

2. predavanje

Karakterizacija materijala

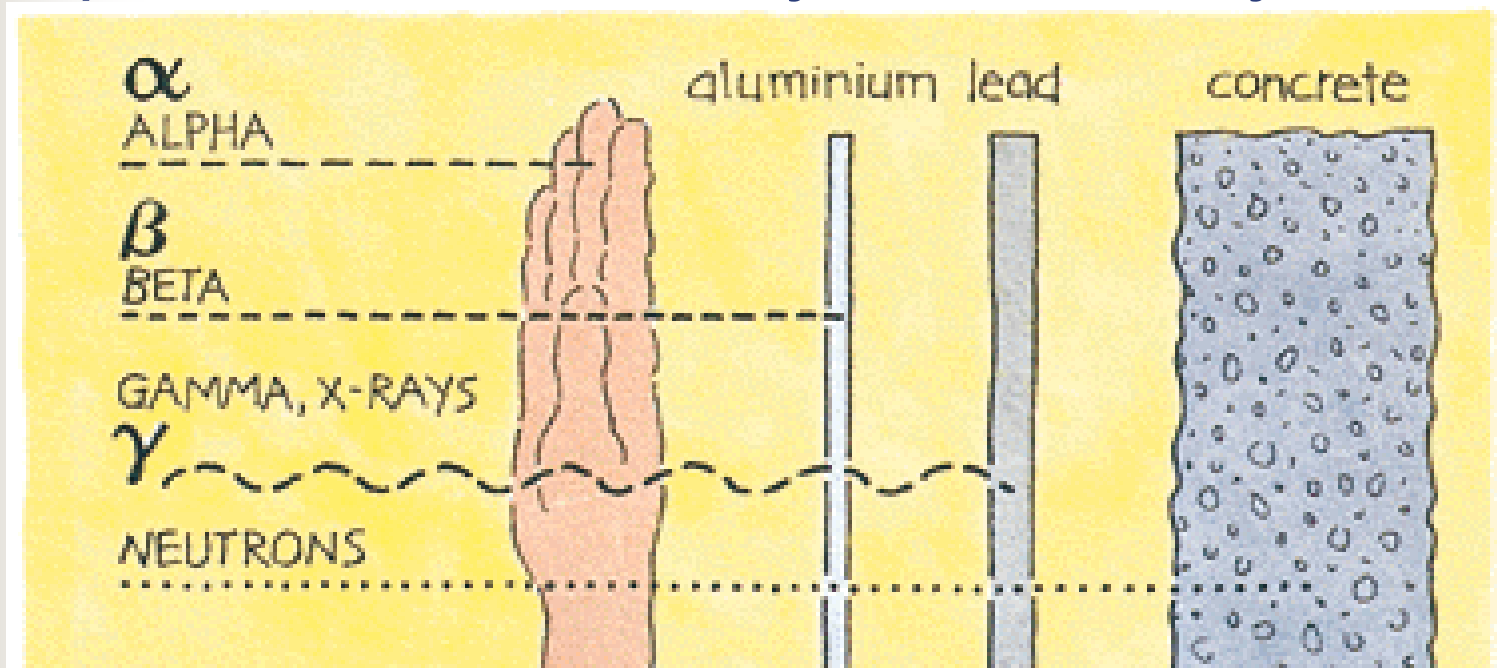
Prof. dr. sc. Danijela Ašperger




Spektrometrijske metode

SPEKTROMETRIJSKE METODE

Propusnost raznih materijala za zračenje čestica





Spektrometrije čine dio instrumentalnih metoda i postupaka kojima se mogu dobiti informacije o kemijskom sastavu i strukturi tvari na temelju separacije, detekcije i mjerenja energetske promjene što se događaju u atomnim jezgrama, atomnom elektronskom omotaču ili u molekulama kao posljedica interakcije s energijom (D. Maljković).

Ta energija može biti energija zračenja (elektrona, iona ili elektromagnetskog zračenja), toplinska, električna ili kemijska, a mi pratimo posljedicu te interakcije.

Interakcija s uzorkom može se odvijati na atomnoj ili molekularnoj razini pa govorimo o atomskim odnosno molekulskim spektrometrijama.

Naziv spektrometrija može nositi svaki postupak mjerenja spektra tj. mjerenje intenziteta zračenja ovisno o energiji, valnoj duljini ili frekvenciji zračenja.

prva polovica XVII st.	Marko Antonije de Dominis	znanstveno objasnio nastajanje duge lomom sunčeve svjetlosti na kapljicama vode
1666.	I. Newton	zaključio da se bijela svjetlost sastoji od svjetlosnih zraka koje se razlikuju po boji, a boja je u vezi s indeksom loma
1762.	A.S. Marggraf	prvi kemijski doprinos, zapaža da natrij i kalij različito boje plamen
1800.	W. Herschel	zaključuje da postoji nevidljivi dio spektra koji se nadovezuje na crveni dio vidljivog spektra (IR)
1801.	J.W. Ritter	otkriva UV zračenje na osnovi djelovanja svijetla na AgCl
-	J. Fraunhofer	razvoj optičkih elemenata i proučavanje spektra
1825.	W. H. F. Talbot	povezuje prisutnost nekog spoja s pojavom linije u spektru

Prema poimanju pojma spektrometrija podjela se može provesti na više načina:

Zračenja koje stupa u interakciju s uzorkom:

- EMZ
- elektroni
- protoni
- ioni
- neutroni

- atomske
- molekulske

Vrsta i posljedice interakcije:

- apsorpcija
- raspršivanje
(smanjenje intenziteta zračenja)
- emisija
(intenzitet zračenja)
- odbijanje, refleksija
(intenzitet zračenja)

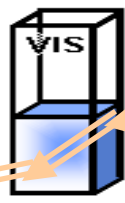
Zračenja nakon interakcije:

- EMZ (energija - valna duljina, jakost)
- zračenje elektrona (energija)
- iona (energija, omjer mase i naboja)



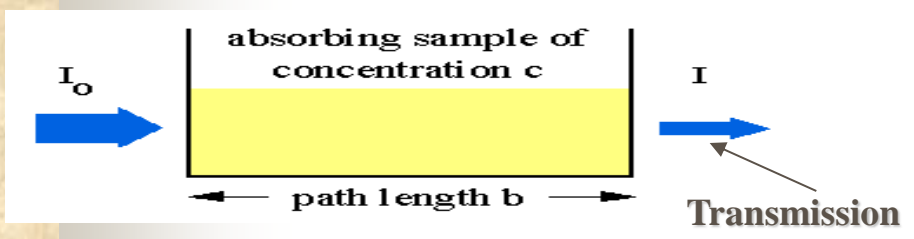
Specular Reflection

Diffuse Reflection

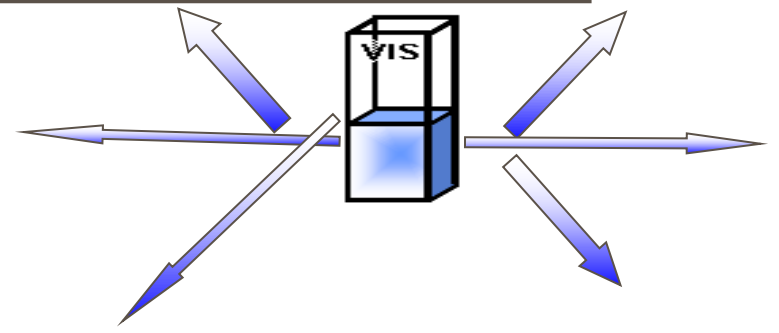


Refraction

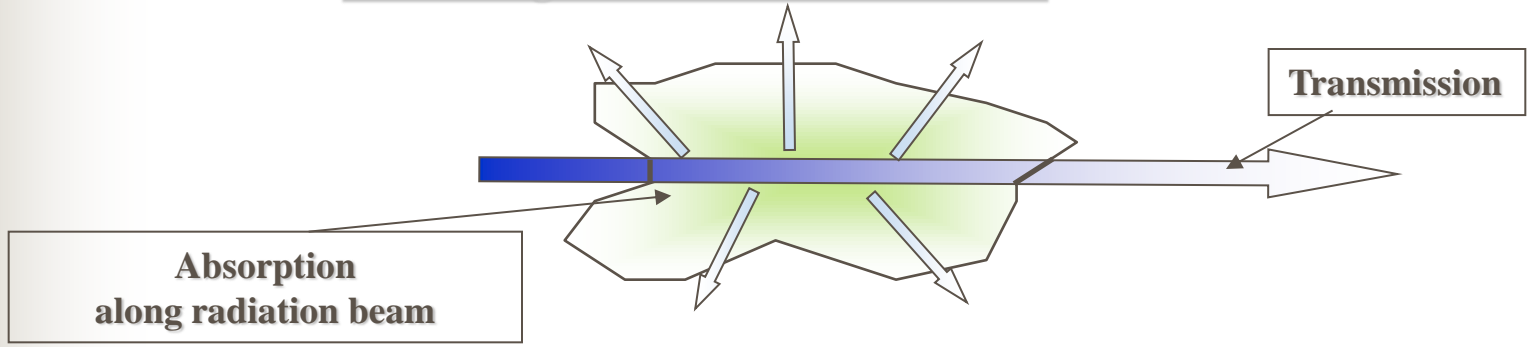
Absorption



Emission or Chemiluminescence



Scattering and Photoluminescence





Podjela ovisno o posljedici interakcije i obzirom na zračenje nakon interakcije a pritom energija pobude može biti toplinska, električna ili bilo koja druga:

- apsorpcija - EMZ, elektrona
- inducirana apsorpcija - EMZ
- emisija – EMZ, elektrona, iona
- raspršenje - EMZ, elektrona, iona
- polarizacija - EMZ
- odbijanje, refleksija – EMZ, elektrona



1 Atomske spektrometrije

1.1 Tehnike kod kojih mjerimo elektromagnetsko zračenje

1.1.1 Spektrometrije apsorpcije EMZ

1.1.1.1 Spektrometrija apsorpcije γ - i X-zračenja

1.1.1.2 Atomska apsorpcijska spektrometrija (UV-VID)

1.1.2 Spektrometrije emisije EMZ

1.1.2.1 Emisija γ - i X-zračenja

1.1.2.2 Emisija UV i VID zračenja, atomska fluorescentna spektrometrija

1.2 Tehnike kod kojih mjerimo zračenje elektrona

1.2.1 Spektrometrije apsorpcije elektrona (odbijeni ili prolazni elektroni)

1.2.2 Spektrometrije emisije elektrona

1.3. Tehnike kod kojih mjerimo zračenje iona

1.3.1 Masena spektrometrija s ionizacijom u plazmi (ICP/MS - omjer mase i naboja)



2 Molekulske spektrometrije

2.1 Tehnike kod kojih mjerimo elektromagnetsko zračenje

2.2.1 Spektrometrije apsorpcije i inducirane apsorpcije

2.2.1.1 Molekulska apsorpcija u UV i VID

2.2.1.2 IR spektrometrija

2.2.1.3 Spektrometrija apsorpcije mikrovalnog zračenja

2.2.1.4 Spektrometrija inducirane apsorpcije (NMR i ESR)

2.2.2 Spektrometrije emisije

2.2.2.1 Molekularna luminiscencija (fluorescencija i fosforescencija)

2.2.3 Spektrometrije raspršenja

2.2.3.1 Turbidimetrija i nefelometrija

2.2.3.2 Spektrometrija Ramanovog raspršenja

2.2.4 Spektrometrije polarizacije

2.2.4.1 Spektropolarimetrija

2.2. Tehnike kod kojih mjerimo zračenje iona

2.2.1 Spektrometrije raspršenih iona

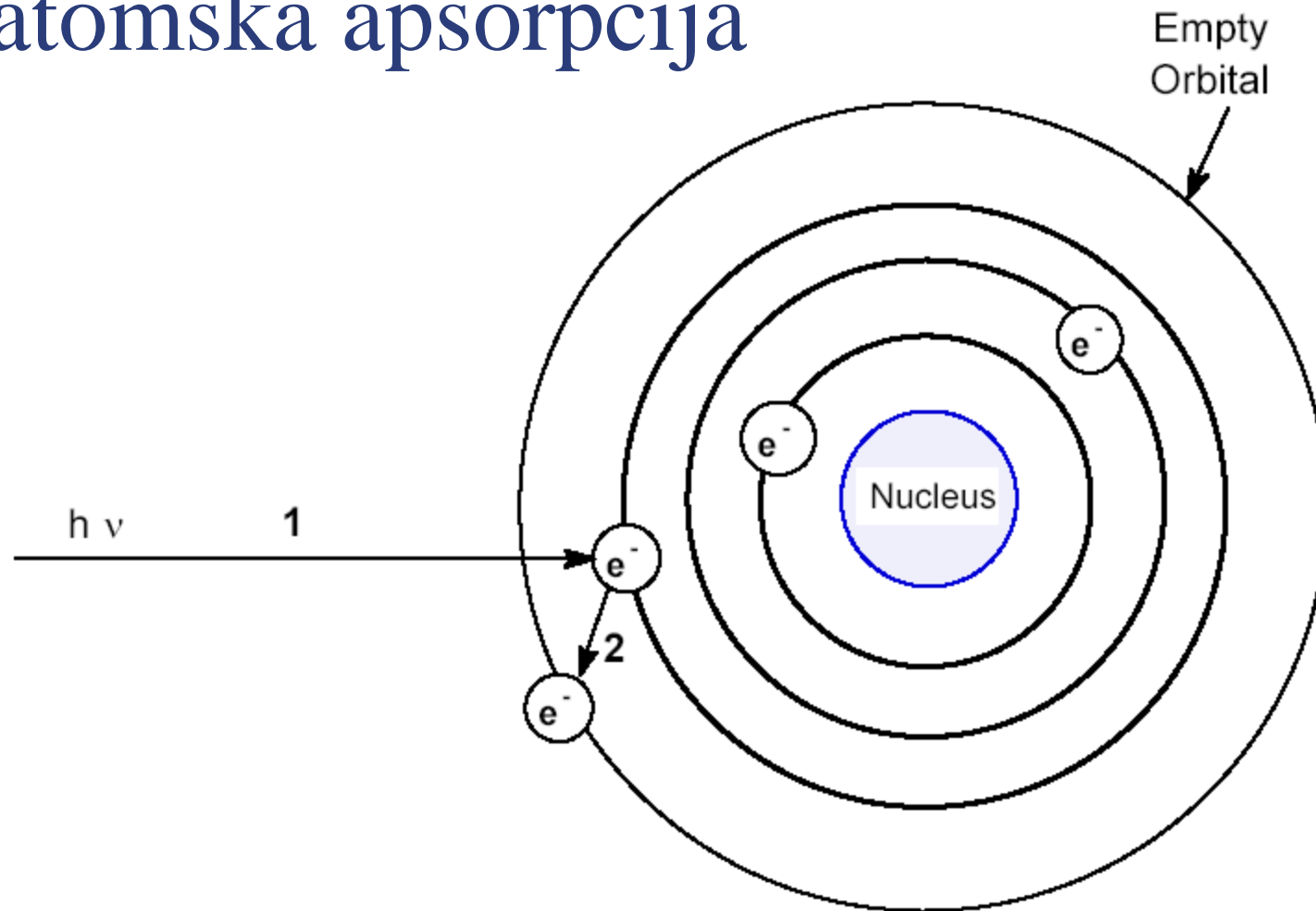
2.2.2 Masena spektrometrija (omjer mase i nabija)

2.3 Tehnike kod kojih mjerimo toplinsko zračenje

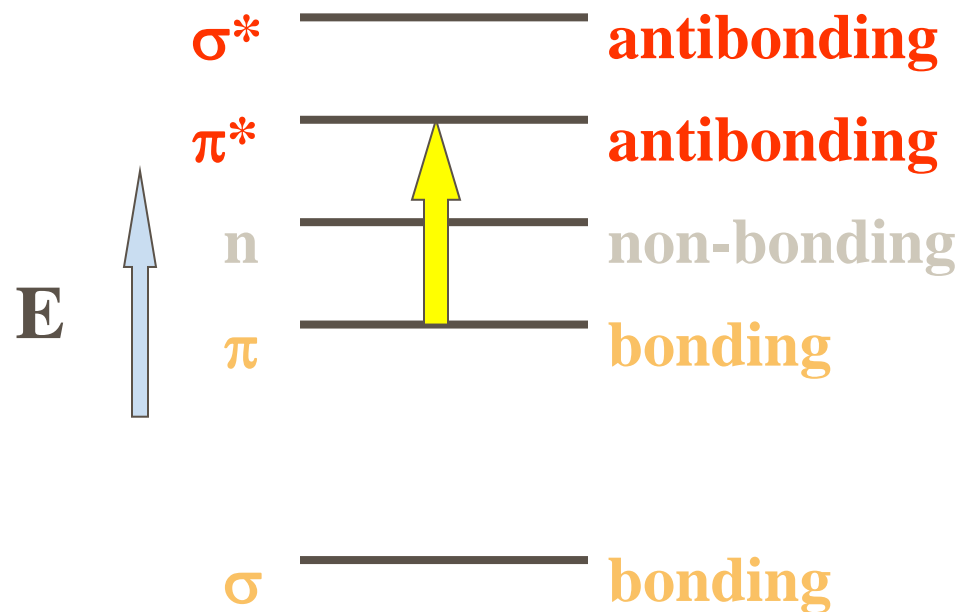
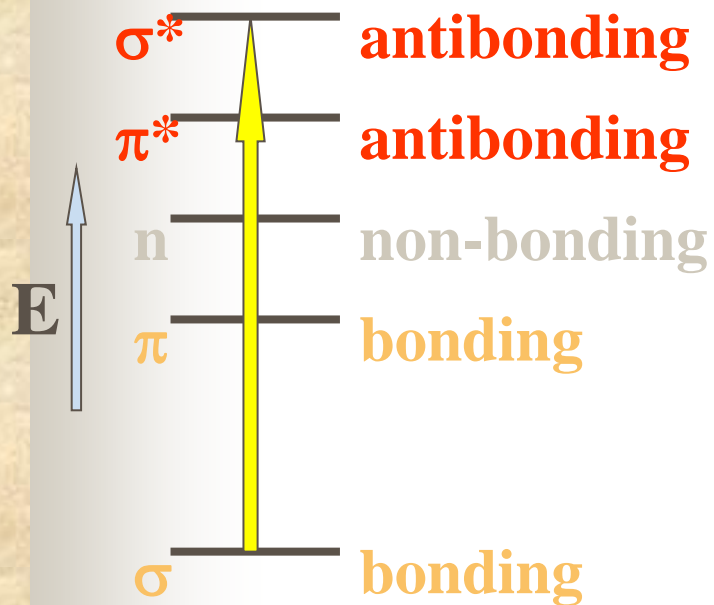
2.3.1 Fotoakustična spektrometrija

2.3.2 Spektrometrija toplinskom lećom

atomska apsorpcija



molekulska apsorpcija



Energy (kJ/mol)

1.2×10^8

1.2×10^7

12 000

310

150

0.12

0.001 2

Frequency (Hz)

10^{20}

10^{18}

10^{16}

10^{14}

10^{12}

10^8

Wavelength (m)

10^{-12}

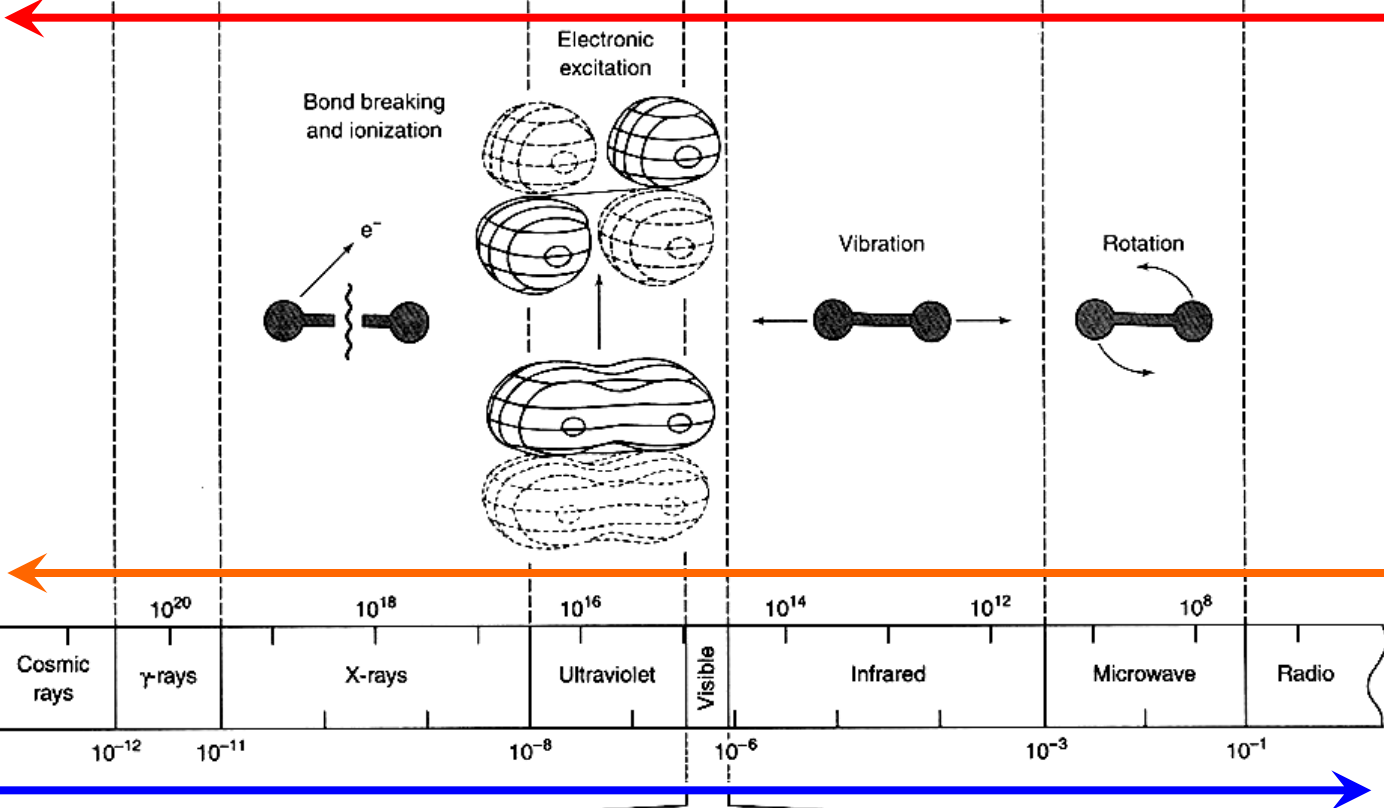
10^{-11}

10^{-8}

10^{-6}

10^{-3}

10^{-1}



Visible spectrum



Violet Blue Green Yellow Orange Red Purple

Wavelength (nm)

400

500

600

700

800

Type of Radiation	Frequency Range (Hz)	Wavelength Range	Type of Transition
<i>g-rays</i>	10^{20} - 10^{24}	$<10^{-12}$ m	<i>Nuclear</i>
<i>X-rays</i>	10^{17} - 10^{20}	1 nm-1 pm	<i>Inner shell electron</i>
<i>Ultraviolet (UV)</i>	10^{15} - 10^{17}	400 nm-1 nm	<i>Outer shell electron</i>
<i>Visible (VIS)</i>	4 - 7.5×10^{14}	750 nm-400 nm	<i>Outer shell electron</i>
<i>Near-infrared</i>	1×10^{14} - 4×10^{14}	2.5 μ m-750 nm	<i>Outer shell electron molecular vibrations</i>
<i>Infrared</i>	10^{13} - 10^{14}	25 μ m-2.5 μ m	<i>Molecular vibrations</i>
<i>Microwaves</i>	3×10^{11} - 10^{13}	1 mm-25 μ m	<i>Molecular rotations, electron spin flips*</i>
<i>Radio waves</i>	$<3 \times 10^{11}$	>1 mm	<i>Nuclear spin flips*</i>



Najveći broj spektrometrijskih tehnika prati elektromagnetsko zračenje nakon interakcije s uzorkom.

