

Ово дело је заштићено лиценцом Креативне заједнице Ауторство – некомерцијално – без прерада¹.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.



¹ Опис лиценци Креативне заједнице доступан је на адреси creativecommons.org.rs/?page_id=74.

"Сва права задржава издавач. Забрањена је свака употреба или трансформација електронског документа осим оних који су експлицитно дозвољени Creative Commons лиценцом која је наведена на почетку публикације."

"Sva prava zadržava izdavač. Zabranjena je svaka upotreba ili transformacija elektronskog dokumenta osim onih koji su eksplicitno dozvoljeni Creative Commons licencom koja je navedena na početku publikacije."



**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU I
ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE**



Spektroskopske i spektrometrijske metode u analizi životne sredine

-praktikum-

Dr Malcolm Watson

Dr Jelena Molnar Jazić

Dr Snežana Maletić

Dr Jelena Beljin

Dr Marijana Kragulj Isakovski

Dr Jasmina Nikić

Novi Sad, 2021.

ISBN: 978-86-7031-603-4

Autori

Dr Malcolm Watson, docent Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu
Dr Jelena Molnar Jazić, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu
Dr Snežana Maletić, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu
Dr Jelena Beljin, docent Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu
Dr Marijana Kragulj Isakovski, vanredni profesor, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu
Dr Jasmina Nikić, naučni saradnik, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

Recenzenti

Dr Branislav Jović, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu
Dr Miljana Prica, redovni profesor Fakulteta tehničkih nauka u Novom Sadu

Izdavač

Univerzitet u Novom Sadu,
Prirodno-matematički fakultet,
Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine,
21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

Glavni i odgovorni urednik

Profesor dr Milica Pavkov Hrvojević, dekan
Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

Praktikum je odobren za štampu i upotrebu na V sednici Nastavno-naučnog veća Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu održanoj 14.01.2022. godine (rešenje broj 6002-07-488/21-6 od 19.01.2022. godine).

CIP - Каталогизација у публикацији
Библиотеке Матице српске, Нови Сад

543.42(075.8)(076)

SPEKTROSKOPSKE i spektrometrijske metode u analizi životne sredine [Elektronski izvor] : praktikum / Malcolm Watson ... [et al.]. - Novi Sad : Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, 2021

Način pristupa (URL):

https://www.pmf.uns.ac.rs/studije/epublikacije/hemija/watson_spektroskopske_i_spektrometrijske_metode.pdf. - Opis zasnovan na stanju na dan 26.1.2022. - Nasl. s naslovnog ekrana. - Bibliografija.

Bibliografija.

ISBN 978-86-7031-603-4

a) Животна средина - Анализа - Спектроскопске и спектрометријске методе
COBISS.SR-ID 56735753

©Sva prava zadržana. Nije dozvoljeno da praktikum ili njegovi delovi budu reprodukovani na bilo koji način bez dozvole izdavača ili autora.

Tiraž: elektronska publikacija, Slog: dr Malcolm Watson, dr Marijana Kragulj Isakovski, dr Jelena Molnar Jazić; dr Jasmina Nikić. Tehnička obrada: Nada Popsavin.

Dragi čitaоче,

Praktikum „Spektroskopske i spektrometrijske metode u analizi životne sredine“ prvenstveno je namenjen studentima Osnovnih akademskih studija zaštite životne sredine i studentima Osnovnih akademskih studija hemije – kontrola kvaliteta i upravljanje životnom sredinom Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, koji na četvrtoj godini osnovnih studija pohađaju nastavu iz predmeta „Primena AAS i ICP-MS u analizi životne sredine“ i „UV/Vis i IR spektroskopija u analizi životne sredine“.

Među brojnim izazovima savremenog društva, posebno se ističu zagađivanje životne sredine i posledično monitoring, kako opštih parametara kvaliteta, tako i rezidua zagađujućih materija u različitim medijumima životne sredine. Stoga se za kvalitativnu i/ili kvantitativnu analizu ovih supstanci primenjuju različite spektroskopske i spektrometrijske metode analize. Generalno, za primenu savremenih instrumentalnih tehnika zahteva se dobro poznavanje osnovnih principa iz oblasti hemije i fizike, što je prilično teško obuhvatiti jednim materijalom Praktikuma. Stoga svako poglavlje u ovom Praktikumumu sadrži kratak teorijski uvod za datu oblast, nakon kojeg slede laboratorijske vežbe. U Praktikumumu su opisani: najvažniji parametri kontrole kvaliteta analitičkih metoda, tehnike pripreme uzoraka iz životne sredine, atomska apsorpciona spektroskopija (AAS), masena spektrometrija sa indukovanom kuplovanom plazmom (ICP-MS), UV/Vis spektroskopija, IR spektroskopija sa Furijevom transformacijom.

Ovaj praktikum namenjen je svim studentima koji žele da steknu odnosno unaprede svoje znanje o spektroskopskim metodama analize. Pored toga, materijal Praktikuma se takođe može koristiti i kao dodatna literatura za srodne predmete, za pripremanje ispitnih testova, kao i za izradu seminarskih, diplomskih i završnih radova.

Posebnu zahvalnost autori duguju recenzentima, dr Branislavu Joviću, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu i dr Miljani Prici, redovnom profesoru Fakulteta tehničkih nauka Univerziteta u Novom Sadu, na dragocenim sugestijama i komentarima koji su značajno doprineli kvalitetu ovog Praktikuma.

