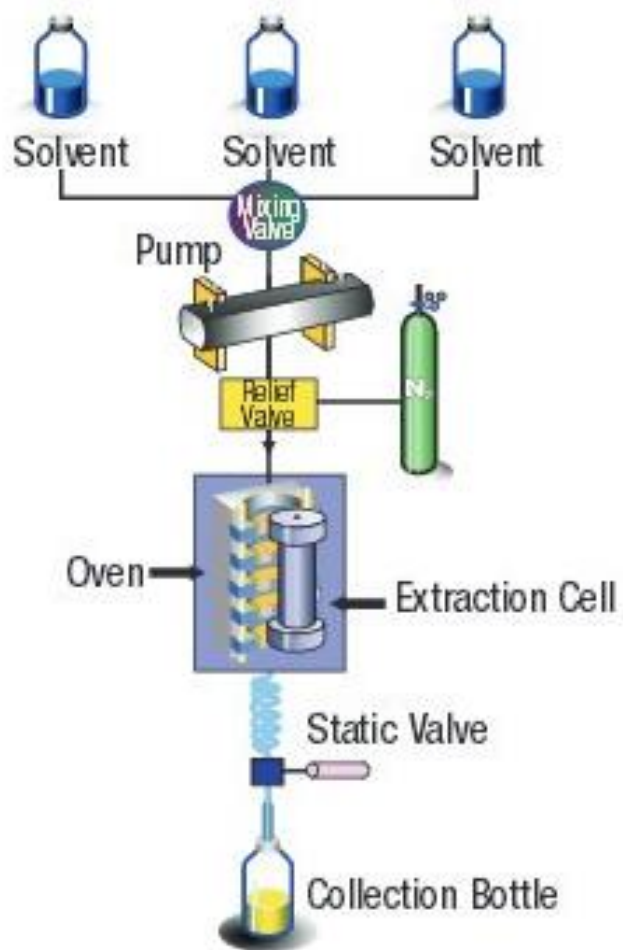
Organski rastvarač kojim se ekstrahuje analit se koristi na visokoj temperaturi i pritisku.

Prednosti:

- kraće vreme ekstrakcije (10-20 min vs. 18–24 h)
- korišćenje manje količine rastvarača (20 ml vs. 150–500 ml)

Metoda se koristi u analizi:

- organo-Cl jedinjenja
- poli Cl -bifenila
- organo-P pesticida iz zemljišta



Ekstrakcija superkritičnom tečnošću

(supercritical fluid extraction, SFE)

Ekstrakcija nepolarnih i umereno polarnih analita **iz čvrstih uzoraka** (iz okoline, hrane, polimernih uzoraka) .

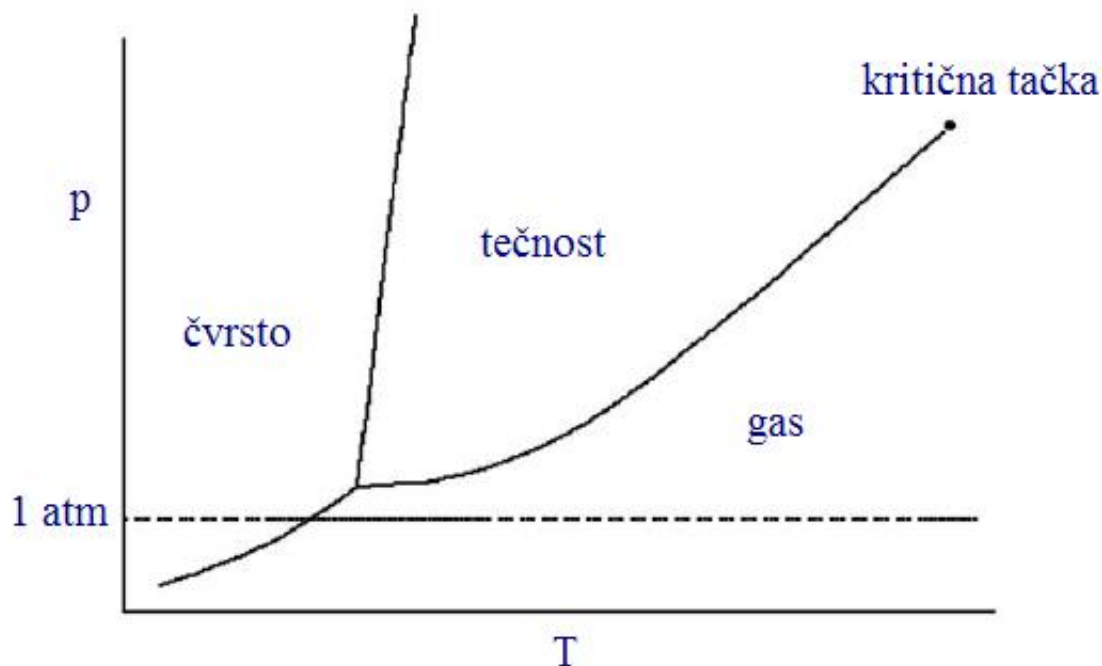
Metoda podrazumeva izdvajanje analita pomoću rastvarača, čije se vrednosti pritiska i temperature održavaju **IZNAD KRITIČNIH** (superkritični uslovi).