Elektromagnetsko zračenje (EMZ) je vrsta energije koja se prenosi kroz prostor najvećom mogućom brzinom, a njegova svojstva okarakterizirana su valnom i korpuskularnom prirodom.

Valni se karakter može opisati valnim parametrima: frekvencijom ν , brzinom širenja vala ν^* , valnom duljinom λ , i valnim brojem ν .

Korpuskularna svojstva opisuju elektromagnetsko zračenje kao česticu-foton. Količina energije koju prenosi foton, ovisi o frekvenciji zračenja, prikazana je izrazom:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$$

gdje je h Planckova konstanta i iznosi $6,62 \times 10^{-34}$ J s.



Apsorpcijske spektrometrije

Intenzitet elektromagnetskog zračenja I smanjuje se prolazom kroz otopinu koja može apsorbirati zračenje.

Smanjenje intenziteta ovisi o koncentraciji tvari (c) koja apsorbira zračenje, debljini sloja, tj. svjetlosnom putu kroz uzorak (b), molarnom apsorpcijskom koeficijentu (ε), specifičnom za svaku tvar, a mijenja se s valnom duljinom.

Odnos intenziteta prije i poslije prolaza kroz uzorak definirali su Lambert, Beer i Bourguer zakonom apsorpcije EMZ:

$$\log I_0/I = A = \varepsilon \cdot c \cdot b$$

Zakon apsorpcije zračenja



August Beer, njemački matematičar, kemičar i fizičar, rođen 1825 u Trieru – umro 1863 u Bonnu.

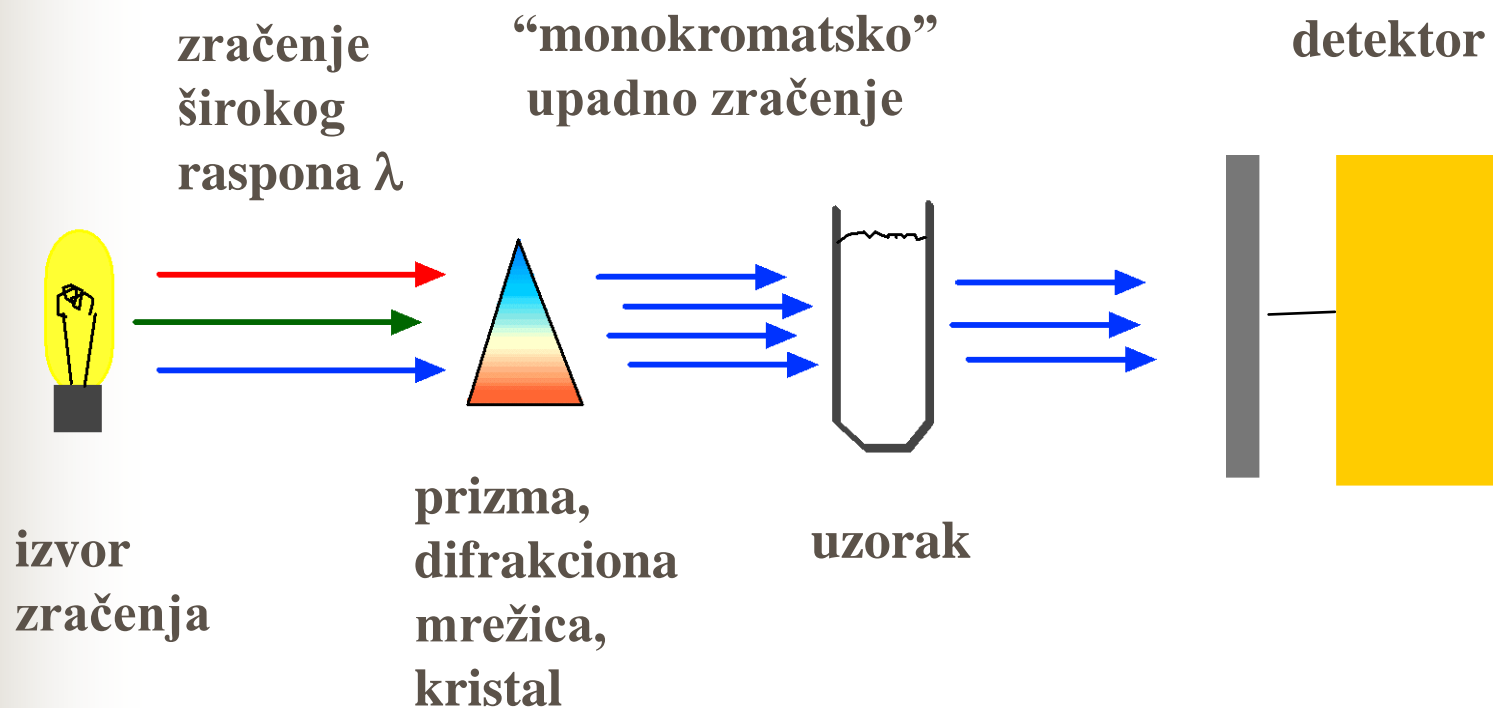


Johann Heinrich **Lambert**,
njemački matematičar,
astronom, fizičar i filozof,
rođen u Mülhausenu (1728) –
umro u Berlinu (1777)



Pierre **Bouguer**, francuski hidrograf i
matematičar, rođen u Le Croisic,
Francuska (1698) – umro u Parizu
(1758)

Apsorpcija **EMZ**





Optičke spektrometrije

Dio spektrometrija pri kojima se mjeri elektromagnetsko zračenja nakon interakcije energije i uzorka a koje obuhvaćaju ultraljubičasti (UV), vidljivi (VID) i infracrveni (IC) dio spektra.

U literaturi, pogotovo starijoj, nazivaju se i optičke spektrometrije.

Vežu ih u tom nazivu klasični optički dijelovi instrumenata (prizme, leće, optičke mrežice itd.).



IZVORI **EM** ZRAČENJA

kontinuirani - diskontinuirani

- **gama** – radioaktivni izotopi
- **X** – rendgenske cijevi
- **UV** – Hg-lučnica, vodikove i deuterijske lampe, šuplje katode
- **VID** – volframove lampe, šuplje katode, natrijeve lučnice, halogene lampe
- **mikro** – klistron
- **radio** – radiofrekventni predajnik



SELEKTORI VALNIH DULJINA I MONOKROMATORI

Sklop za odabir uskog raspona valnih duljina – ulazna pukotina, selektor valnih duljina, izlazna pukotina:

- **X** - kristalna rešetka
- **UV** - interferencijski filteri, optičke mrežice i prizme
- **VIS** - obojeni i interferencijski filteri, optičke mrežice i prizme
- **IR** - optičke mrežice

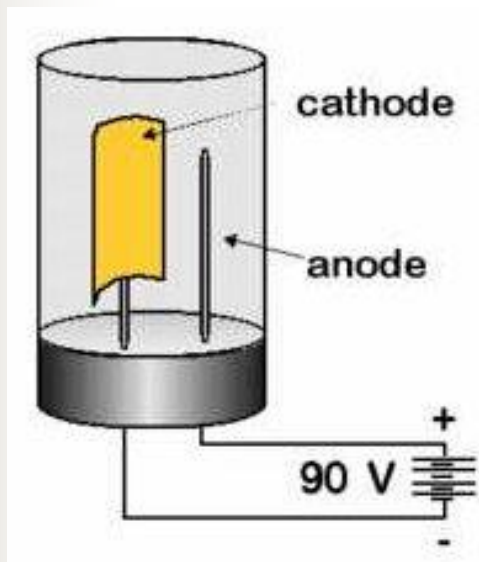


DETEKTORI **EM** ZRAČENJA

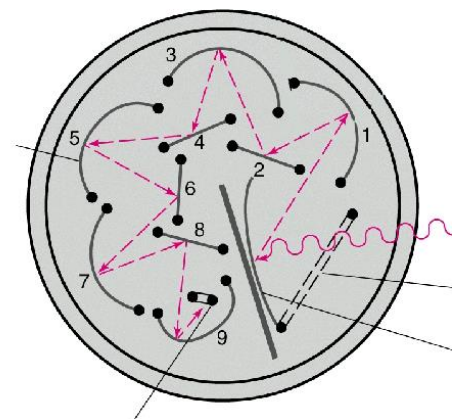
- **gama** – scintilacijski brojači
- **X, UV, VID** – foto-ćelije, foto-osjetljive cijevi, fotomultiplikatori, fotomultiplikatorske cijevi, fotodiode
- **IR** – toplinski detektori, bolometri
- **mikro** – mikrovalni prijemnik
- **radio** – radiofrekventni prijemnik

DETEKTORI

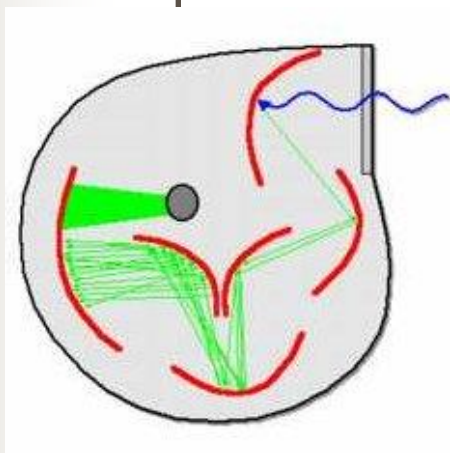
fotoosjetljive cijevi



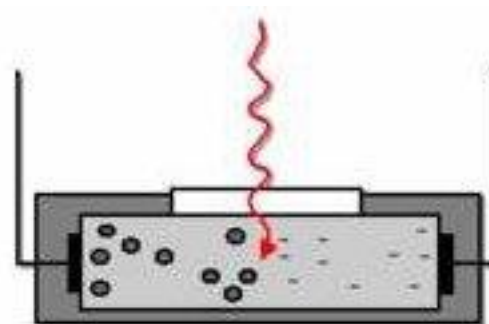
fotomultiplikatori



fotomultiplikatorske cijevi



fotodiode

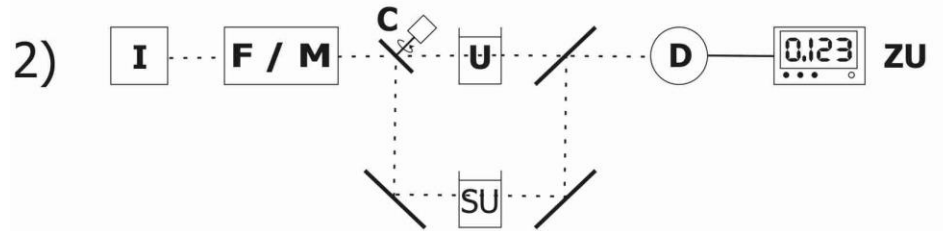


Apsorpcija UV-VID-IR

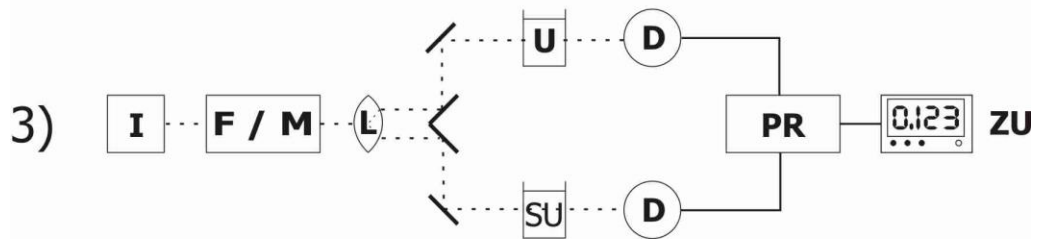
Jednozračni spektrometar



Dvozáračni spektrometar sa signalom dijeljenim u vremenu



Dvozáračni spektrometar sa signalom dijeljenim u prostoru



Jednozračni spektrometar s video kamerom



Jednozračni spektrometar s nizom dioda

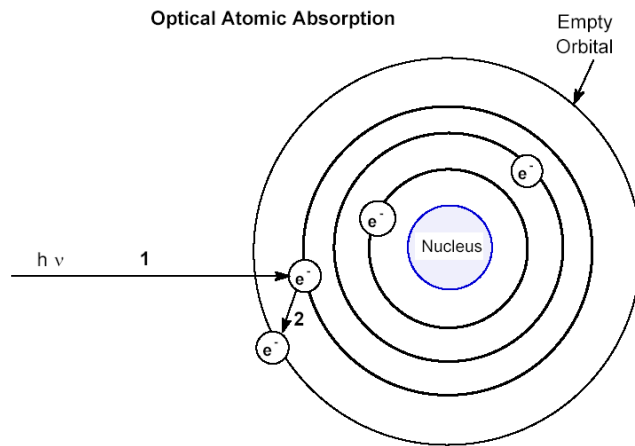




Spektrometri

■ Interferometri

- Umjesto višestruke interferencije koja se zbiva na optičkoj mrežici prati se interferencija dva snopa zračenja.
- Snimajući intenzitet na nekoj čvrstoj točki i mijenjajući relativne fazne pomake (zaostatak u fazi) dobiva se spektar kao funkcija razlike puta (spektar u vremenu).
- Fourier-ovim transformacijama dobiva se spektar u domeni frekvencija.



ATOMSKA SPEKTROMETRIJA

1 Atomske spektrometrije

1.1 Tehnike kod kojih mjerimo elektromagnetsko zračenje

1.1.1 Spektrometrije apsorpcije EMZ

1.1.1.1 Spektrometrija apsorpcije γ - i X-zračenja

1.1.1.2 Atomska apsorpcijska spektrometrija (UV-VID)

1.1.2 Spektrometrije emisije EMZ

1.1.2.1 Emisija γ - i X-zračenja

1.1.2.2 Emisija UV i VID zračenja, atomska fluorescentna spektrometrija

1.2 Tehnike kod kojih mjerimo zračenje elektrona

1.2.1 Spektrometrije apsorpcije elektrona (odbijeni ili prolazni elektroni)

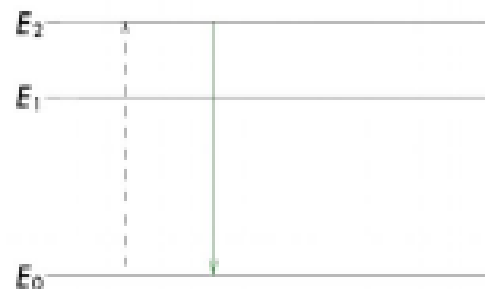
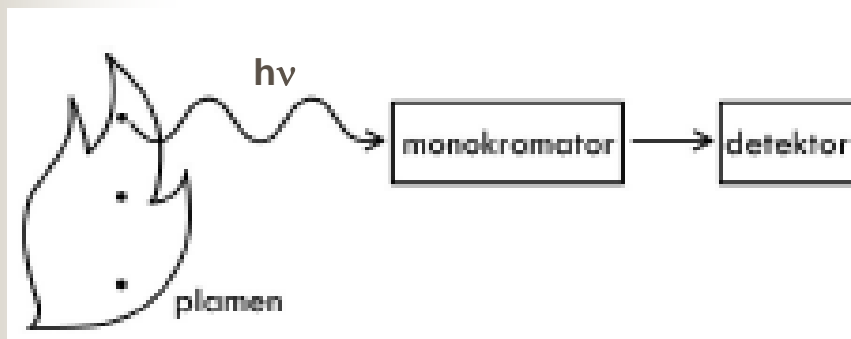
1.2.2 Spektrometrije emisije elektrona

1.3. Tehnike kod kojih mjerimo zračenje iona

1.3.1 Masena spektrometrija s ionizacijom u plazmi (ICP/MS - omjer mase i naboja)

- ❖ Atomska se spektrometrija primjenjuje za kvalitativno i kvantitativno određivanje približno 70 elemenata.
- ❖ Osjetljivost ovih metoda nalazi se u području **ppm** i **ppb**.
- ❖ Metode su brze, prikladne, visoke selektivnosti i umjerene cijene instrumenata.
- ❖ Prvi korak svih atomskih spektrometrijskih postupaka je **ATOMIZACIJA**, proces kojime se uzorak isparava i razgrađuje uz nastajanje atomske pare.
- ❖ **ATOMIZACIJA** je najkritičniji korak u atomskoj spektrometriji – utječe na *osjetljivost, preciznost i točnost metode*.
- ❖ Atomske se metode temelje na pojavama **apsorpcije, fluorescencije i emisije**.
- ❖ Atomske spektrometrijske metode kategorizirane su prema načinu atomiziranja uzoraka, pri čemu se atomizacijska temperatura bitno mijenja.
- ❖ **Najčešća četiri načina atomizacije:**
 - atomizacija u plamenu
 - elektrotermička atomizacija
 - atomizacija u induktivno spregnutoj plazmi
 - atomizacija u plazmi istosmjerne struje

1. Emisijska spektrometrija

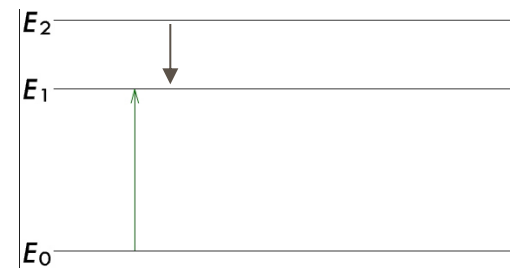
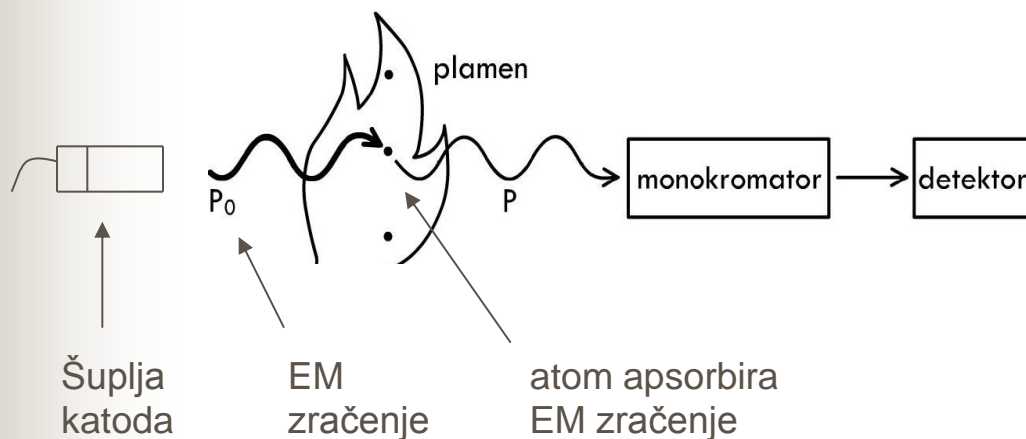


Pobuda u plamenu kod emisijske spektrometrije

U plamenu dolazi do pobude iz osnovnog u više energetske stanje. Pri povratku iz pobuđenog stanja atom emitira EM zračenje određene valne duljine.

**Signal pobude je energija plamena
emitirano zračenje je analitički signal**

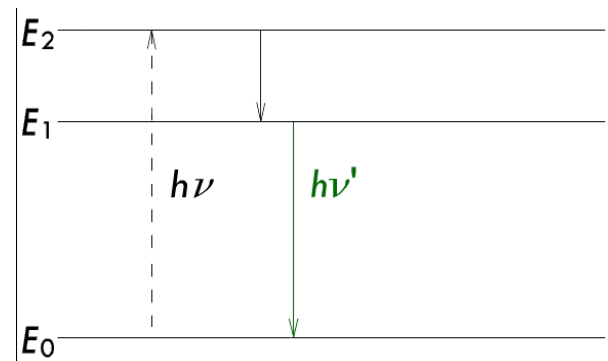
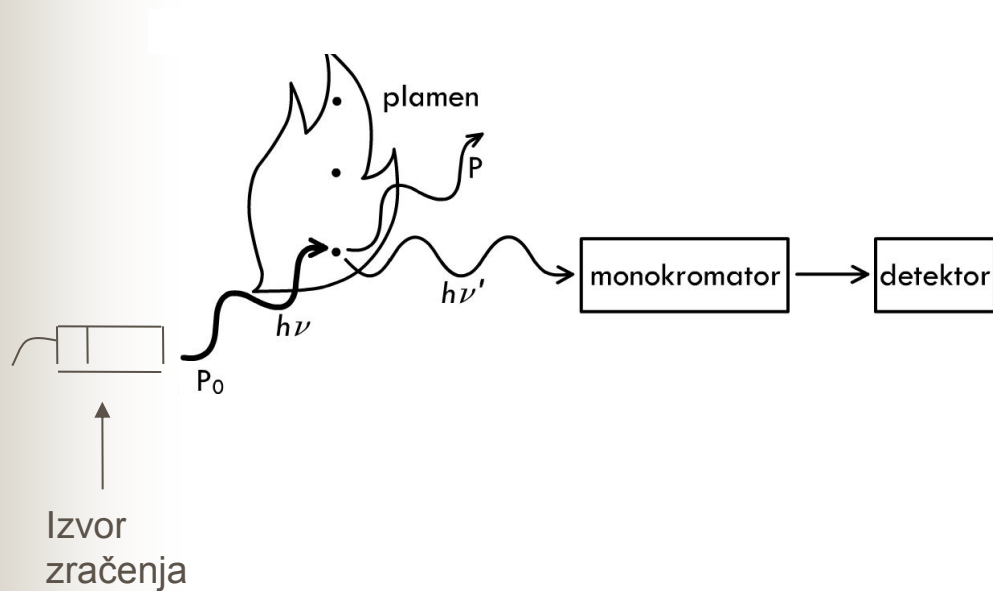
2. Apsorpcijska spektrometrija



Signal pobude je apsorbirano zračenje

Pad intenziteta zračenja uslijed apsorpcije EM zračenja atoma je analitički signal

3. Fluorescentna spektrometrija



Signal pobude je apsorbirano zračenje
intenzitet reemitiranog zračenje je analitički signal

Tablica 24–1.
KLASIFIKACIJA ATOMSKIH SPEKTRALNIH METODA

Metoda atomizacije	Tipična temperatura atomizacije; °C	Temelj metode	Uobičajeni naziv i kratica metode
plamena	1700 3150	apsorpcija emisija fluorescencija	atomska apsorpcijska spektroskopija, AAS atomska emisijska spektroskopija, AES atomska fluorescencijska spektroskopija, AFS
elektrotoplinska	1200 3000	apsorpcija fluorescencija	elektrotoplinska atomska apsorpcijska spektroskopija elektrotoplinska atomska fluorescencijska spektroskopija
induktivno spregnuta argonska plazma	6000 8000	emisija fluorescencija	induktivno spregnuta plazma spektroskopija, ICP induktivno spregnuta plazma fluorescencijska spektroskopija
istosmjerna argonska plazma	6000 10000	emisija	istosmjerna plazma spektroskopija, DCP
električni luk	4000 5000	emisija	emisijska spektroskopija uz lučni izvor
električna iskra	40000(?)	emisija	emisijska spektroskopija uz iskra kao izvor

USPOREDBA ATOMSKIH I MOLEKULSKIH SPEKTROMETRIJSKIH METODA

- ❖ Atomska se spektrometrija temelji na pojavama **APSORPCIJE, FLUORESCENCIJE I EMISIJE**, a za molekulska su općenito primjenjive samo apsorpcija i fluorescencija.
- ❖ Atomska spektrometrija bavi se identitetom i koncentracijom **ATOMA** u uzorku, bez obzira na način njihove povezanosti, dok molekulska spektrometrija upućuje na kvalitativne i kvantitativne podatke o **MOLEKULAMA** u uzorku.
- ❖ Atomska spektrometrija ograničena je na frekvencije ultraljubičastog, vidljivog i X-zračenja.
- ❖ Instrumenti i kod atomske i molekulske spektrometrije primjenjuju monokromatore ili filtre za odabiranje valnih duljina, te fotonske detektore za određivanje intenziteta zračenja.
- ❖ Spremnik uzoraka se razlikuje - kod molekulske s. su to kivete, a kod atomske s. **PLAMEN, PLAZMA, LUK ili ISKRA**, koji sadrži plinski atomski uzorak.
- ❖ Kod atomske spektrometrije spremnik uzoraka služi u dvije svrhe:
 - sredstvo za atomizaciju
 - spremnik atomskih para
- ❖ Izvor zračenja kod atomskih i molekulskih spektrometrija je izrazito različit.