Novi Sad, decembar 2021. godine

Autori

Sadržaj

1: Kontrola kvaliteta	1
Vežba 1.1. Određivanje limita detekcije i kvantitacije metode za određivanje sadržaja cinka u uzorcima vode	11
Vežba 1.2. Određivanje preciznosti i tačnosti metode za sadržaj cinka u uzorcima vode	12
Vežba 1.3. Konstruisanje kontrolnih karata za sadržaj cinka u uzorcima vode	14
2. Osnovne metode karakterizacije sedimenta	16
Vežba 2.1. Određivanje sadržaja suve materije i vode u sedimentu gravimetrijski	19
Vežba 2.2. Određivanje gubitka žarenjem suve mase sedimenta i zemljišta gravimetrijski	21
Vežba 2.3. Određivanje granulometrijskog sastava sedimenta (frakcije < 0.063 mm) gravimetrijski	23
3. Priprema uzoraka iz životne sredine za analizu teških metala	27
Vežba 3.1. Priprema vodenih uzoraka i uzoraka sedimenta mikrotalasnom digestijom	29
4. Atomska apsorpciona spektroskopija	31
Vežba 4.1. Određivanje sadržaja kalijuma i natrijuma u vodi plamenom atomskom emisionom tehnikom	39
Vežba 4.2. Određivanje sadržaja odabranih metala u vodi i sedimentu plamenom tehnikom	42
Vežba 4.3. Određivanje tragova odabranih metala u vodi i sedimentu grafitnom tehnikom	45
Vežba 4.4. Određivanje sadržaja žive u vodi i sedimentu nakon redukcije sa natrijum tetraborhidridom	48
5. ICP-MS analiza	51
Vežba 5.1. Upoznavanje sa radom na ICP-MS	59
Vežba 5.2. Semikvalitativno određivanje metala u sedimentu primenom ICP-MS	61
Vežba 5.3. Kvantitativno određivanje teških metala u sedimentu primenom ICP-MS	62
Vežba 5.4. Određivanje spektralnih interferencija u ICP-MS analizi	64
Vežba 5.5. Korekcija interferencija koje potiču iz matriksa primenom internog standarda	66

6. UV-Vis spektroskopske metode analize	68
Vežba 6.1. UV-Vis spektroskopska karakterizacija organskih materija u vodi	74
Vežba 6.2. Određivanje amonijaka u podzemnoj vodi spektrofotometrijskom metodom sa Nessler-ovim reagensom	77
Vežba 6.3. Određivanje nitrata u vodi spektrofotometrijski sa Griess-ovim reagensom	80
Vežba 6.4. UV spektrofotometrijska metoda za "skrining" nitrata u vodi	84
Vežba 6.5. Određivanje nitrata u vodi spektrofotometrijski sa sulfsalicilnom kiselinom	86
Vežba 6.6. Određivanje sadržaja ukupnog fosfora i ortofosfata spektrofotometrijskom metodom sa amonijum-molibdatom	89
Vežba 6.7. Određivanje hemijske potrošnje kiseonika u vodi spektrofotometrijskom metodom	93
Vežba 6.8. Određivanje hroma u otpadnoj vodi spektrofotometrijskom metodom	97
Vežba 6.9. Određivanje rezidualnog ozona u vodi indigo spektrofotometrijskom metodom	100
7. Infracrvena spektroskopija	104
Vežba 7.1. Određivanje sadržaja mineralnih i ukupnih ugljovodonika u vodi metodom IR spektroskopije	110
Vežba 7.2. Određivanje sadržaja naftnih ugljovodonika u zemljištu metodom IR spektroskopije	114
Vežba 7.3. Primena IR detektora za određivanje sadržaja ukupnog organskog ugljenika u vodi	117
Vežba 7.4. Primena IR detektora za određivanje sadržaja ukupnog organskog ugljenika u čvrstim uzorcima	120
Vežba 7.5. Primena IR spektroskopije za karakterizaciju mikroplastike	123
Vežba 7.6. Određivanje gasovitih polutanata IR spektroskopijom	127

1. Kontrola kvaliteta

Kada laboratorija usvaja standardnu metodu bez značajnih odstupanja, sprovedi se verifikacija koja obuhvata: procenu limita detekcije (LoD), preciznosti i tačnosti, linearnosti i svakako merne nesigurnosti. Ako laboratorija uvodi metodu razvijenu unutar institucije, nestandardnu metodu ili ako su modifikacije od referentne metode značajne, sprovodi se validacija metode, koja obuhvata najmanje: procenu LoD-a, opsega kalibracije i linearnost, tačnosti i preciznosti, međulaboratorijsko poređenje, kao i nesigurnost merenja.

Limit detekcije (LoD). Limit detekcije i kriterijum detekcije se izračunavaju iz standardnih devijacija rezultata najmanje 6 određivanja slepih proba ili ako metoda ne daje slepu probu, 6 određivanja uzorka sa koncentracijom analita blizu očekivanog LoD. Uzorak koncentracije 5 puta manje od LoD bi generalno bio adekvatan. Određivanje bi moralo biti urađeno pod uslovima ponovljivosti. Standardna devijacija (s) se dobije iz jednačine:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (1.1)$$

gde je

\bar{x} – prosečna izmerena vrednost

x_i – pojedinačne izmerene vrednosti i

n – broj merenja.

Limit detekcije (LoD) se može odrediti na više načina. Međutim, najčešće se LoD definiše kao koncentracije pri kojima je signal bitno različit od šuma. Tada je:

$$LoD = x_{bg} + 3 s, \text{ ili samo: } LoD = 3 s \quad (1.2)$$

gde je

s – standardna devijacija dobijena analizom 5–10 nezavisnih slepih proba ili uzoraka sa niskom koncentracijom analita, dobijena primenom jednačine 1.1, ili standardna greška procenjene vrednosti za kalibracionu krivu SEE (*eng.* standard error of estimate),

x_{bg} – pozadinski signal.

SEE se može odrediti npr. analiziranjem niza standarda sa koncentracijama bliskim LoQ (odnos signal-šum S/N, od *eng.* signal-to-noise ratio) ~0–10 i očitavanjem standardne devijacije regresione jednačine, ili iz jednačine:

$$SEE_y = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - y_{pred,i})^2}{n - 2}} = \sqrt{\frac{\sum_i [y_i - (k \cdot x_i + c)]^2}{n - 2}} \quad (1.3)$$

gde je

n – broj merenje

y_i – očitana vrednost i

$y_{pred,i}$ – predviđena vrednost na osnovu linearne prave (k je nagib, a c je odsečak linearne funkcije).