Fluidi u superkritičnom stanju imaju:

- znatno veću rastvorljivost
- znatno veći stepen selektivnosti od klasičnih tečnih rastvarača koji se koriste u ekstrakciji
- jako veliki koeficijent difuzije, čak oko 100 puta veći od onih kod običnih tečnosti
- nisku dinamičku viskoznost i gustinu

Za ekstrakciju se mogu koristiti gasovi
kao što su:

- propan
- butan
- freoni
- CO₂ i dr.



Gasovi se mogu prevesti u tečno stanje povećanjem pritiska (samo na temperaturama NIŽIM od kritične). Tada se gasovi ponašaju kao rastvarači .

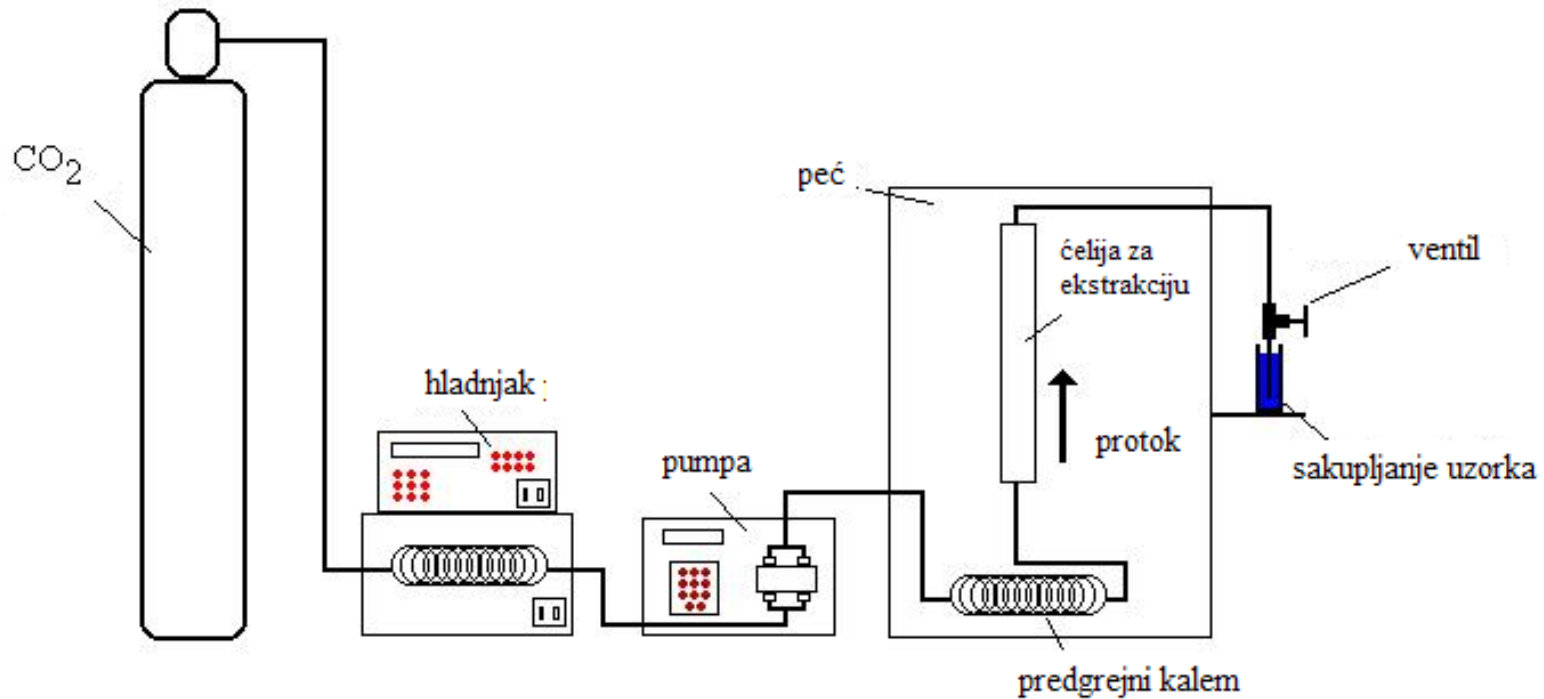
CO₂ se nalazi u tečnom stanju na pritiscima u intervalu $p = 5 - 73$ bara i $T = (-55) - (+ 31)^{\circ}\text{C}$.