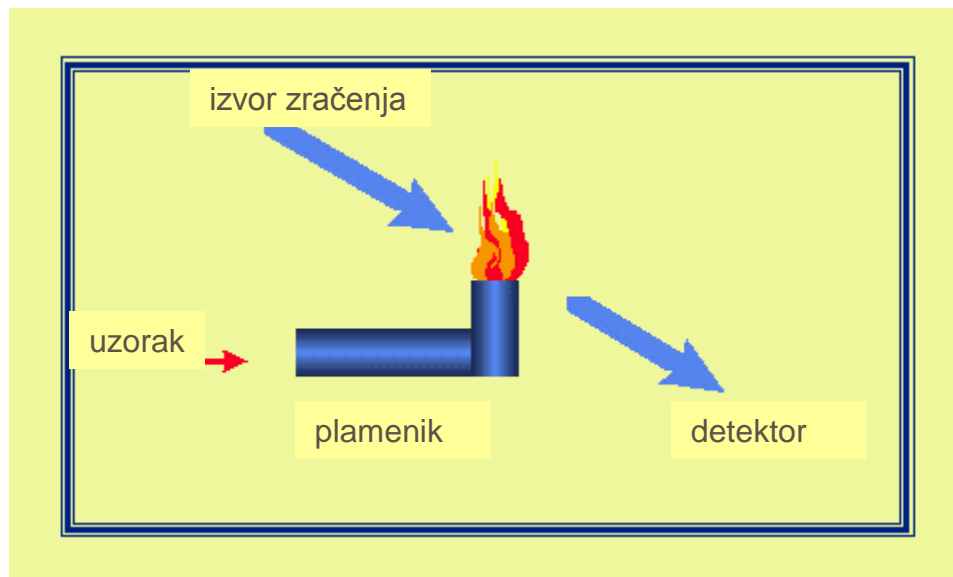
ATOMSKA SPEKTROMETRIJA TEMELJENA NA PLAMENOJ ATOMIZACIJI

- ❖ Tri su tipa atomskih metoda temeljenih na plamenoj atomizaciji:
 - atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS)
 - atomska emisijska spektrometrija (AES)
 - atomska fluorescencijska spektrometrija (AFS)
- ❖ U plamenoj se atomizaciji vodena otopina uzorka raspršuje, **NEBULIZIRA**, u oblik fine vodene prašine i miješa s plinovitim gorivom i oksidansom koji ga unose u plamen. Otapalo ispari u **OSNOVNOM PODRUČJU PLAMENA**, potom se fine čvrste čestice unose u **UNUTRAŠNJI STOŽAC** - najtopliji dio plamena u kojemu iz čvrstih čestica nastaju plinoviti atomi i elementni ioni, te se pobuđuju atomski emisijski spektri. U konačnici atomi i ioni ulaze u **VANJSKI STOŽAC** plamena gdje može doći do oksidacije prije raspršivanja atomizacijskih produkata u atmosferu. Zbog velike brzine prolaza smjese gorivo-oksidans kroz plamen, samo dio uzorka podliježe opisanim procesima. Zbog navedenog plamen nije djelotvoran atomizator.



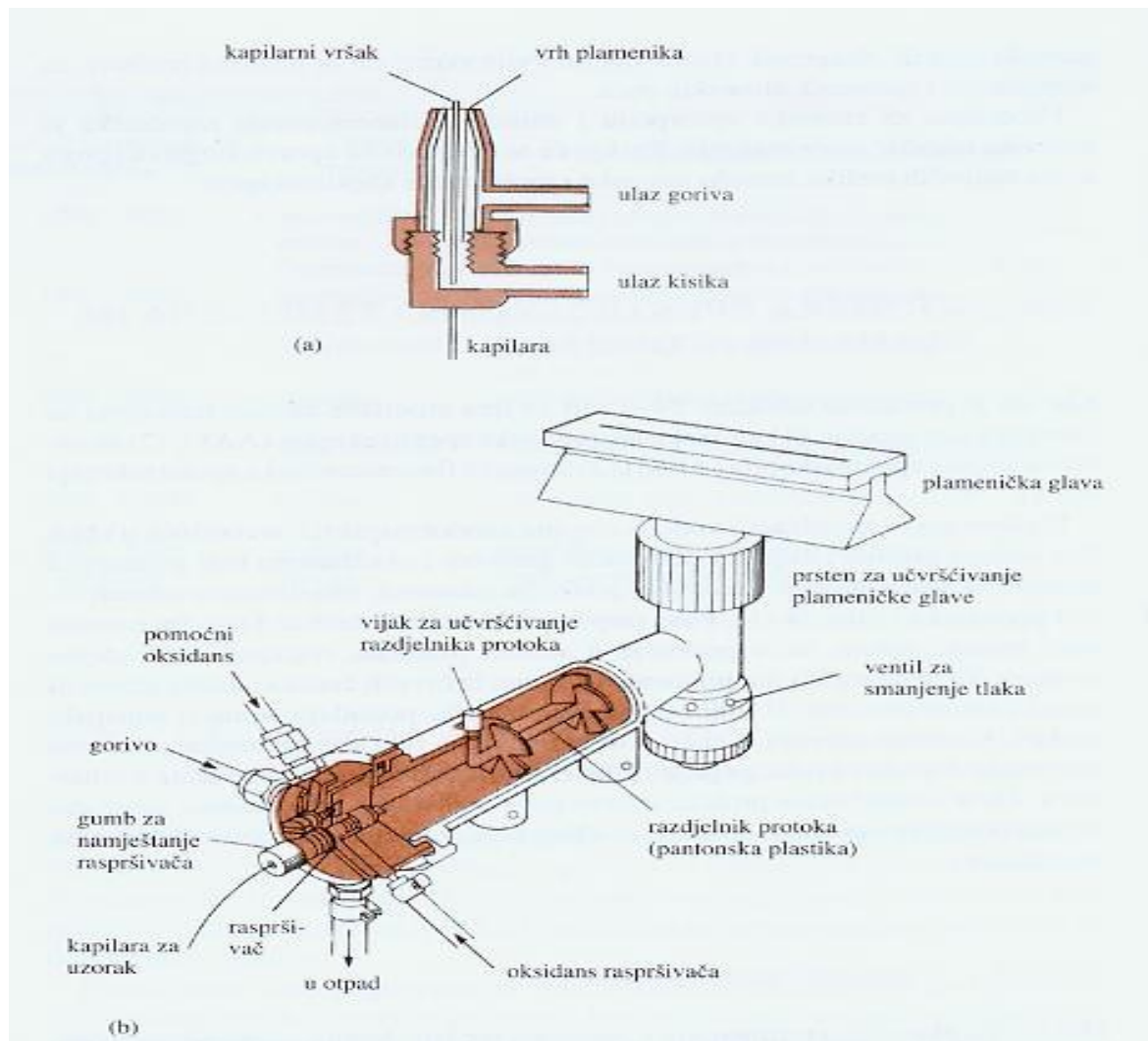
Uvođenjem uzorka u plamen dolazi do fizikalno-kemijskih procesa:

1. isparavanje otapala i stvaranje čvrstih čestica
2. prevođenje uzorka u parnu fazu ili direktno u slobodne atome uslijed termičke disocijacije molekula
3. zbog visoke temperature može doći do termičke ekscitacije atoma i termičke ionizacije prisutnih atoma i molekula
4. slobodni atomi mogu reagirati sa drugim atomima ili radikalima koji su prisutni u plamenu (O ili OH koji se nalaze u smjesi za gorenje)



Plameni atomizatori

- ❖ Dva se tipa plamenika primjenjuju u plamenoj spektrometriji:
 - plamenik turbulentnog protoka ili plamenik s potpunim izgaranjem
 - plamenik laminarnog protoka ili plamenik s prethodnim miješanjem



Dobivanje spektara pomoću plamena

- ❖ U atomskoj emisijskoj spektrometriji sam je uzorak izvor zračenja – ne primjenjuje se nikakav vanjski izvor – spektri se snimaju smještanjem unutrašnjeg stošca plamena ispred ulazne pukotine monokromatora. Izlazni signal izlazne pukotine promatra se kao spektar, koji se snima rotiranjem rešetke ili prizme.
- ❖ U atomskoj apsorpcijskoj spektrometriji zahtjeva se linijski izvor zračenja – zračenje posebne vrste vanjskog izvora propušta kroz unutrašnji stožac plamena, monokromator, do površine detektora zračenja.
- ❖ U atomskoj fluorescencijskoj spektroskopiji fluorescencija se pobuđuje pomoću snopa zračenja koji ulazi u plamen pod pravim kutom u odnosu na put prema ulaznoj pukotini selektora valnih duljina.

Tipovi plamena

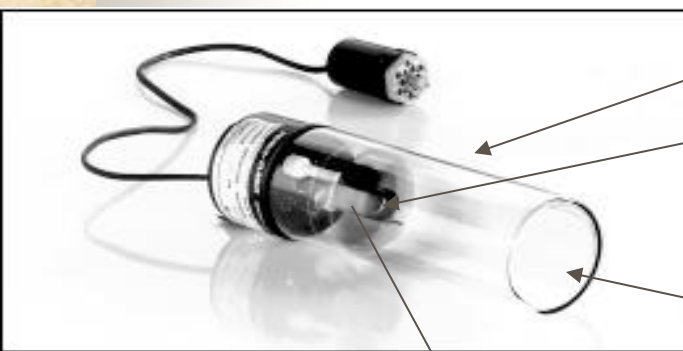
- ❖ U plamenoj se spektrometriji primjenjuje nekoliko kombinacija goriva i oksidansa kao što je navedeno u tablici:

GORIVI PLIN	OKSIDANS	TEMPERATURA (K)
Acetilen	Zrak	2400 - 2700
Acetilen	Dušikov suboksid	2900 - 3100
Acetilen	Kisik	3300 – 3400
Vodik	Zrak	2300 – 2400
Vodik	Kisik	2800 - 3000

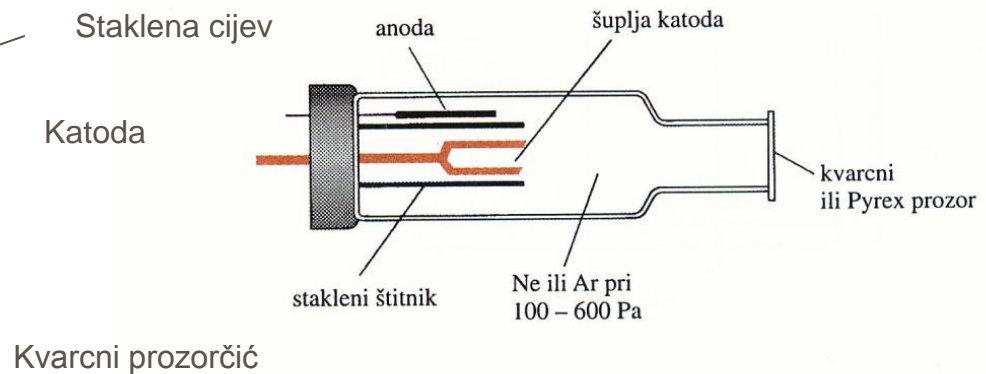
Linijski izvori za atomsku apsorpcijsku spektroskopiju

- ❖ Koriste se dvije vrste žarulja ili lampi:
 - žarulje ili lampe sa šupljom katodom**
 - bezelektrodne žarulje ili lampe uz izbijanje - laser**
- ❖ Žarulje ili lampe sa šupljom katodom:
 - najčešće se primjenjuju, sastoji se od volframove anode i cilindrične katode, zataljenih u staklenoj cijevi punjenoj inertnim plinom, najčešće argonom, pod tlakom od 100 do 600 Pa, katoda je napravljena od metala koji se analizira.
- ❖ Bezelektrodne žarulje ili lampe:
 - sastoje se od zataljene kvarcne cijevi koja sadrži inertan plin kao što je argon pri tlaku od nekoliko stotina Pa, te malu količinu metala koji se analizira, ili njegove soli, ne sadrži elektrode, već koristi energiju jakog polja radiofrekvencijskog ili mikrovalnog zračenja – nemaju široku primjenu!!!

U **ŠUPLJOJ KATODI** kationi argona putuju prema katodi, a elektroni prema anodi, kationi argona izbijaju atome metala čime nastaje atomski oblak, pri čemu dolazi do emitiranja tipične valne duljine pri povratku u osnovno stanje, atomi koji daju emisijske linije nalaze se u žarulji pri mnogo nižoj temperaturi od atoma uzorka u plamenu, stoga se emisijske linije žarulje manje proširuju od apsorpcijskih maksimuma u plamenu. Izbijeni atomi metala u žarulji mogu prijeći natrag na površinu katode ili na stjenke žarulje i tamo se istaložiti.

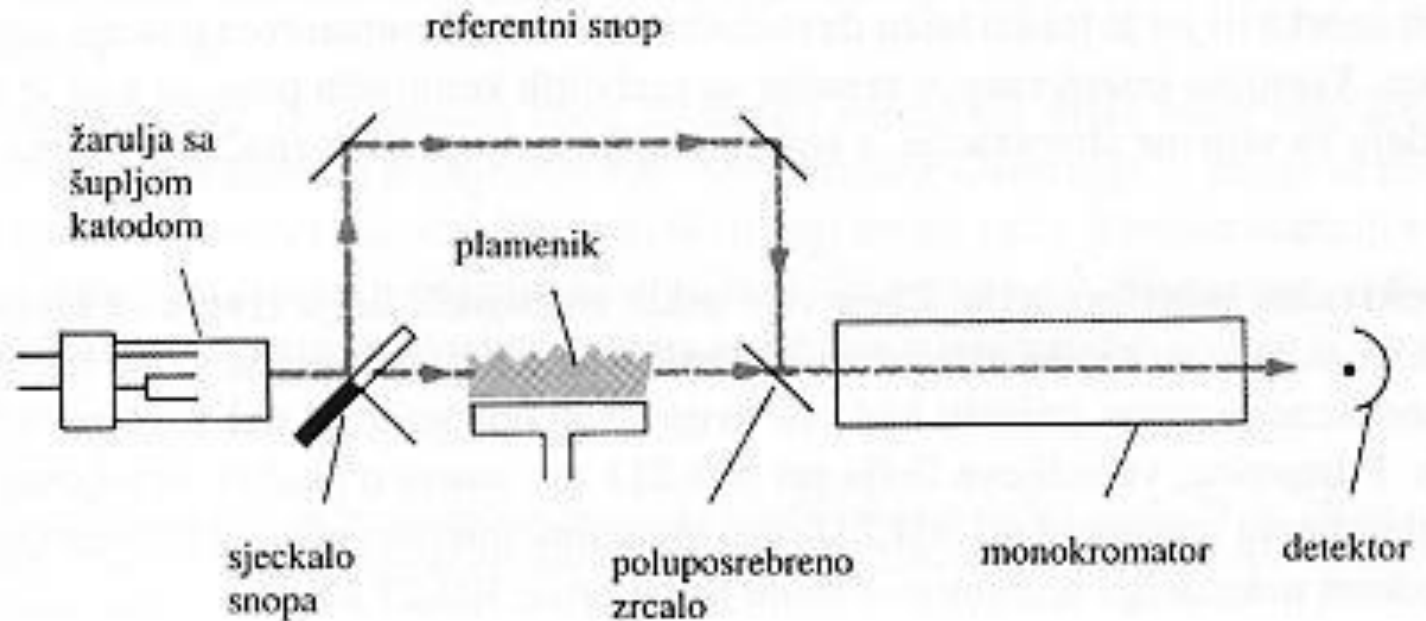


Anoda



Modulacija izvora

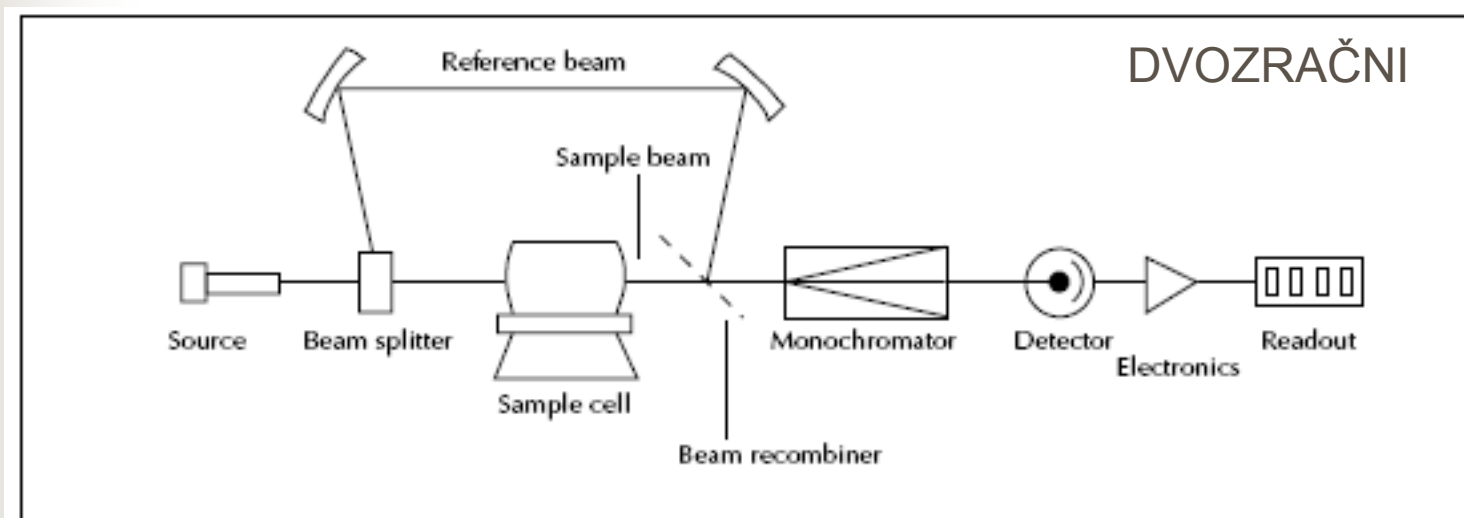
- ❖ U atomskim apsorpcijskim mjerenjima može doći do toplinskog pobuđivanja dijela atoma u uzorku u plamenu pa se stvara zračenje koje nije moguće ukloniti monokromatorom koji je postavljen između plamena i detektora, te je nužno provoditi **MODULACIJU** izlaznog signala žarulje ili lampe – frekvencija izvora se modulira od kontinuirane (istosmjerne) u isprekidanu (izmjeničnu), i u tu svrhu umeće se tzv. **sjeckalo Ili čoper** – zračenje se polovicu vremena propušta kroz sredstvo, a drugu polovicu reflektira.