Iz vrednosti SEE_y se deljenjem sa nagibom krive računa SEE_x , koji se zatim koristi u gornjoj jednačini. Postupak sa SEE koristi se naročito za hromatografske metode, gde je očitavanje vrlo niskih koncentracija otežano.

Standardna devijacija sintetičkog uzorka i prirodnog uzorka (sa i bez niske koncentracije analita) nije nužno ista i standardna devijacija je generalno veća za prirodne uzorke. Stoga kad god je to moguće za određivanje LoD treba koristiti prirodne uzorke. Kada je LoD izračunat, važno je potvrditi da se može postići prihvaćena standardna devijacija za koncentracije blizu LoD. Ako se to ne potvrdi, LoD se mora ponovo proceniti.

Kriterijum detekcije je najniža vrednost za koju, sa datim nivoom poverenja (obično 95%) može da se kaže da je veća od nule. Limit detekcije je najniža koncentracija sa datim nivoom poverenja (obično istim kao za kriterijum detekcije) koja će dati rezultat veći od kriterijuma detekcije tj. koncentracija koja će biti detektovana. Vrednosti između kriterijuma detekcije i limita detekcije su normalno date kao polukvantitativne ili prosto kao "trag".

Limit kvantitacije (LoQ). Limit kvantitacije se obično određuje analizom uzoraka sa poznatim koncentracijama analita i utvrđivanjem minimalnog nivoa na kojem se analiti mogu kvantifikovati sa prihvatljivom tačnošću i preciznošću. Ako je potrebna preciznost sa preciziranim limitom kvantitacije, 5 ili 6 uzoraka sa smanjenjem količine analita se analizira šest puta nakon čega se izračunava LoQ primenom jednačine 1.4.

LoQ se može definisati kao koncentracija pri kojoj je se vrednost signal šum bitno razlikuju. Izračunava se na sledeći način:

$$LoQ = x_{bg} + 10 s, \text{ ili samo: } LoQ = 10 s \quad (1.4)$$

Postoji nekoliko metoda za izračunavanje LoD i LoQ. Moguće je proceniti (ili grafički odrediti) koncentraciju pri kojoj se signal bitno razlikuje od intenziteta šuma (tj. 3 do 10 puta veći za LoD i LoQ, redom). Kod većine novijih instrumenata, softver omogućava direktno izračunavanje odnosa signal/šuma (S/N). U nekim slučajevima, može se na osnovu analize niza uzoraka poznatih koncentracija proceniti najniža koncentracija pri kojoj je detekcija/kvantitacija dovoljno pouzdana.

Vrednosti LoD i LoQ izražavaju se na jednu značajnu cifru. Treba imati u vidu da, za dati realni uzorak, granice kvantitacije i detekcije mogu biti mnogo više od teorijskih, dobijenih validacijom, usled uticaja matriksa (npr. preklapanje pikova kod hromatografskih metoda). U tom slučaju, često je na analitičaru da proceni praktičnu vrednost LoD/LoQ.

Preciznost. Svaka laboratorija mora da uspostavi sopstvenu ponovljivost za svaku metodu koju koristi, a isto tako je neophodno da uspostavi međuserijsku standardnu devijaciju. Biraju se uzorci i svaki uzorak se meri n puta u svakoj od m serija. Izbor broja ponavljanja (n) i broja serija (m) zahteva pažljivo razmatranje da bi se osiguralo da se oceni dominantan izvor nesigurnosti. Veoma mali broj analiza neće dozvoliti procenu standardne devijacije koja je statistički manje značajna. Nesigurnost procene standardne devijacije zavisi od broja pridruženih stepeni slobode. Testovi, koji obezbeđuju procenu standardne devijacije sa manje od 6 stepeni slobode, mogu se pokazati nedovoljno informativnim.

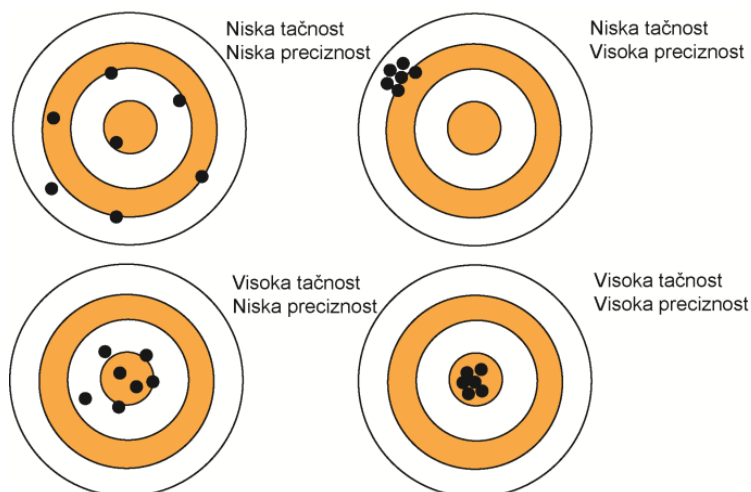
Eksperimentalni plan treba da predvidi da se uradi 2 ponavljanja ($n = 2$) i 5-10 serija ($m = 5$ do 10). Takav plan obezbeđuje procenu ponovljivosti i međuserijsku standardnu devijaciju sa otprilike jednakim brojem stepeni slobode. Takav plan bi trebalo modifikovati, kako je naznačeno, u skladu sa specifičnostima pojedinih analitičkih metoda. Standardna devijacija ponovljivosti (s_r) se može izračunati iz primenom formule 1.1.