Kada se CO₂ ohladi ispod kritične temperature ($T < 31,3^{\circ}\text{C}$) tečni ugljendioksid poseduje visoku moć rastvaranja, koja u maloj meri zavisi od pritiska.

Kada je CO₂ u superkritičnom stanju, tj. kada je na $T > 31,3^{\circ}\text{C}$ i $p > 73$ bar sposobnost rastvaranja CO₂ varira u širokim granicama sa promenom pritiska i temperature (promena gustine i dielektrične konstante) .

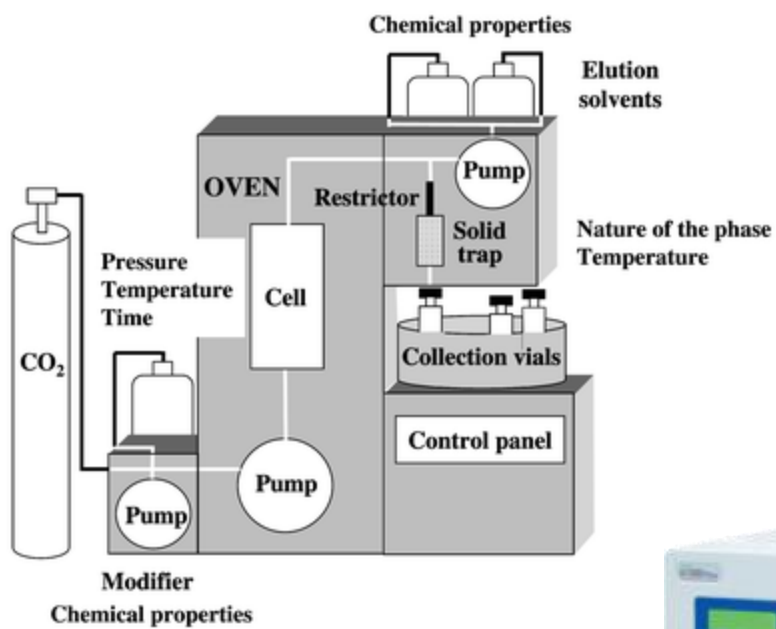
Na taj način se može, pogodnim izborom pritiska i temperature, ostvariti selektivna ekstrakcija prirodnih aktivnih supstanci, kao i frakciono razdvajanje ovih supstanci .

Šematski prikaz aparature za ekstrakciju superkritičnom tečnošću



Uzorak se stavlja u posebnu posudu i tretira superkritičnim gasom CO_2 . Ekstrahovani analit se potom skuplja u rastvaraču ili na sorbentu.

Pogodnost: veća difuzija i manja viskoznost superkritične tečnosti doprinose selektivnosti metode



Ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima

(microwave-assisted extraction, MAE)

MT tehnologija sa korišćenjem kiselih rastvora postaje metoda koja sve više zamenjuje tradicionalnu kiselu digestiju.

Uzorak se stavlja u posudu i tretira MT (1-300 GHz) koji ga zagrevaju. MT zračenje zagreva celu zapreminu uzorka simultano i raskida vodonične veze potpomažući rotaciju dipola. Ovim se povećava prodiranje rastvarača u matriks te na taj način pospešuje rastvaranje.