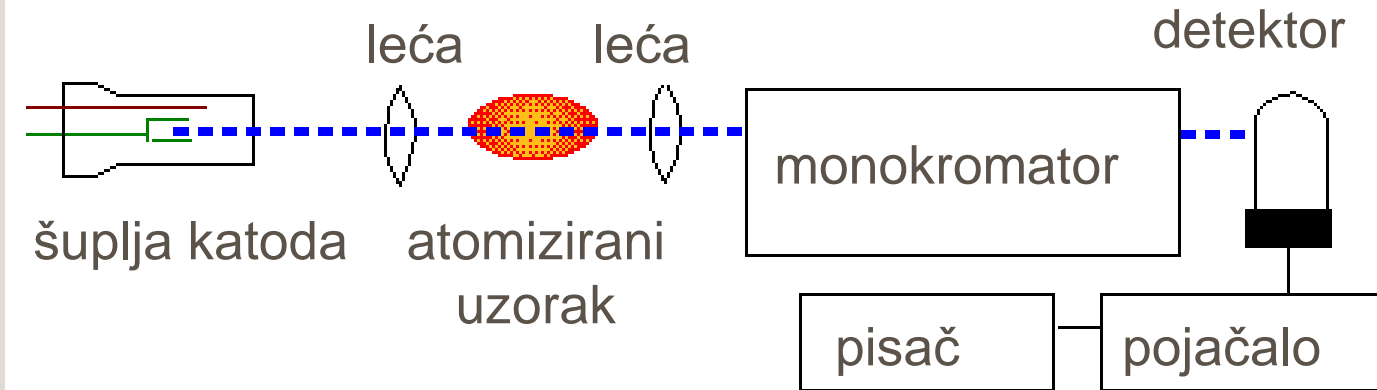
Instrumenti

- ❖ U atomskoj spektrometriji instrumenti sadrže: **IZVOR, SPREMNIK UZORKA (PLAMEN), SELEKTOR VALNIH DULJINA I SUSTAV ZA DETEKTIRANJE I OČITANJE**

- AAS MOGU BITI JEDNOZRAČNI I DVOZRAČNI
- MODERNI INSTRUMENTI SU:
 - DVOZRAČNI
 - IZVOR ZRAČENJA - MULTI KATODA
 - UGRAĐENA KOREKCIJA POZADINSKOG ZRAČENJA
 - RAČUNALO ZA OBRADU PODATAKA



Atomski apsorpcijski spektrometar



Pojednostavljen prikaz AA spektrometra

SASTOJI SE OD:

- IZVORA ZRAČENJA - ŠUPLJA KATODA
- PLAMENA - ATOMIZACIJA UZORKA
- MONOKROMATORA
- DETEKTORA
- ZAPISNOG UREĐAJA (pisač, kompjuter)



MONOKROMATORI

- FILTRI

- OPTIČKE PRIZME

- OPTIČKE REFLEKSIJSKE MREŽICE – KORISTE SE KOD AAS

SJECKALO ILI ČOPER

- ZRCALO KOJE SE ZAKREĆE – ROTIRA PROPUŠTAJUĆI NAIZMJENIČNO RADNU I REFERENTNU ZRAKU

DETEKTORI

– mjere izlazni signal

(fotoelektrode, selenske i cezijeve ćelije, multikanalni detektori)

FOTOMULTIPLIKACIJSKA CIJEV

- visokonaponska vakuumaska fotoćelija



Primjena atomske apsorpcijske spektrometrije

- VEĆINA ELEMENATA U PERIODNOM SISTEMU
MOŽE SE ODREĐIVATI METODOM AAS

H																	He
Li	Be										B	C	N	O	F		Ne
Na	Mg										Al	Si	P	S	Cl		Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac															

**AAS JE NAJŠIRE PRIMJENJIVA METODA ZA
ODREĐIVANJE METALA U TRAGOVIMA!!!
(UZORCI PRAŠINE, PEPELA, HRANE, POVRŠINSKIH I OTPADNIH VODA)**



- OVOM METODOM NE MOGU SE ODREĐIVATI:

- HALOGENI ELEMENTI I PLEMENITI
PLINOVI (APSORBIRAJU NA NIŽIM
VALNIM DULJINAMA)

- ELEMENTI OD KOJIH SE NE MOŽE IZRADITI
KATODA

- ELEMENTI KOJI LAKO OKSIDIRAJU ILI
STVARAJU HIDROKSIDE



Interferencije u atomskim apsorpcijskim metodama

1. **SPEKTRALNE** – zračenje koje dolazi u detektor a nije rezultat interakcije s analitom, pozadinsko zračenje (korekcija)
2. **KEMIJSKE** – uzrokovane kemijskim spojevima koji se nalaze ili nastaju u plamenu i koji smanjuju broj slobodnih atoma u analitu
3. **FIZIKALNE** – posljedica promjene fizikalnih svojstava otopine (viskoznost, napetost površine, gustoća) uzrokovane prisutnošću kemijskih tvari (soli, organskih spojeva) što uzrokuje promjenu u transportu tvari i brzini isparavanja

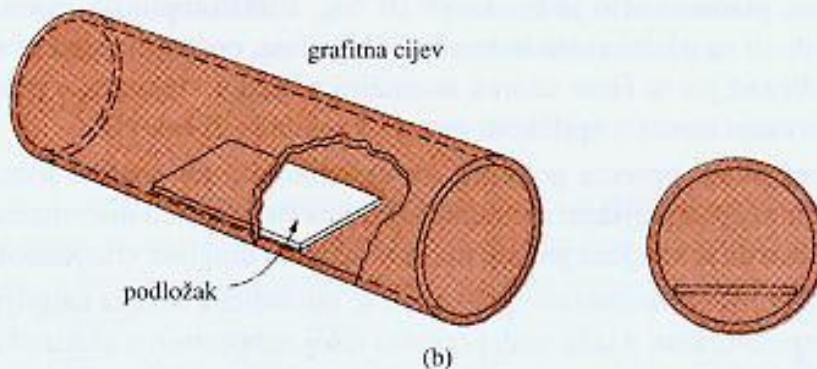
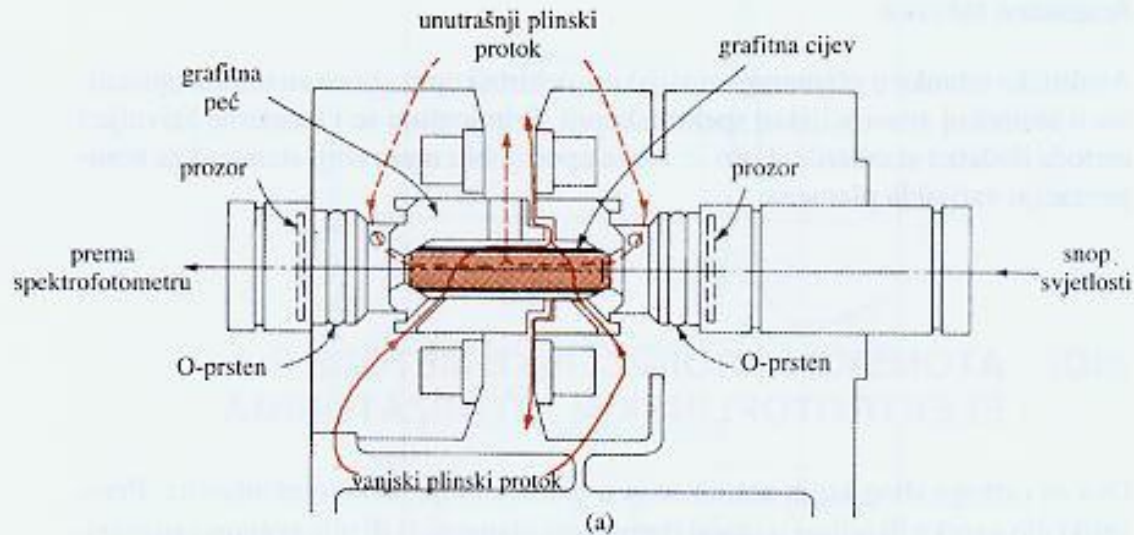


Plamena emisijska spektrometrija

- ❖ Atomska emisijska spektrometrija u kojoj se koristi plamen (plamena emisijska spektrometrija ili plamena fotometrija) koristi se u elementnoj analizi – najčešće za određivanje **natrija kalija, litija i kalcija**.
- ❖ Može se koristiti i u kvalitativnoj analizi snimanjem emisijskih spektara – identifikacija prisutnih elemenata temelji se na valnim duljinama maksimuma, koje su jedinstvene za svaki element.
- ❖ U tom smislu plamena emisija je u velikoj prednosti pred plamenom apsorpcijom, kojom se ne mogu dobiti cijeli spektri zbog diskontinuirane prirode primijenjenih izvora zračenja.
- ❖ Plameni emisijski instrumenti su po građi slični plamenim apsorpcijskim instrumentima, uz iznimku izvora zračenja, koji je u prvom primjeru plamen – nepotrebni su žarulja sa šupljom katodom i sjeckalo (čoper).

Atomske apsorpcijske metode s elektrotoplinskim atomizatorima

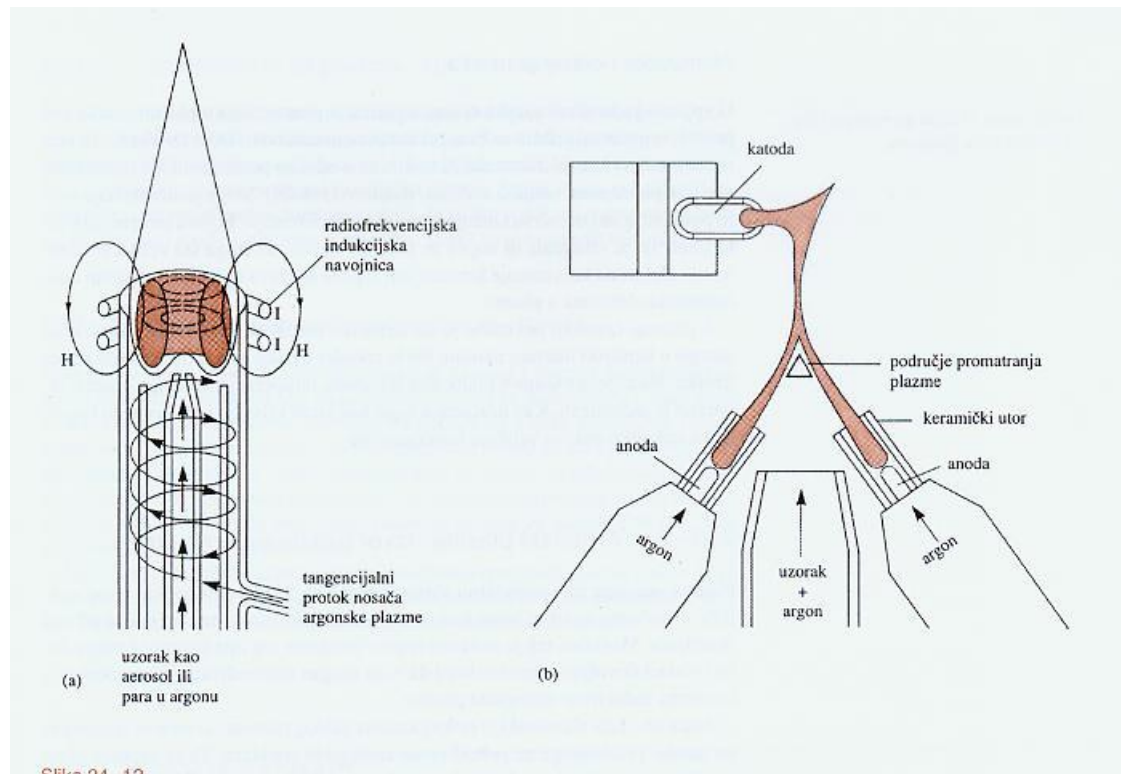
- ❖ Elektrotoplinski atomizatori osiguravaju povećanu osjetljivost jer se čitav uzorak atomizira u kratkom vremenu.

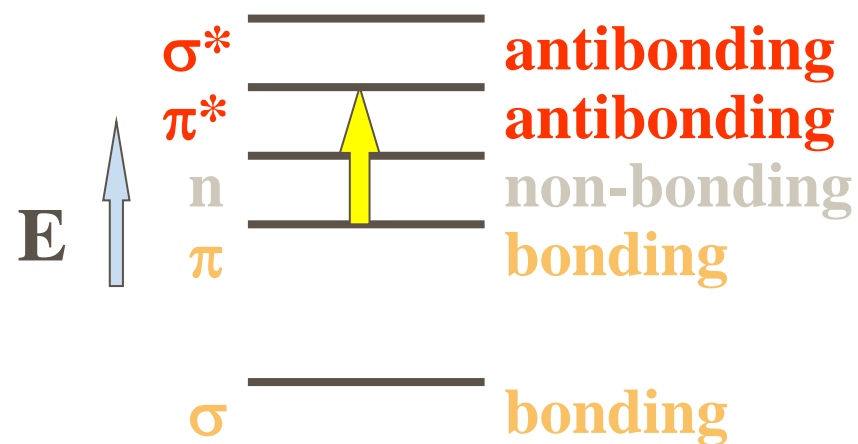
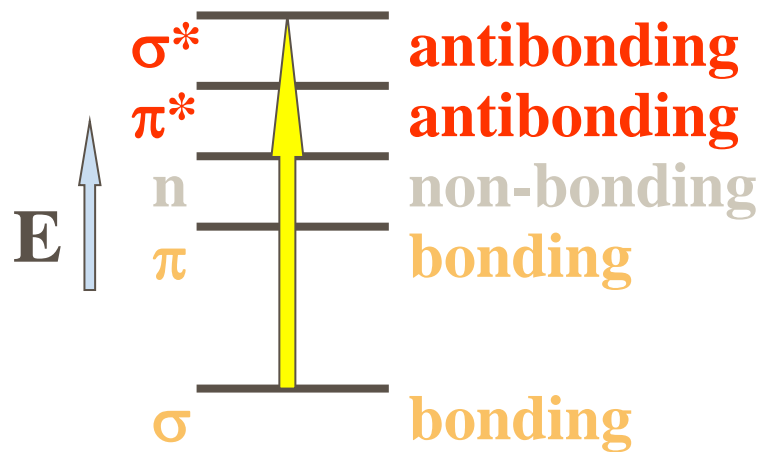


- Presjek grafitne peći
- L'vovljev podložak i njegov položaj u grafitnoj peći

Atomske emisijske metode temeljen na atomizaciji u plazmi

- ❖ Plazma atomizatori primijenjeni su za toplinsku emisiju i za fluorescencijsku spektrometriju.
- ❖ **Plazma je vodljiva plinska smjesa koja sadrži znatnu količinu kationa i elektrona.**
- ❖ U argonskoj plazma spektrometriji primijenjene su tri vrste izvora:
 - istosmjerni električni izvor koji održava struju, a drugi i treći izvor su snažni generatori radiofrekvencije odnosno mikrovalne frekvencije kroz koje protječe argon-ISP**





MOLEKULSKA SPEKTROMETRIJA

2 Molekulske spektrometrije

2.1 Tehnike kod kojih mjerimo elektromagnetsko zračenje

2.2.1 Spektrometrije apsorpcije i inducirane apsorpcije

2.2.1.1 Molekulska apsorpcija u UV i VID

2.2.1.2 IR spektrometrija

2.2.1.3 Spektrometrija apsorpcije mikrovalnog zračenja

2.2.1.4 Spektrometrija inducirane apsorpcije (NMR i ESR)

2.2.2 Spektrometrije emisije

2.2.2.1 Molekularna luminiscencija (fluorescencija i fosforescencija)

2.2.3 Spektrometrije raspršenja

2.2.3.1 Turbidimetrija i nefelometrija

2.2.3.2 Spektrometrija ramanovog raspršenja

2.2.4 Spektrometrije polarizacije

2.2.4.1 Spektropolarimetrija

2.2. Tehnike kod kojih mjerimo zračenje iona

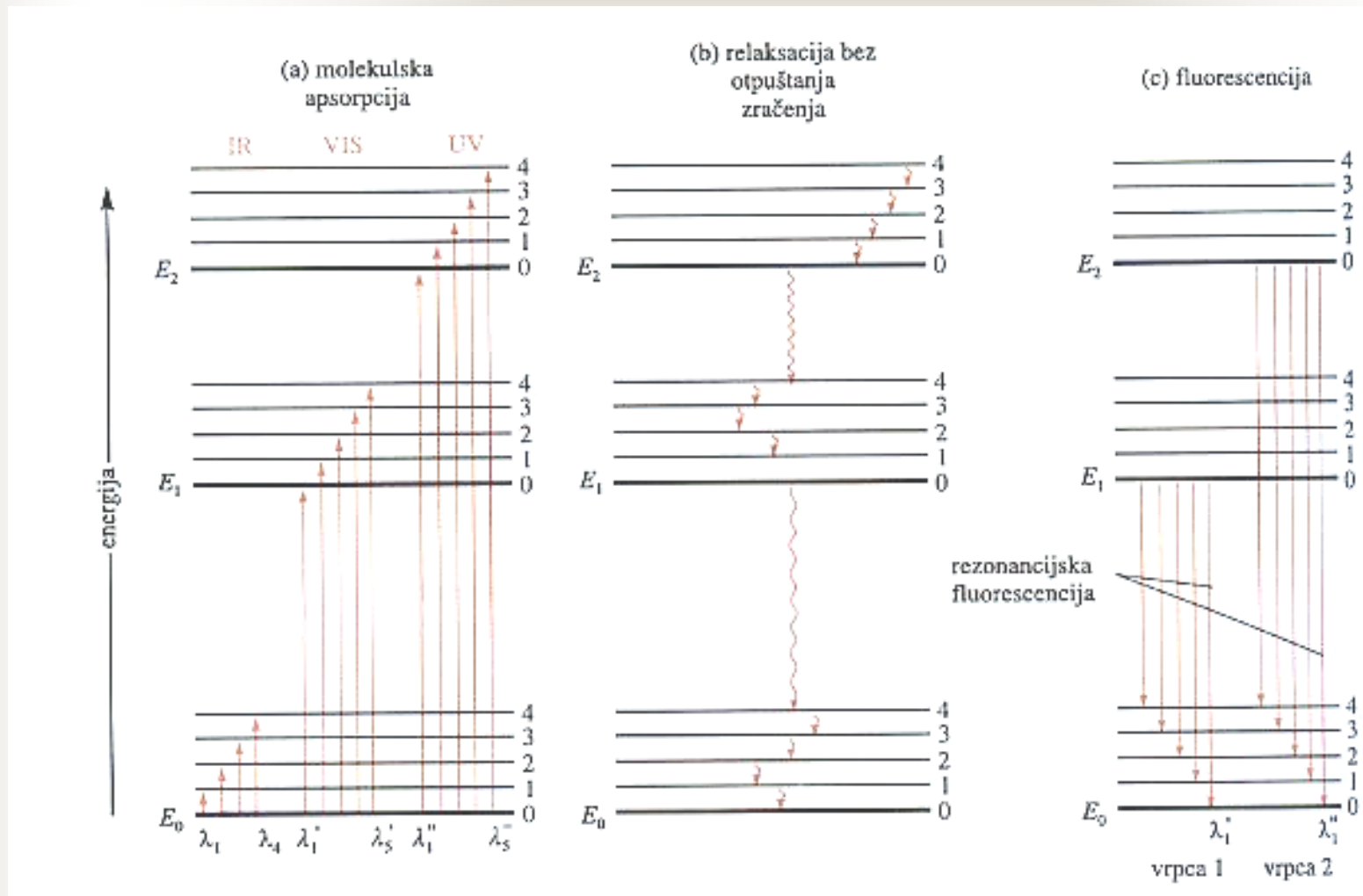
2.2.1 Spektrometrije raspršenih iona

2.2.2 Masena spektrometrija (omjer mase i nabija)

2.3 Tehnike kod kojih mjerimo toplinsko zračenje

2.3.1 Fotoakustična spektrometrija

2.3.2 Spektrometrija toplinskom lećom



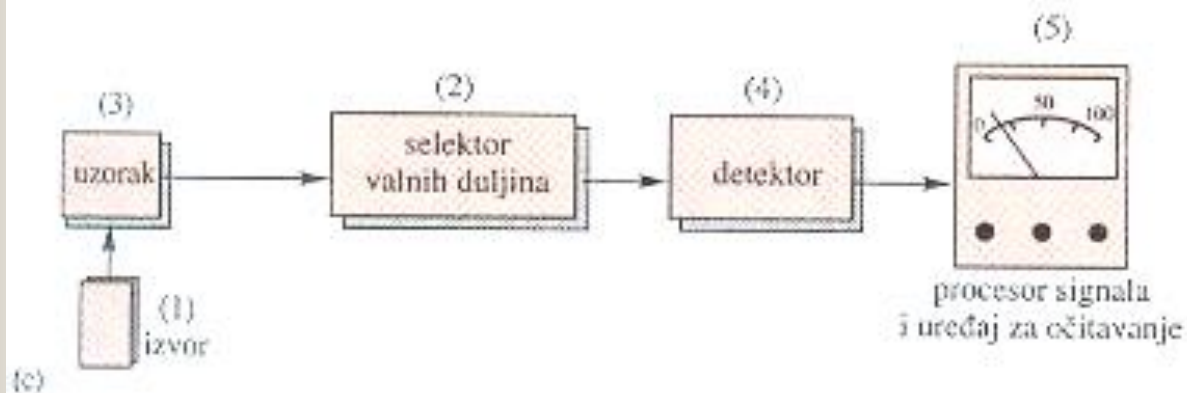
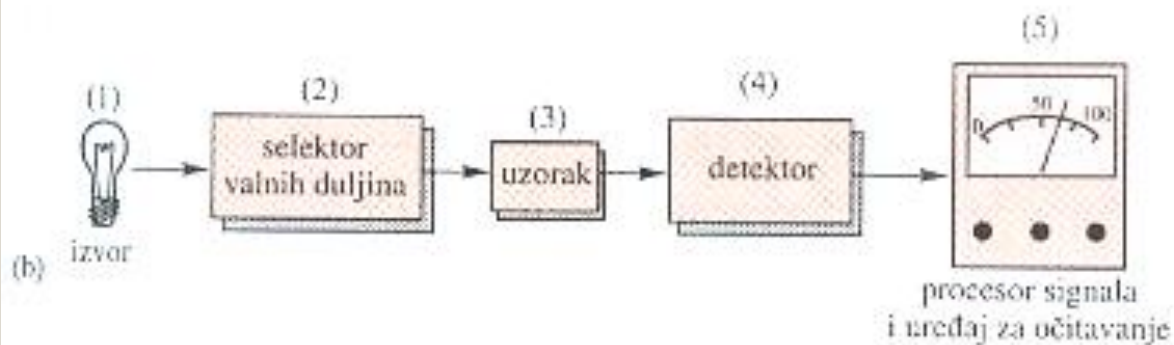
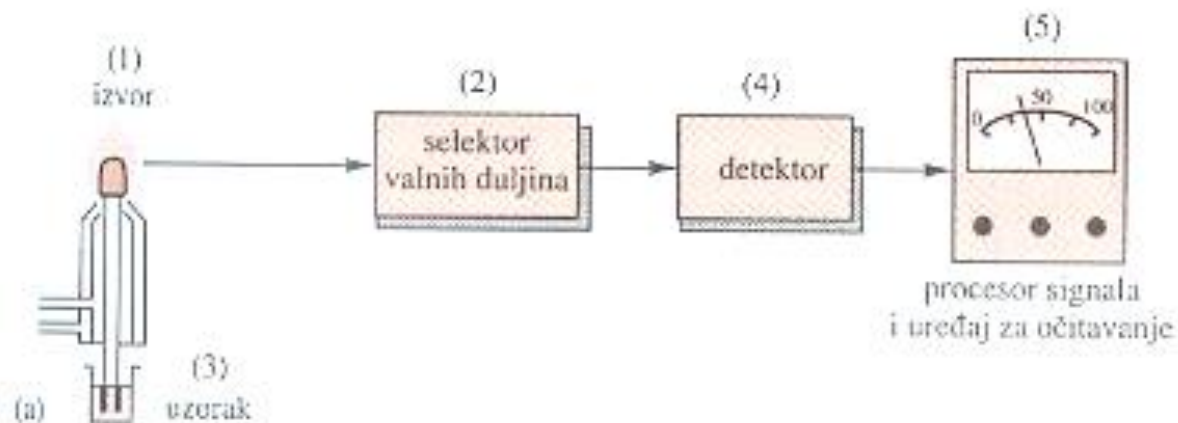
Dijagram energijskih razina koji prikazuje energijske promjene neke molekulske vrste pri apsorpciji, relaksaciji bez otpuštanja zračenja i fluorescenciji.