Iz apsolutne vrednosti standardne devijacije dobija se relativna standardna devijacija, *RSD*:

$$RSD, \% = \frac{s_r}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (1.5)$$

Dobijena vrednost *RSD* poredi se sa unapred postavljenim kriterijumom. Uzorci koji se koriste za test preciznosti treba da budu stabilni za vreme u toku kog se izvodi eksperiment. Uzorci takođe moraju da budu dovoljno homogeni da osiguraju da nehomogenost ne doprinosi značajno izračunatoj standardnoj devijaciji. Standardni rastvori ili sintetički uzorci su pogodni za upotrebu. Štaviše, standardna devijacija za prirodne uzorke se često značajno razlikuje od one za sintetičke uzorke i zato nije dovoljno zasnovati meru preciznosti na sintetičkim uzorcima i standardnim rastvorima.

Tačnost. Tačnost meri slaganje između rezultata i prave vrednosti, dok preciznost opisuje slaganje između nekoliko rezultata dobijenih na isti način (slika 1.1).



Slika 1.1. Razlika između preciznosti i tačnosti

Metode koje se najčešće koriste za određivanje tačnosti su:

a) Eksperiment prinosa - *Recovery test*. Poznata količina analita se dodaje u prirodni uzorak dajući spajkovani (eng. spike) uzorak. Nakon čega se dodata odnosno spajkovana supstanca analizira u uzorku ili matriksu. Oba, originalni prirodni i spajkovani uzorak se analiziraju koristeći celu analitičku proceduru nekoliko puta. Razlika između rezultata dva uzorka daje *recovery*. Na taj način se otkrivaju interference koje utiču na osjetljivost.

b) Poređenje sa rezultatima druge validovane ili generalno prihvaćene metode. Ova procedura je važna pri prelasku sa jedne na drugu metodu ili kada se modifikuje postojeća standardna metoda.

c) Međulaboratorijske studije. Ako je dostupna podesna međulaboratorijska studija.

d) Analiza sertifikovanog referentnog materijala. Ako je takav materijal pristupačan treba ga koristiti, ali ponovo, nedostatak referentnih materijala ograničava korisnost metode.

Recovery vrednost (R) se iskazuje u procentima i može se izračunati primenom datog izraza:

$$Recovery, \% = \frac{x_{eksp}}{x_{teo}} \cdot 100 \quad (1.6)$$

gde je

x_{eksp} - eksperimentalno određena koncentracija dodatog tj spajkovanog "spike" uzorka

x_{teo} - teorijska vrednost koncentracije spajka.

Kontrola kvaliteta hemijske analize obuhvata: staranje o uzorcima (na terenu i u laboratoriji, etaloniranje/proveru/podešavanje instrumenata (na terenu i u laboratoriji), proveru rastvora, proveru rada laboratorijske i terenske opreme kao i sva uputstva metoda i uputstva za bezbedno rukovanje opremom. U laboratoriji se sprovodi interna i eksterna kontrola kvaliteta:

Interna kontrola kvaliteta podrazumeva kontinualno praćenje propisanih procedura i redovnih radnih aktivnosti laboratorije. Ona obuhvata analitički proces uzorkovanja, transporta i prijem uzorka u laboratoriju do izdavanja izveštaja o ispitivanju. Podrazumeva redovnu analizu seta kontrolnih uzoraka.

Eksternu kontrolu kvaliteta laboratorija sprovodi učešćem u programima međulaboratorijskog poređenja i programima ispitivanja osposobljenosti.

Zapisivanje rezultata interne i eksterne kontrole laboratorija sprovodi u kontrolnim kartama, tako da su lako uočljivi trendovi. Interna kontrola kvaliteta obuhvata kontrolu kvaliteta na terenu i u laboratoriji, pri čemu će ovde biti fokus na kontroli kvaliteta koja se sprovodi samo u laboratoriji.

Kontrola kvaliteta u laboratoriji. Ova kontrola obezbeđuje pouzdanost rezultata ispitivanja. Analitičari u laboratoriji moraju strogo poštovati sve procedure kontrole kvaliteta specificirane različitim metodama i njihovim uputstvima. Osnovna kontrola podrazumeva nekoliko vrsta merenja:

a) Slepa proba reagenasa - slepa proba celog analitičkog metoda pri čemu se slepa proba podvrgava istoj proceduri kao i uzorak.

b) Slepa proba pripreme uzorka - kada uzorak prolazi kroz bilo kakav vid predtretmana (digestiju, destilaciju, ekstrakciju, filtraciju) mora se proveriti da li predtretman ima efekte na rezultat. Zbog toga se ova slepa proba radi kad i standardi i uzorci, istovremeno. To je u stvari analiza matriksa po istoj proceduri bez supstance koja se analizira u uzorcima.

c) Dodatak supstance – ako se u uzorak ili matriks dodaje supstanca koja se analizira (*eng. spike*) tako da se doda minimalna zapremina rastvora veće koncentracije u alikvot matriksa. Ova supstanca se dodaje na samom početku analize i služi za proveru kompletnog analitičkog sistema. Uzorci vode se dobro promešaju pre uzimanja alikvota, a čvrsti uzorci se promešaju staklenim štapićem ili se u staklenom avanu promešaju pre uzimanja alikvota. Dodatak treba da daje minimalno

10 puta i maksimalno 100 puta detekcioni limit instrumenta, a uobičajeno je da bude 3–5 puta veća koncentracija od one koja se očekuje u uzorku.

d) Kalibracioni verifikacioni standardi (KVS) - standardni rastvori napravljeni iz drugog izvora u odnosu na kalibracioni standard. Analiziraju se nakon kalibracije analitičkog sistema i pre analize uzoraka. Koriste se za verifikaciju (proveru) tačnosti kalibracije.

e) Kalibracioni standard za kontinualnu kalibraciju (KKS) - potvrđuje tačnost kalibracije tokom svakog analitičkog merenja. Najčešće se za njega uzima koncentracija koja se nalazi na sredini kalibracionog opsega. On se mora odmah nakon dobijanja kalibracione krive uraditi. Pri tome rezultat koji se dobije zavisi od specifikacija metoda.

f) Laboratorijski kontrolni standard (LKS) - predstavlja istu koncentraciju kao i kalibracioni verifikacioni standard, s tim što prolazi proceduru pripreme uzorka. Dozvoljena devijacija za *recovery* vrednost zavisi od specifikacija metoda.