Prednosti MTE:

- kratko vreme ekstrakcije (10 min)
- mogućnost ekstrakcije više uzoraka istovremeno (do 14)
- potrošnja manje količine org. rastvarača
- metoda pogodna za analizu prehrambenih proizvoda i bioaktivnih komponenata

Postoje dve mogućnosti izvođnja ekstrakcije pomoću MT:

rastvarač velike dielektrične konstante može da apsorbuje MT

- analit i rastvarač se nalaze u zatvorenom sudu
- rastvarač se greje iznad tačke ključanja i izaziva brzu ekstrakciju pod umerenim pritiskom

rastvarač male dielektrične konstante koji ne apsorbuje MT

- analit i rastvarač se nalaze u otvorenom sudu
- analit sam apsorbuje MT zračenje i greje se
- zagrejan analit se prebacuje u hladnu okolnu tečnost (rastvarač koji ne apsorbuje MT)



Uređaj za MT ekstrakcije i hidrodestilaciju
s gravitacijom

Ekstrakcija čvrstom fazom

(Solid phase extraction, SPE)

U osnovi je čvrsto-tečna ekstrakcija. Brža procedura od klasične ekstrakcije tečno-tečno. Korisiti se manje tečnih organskih rastvarača.

Ovaj tip ekstrakcije omogućava izolovanje tečnog analita iz različitih uzoraka čak i iz veoma složenih matriksa kao što su voda, mleko, urin, krv, tkiva, ...

Metoda se danas primenjuje najčešće u pripremi uzoraka radi dalje analize pogodnom analitičkom metodom.

Ekstrakcija na čvrstoj fazi se primenjuje u:

- uklanjanje interferirajućih (ometajućih) supstanci i precišćavanja uzoraka
- koncentrovanje analita
- selektivno razdvajanje jona
- promena matriksa analita uz primenu drugog rastvarača (ako je to potrebno u daljim analizama)

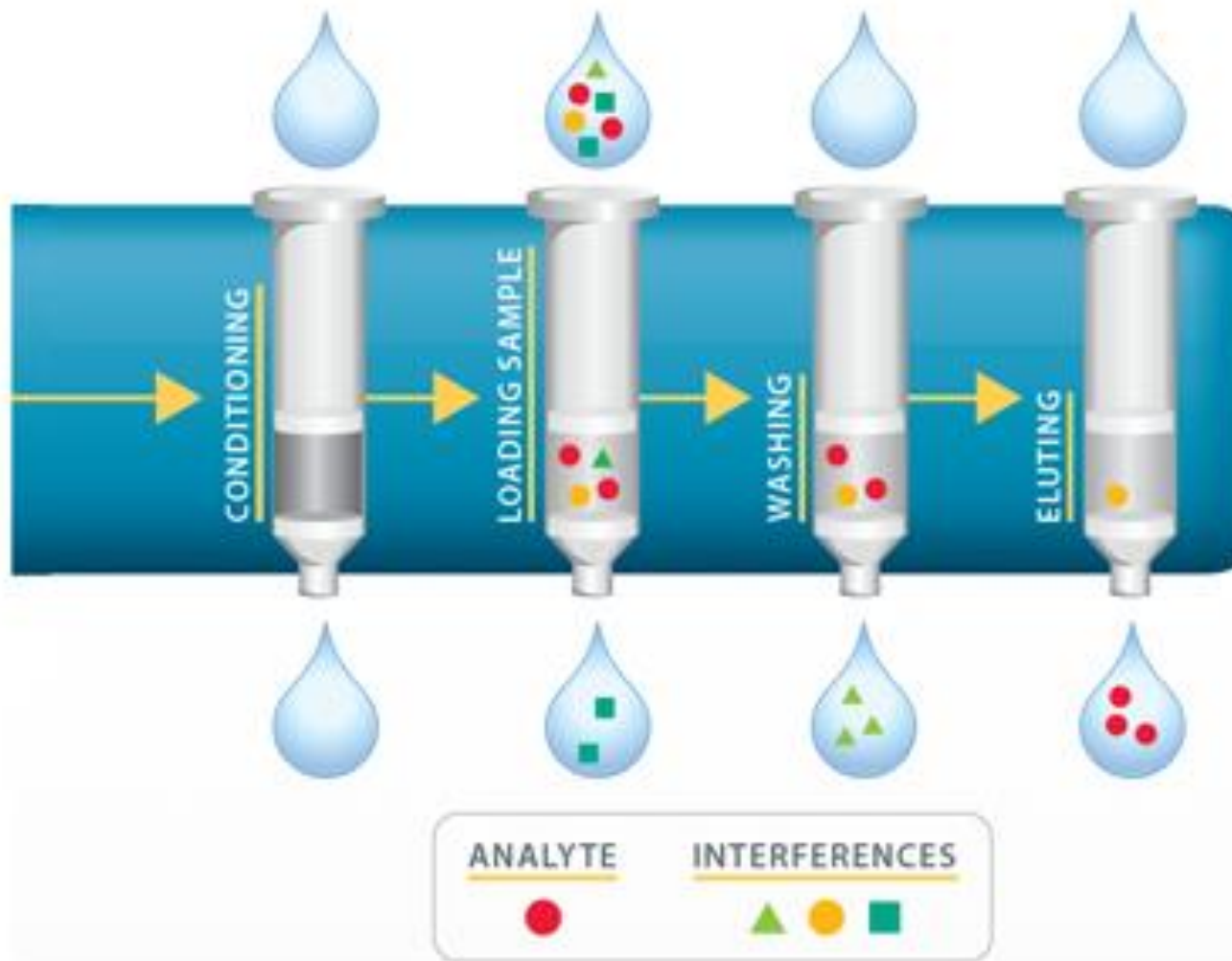
Ekstrakcija čvrstom fazom se izvodi prolaskom uzorka kroz kratku kolonu sa odgovarajućim sorbentom (čvrsta supstanca), korišćenjem pritiska ili vakuuma. Analit se zbog velikog afiniteta zadržava na čvrstom nosaču. Neželjene supstance eliminišu se ispiranjem. Supstanca od interesa se onda “skida” sa adsorbenta primenom odgovarajućeg rastvarača (ova procedura omogućava i koncentrisanje supstance, osim njene izolacije). Analit se obavezno rastvara u rastvaraču koji ima malu eluacionu moć (gledano u odnosu na čvrsti nosač).