INSTRUMENTI U OPTIČKOJ SPEKTROMETRIJI

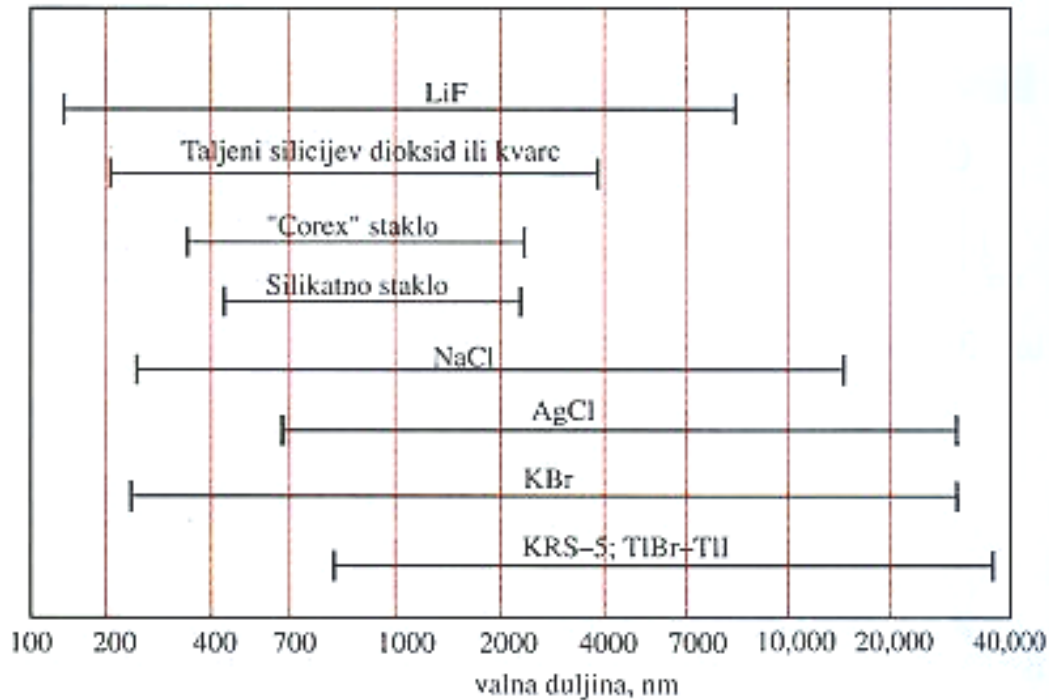
- Osnovni dijelovi analitičkih instrumenata za emisijsku, apsorpcijsku i fluorescencijsku spektrometriju međusobno su vrlo slični kako u funkciji tako i u izvedbi bez obzira na to jesu li predviđeni za rad u UV, VID ili IR dijelu spektra – **OPTIČKI INSTRUMENTI!!!**

- Većina spektrometrijskih uređaja sastavljena je od pet osnovnih dijelova:
 - (1) stabilnog izvora energije zračenja
 - (2) selektora valnih duljina koji omogućuje izdvajanje određenog valnog područja
 - (3) jednoga ili više spremnika za uzorke
 - (4) detektora zračenja ili pretvornika energije zračenja u mjerljiv signal
 - (5) procesora signala i uređaja za njegovo očitavanje



Sastavni dijelovi različitih tipova instrumenata za optičku spektrometriju:

- (a) emisijsku,
- (b) apsorpcijsku,
- (c) fluorescencijsku i spektrometriju raspršivanja.



Transmitacijsko područje različitih materijala za izradbu dijelova optičkih (leća, kiveta, prizama) instrumenata.

Prozirnost materijala za izradbu optičkih dijelova uređaja:

- ❑ Silikatno staklo uglavnom se rabi u uređajima za primjenu samo u vidljivu dijelu spektra.
- ❑ Taljeni silicijev dioksid i kvarc proširuju područje spektrometrijskih instrumenata do 180 i 200 nm u UV dijelu spektra.
- ❑ IR spektrometrija zahtjeva primjenu prozora načinjenih od tvari kao što je polirani natrijev, kalijev ili srebrov klorid (bromid) – osjetljivi na vlagu.

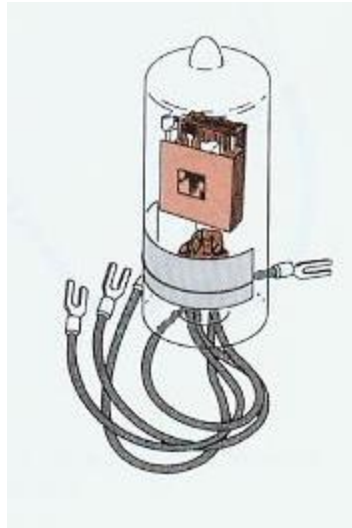
Spektroskopski izvori zračenja

- ❑ Apsorpcijska i fluorescencijska spektrometrija zahtjevaju vanjski izvor konstantnog i dovoljno snažnog zračenja koje omogućuje jednostavnu detekciju i mjerenje.
- ❑ Najčešće se snaga zračenja izvora eksponencijalno mijenja s naponom izvora električne energije, stoga se često uz te izvore upotrebljavaju regulatori napona.
- ❑ Primjenjuju se i linijski (kod atomske spektrometrije) i kontinuirani izvori zračenja – češće kod UV, VID i IR molekulske spektrometrije.

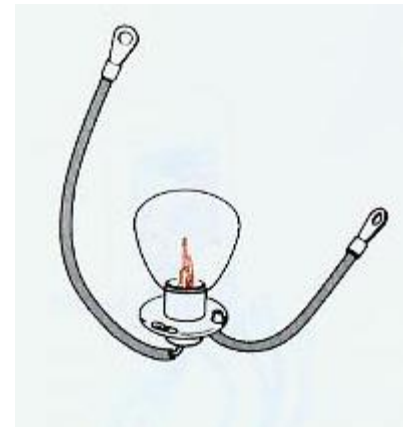
SPEKTROSKOPSKI IZVORI ZRAČENJA

Izvor zračenja	Valno područje, nm	Vrsta spektroskopije
kontinuirani izvori		
ksenonova lampa	250–600	molekulska fluorescencijska; Ramanova
H ₂ i D ₂ lampa	160–380	UV molekulska apsorpcijska
volfram/halogen žarulja	240–2500	UV/VIS/bliski IR molekulska apsorpcijska
volframova žarulja	350–2200	VIS/bliski IR molekulska apsorpcijska
Nerstov štapić	400–20000	IR molekulska apsorpcijska
nikromska žica	750–20000	IR molekulska apsorpcijska
Globar	1200–40000	IR molekulska apsorpcijska
linijski izvori		
lampa sa šupljom katodom	UV/VIS	atomska apsorpcijska; atomska fluorescencijska
bezelektrodna lampa uz pražnjenje	UV/VIS	atomska apsorpcijska; atomska fluorescencijska
lampa s metalnim parama	UV/VIS	atomska apsorpcijska; molekul- ska fluorescencijska; Ramanova
laser	UV/VIS/IR	Ramanova; molekulska apsorpcijska; molekulska fluorescencijska

- **Vodikova i deuterijeva žarulja ili lampa** – daju kontinuiran spektar u ultraljubičastom području koji nastaje električnim pobuđivanjem deuterija ili vodika pri niskom tlaku
- **Žarulja ili lampa s volframovom niti** – najčešći je izvor vidljiva zračenja i zračenja u bliskom infracrvenom području, ovisna je o temperaturi, primjenjiva je između 320 do 2500 nm, donja granica određena je apsorpcijom staklenog omotača oko niti.
- Izvori kontinuiranog infracrvenog zračenja su – **Globarov štapić** (silicijev karbid koji se zagrijava prolazom elektriciteta na 1500 °C), **Nernstov štapić** (valjak od cirkonijeva i itrijeva oksida, a zagrijava se do visokih temperatura pomoću električne struje).



Deuterijeva žarulja



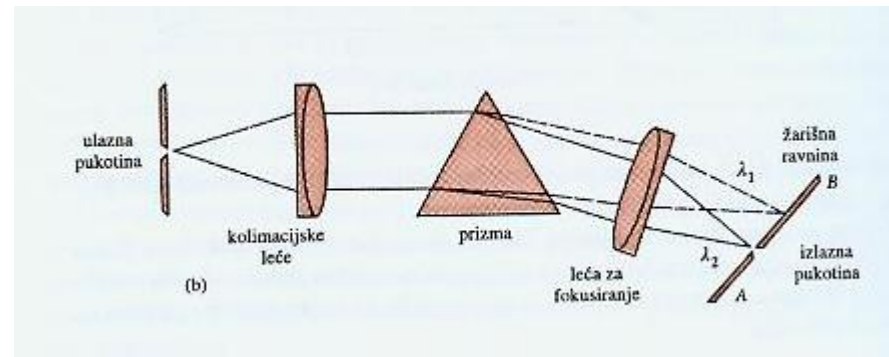
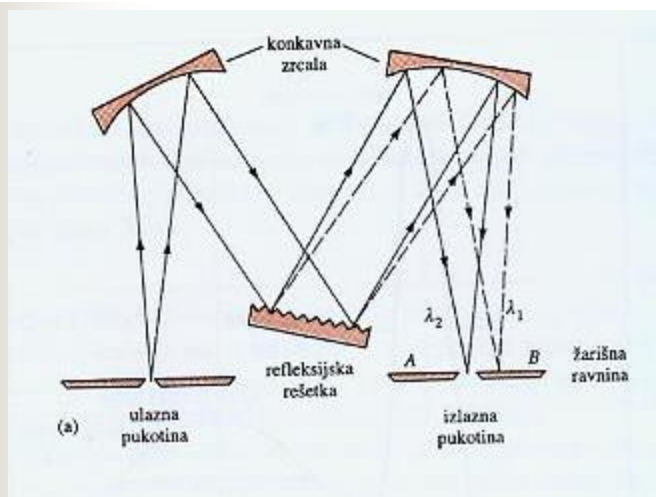
Volframova žarulja

Selektori valnih duljina

- Spektrometrijski instrumenti uglavnom sadrže uređaj koji sužava mjerno zračenje do uske vrpce koju uzorak apsorbira ili emitira – ti uređaji stoga utječu na osjetljivost i selektivnost instrumenta.
- **Napomena** – nema selektora koji bi mogao izdvojiti zračenje samo jedne valne duljine, već se izdvaja skupina susjednih valnih duljina, koja se naziva vrpcom.
- Različiti selektori valnih duljina daju bitno različite širine vrpca – monokromatori visoke kakvoće za vidljivo područje mogu imati efektivnu širinu vrpce nekoliko desetinka nanometara ili manje, a neki apsorpcijski filter istog područja može posjedovati širinu vrpce od 200 nm ili više.
- Postoje dva osnovna tipa selektora valnih duljina za proizvodnju uskih vrpca zračenja:
 - (1) **monokromatori** – izlazne se valne duljine mogu kontinuirano mijenjati u relativno širokom spektralnom području,
 - (2) **filtri** – rade na načelu apsorpcije svih valnih duljina kontinuiranog izvora, osim jedne ograničene vrpce, a dijele se na na:
 - (i) **Interferencijske filtre** – temelje se na optičkoj interferenciji, čime proizvode relativno uske vrpce zračenja, primjenjivi za UV, VID i IR zračenju, a sastoji se od tankog propusnog sloja Ca ili Mg fluorida;
 - (ii) **Apsorpcijski filtri** – jeftiniji i lošiji od interferencijskih, primjenjivi samo za VID zračenje, staklena obojena ploča – kod fotokolorimetara.

MONOKROMATORI – za UV, VID i IR zračenje slične su građe:

- Svi se sastoje od pukotina, leća, zrcala, prozora i disperznog sredstva, no tvari od kojih su ti dijelovi načinjeni ovise o valnom području njihove primjene.
- Dijelovi monokromatora: (1) **ulazna pukotina**; (2) kolimacijske leće ili **zrcalo** koje proizvodi paralelan snop; (3) **prizma ili rešetka** koja raspršuje zračenje u pojedinačne komponente - valne duljine; (4) **dio za fokusiranje** koji projicira niz pravokutnih slika izlazne pukotine na ravnu površinu nazvanu žarišnom ravninom.
- Većina monokromatora ima izlazne i ulazne prozore koji štite unutrašnje dijelove od prašine i korozivnih laboratorijskih para.
- Dva najčešća tipa **disperzijskih sredstava** u monokromatorima su **refleksijska rešetka** (najčešće u suvremenim uređajima) i **prizma**.



Dva tipa monokromatora:

(a) monokromator s rešetkom;

(b) monokromator s prizmom

Detektori zračenja i pretvornici

- ❑ **Detektor** je naprava koja pokazuje postojanje neke fizičke pojave.
- ❑ **Pretvornik** je posebna vrsta detektora koja pretvara signale kao što su svjetlosni intenzitet, pH, masa, temperatura, u električne signale koji nakon toga mogu pojačavati, prilagođavati i konačno pretvoriti u broj koji označuje veličinu početnog signala.
- ❑ Postoje dvije osnovne vrste pretvornika, oni koji daju odgovor na fotone i drugi koji reagiraju na promjenu topline.

DETEKTORI U SPEKTROSKOPIJI

Vrsta	Valno područje, nm
-------	--------------------

fotonski detektori

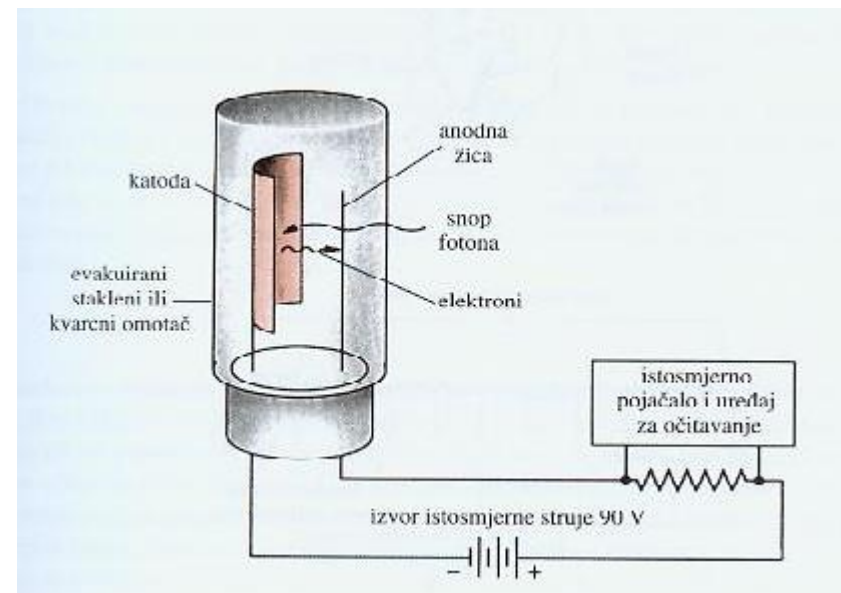
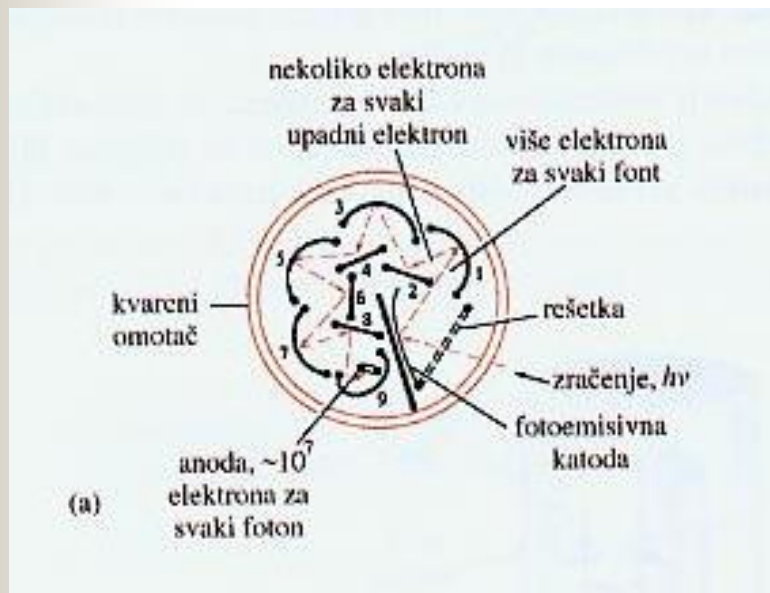
fotocijevi	150 – 1 000
fotomultiplikatori	150 – 1 000
silicijske diode	350 – 1 100
fotovodiči	750 – 3 000
fotonaponski članci	380 – 780

toplinski detektori

termočlanci	600 – 20 000
bolometri	600 – 20 000
pneumatski članci	600 – 40 000
pireoelektrični članci	1 000 – 20 000

Fotonski detektori:

- 1.) **Fotocijevi** – šuplja katoda (AAS)
- 2.) **Fotomultiplikatori** – sličan fotocijevi, značajno osjetljiviji elektroni se emitiraju kada su izloženi zračenju, dolazi do umnožavanja elektrona pri svakom udaru u dinodi, koji se konačno skupljaju na anodi, a nastala struja se mjeri
- 3.) **Silicijske fotodiode**
- 4.) **Detektori s nizom dioda** – silicijske diode njih 1000 ili više nanižu se jedna uz drugu u jednom jedinom silicijskom čipu što omogućava istovremeno promatranje svih valnih duljina – omogućena je spektrometrija velikih brzina
- 5.) **Fotnaponski članci ili fotoćelija** – sastoji se od plosnate bakrene ili željezne elektrode premazane slojem poluvodičkog materijala kao što je na primjer selen

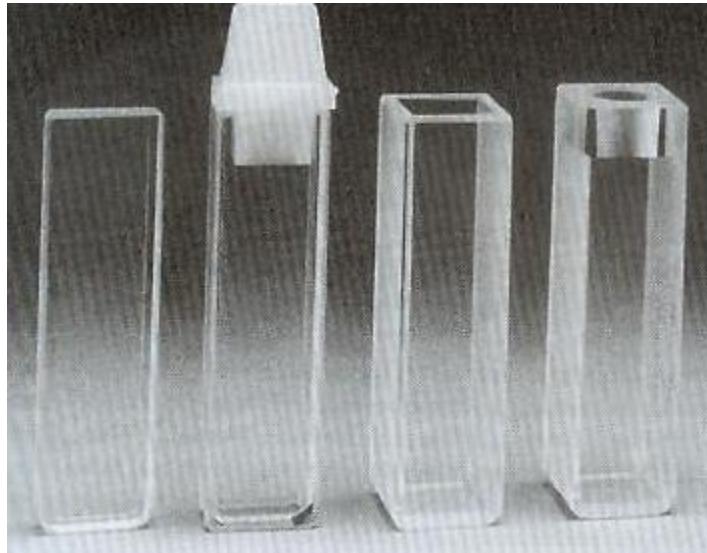


Procesori signala i uređaji za očitavanje:

- ❑ Procesor signala je obično naprava koja pojačava električni signal iz detektora – može promijeniti signal od istosmjernoga u izmjeničan ili obrnuto, mijenjati fazu signala te ga filtrirati zbog uklanjanja neželjenih komponenata, može izvoditi neke matematičke operacije na signalu – diferenciranje, integriranje, logaritmiranje.
- ❑ Uređaji za očitavanje mogu biti – uređaji za digitalno očitavanje, potenciometrijske ljestvice, pisala, monitori mikroračunala.

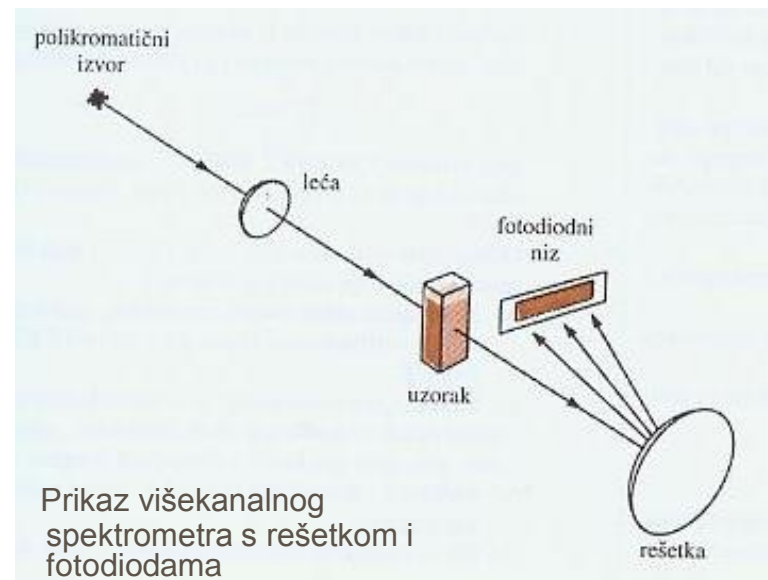
Spremnici za uzorke:

- ❑ Nazivaju se ćelijama ili kivetama – moraju imati prozore načinjene od materijala prozirnog u određenom spektralnom području.



SPEKTROMETRIJSKI INSTRUMENTI

- ❑ Sastavni dijelovi mogu biti sklopljeni na različite načine, te time nastaje niz različito konstruiranih instrumenata za spektrometrijska mjerenja.
- ❑ Izbor instrumenata određen je vrstom posla i ekonomičnošću primjene.
- ❑ Tipovi spektrometrijskih instrumenata:
 - spektroskop** – za identifikaciju elemenata u uzorku koji je ekscitiran u plamenu ili nekoj drugoj vrućoj sredini
 - kolorimetar** – instrument za apsorpcijska mjerenja koji koristi ljudsko oko kao detektor
 - fotometar** – može se primjenjivati za apsorpcijska, emisijska ili fluorescencijska mjerenja s UV, VID i IR zračenjem
 - spektrometar** – je monokromator s pukotinom učvršćenom u žarišnoj ravnini
 - spektrograf** – snima spektre na fotografsku ploču ili film smješten uzduž žarišne ravnine monokromatora
- ❑ Prema građi instrumente djelimo na:
 1. jednozračni ili jednosnopni
 2. dvozračni ili dvosnopni s prostorno razdvojenim snopovima
 3. dvozračni ili dvosnopni s vremenski razdvojenim snopovima
 4. višekanalni instrumenti





MOLEKULSKA APSORPCIJA

- ❖ Temelji se na UV, VID i IR zračenju za identifikaciju i određivanja niza anorganskih i organskih spojeva.
- ❖ IR apsorpcijska spektrometrija najčešće korištena metoda određivanja strukture anorganski i organskih spojeva.
- ❖ UV i VID apsorpcijska spektrometrija primjenjuje se prvenstveno za kvantitativnu analizu – najčešće primjenjivane metode.
- ❖ Molekulske fluorescencijske metode – važne zbog selektivnosti i izuzetne osjetljivosti, važne za kvantitativna određivanja.