g) Laboratorijski dupli uzorci - alikvoti istog uzorka koji se pripremaju i analiziraju u isto vreme. Koriste se za određivanje preciznosti u radu.

h) Duplikati matriksa uzoraka sa dodatkom (duplikat spajka) - alikvoti istog uzorka sa dodatkom supstance koja se analizira, takođe služe za određivanje preciznosti.

i) Slepe probe kolone - moraju biti proverene nakon aktiviranja i deaktiviranja kolona da li sadrže analite od interesa.

j) Interni standard - supstanca sličnih hemijskih karakteristika onoj supstanci koja se analizira, ali koja se pod normalnim uslovima ne nalazi u uzorcima ili ne interaguje sa supstancom koja nam je interesantna. Koncentracija internog standarda koja će se upotrebiti zavisi od odziva instrumenta i relativnog odnosa sa odzivom supstance koju analiziramo i kalibracionih rastvora. Interni standard se koristi obično u hromatografskim analizama.

Optimalna kontrola mora obuhvatiti pametan izbor kontrolnih uzoraka, kontrolne karte i frekvenciju kontrole, kao i procenu značaja različitih tipova grešaka u smislu rizika povezanog sa rezultatima. Frekvencija merenja kontrolnih uzoraka zavisi od stabilnosti procesa merenja, veličine serije uzoraka (jedan set kontrolnih uzoraka na 20 uzoraka), cene ponovljenih analiza, važnosti odluka koje se zasnivaju na rezultatima (npr. toksični parametri).

Ne postoji standardni kontrolni program već se razlikuje od parametra do parametra, od tehnike do tehnike, od laboratorije do laboratorije. Učestalost

sprovođenja interne kontrole kvaliteta u laboratoriji definisana je u pojedinačnim uputstvima metoda/parametara.

Sa svakom serijom uzoraka analizira se bar jedan kontrolni uzorak. Kada se ustanovi frekvencija kontrole kvaliteta, sva merenja kontrolnih uzoraka treba uključiti u kontrolne karte. Interna kontrola kvaliteta sa redovnim merenjem kontrolnih uzoraka i unošenjem kontrolnih vrednosti na kontrolne karte daje informacije o kvalitetu celog procesa merenja.

Vrste kontrolnih uzoraka i konstrukcija kontrolnih karti. Izbor kontrolnog uzorka zavisi od matriksa, metode i karakteristika izvođenja, za koje je neophodno praćenje. U tabeli 1.1 je dat pregled vrste kontrolnih uzoraka i kontrolnih karti.

Tabela 1.1. Vrste kontrolnih uzoraka i kontrolnih karti

Kontrolni uzorak	Kontrolna vrednost	Kontrolna karta	Koristi se za uočavanje grešaka	
			Slučajna	Sistematska
Sintetički uzorak ili referentni materijal (sertifikovan) ili laboratorijski referentni material	Srednja vrednost rezultata analize sintetičkog uzorka	X	+	+
	Razlika između najvišeg i najnižeg rezultata za sintetički uzorak	R	+	-
Prirodni uzorak	Razlika između najvišeg i najnižeg rezultata	R	+	-
Prirodni uzorak sa standardnim dodatkom	Srednja vrednost <i>recovery</i> dodatka	D	+	+
Slepa proba	Srednja vrednost slepe probe	X	+	+
	Razlika između najvišeg i najnižeg rezultata slepe probe	R	+	-
Prirodni uzorak sa ograničenom stabilnošću	Razlika između najvišeg i najnižeg rezultata	r	+	-

Kontrolne karte su lake za konstrukciju, upotrebu i interpretaciju. Korisne su za lako prepoznavanje pojedinih odstupanja od kontrolnih vrednosti. Stoga je neophodno da je merenje u okviru statističke kontrole, koja znači da analitičar mora dobro poznavati metodu, moraju biti poznati važni izvori grešaka a metoda validovana, da bi osigurali dobijanje zadovoljavajućeg kvaliteta merenja. Kontrolna karta je prezentacija podataka u kojoj su kontrolne vrednosti postavljene u odnosu na seriju uzoraka ili vreme.

Kontrolna karta ima:

1. centralnu liniju (CL)
2. gornju (GGU) i donju (DGU) granicu upozorenja i
3. gornju (GGA) i donju granicu akcije (DGA).

Centralna linija predstavlja najbolju procenu nivoa predstavljene kontrolne varijable. Često je to srednja vrednost prvih 20 vrednosti ili može biti očekivana vrednost (ako je kontrolni uzorak CRM). Granica upozorenja je interval u kojem je 95% verovatnoće da će se naći kontrolna vrednost. Granica akcije je interval u kojem se očekuje najveći broj (99,7%) kontrolnih vrednosti.

Postoje 4 tipa kontrolnih karti:

- a) X-karta (karta srednje vrednosti se dobija analizom istog kontrolnog uzorka sa svakom grupom uzoraka i ubeležavanje rezultata ili srednje vrednosti rezultata u odnosu na vreme).
- b) R-karta (kontrolna karta opsega, tj. razlike dva merenja istog uzorka i služi za ponovljivost merenja. Dobija se analizom istog kontrolnog uzorka u duplikatu sa svakom serijom i ubeležavanjem odstupanja u kartu u odnosu na vreme).
- c) D-karta (kontrolna karta za recovery za uzorke sa standardnim dodatkom. Kontrolna vrednost je razlika između rezultata za obogaćeni prirodni uzorak i prirodni uzorak bez dodatka analita) i
- d) r-karta (karta relativnog opsega) – za duplikate realnih uzoraka i nestabilnih kontrolnih uzoraka.

U tabeli 1.2 prikazani su načini izračunavanja centralne linije, granica upozorenja i granica akcije za sve tipove karti, dok je na slikama 1.2 i 1.3 dat primer izgleda X i r-karte.