kondicioniranje

dodavanje uzorka

ispiranje

eluiranje



Najčešći postupci analize **tečnih** uzoraka su:

- mikrodijaliza
- liofilizacija
- filtriranje
- centrifugiranje
- ekstrakcija tečnost-tečnost
(*liquid– liquid extraction, LLE*)

Mikrodijaliza:

- polupropustljiva membrana se stavlja između dve tečnosti
- analit prelazi iz jedne tečnosti u drugu
- metoda pogodna u razdvajanju proteina od bioloških uzoraka pre primene HPLC metode

Liofilizacija:

- tzv. tehnika sušenja
- koristi se u analizi: biljnog materijala, seruma, vakcina, antibiotika, vitamina
- metoda konzerviranja voća
- tečni uzorak se zamrzava a voda eliminiše sublimacijom pod vakumom
- metoda jako pogodna u analizi neisparljivih analita

Filtriranje:

- tečnost se propušta kroz filter papir ili membranu radi eliminisanja suspendovanih čvrstih materija

Centrifugiranje:

- postupak kojim se, pod uticajem centrifugalne sile, u vidu taloga odvaja čvrsta faza iz suspenzija, odnosno disperzna faza iz emulzije
- dispergovane čestice male mase koje se ne talože spontano, pod dejstvom gravitacione sile, mogu se taložiti ako na njih deluje sila koja je jača od gravitacione
- to se postiže u centrifugama
- preostala tečnost se dekantuje (odliva) i dalje obrađuj

Ekstrakcija tečnost-tečnost:

(liquid– liquid extraction, LLE)

-zasniva se na particiji, raspodeli, analizirane supstance iz jedne tečne faze u drugu tečnu fazu

-tečne faze međusobno se ne mešaju npr. voda- hidrofobni organski rastvarač, alkohol ili etar

- ukoliko se analit nalazi u matriksu koji može da utiče na njegovu analizu potrebno ga je ekstrahovati rastvaračem u kome se on dobro rastvara, a matriks se pritom slabo ili uošte ne rastvara u tom rastvaraču