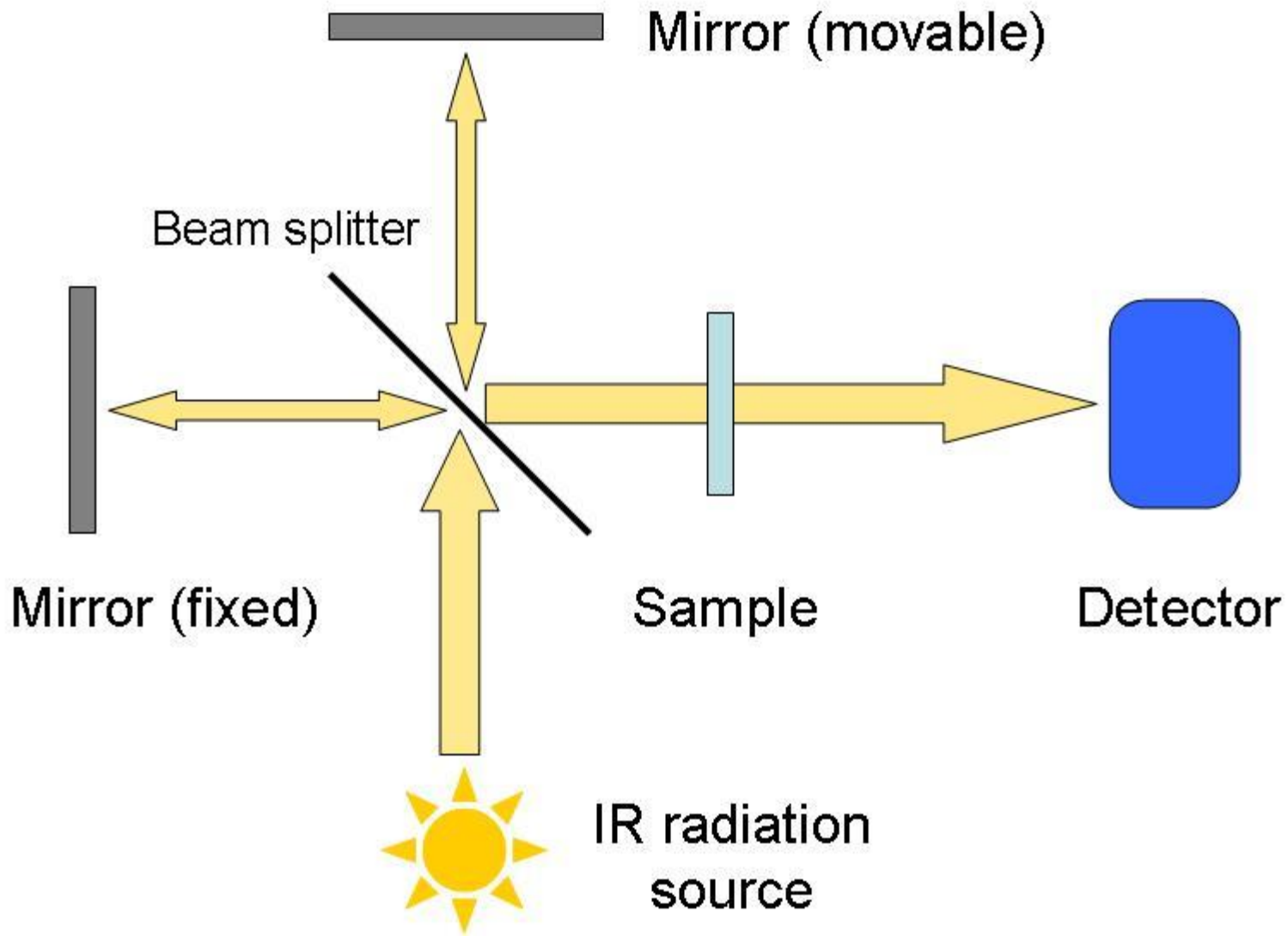
ULTRALJUBIČASTA I VIDLJIVA APSORPCIJSKA SPEKTROMETRIJA

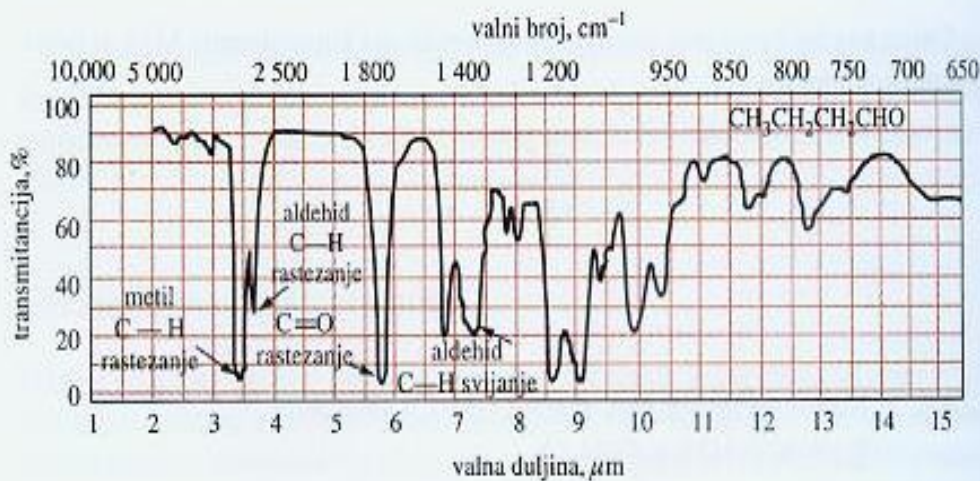
- ❖ Vrste koje apsorbiraju ultraljubičasto i vidljivo zračenje – pokazuje se u obliku jedne elektronske apsorpcijske vrpce ili više, od kojih je svaka građena od velikog broja smještenih, ali odvojenih linija.
- ❖ Svaka linija je prijelaz elektrona iz osnovnog u jedno od mnogih vibracijskih i rotacijskih energijskih stanja povezanih sa svakim pobuđenim elektronskim energijskim stanjem.
- ❖ Zbog mnogo postojećih vibracijskih i rotacijskih energijskih stanja te neznatnih međusobnih razlika njihovih energija, broj linija koje obuhvaća tipična vrpca je vrlo velik, a njihov međusobni razmak vrlo malen.
- ❖ Kod kvantitativnog određivanja može se provoditi apsorpcija:
 - organskih spojeva
 - anorganskih spojeva
 - apsorpcija prijenosa naboja – karakteristično za kompleksne spojeve
- ❖ Instrumenti za UV i VID apsorpcijsku spektrometriju su, **uzorci su smješteni između monokromatora i detektora** da bi se izbjeglo fotokemijsko razgrađivanje uzoraka:
 - fotometri
 - spektrofotometri
- ❖ Kvantitativna primjena – široka primjenjivost za ogroman broj anorganskih, organskih i biokemijskih vrsta, mnoge vrste koje ne apsorbiraju mogu se kemijskim reakcijama prevesti u derivate koji apsorbiraju, osjetljivost do 10^{-5} M, velika selektivnost (često apsorbira samo jedna vrsta spoja), velike točnosti, jednostavne i prikladne brzine.

INFRACRVENA APSORPCIJSKA SPEKTROMetriJA

- ❖ Metoda koja se primjenjuje za identifikaciju svih spojeva, osim nekoliko homonuklearnih molekula kao što su O_2 , N_2 i Cl_2 .
- ❖ Osim kiralnih molekula svaka molekulska vrsta ima jedinstven IR apsorpcijski spektar.
- ❖ U infracrvenom se području pojavljuju vibracijske apsorpcije jer je u tom području energija zračenja nedostatna za pobuđivanje elektronskih prijelaza.
- ❖ Razlike u rotacijskim stupnjevima mogu također biti uzrok nizu maksimuma za svako vibracijsko stanje, no u krutim i tekućim uzorcima rotacije su često ometane ili spriječene, te se učinci takvih malih energijskih razlika ne mogu opaziti – dakle IR spektar se sastoji od niza vibracijskih maksimuma.
- ❖ Apsorpcija IR zračenja zbiva se i u kovalentno vezanim metalnim kompleksima.
- ❖ Instrumenti se dijele u tri osnovna tipa instrumenata:
 - dispersionni spektrofotometri** – slični dvozračnim instrumentima sa zrakom podijeljenom u vremenu, uzorak se smješta između izvora i monokromatora, izvori su zagrijane krutine ili štapići, a detektori odgovaraju na toplinu a ne na fotone;
 - spektrofotometri s Fourierovom transformacijom** (FTIR) – velike osjetljivosti, podaci cijelog spektra mogu se dobiti za jednu sekundu, ne sadrže disperzni element, sve se valne duljine detektiraju i mjere simultano, dobivaju se interferogrami pomoću **INTERFEROMETRA** kojim se mjeri vrijeme zaostalog signala, za periodičke funkcije, bolji odnos šuma i signala jer se mjerenja ponavljaju pulsnom tehnikom.
 - fotometri s filtrima** – manje u uporabi za kvantitativna određivanja onečišćivala zraka

Michelsonov interferometar





Funkcionalna skupina		Apsorpcijski maksimumi	
		valni broj, cm^{-1}	valna duljina, μm
O—H	alifatska i aromatska	3600–3000	2,8–3,3
NH_2	također sekundarna i tercijarna	3600–3100	2,8–3,2
C—H	aromatska	3150–3000	3,2–3,3
C—H	alifatska	3000–2850	3,3–3,5
$\text{C}\equiv\text{N}$	nitrilna	2400–2200	4,2–4,6
$\text{C}\equiv\text{C}$	alkinska	2260–2100	4,4–4,8
COOR	esterska	1750–1700	5,7–5,9
COOH	karboksilna kiselina	1740–1670	5,7–6,0
C=O	aldehidna i ketonska	1740–1660	5,7–6,0
CONH_2	amidna	1720–1640	5,8–6,1
C=C	alkenska	1670–1610	6,0–6,2
$\phi\text{—O—R}$	aromatska	1300–1180	7,7–8,5
R—O—R	alifatska	1160–1060	8,6–9,4

Kvalitativna analiza primjenom infracrvene spektrometrije

- IR apsorpcijski spektri sadrže veliki broj maksimuma i minimuma čak i za vrlo jednostavne spojeve, maksimumi kojima se prepoznaju funkcionalne skupine nalaze se u području manjih valnih duljina IR područja (od 2,5 do 8,5 mikrometara).
- Za kompletnu identifikaciju potrebne su baze spektara.
- Energetska os IR spektra prikazuje se kao valni broj (cm^{-1}) koji je obrnuto proporcionalan valnoj duljini!!!
- Područje srednjeg IR spektra dijeli se na 2 dijela:
 - 1.) 4000-2000 cm^{-1} – grupne frekvencije, posljedica istežanja i uvijek na istim valnim brojevima
 - 2.) Ispod 2000 tj. 1500 cm^{-1} – savijanje, područje otiska prsta, tu je teško pridružiti pojedinu vrpцу pojedinoj skupini

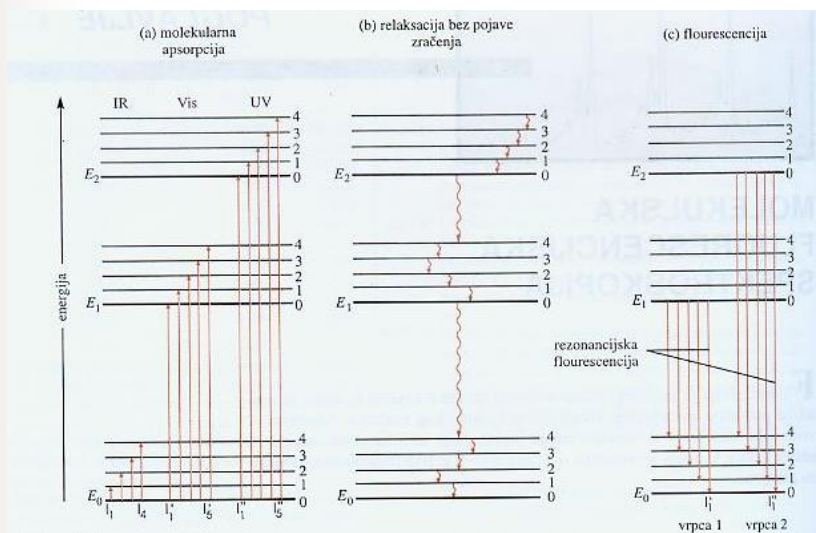
SPEKTROMETRIJA MOLEKULSKE LUMINESCENCIJE

-podrazumijeva mjerenje **emisije** fotona iz molekule:

-**emisija** može biti rezultat pobuđivanja nastalog apsorpcijom fotona – **fotoluminescencija**

-**emisija** može biti rezultat pobuđivanja proizvedenog kemijskom reakcijom – **kemiluminescencija**

-**fotoluminescencija** se dijeli na **spektrometriju fluorescencije** (promjena stanja jednakog multipliciteta-prijelaz među singletnim stanjima) i **spektrometriju fosforescencije** (prijelaz među stanjima različita multipliciteta-singletnog i tripletnog)



Dijagram energijskih razina koji pokazuje neke od energijskih promjena što se događaju pri

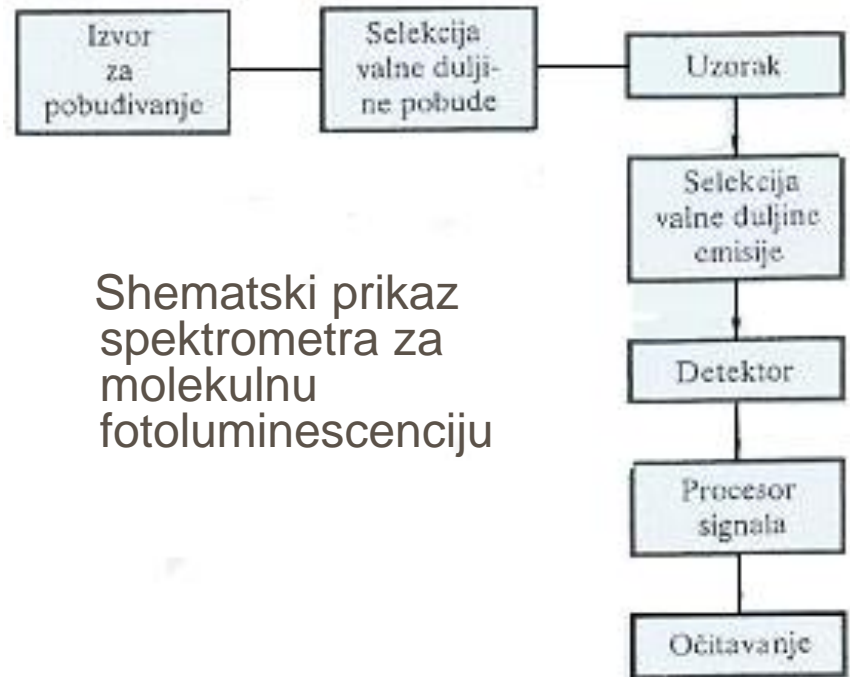
(a) apsorpciji,

(b) relaksaciji bez pojave zračenja i

(c) fluorescenciji molekularnih vrsta

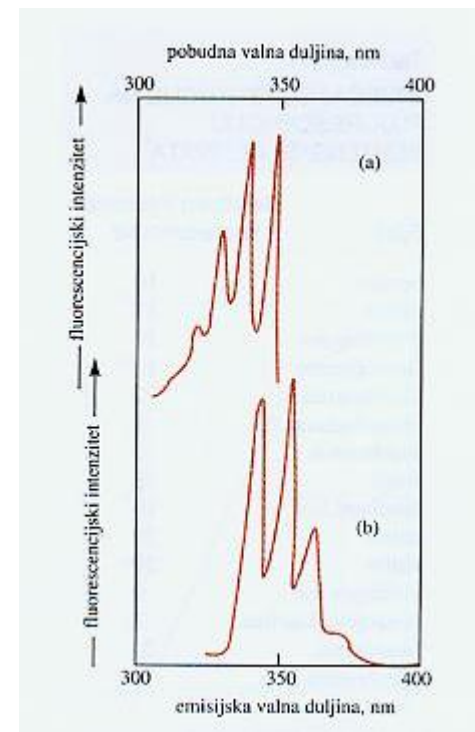
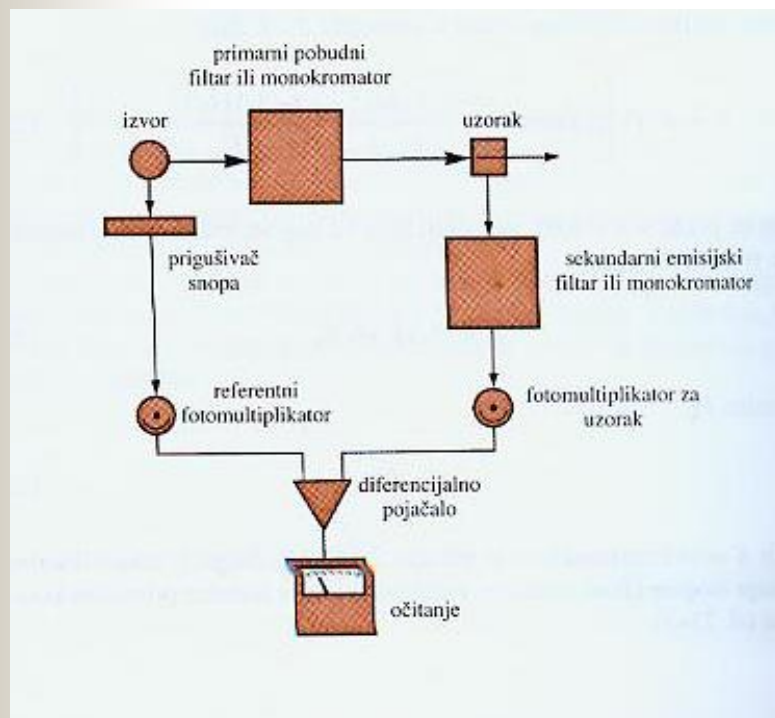
-na konstrukciju spektrometara za fotoluminescenciju (*spektrofluorimetara i spektrofosforimetara*) utjecala je potreba detektiranja vrlo niskih snaga zračenja, reda veličine pikovata

-prilikom fotoluminescentnih mjerenja luminescentni signal ili snaga luminescentnog zračenja razmjerna je snazi zračenja koju apsorbira analit



INSTRUMENTI ZA MJERENJE FLUORESCENCIJE

- ✓ Dijelovi su istovjetni onima za spektrometriju u UV/VIS području!!!
- ✓ Spektrofluorimetri primjenjuju filtre za ograničavanje pobudnog zračenja i monokromatorsku rešetku za disperziju fluorescencije uzorka.
- ✓ Neki spektrofluorimetri imaju dva monokromatora-jedan za pobudno zračenje, a drugi za fluorescenciju.
- ✓ Fluorescencijski su instrumenti uglavnom dvosnopni/dvoznačni radi kompenziranja fluktuacija snage zračenja izvora.
- ✓ Fluorescencijsko zračenje uzorka širi se u svim smjerovima, pa ga je najpogodnije promatrati pod pravim kutom u odnosu prema pobudnom snopu.





SPEKTROMETRIJA MOLEKULNE FLUORESCENCIJE

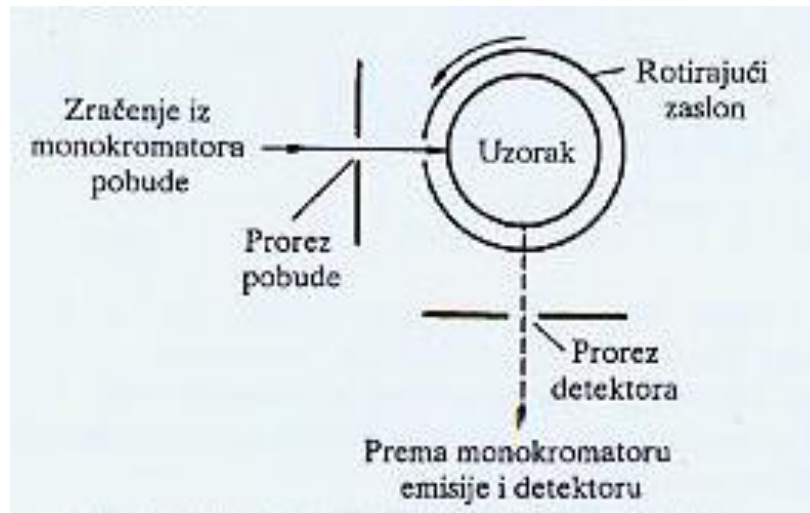
(spektrofluorimetrija)

- osniva se na mjerenju snage fluorescentnog zračenja i omogućuje kvantitativno određivanje tragova anorganskih i organskih tvari
- karakteristika je te tehnike velika osjetljivost, često uz bolju selektivnost od drugih tehnika
- primjena je, međutim, ograničena samo na one kemijske sustave koji mogu fluorescirati ($\leq 15\%$ spojeva)
- većina anorganskih fluorimetrijskih određivanja osniva se na stvaranju fluorescentnih kelata s nefluorescentnim ligandima
- tehnika se rutinski primjenjuje za određivanje mnogih vrsta organskih molekula i posebno je proširena u kliničkom i biokemijskom području (steroidi, enzimi, vitamini, proteini, medicinski agensi)
- analiza se provodi s otopinama uzoraka ili uzorcima adsorbiranim ili imobiliziranim na čvrstoj površini
- spektrofluorimetri se koriste često kao i UV/VID spektrometri kao detektori kod tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

SPEKTROMETRIJA FOSFORESCENCIJE

(spektrofosforimetrija)

- osniva se na mjerenju vremenski pomaknute luminescentne emisije
- dok je tipično vrijeme života pobuđenog elektronskog stanja oko 10^{-8} s, tvari emitiraju fluorescentno zračenje u trajanju od 10^{-8} do 10^{-4} s, a fosforescentno u trajanju duljem od 10^{-4} s, pa čak 20 s i više
- snaga fluorescencije ovisi obrnuto proporcionalno s temperaturom, ta ovisnost nije tako jaka kao prilikom fosforescencije, te činjenice utječu na konstrukciju instrumenata, naime spektrofosforimetar mora imati i sklop koji omogućuje vremenski pomak između vremena ozračivanja i vremena detekcije fosforiscencije - **rotirajući zaslon**, te ćeliju za uzorak koja omogućuje mjerenje fosforiscencije na temperaturi ukapljenog dušika - iz navedenog razloga metoda nije proširena, no ipak se najviše primjenjuje u biologiji i medicini



Upotreba rotirajućeg zaslona u provedbi mjerenja fosforescencije

FLUORESCENCIJA I STRUKTURA SPOJEVA I PRIMJENA FLUORESCENCIJE

- ❖ spojevi koji sadrže aromatske prstenove daju najintenzivnije i najupotrebljivije molekulske fluorescencijske emisije
- ❖ neki alifatski i aliciklički karbonilni spojevi kao i visoko konjugirane dvostruko vezane strukture također fluoresciraju, njihov broj je mali u usporedbi s brojem fluorescentnih spojeva koji sadrže aromatske sustave
- ❖ u većine molekula kvantna djelotvornost fluorescencije smanjuje se s povišenjem temperature, jer povećana frekvencija sudara pri povišenim temperaturama pogoduje vjerojatnosti kolizijske relaksacije, a do navedenog dolazi i kod smanjenja viskoznosti otapala
- ❖ fluorescencijske su metode općenito za jedan red veličine do tri reda veličine osjetljivije od metoda temeljenih na apsorpciji jer se njihova osjetljivost može povećati ili povećanjem snage pobudnog snopa ili pojačanjem detektorskog signala
- ❖ **za određivanje anorganskih vrsta** može se koristiti izravna (reakcija s kelatnim reagensom pri čemu nastaje kompleks koji fluorescira) i neizravna metoda (ovisi o smanjenju ili gašenju fluorescencije reagensa kao rezultat njegove reakcije s uzorkom npr. kod aniona)
- ❖ **za određivanje organskih i biokemijskih vrsta** je znatno veća – adenin, aromatski policiklički spojevi, nervni bojni otrovi, bjelančevine, organske kiseline, triptofan, flavonoidi, razni farmaceutici, izuzetno mnogo u prehrambenoj industriji, kliničkih uzoraka i prirodni spojevi

ODABRANE FLUORIMETRIJSKE METODE ZA ANALIZU ANORGANSKIH VRSTA

Ion	Reagens	Valna duljina, nm		Osjetljivost, $\mu\text{g/mL}$	Interferencije
		Apsorpcija	Fluorescencija		
Al^{3+}	alizarinski granat R	470	500	0,007	Be, Co, Cr, Cu, F^- , NO_3^- , Ni, PO_4^{3-} , Th, Zr
F^-	Al-kompleks s alizarinskim granatom R (gašenje)	470	500	0,001	Be, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, PO_4^{3-} , Th, Zr
$\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$	benzoin	370	450	0,04	Be, Sb
Cd^{2+}	2-(<i>o</i> -hidroksifenil) benzoksazol	365	plavo	2	NH_3
Li^+	8-hidroksikinolin	370	580	0,2	Mg
Sn^{4+}	flavanol	400	470	0,1	F^- , PO_4^{3-} , Zr
Zn^{2+}	benzoin	—	zeleno	10	B, Be, Sb obojeni ioni

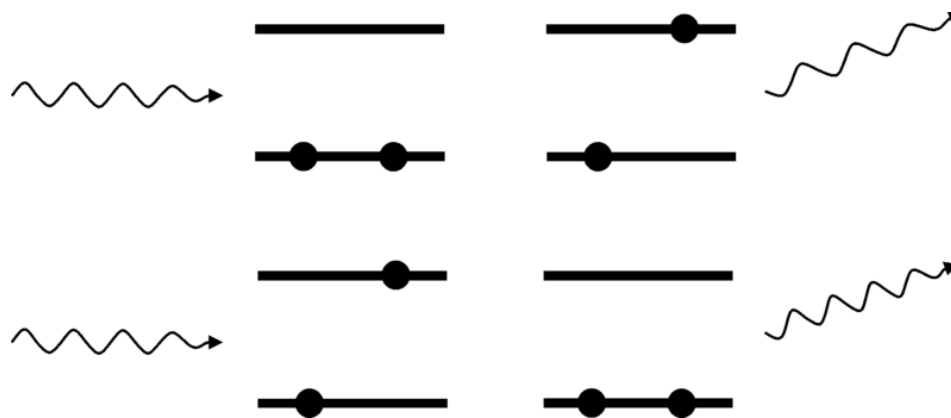
SPEKTROMETRIJA RASPRŠENJA

-spektrometrija Ramanova raspršenja

- Osniva se na mjerenju Ramanova raspršenog zračenja koje može nastati kada se molekule ozrače prikladnim monokromatskim zračenjem.
- Ramanovo raspršeno zračenje mali je dio (<1%) od ukupnog raspršenog zračenja, a frekvencija mu je različita od frekvencije upadnog zračenja.
- Za razliku od Rayleighova raspršenja, koje je posljedica elastičnog sudara, **Ramanovo raspršenje uključuje neelastičan sudar molekule i fotona**-nastaje promjena energije!!!
- Promjena energije može biti pozitivna ili negativna, tj. raspršeno zračenje može imati manju frekvenciju (Stokesova linija) ili veću frekvenciju (anti-Stokesova linija).
- Da bi molekulne vibracije u Ramanovom spektru bile aktivne pri toj vibraciji mora se mijenjati polarizabilnost molekule-polarizacija molekule pod djelovanjem električnog polja.
- Instrumentacija se razvija sve više sa novim tehnologijama – uvođenje laserskih izvora!!!