Granice dozvoljnih odstupanja kontrolnih uzoraka mogu biti propisane pojedinim metodama. Ukoliko odstupanja nisu propisana preporuka je da se pre izračunavanja granice upozorenja i kontrolnih limita za tačnost izvrši 20 merenja i prikupiti podatke o tačnosti odnosno *recovery* analiziranog parametra, izračuna srednja vrednost i standardna devijacija, a preciznost izrazi kao RSD.

Po završetku svake analize, izračunate vrednosti preciznosti i tačnosti se zapisuju u kontrolnim kartama i čuvaju kao laboratorijska dokumentacija u obliku tabela/karata. Rezultati koji su izvan navedenih limita signaliziraju da se analitički sistem nalazi blizu toga ili da je već van kontrole. Analize pri tome moraju biti zaustavljene i greške u radu otklonjene.

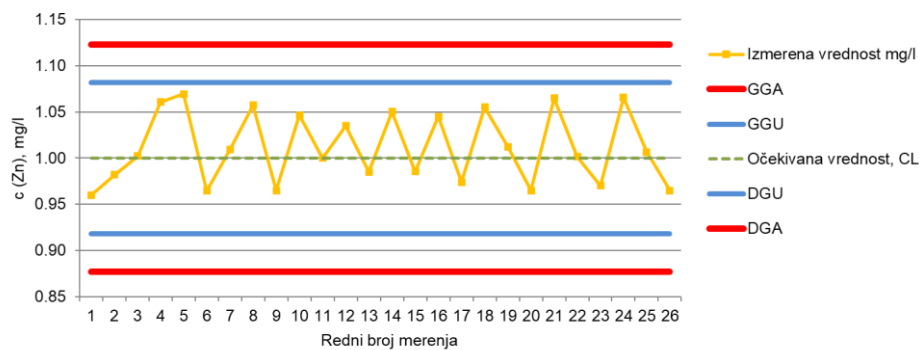
Tabela 1.2. Tipovi kontrolnih karti

Kontrolna karta	Sadržaj kontrolne karte	Proračun
X-karta	Centralna linija, CL Granica upozorenja, GU Granica akcije, GA	Srednja vrednost ili poznata vrednost $CL \pm 2 s_x$ $CL \pm 3 s_x$
R-karta	Centralna linija, CL Gornji akcioni nivo Donji akcioni nivo	$d_2 \cdot s_w = 1,128 \cdot s_w$, ili srednja vrednost razlike merenja $D_4 \cdot CL = 3,27 \cdot CL$ $D_3 = 0$
D-karta	Centralna linija, CL Granica upozorenja, GU Granica akcije, GA	Srednja vrednost ili poznata vrednost standardnog dodatka $CL \pm 2 \cdot s_x$ $CL \pm 3 \cdot s_x$
r-karta	Centralna linija, CL Gornji akcioni nivo Donji akcioni nivo	$d_2 \cdot s_w \cdot 100/x = 1,128 \cdot s_w \cdot 100/x$, ili srednja vrednost relativne razlike merenja $D_4 \cdot CL = 3,27 \cdot CL$ $D_3 = 0$

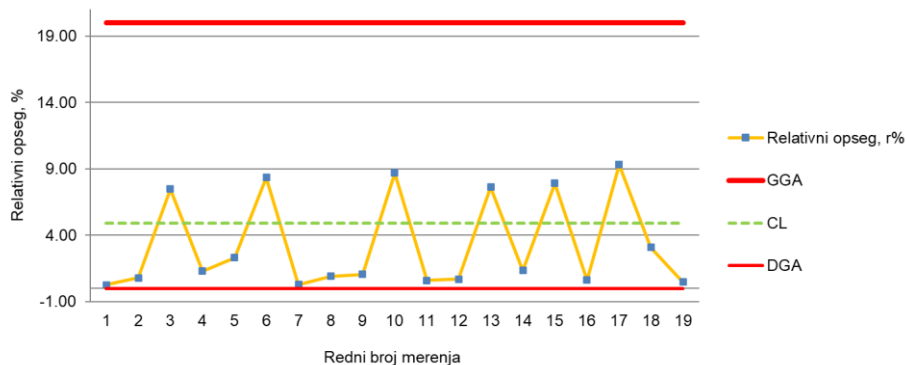
s_x – standardna devijacija izmerenih vrednosti,

s_w – međuserijska standardna devijacija dobijena prilikom validacije metode i

d_2 – statistički koeficijent za merenja u duplikatu iznosi 1,128.



Slika 1.2. Primer X-karte za kontrolu kvaliteta sadržaja cinka u uzorcima vode



Slika 1.3. Primer *r*-karte za kontrolu kvaliteta sadržaja cinka u prirodnim uzorcima vode

Kontrolne karte ostavljaju mogućnost vizuelnog pregleda, da li je merenje pod statističkom kontrolom ili ne, da li je nastala velika promena u sistematskim i slučajnim greškama, i to istog momenta kada se unese rezultat. Podaci o kontroli kvaliteta se moraju analizirati kako bi se preduzele odgovarajuće aktivnosti ako se utvrdi da je metoda izvan određenih granica i preduzeli preventivni koraci u cilju izbegavanja pojave loših rezultata. Situacija je van kontrole u sledećim slučajevima:

- jedna vrednost izvan granice akcije,
- dve uzastopne vrednosti izvan granice upozorenja,
- sedam uzastopnih vrednosti sa tendencijom rasta ili opadanja,
- deset od jedanaest uzastopnih vrednosti je sa jedne strane centralne linije odnosi se na *X*-karte kao dodatni kriterijum i
- sedam uzastopnih vrednosti je iznad centralne linije odnosi se na *R*-karte kao dodatni kriterijum.

Ako merenja kontrolnog uzorka pokazuju situaciju van kontrole, verovatno je da će biti isto i u slučaju analize realnih uzoraka. Važno je naći i ukloniti uzrok greške u cilju da se merenje vrati u okvire statističke kontrole.

Vežba 1.1. Određivanje limita detekcije i kvantitacije metode za određivanje sadržaja cinka u uzorcima vode

1.1.1. Zadatak vežbe

Detekcioni limit je određen snimanjem jedne serije od 6 ponavljanja slepe probe i jedne serije od 6 ponavljanja prirodnog uzorka površinske vode (tabela 1.3), za koji je ranijim merenjem utvrđeno da ima koncentraciju cinka ispod limita detekcije. Na osnovu izmerenih vrednosti sadržaja cinka u slepoj probi i prirodnom matriksu izračunati limit detekcije i limit kvantitacije metode.

Tabela 1.3. Sadržaj cinka u uzorcima slepe probe i prirodnog matriksa izmeren primenom AAS

Sadržaj cinka (mg/l)	
Sintetički uzorak - SP	Prirodni uzorak
-0,0102	0,0494
-0,0101	0,0552
-0,0102	0,0556
-0,0099	0,0527
-0,0101	0,0546
-0,0098	0,0529

Vežba 1.2. Određivanje preciznosti i tačnosti metode za sadržaj cinka u uzorcima vode

1.2.1. Zadatak vežbe

Preciznost metode je određivana merenjem sadržaja cinka primenom AAS i to duplikata u 6 serija, tri uzorka vode: 2 prirodna uzorka (N1 i N3) i 1 spajkovan prirodni (N4). Izračunaj preciznost metode na osnovu podataka datih u tabeli 1.4.

Tabela 1.4. Izmerena koncentracija cinka u uzorcima vode

N1: Prirodni uzorak vode (mg/l)	N3: Prirodni uzorak vode (mg/l)	N4: Spajkovan prirodni uzorak vode (mg/l)
0,036	0,034	0,73
0,036	0,027	0,71
0,035	0,033	0,73
0,033	0,028	0,71
0,033	0,034	0,73
0,033	0,030	0,71
0,039	0,038	0,73
0,039	0,031	0,71
0,040	0,030	0,80
0,040	0,020	0,78
0,027	0,029	0,74
0,030	0,027	0,72

Tačnost metode je određivana merenjem sadržaja cinka primenom AAS tehnike u uzorcima vode i to: 1 sintetički (N4, teorijska koncentracija cinka 0,75 mg/l) i 1 spajkovan prirodni uzorak (N5, teorijska koncentracija cinka 1,30 mg/l). Izračunaj tačnost metode na osnovu podataka datih u tabeli 1.5.

Tabela 1.5. Izmerena koncentracija cinka u sintetičkom i spajkovanom prirodnom uzorku vode

N4: Sintetički uzorak vode (mg/l)	N5: Spajkovan prirodni uzorak (mg/l)
0,73	1,30
0,71	1,29
0,73	1,29
0,71	1,29
0,73	1,28
0,71	1,28
0,73	1,20
0,71	1,30
0,80	1,32
0,78	1,39
0,74	1,32
0,72	1,31

Vežba 1.3. Konstruisanje kontrolnih karata za sadržaj cinka u uzorcima vode

1.3.1. Zadatak vežbe

Na osnovu vrednosti datih u tabeli 1.6 konstruisati X-kartu, nakon čega u istu uneti izmerene vrednosti sadržaja cinka u laboratorijskim kontrolnim uzorcima. Na osnovu vrednosti datih u tabeli 1.7 konstruisati r-kartu, nakon čega uneti opseg merenja za dve izmerene vrednosti sadržaja cinka u uzorcima vode. Analizirati dobijene podatke o kontroli kvaliteta.

Tabela 1.6. Podaci za crtanje X-karte

Red. br.	Izmerena vrednost za konstruisanje X-karte (mg/l)	Izmerena vrednost u LKS uzorcima (mg/l)
1	0,061	0,044
2	0,059	0,048
3	0,039	0,048
4	0,052	0,050
5	0,055	0,046
6	0,053	0,051
7	0,056	0,049
8	0,051	0,046
9	0,053	0,053
10	0,052	0,055

Tabela 1.7. Podaci za crtanje r-karte

Red.br.	Izmerene vrednosti za konstruisanje r-karte		Izmerene vrednosti u prirodnom uzorku	
	Prva izmerena vrednost (mg/l)	Prva izmerena vrednost (mg/l)	Prva izmerena vrednost (mg/l)	Druga izmerena vrednost (mg/l)
1	0,127	0,113	0,753	0,759
2	0,052	0,044	0,088	0,089
3	0,085	0,091	0,161	0,154
4	0,068	0,079	0,085	0,080
5	0,162	0,169	0,710	0,721
6	0,343	0,334	0,750	0,771
7	0,071	0,069	0,058	0,059
8	0,144	0,137	0,221	0,212
9	0,393	0,371	0,104	0,123
10	0,394	0,395	0,087	0,078
11	0,753	0,759	0,753	0,759
12	0,088	0,089	0,088	0,089
13	0,161	0,154	0,161	0,154
14	0,085	0,080	0,085	0,080
15	0,710	0,721	0,710	0,720
16	0,750	0,771	0,014	0,762
17	0,058	0,059	0,001	0,058
18	0,221	0,212	0,009	0,216
19	0,104	0,123	0,020	0,114
20	0,087	0,078	0,008	0,082

2. Osnovne metode karakterizacije sedimenta

Za pravilnu interpretaciju rezultata koji se dobijaju analizom uzoraka sedimenta, u pogledu sadržaja teških metala, na AAS ili masenom spektrometru sa indukovanom kuplovanom plazmom (ICP-MS), potrebno je utvrditi sledeće parametre:

1. Sadržaj vlage – kako bi se rezultati izrazili po masi suvog sedimenta
2. Sadržaj organske materije
3. Granulometrijski sastav

Trenutno važeća regulativa u ovoj oblasti, data Uredbom o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i podzemnim vodama i sedimentu i rokovima za njihovo dostizanje (Sl. Glasnik br. 50/2012), definiše način na koji ovi parametri ulaze u proračun i koji su kriterijumi za ocenu kvaliteta sedimenta i dozvoljeni načini postupanja sa izmuljenim sedimentom (tabela 2.1).