- Standardni Ramanov spektrometar sastoji se od: **laserskog izvora (argon-ionski laser ili kripton-ionski laser), ćelije za uzorak, selektora valnih duljina, detektora i sustava za procesiranje signala.**
- Raspored komponenata u instrumentu je takav da se raspršeno zračenje mjeri pod kutom (najčešće 90°) prema upadnom zračenju.
- Izbor valne duljine izvora tu je posebno važan radi postizanja velikih intenziteta Ramanovih linija uz što manji fotoraspad uzorka, fluorescenciju i apsorpciju.
- Selektori valnih duljina moraju postizati potrebnu rezoluciju ($<5 \text{ cm}^{-1}$) i odvajati relativno slabe Ramanove od Rayleighova raspršenog zračenja.
- Uvođenje holografskih rešetki omogućilo je otklanjanje lutajućeg zračenja.
- Kao detektori najčešće se koriste fotomultiplikatorske cijevi.
- IR i Ramanovi spektri imaju mnogo sličnosti, no velika je razlika u instrumentaciji, ali i pri rukovanju s uzorcima!!!
- ***Prednost Ramana prema IR tehnici je u mogućnosti upotrebe vode kao otapala, stakla i kremenog stakla kao materijala za optičke elemente i ćelije, upotreba standardnih detektora kao i kod UV/VID spektrometrije, mogućnost pokrivanja čitava područja vibracijskih frekvencija jednim instrumentom, intenziteti Ramanovih linija upravo su razmjerni koncentraciji analita.***

- No, IR spektrometrija ima veću osjetljivost na male strukturne razlike, nižu cijenu instrumentacije, te mogućnost usporedbe rezultata dobivenih na različitim instrumentima.
- **Rezultati se kod Ramana ne mogu uspoređivati zbog velike ovisnosti o snazi lasera, geometriji ćelije i karakteristikama instrumenata.**
- Raman i IR tehnike se nadopunjuju!!!
- Ramanova se spektrometrija može upotrijebiti za mikrouzorke, za analizu površina, tankih slojeva, prahova, otopina i plinova, široka je primjena u kvalitativnoj i kvantitativnoj i strukturnoj analizi organskih i anorganskih uzoraka, a važna primjena u biologiji!



Ramanovo raspršenje

Foton koji odlazi od sustava nema jednaku energiju kao i foton koji je došao na sustav. Sustav **Ramanovim raspršenjem** dobiva ili gubi energiju. Razlika u energiji sustava, prije i nakon **Ramanovog raspršenja** odgovara razlici energija dolazećeg i odlazećeg fotona. Ukoliko odlazeći foton ima nižu energiju od dolazećeg fotona (sustav je raspršenjem dobio energiju), raspršenje se naziva **Stokesovo raspršenje**, u suprotnom slučaju raspršenje se naziva **antistokesovo raspršenje**.

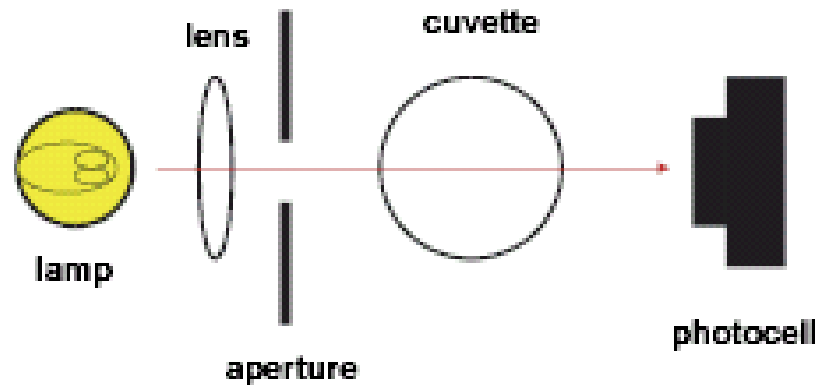


SPEKTROMETRIJA RASPRŠENJA

-Turbidimetrija i nefelometrija

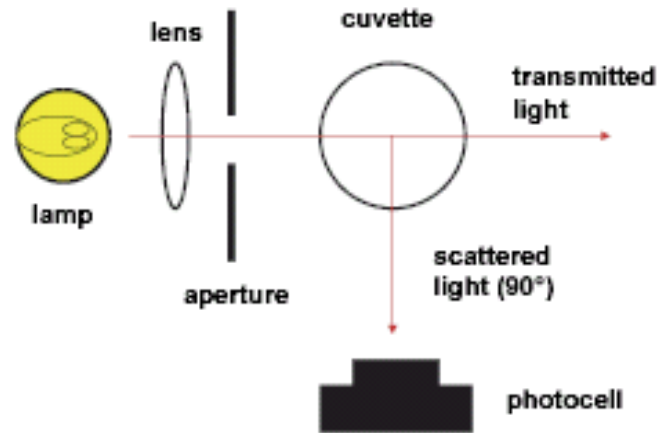
- Ovim metodama se određuje koncentracija čestica u suspenziji, a osniva se na elastičnom raspršenju EMZ na suspendiranim česticama u otopini.
- Mjeri se smanjenje intenziteta prolaznog zračenja ili intenzitet raspršenog zračenja kao posljedicu sraza sa česticama-Tyndallov efekt.
- Optimalna veličina čestica da bi došlo do raspršenja je 100-1000 nm – veličine 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 – često zamjenjuje gravimetriju.
- U turbidimetriji se mjeri transmitacija primarne zrake, primjenjuje se Beerov zakon pri čemu se mjeri zamućenje $S!!!$

- Parametri koji utječu na turbidimetrijsko određivanje su:
 - koncentracija čestica,
 - odnos indeksa loma čestice i okolnog medija,
 - veličina, oblik i raspodjela čestica,
 - valna duljina ulaznog zračenja.
- U turbidimetriji se koriste instrumenti slični ili isti kao i kod UV/VIS spektrometrije!!!



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.



Blok shema nefelometra s okruglim kivetama

- Nefelometrijska mjerenja su pogodna za analizu otopina slabog zamućenja.
- Sustavi se 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.
- 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).

2 Molekulske spektrometrije

2.1 Tehnike kod kojih mjerimo elektromagnetsko zračenje

2.2.1 *Spektrometrije apsorpcije i inducirane apsorpcije*

2.2.1.1 Molekulska apsorpcija u UV i VID

2.2.1.2 IR spektrometrija

2.2.1.3 Spektrometrija apsorpcije mikrovalnog zračenja

2.2.1.4 Spektrometrija inducirane apsorpcije (NMR)

2.2.2 *Spektrometrije emisije*

2.2.2.1 Molekularna luminiscencija (fluorescencija i fosforescencija)

2.2.3 *Spektrometrije raspršenja*

2.2.3.1 *Turbidimetrija i nefelometrija*

2.2.3.2 Spektrometrija ramanovog raspršenja

2.2.4 *Spektrometrije polarizacije*

2.2.4.1 Spektropolarimetrija

2.2. Tehnike kod kojih mjerimo zračenje iona

2.2.1 *Spektrometrije raspršenih iona*

2.2.2 Masena spektrometrija (omjer mase i naboja)

2.3 Tehnike kod kojih mjerimo toplinsko zračenje

2.3.1 *Fotoakustična spektrometrija*

2.3.2 *Spektrometrija toplinskom lećom*

NUKLEARNA MAGNETSKA REZONANCIJA (NMR)

- Vrlo rasprostranjena metoda za ispitivanje strukture organskih spojeva. Podaci o strukturi molekule dobivaju se ispitivanjem magnetskih svojstava pojedinih atoma unutar molekula.
- Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) je spektroskopska metoda koja se temelji na interakciji magnetskog momenta jezgre s primijenjenim magnetskim poljem uz pobudu jezgre radiofrekventnim zračenjem.
- Preko 100 elemenata se može detektirati spektroskopijom NMR, ali od najveće praktične važnosti u organskoj kemiji su izotop vodika (^1H) i manje zastupljeni izotop ugljika (^{13}C) jer su to elementi koji su najčešće prisutni u organskim spojevima. Druge jezgre od koristi za organske kemičare kojima se mogu dobiti NMR spektri su ^2H , ^{15}N , ^{17}O , ^{19}F i ^{31}P .
- Atomska jezgra ima kvantni broj spina I čija vrijednost ovisi o broju protona i neutrona od kojih se jezgra sastoji

Tablica 1: Ovisnost kvantnog broja spina I o sastavu jezgre

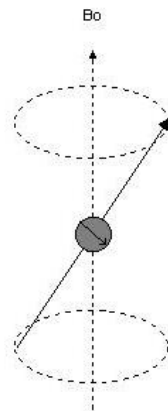
Broj protona	Broj neutrona	Kvantni broj spina I
paran	paran	0
neparan	neparan	cijeli broj (1,2,...)
neparan	paran	polucijeli broj
paran	neparan	(1/2,3/2,...)

- Efekt nuklearne magnetske rezonancije pokazuju kemijski elementi čije jezgre imaju neparni broj protona ili neutrona, te zbog te unutarnje asimetrije rotiraju oko svoje osi - imaju spin.
- Kao posljedica kružnih struja koje nastaju rotacijom električnog naboja oko osi jezgre inducira se magnetsko polje. Magnetski moment (μ), koji je mjera za jačinu nastalog magnetizma proporcionalan je kutnom momentu (P), a γ je žiromagnetska konstanta, prirodna konstanta svake jezgre :

$$\mu = \gamma P$$

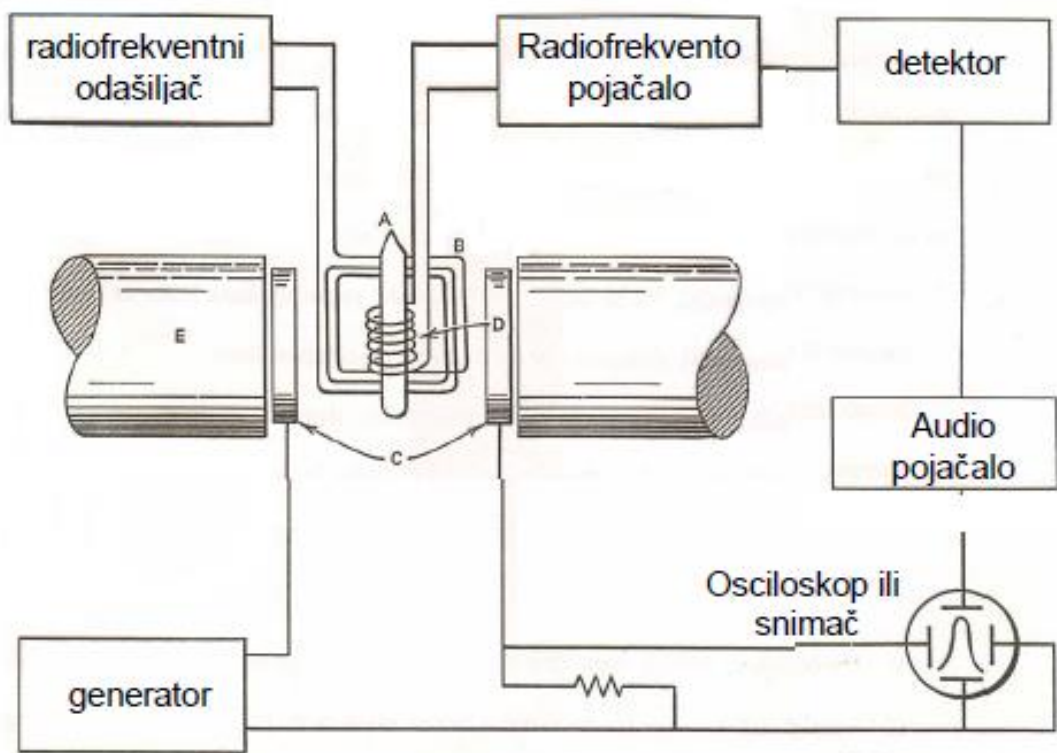
- Žiromagnetska konstanta za ^1H jezgre je približno 4 puta veća od žiromagnetske konstante ^{13}C .
- Magnetski moment i kutni moment su vektorske veličine, imaju iznos i smjer. Prema dogovoru kao smjer z-osi uzima se smjer vanjskog magnetskog polja B_0 .
- Vektor magnetskog momenta jezgre u vanjskom magnetskom polju zauzima jednu od mogućih orijentacija određenih komponentom μ_z odnosno magnetskim kvantnim brojem m i precesira oko z-osi Larmorovom frekvencijom ν .

$$\nu = -\frac{\gamma B_0}{2\pi}$$



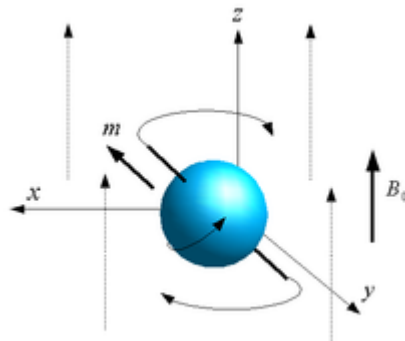
Precesija vektora magnetskog momenta oko z-osi u vanjskom magnetskom polju B_0 .

- Uzorak za analizu stavlja se u staklenu cjevčicu smještenu između polova snažnog magneta, cjevčica je unutar uzvojnica spojenih na izvor i prijemnik elektromagnetskog zračenja (RF-oscilator i RF-prijemnik).
- Uzorci se obično otapaju u oko 0,5 mL otapala koja ne sadrže protone, kao na primjer tetraklorugljik (CCl_4) ili deuterirani kloroform (CDCl_3), tako da se opažaju samo protoni uzorka.
- Cjevčica s uzorkom obično brzo rotira.
- NMR spektroskopijom mogu se analizirati i čvrste tvari i plinovi.



Shema spektrometra nuklearne magnetske rezonancije.

- Za bolje razumijevanje koristiti će se vodikova jezgra za tumačenje principa NMR metode.
- Proton se može promatrati kao pozitivno nabijena čestica koja se okreće oko svoje osi, pritom se stvara slabo magnetsko polje u smjeru osi vrtnje – spina.
- Ako se proton nađe pod utjecajem vanjskog magnetskog polja B_0 , on će se usmjeriti paralelno ili antiparalelno prema smjeru tog polja.



- Paralelna orijentacija ima nižu energiju, no to su vrlo male razlike.
- Od milijun jezgara one s nižim energetske stanjem spina su pri 25 °C u višku samo 10 jezgara prema jezgrama sa spinom više energije.
- Zajedničkim djelovanjem vanjskog magnetskog polja i radiozračenja za vrijeme NMR analize jezgre se energetske perturbiraju, odnosno prelaze iz paralelnog u antiparalelno stanje.
- Kada se energija, koja se prenosi na jezgre, mijenja kontinuiranom promjenom magnetskog polja ili radiofrekvencije govorimo o instrumentu koji radi **tehnikom kontinuiranog vala**.
- Većina NMR spektrometara radi na navedeni način uz primjenu stalne radiofrekvencije, a jakost magnetskog polja mijenja se prilikom snimanja spektra.

- Kad se energija koju je primila jezgra izjednači s razlikom energija stanja spina, postignut je uvjet za **nuklearnu magnetsku rezonanciju**.
- Energija se apsorbira kad se jezgra “zakrene” iz jednog stanja spina u drugo.
- Apsorpciju i potom emisiju energije vezanu uz zakretanje spina detektira radiofrekvencijski prijemnik, što se naposljetku bilježi kao signal u NMR-spektru.
- Razlika energija dvaju stanja spina određena je pojedinim vrstama jezgara i jakošću magnetskog polja koje djeluje na te jezgre.
- Frekvencija pri kojoj se postiže rezonancija proporcionalna je jakosti magnetskog polja kojem je izložena jezgra.
- Porast jakosti magnetskog polja spektrometra omogućuje bolje razlučivanje rezonancijskih signala u NMR spektru.
- Danas se može postići odlično razlučivanje na instrumentima sa superprovodljivim magnetima hlađenim tekućim helijem kombiniranim s radiofrekvencijskim oscilatorima frekvencije više od 500 MHz.
- Tehnika kontinuiranog vala daje dobre ^1H -NMR spektre koji se snimaju 5-10 minuta, a potrebno je 50-100 mg uzorka, ponekad i manje.
- U NMR je bitna i ugljikova jezgra, i to ne ^{12}C jer nema magnetski moment, već ^{13}C , no njegova osjetljivost je 64 puta manja od protonskog, a ujedno mu je prirodni udio svega 1,1%, tako da su signali u ^1H -NMR spektru određenog uzorka oko 6000 puta intenzivniji nego u ^{13}C -NMR spektru.
- Taj problem je riješen višestrukim ponavljanjem snimanja ^{13}C -NMR spektra čime se pojačava intenzitet signala, ali i šuma instrumenta, i sama snimanja su u tim slučajevima bila dugotrajna, no sve se je promijenilo primjenom **Fourierovih transformacija (FT)** - pri čemu se sve jezgre pobuđuju istodobno jednim vrlo kratkim elektronskim pulsom i analizira se izlazni signal dobiven iz nuklearnog opuštanja (relaksacije).

o Osnovni NMR parametri su:

-Kemijski pomak

-Vrijeme relaksacije ili opuštanja

-Konstanta sprege

-Nuklearni Overhauserov efekt (NOE)

o Kemijski pomak

➤ Položaj signala u NMR spektru naziva se kemijski pomak.

➤ Kemijski pomak jezgre odražava njenu elektronsku okolinu - on je funkcija elektronske gustoće oko jezgre i ovisi o tzv. **konstanti zasjenjenja (σ)**.

➤ Iznos konstante zasjenjenja suma je paramagnetskog i dijamagnetskog doprinosa elektrona, doprinosa susjednih atoma i doprinosa otapala i ne ovisi o vanjskom magnetskom polju.

➤ Kemijski pomak je posljedica činjenice da na jezgre ne djeluje samo magnetsko polje koje se primjenjuje u eksperimentu već individualno magnetsko polje koje je posljedica superpozicije primijenjenog magnetskog polja i lokalnog magnetskog polja induciranog gibanjem elektrona oko jezgre suprotnog smjera od primijenjenog magnetskog polja.

➤ Dakle, kad bi promatrali jezgru vodika bez utjecaja elektronskog oblaka dobili bi jedan jedini signal. No, jezgre vodika nalaze se u različitim funkcionalnim grupama, različito zasjenjenim elektronskim oblakom, ovisno o konfiguraciji dotične skupine i susjednih skupina.

➤ Kad energija koja djeluje na pojedinu jezgru zadovolji vrijednost potrebnu za rezonanciju, ona se apsorbira, a prouzročena emisija se registrira uz pomoć uzvojnice radiofrekvencijskog prijemnika-dogovorno spektar se snima slijeva na desno u smjeru povećanja magnetnog polja.

niže polje $\xrightarrow{B_0}$ više polje

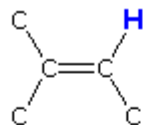
- Većina funkcionalnih skupina nalazi se u ^1H -NMR spektru od 0-10 ppm. Raspon ^{13}C kemijskih pomaka je uglavnom od 0 do 250 ppm.
- Kao referentna tvar najčešće se koristi tetrametilsilan (TMS) koji daje jedan signal i u ^1H i ^{13}C NMR spektrima na višim poljima kod većine poznatih molekula. Desno od TMS su negativne vrijednosti, a lijevo pozitivne vrijednosti kemijskih pomaka.
- **Bez obzira da li spektrometar radi pri stalnoj frekvenciji uz promjenu polja, ili pri stalnom polju uz promjenu frekvencije, kemijski pomaci se izražavaju jedinicama frekvencije (Hz).**
- Budući da energija potrebna za rezonanciju pojedine jezgre ovisi o frekvenciji instrumenta i jakosti polja, kemijski pomaci istog uzorka izraženi u Hz razlikuju se na različitim instrumentima ovisno o tim karakteristikama, pa se za jednostavniju usporedbu spektara koristi ljestvica δ -vrijednosti koje ne ovise o frekvenciji, kao dijelovi na milijun (ppm).
- **Kemijski pomak** se obično izražava u δ -skali prema izrazu:

$$\delta / ppm = \frac{\nu_{rez} - \nu_{ref}}{\nu_{ref}}$$

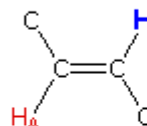
-gdje je ν_{rez} rezonantna frekvencija jezgre u molekuli, a ν_{ref} rezonantna frekvencija jezgre iz referentnog spoja

-tako definirana vrijednost kemijskog pomaka neovisna je o B_0 i ovisi samo o konstanti zasjenjenja jezgre

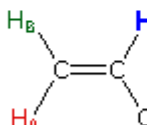
No Coupled
Hydrogens



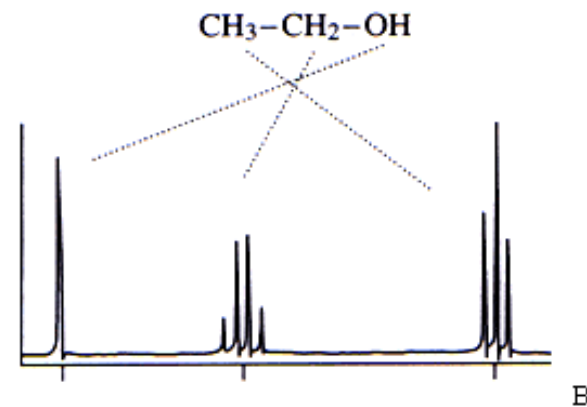
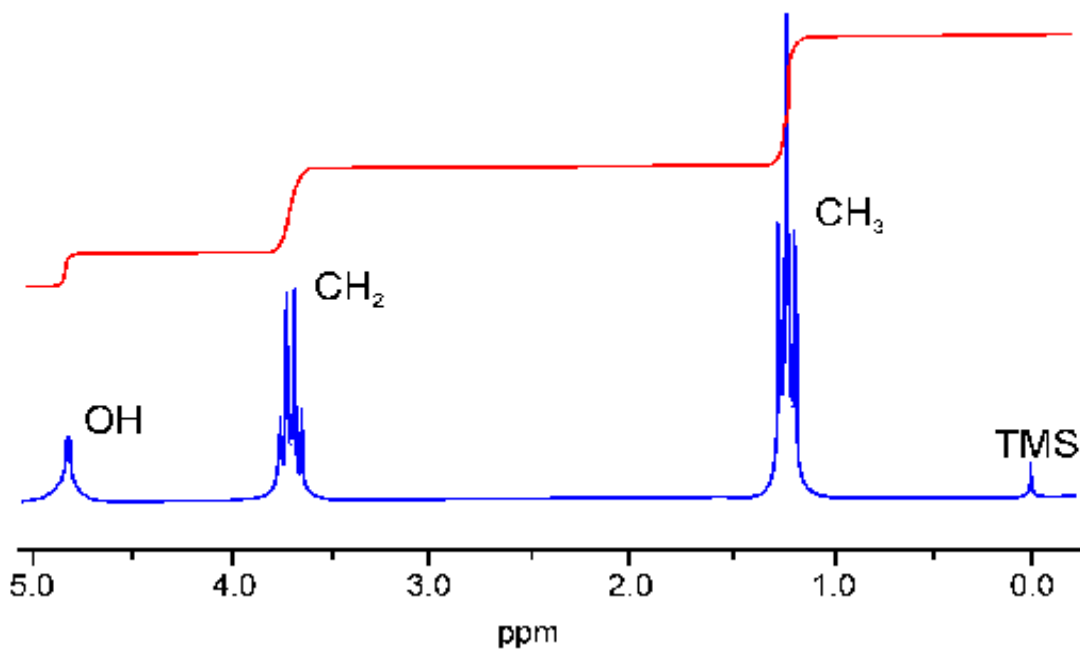
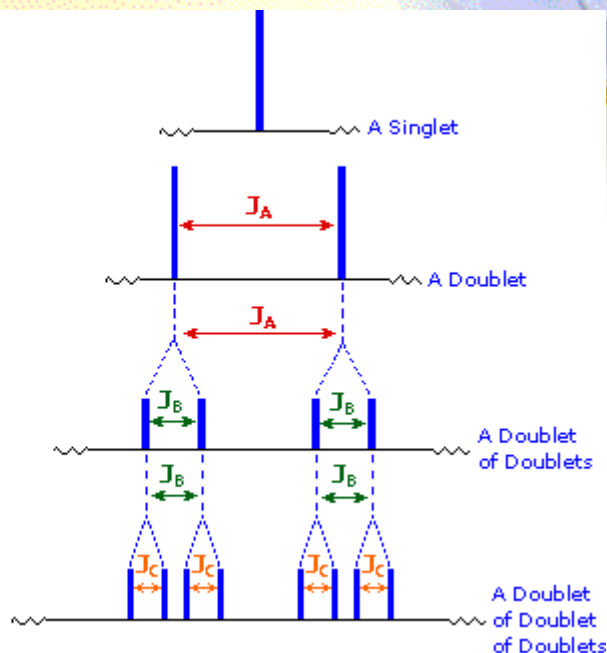
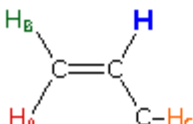
One Coupled
Hydrogen



Two Coupled
Hydrogens



Three Coupled
Hydrogens



B

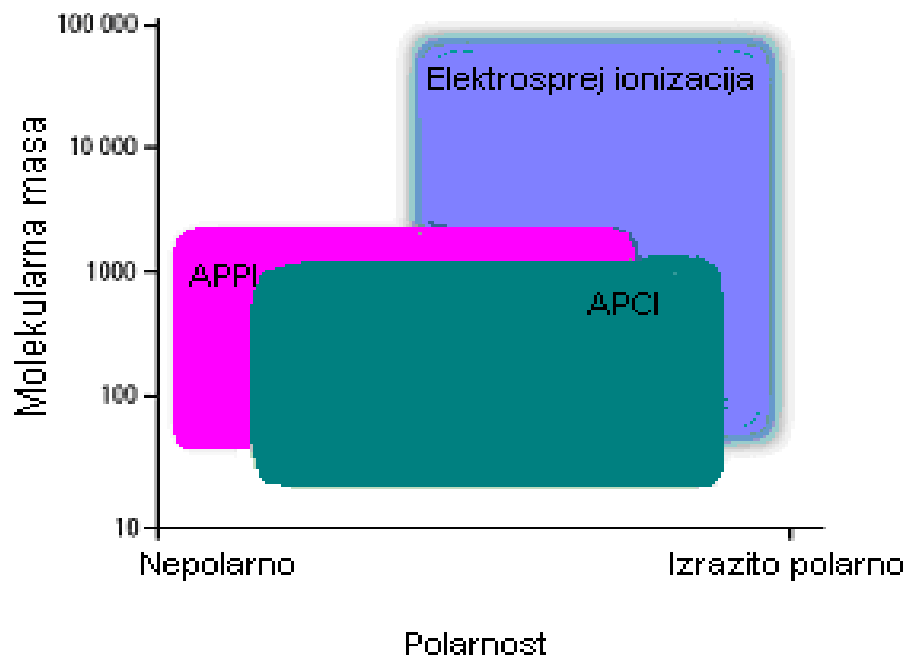
SPEKTROMETRIJA MASA

[ILI MASENA SPEKTROMETRIJA (MS)]

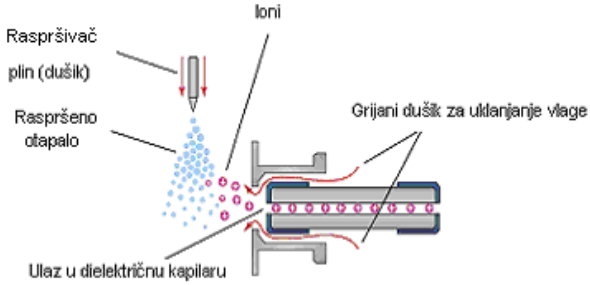
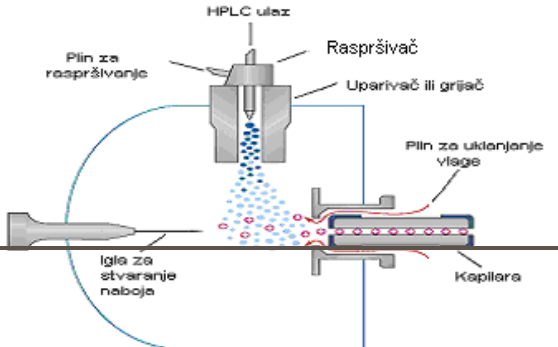
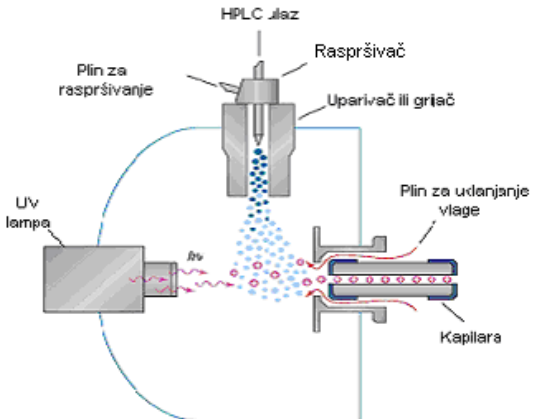
- Analitička metoda u kojoj se molekule ioniziraju, a potom se ioni razdvajaju prema njihovoj masi.
- Primjenjuje se za određivanje relativnih molekulskih masa, a preko njih molekulskih formula, pri čemu se dobivaju važni podaci o strukturi molekule.
- Spektrometrija masa uključuje dva procesa:
 - **PROCES IONIZACIJE UZORKA**
 - **ZATIM SLIJEDI RAZDVAJANJE I ODREĐIVANJE IONA.**
- **IONIZACIJA UZORKA**
 - U MS metodi najčešće se stvaraju pozitivni ioni, no mogu se stvarati i negativni ioni!!!
 - Princip je bombardiranje molekula uzorka u plinovitom stanju pri visokom vakuumu snopom elektrona koji mogu izbaciti iz nekih molekula elektrone pri čemu nastaje **molekulski ion (M^+)**, **elektronsko bombardiranje** jedan je od najstarijih načina ionizacije. Molekulski ioni obično nastaju djelovanjem snopa elektrona energija oko 70 elektronvolti te su visoko aktivirani, te nastupa fragmentiranje u manje ione, čijom analizom se može odrediti struktura molekule.

- **Kemijska ionizacija** je postupak u kojem ioni nastaju reakcijom molekula uzorka s ionima nastalim u nekom drugom procesu (reakcije ion-molekula). Često se uz pomoć elektronskog bombardiranja stvaraju ioni, koji zatim sudjeluju u reakcijama ion-molekula. Npr. od metana se izvodi ion koji se obično koristi za poticanje kemijske ionizacije uzorka. Kod kemijske ionizacije molekule primaju znatno manje energije nego pri udaru elektronima, čime je fragmentiranje svedeno na minimum što omogućava lakše utvrđivanje molekulskog iona i olakšava strukturnu analizu.
- **Bombardiranje brzim atomima** uzorak se bombardira snopom iona ili atoma visoke energije, najčešće se upotrebljavaju u tu svrhu argon i ksenon, a ioni se izbijaju iz analiziranog uzorka. Ova metoda ionizacije se za razliku od prvih dviju primjenjuje na čvrste uzorke velike molekulске mase koje se ne mogu ispariti.

Primjena
različitih MS
ionizacijskih
tehnika



Tablica 2: Vrste različitih MS ionizacijskih tehnika i njihova primjena

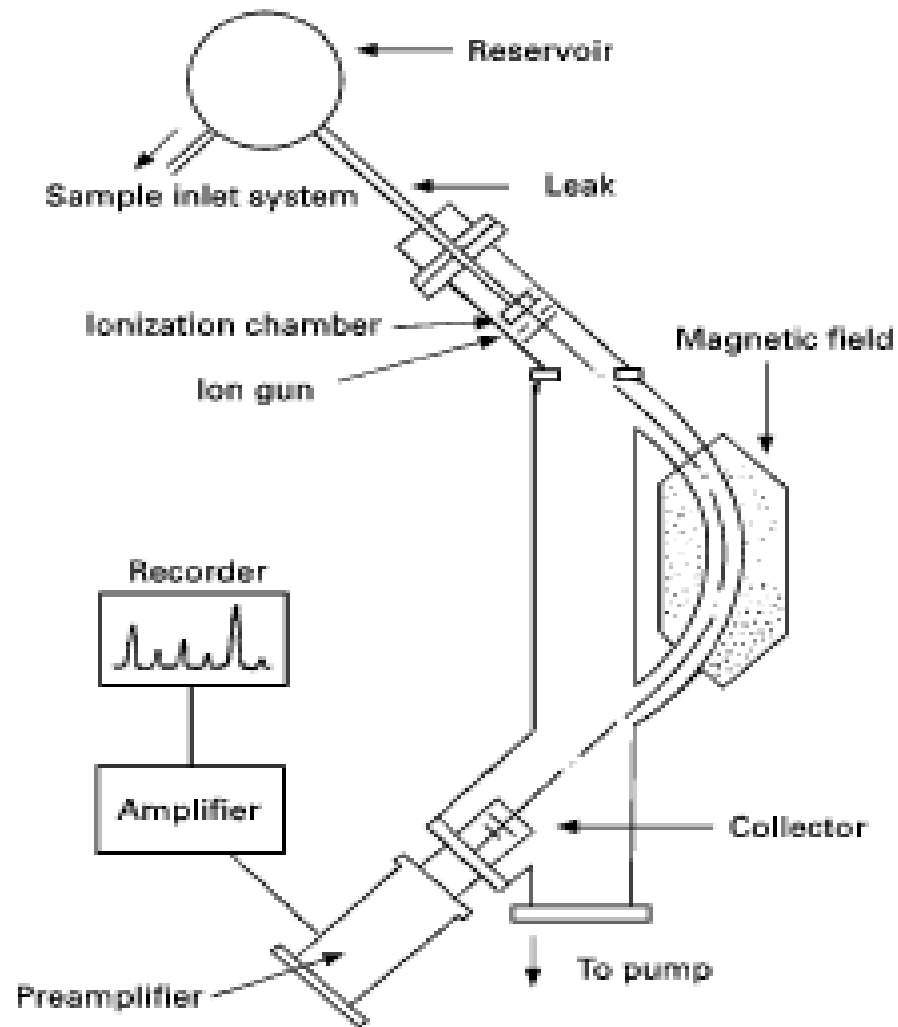
MS ionizacijska tehnika	Primjena
<p>ESI</p>  <p>Raspršivač plin (dušik) Raspršeno otapalo Ioni Grijani dušik za uklanjanje vlage Ulaz u dielektričnu kapilaru</p>	<p>-za određivanje molekularne mase i strukture spojeva velikih ionskih molekula kao što su proteini, peptidi i oligonukleotidi, no može se primjeniti i za manje molekule -ionizacija može dati i pozitivne i negativne ione [ESI(+)] i (-)]</p>
<p>APCI</p>  <p>HPLC ulaz Plin za raspršivanje Raspršivač Uparivač ili grijač Plin za uklanjanje vlage Igla za stvaranje naboja Kapilara</p>	<p>-za određivanje molekularne mase i strukture molekula <2000, spojevi mogu biti i polarni i nepolarni -ionizacija može dati i pozitivne i negativne ione [APCI(+)] i (-)]</p>
<p>APPI</p>  <p>HPLC ulaz Plin za raspršivanje Raspršivač Uparivač ili grijač Plin za uklanjanje vlage Uv lampa Kapilara</p>	<p>-za određivanje molekularne mase manje polarnih spojeva -ionizacija može dati i pozitivne i negativne ione [APPI(+)] i (-)]</p>

Ionizacijske tehnike koje se koriste su:

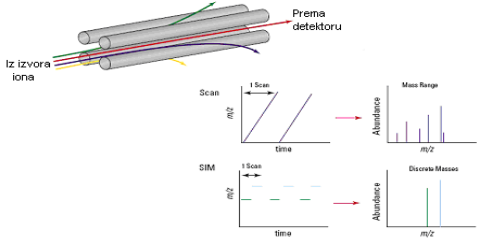
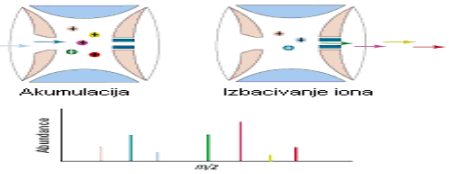
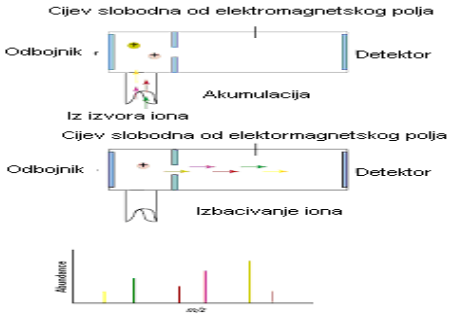
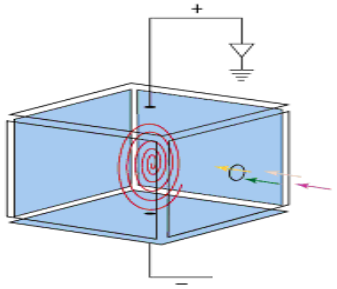
- 1.) elektrosprej ionizacija (ESI= *Electrospray Ionization*)
- 2.) kemijska ionizacija kod atmosferskog tlaka (APCI= *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)
- 3.) fotoionizacija kod atmosferskog tlaka (APPI= *Atmospheric Pressure Photoionization*)

o RAZDVAJANJE I ODREĐIVANJE

- **Instrumenti s magnetskim sektorom** su najstariji, ali još u širokoj primjeni za razdvajanje iona različitih masa. Snima uz promjenu magnetskog polja ili brzine iona.
- Nastali ioni se ubrzavaju u evakuiranom magnetskom dijelu instrumenta. Pri prolazu kroz magnetsko polje ioni dobivaju **otklon razmjernan njihovoj brzini, naboju i masi** – veličina otklona obrnuto je proporcionalna masi fragmenata. Fragmenti manje mase više su otklonjeni od fragmenata veće mase. Ioni na kraju ulaze u **sakupljač** gdje se određuju. U sakupljaču iona se dobiva elektronski signal odnosno dobiva se **spektar masa**.
- Spektar masa pokazuje omjer mase i naboja (m/z) s obzirom na **relativan intenzitet** (učestalost) pojedinačnog fragmenta!!! Najintenzivniji ili najviši signal naziva se **osnovni signal**, koji se koristi kao standard prema kojem se izražava udio ostalih signala, pri čemu se dogovorno osnovnom signalu pripisuje vrijednost 100.
- Noviji i jednostavniji instrumenti za razdvajanje iona koriste se **kvadrupolnim analizatorom masa** – dio u kojem se razdvajaju ioni sastoji se od četiri štapića koji stvaraju oscilirajuće električno polje. Ioni nastali u ionizacijskoj komori dovode se u evakuirani prostor između štapića. Samo ioni s određenim m/z tijekom prolaza kroz električno polje rezoniraju s kvadrupolnom frekvencijom. Ostali ioni su izvan rezonancije i nemaju stabilnu putanju te se ne usmjeravaju prema detektoru. Negativna strana je što mu moć razdvajanja iona znatno opada kod uzoraka s relativnom molekulskom masom većom od 1000.



Tablica 3: Maseni analizatori u MS sustavima

Maseni analizatori	Karakteristike analizatora
<p>Q</p> 	<ul style="list-style-type: none"> -lagan za rukovanje -niske cijene -visoke osjetljivosti kod analize izabranog iona (SIM mode) -izvrstan za kvantifikaciju -nedostatak mu je što se ne mogu dobiti točne mase -manje brzine skeniranja ili snimanja od TOF
<p>IT</p> 	<ul style="list-style-type: none"> -mogućnost brzog skeniranja -dobra rezolucija -dobro definirani putovi fragmentacije iona uz detaljnu interpretaciju -nema informaciju o točnoj masi -veće osjetljivosti od QQQ, ali manje fragmentacije od QQQ
<p>TOF</p> 	<ul style="list-style-type: none"> -dobiva se točna informacija o masi iona -visoke rezolucije -brzo skeniranje i dobra osjetljivost skeniranja -nema mogućnosti vezanja u MS/MS sustav bez uporabe CID moda
<p>FT-ICR</p> 	<ul style="list-style-type: none"> -može se vezati u više stupnjeva kao MS/MS bez dodatnog masenog analizatora, kao i IT -pokriva širok spektar masa uz izvrsnu rezoluciju -najskuplji je od svih masenih analizatora

Kod MS sustava kao analizatori masa mogu se koristiti:

- 1.) kvadrupolni analizator koji se sastoji od četiri štapa pod elektromagnetskim poljem (Q=**Quadrupole**)
- 2.) analizator koji zarobi ion u šupljini (IT=**Ion Trap**)
- 3.) analizatori koji mjere vrijeme putovanja iona kroz cijev nakon pobude elektrostatskom silom (TOF=**Time-of-Flight**)
- 4.) analizatori gdje ioni ulaze u ciklotron te nakon elektromagnetske pobude ovisno o masi izlaze iz komore do detektora (FT-ICR=**Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance**)
- 5.) te njihove kombinacije koje se mogu vezati jedna na drugu (MS/MS).

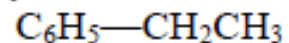
Tablica prikazuje shematske prikaze analizatora masa i njihove osnovne karakteristike.

Ioni nakon analizatora masa dolaze na detektor, a u MS sustavu kao detektori se koriste elektronsko pojačalo i mikrokanalna ploča.

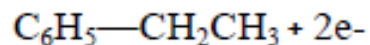
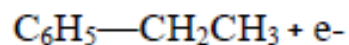


Electron Ionization Example

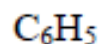
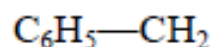
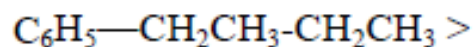
Ethylbenzene M.W. 106



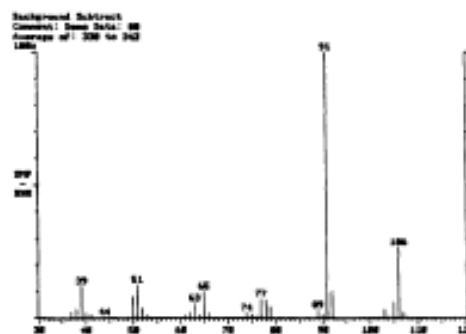
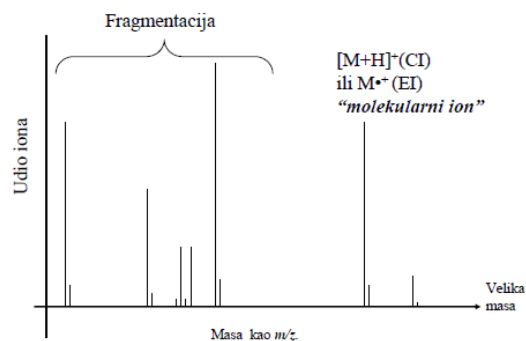
- Molecular Ion Formation (7 to 15 eV)



- Molecular Fragmentation (50 to 70 eV)



MASENI SPEKTAR



Most Stable Fragment