Za korekciju graničnih vrednosti za sadržaj metala u zavisnosti od sadržaja gline i organske materije u datom sedimentu koristi se sledeća korekciona formula:

$$GV_K = GV_{ST} \frac{A + B \% \text{ gline} + B \% OM}{A + B 25 + V 10} \quad (2.1)$$

gde je:

GV_K – korigovana granična vrednost za određeni sediment kada se u obzir uzme sadržaj gline i sadržaj organske materije

GV_{ST} – granična vrednost za standardni sediment sa 25% gline i 10% organske materije (vrednosti iz tabele 2.2)

$\% \text{ gline}$ – izmereni sadržaj gline (mineralne frakcije $< 2 \mu\text{m}$) u datom sedimentu izražen u procentima u odnosu na masu suvog sedimenta

$\% OM$ – izmereni sadržaj organske materije u datom sedimentu izražen u procentima u odnosu na masu suvog sedimenta

A, B i V – konstante koje zavise od vrste metala (tabela 2.3)

Tabela 2.1. Kriterijumi za ocenu kvaliteta sedimenta i dozvoljeni načini postupanja sa izmuljenim sedimentom

Klasa	Kriterijum	Načini postupanja sa izmuljenim sedimentom
0	\leq Ciljna vrednost	Koncentracije zagađujućih materija u sedimentu su na nivou prirodnog fona. Sedimenti mogu biti dislocirani bez posebnih mera zaštite.
1	$>$ Ciljna vrednosti	Sediment je neznatno zagađen. Prilikom dislokacije dozvoljeno je odlaganje bez posebnih mera zaštite u pojasu širine do 20 m u okolini vodotoka.
2	\leq Vrednost limita i Verifikacioni limit	
3	$>$ Vrednost limita i Verifikacioni nivo \leq Remedijaciona vrednost	Sediment je zagađen. Nije dozvoljeno njegovo odlaganje bez posebnih mera zaštite. Neophodno je čuvanje u kontrolisanim uslovima uz posebne mere zaštite kako bi se sprečilo rasprostiranje zagađujućih materija u okolinu.
4	$>$ Remedijaciona vrednost	Izuzetno zagađeni sedimenti. Obavezna je remedijacija ili čuvanje izmuljenog materijala u kontrolisanim uslovima uz posebne mere zaštite kako bi se sprečilo rasprostiranje zagađujućih materija u okolinu.

Tabela 2.2. Granične vrednosti za ocenu statusa i trenda kvaliteta sedimenta

Parametar	Jedinica mere	Ciljna vrednost	Maksimalno dozvoljena koncentracija	Remedijaciona vrednost
Arsen (As)	mg/kg	29	42	55
Kadmijum (Cd)	mg/kg	0,8	6,4	12
Hrom (Cr)	mg/kg	100	240	380
Bakar (Cu)	mg/kg	36	110	190
Živa (Hg)	mg/kg	0,3	1,6	10
Olovo (Pb)	mg/kg	85	310	530
Nikl (Ni)	mg/kg	35	44	210
Cink (Zn)	mg/kg	140	430	720

Tabela 2.3. Konstante u zavisnosti od vrste metala

Metal	Konstanta		
	A	B	V
Arsen (As)	15	0,4	0,4
Hrom (Cr)	50	2	0
Bakar (Cu)	15	0,6	0,6
Olovo (Pb)	50	1	1
Nikl (Ni)	10	1	0
Cink (Zn)	50	3	1,5
Kadmijum (Cd)	0,4	0,007	0,021
Živa (Hg)	0,2	0,0034	0,0017

Vežba 2.1. Određivanje sadržaja suve materije i vode u sedimentu gravimetrijski

2.1.1. Princip metode

Uzorci sedimenta se suše u sušnici na $105 \pm 5^\circ\text{C}$ do konstantne mase. Za izračunavanje suvog ostatka i sadržaja vode uzima se razlika između mase pre i posle procesa sušenja.

2.1.2. Aparati i pribor

- Sušnica
- Eksikator
- Analitička vaga
- Lončić za žarenje

2.1.3. Postupak izvođenja vežbe

Stavi se prazan lončić za žarenje i/ili posuda sa poklopcem u sušnicu prethodno podešenu na 105°C najmanje 30 min. Posle hlađenja u eksikatoru do temperature okoline, lončić se izmeri sa tačnošću od 1 mg (m_a). U zavisnosti od očekivanog sadržaja vode, izmeri se količina uzorka sedimenta u lončiću (vlažan sediment) ili posudi sa poklopcem (osušen sediment) (m_b), tolika da suva materija koja se dobije ima masu od najmanje 0,5 g (obično oko 5 g). Posuda za uparavanje ili lončić se zajedno sa uzorkom stave u sušnicu podešenu na 105°C , sve dok ostatak ne bude suv, obično tokom noći. Posle hlađenja u eksikatoru, izmeri se posuda za uparavanje ili lončić i zabeleži prva izmerena vrednost mase (m_c). Masa suvog ostatka ($m_c - m_a$) smatra se konstantnom ako se posle jednog sata od sušenja ne razlikuje više od 0,5% od prethodne vrednosti ili 2 mg, pri čemu se uzima veća vrednost. U drugom slučaju ponavlja se sušenje sve do konstantne mase.

2.1.4. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Suvi ostatak (w_{dr}) ili sadržaj vode (w_w) izražen u masenim procentima ili gramima po kilogramu, izračunava se na sledeći način:

$$w_{dr} = \frac{(m_c - m_a)}{(m_b - m_a)} \cdot f \quad (2.2)$$

$$w_w = \frac{(m_b - m_c)}{(m_b - m_a)} \cdot f \quad (2.3)$$

gde je:

w_{dr} – suvi ostatak uzorka mulja (% ili g/kg)

w_w – sadržaj vode u uzorku mulja (% ili g/kg)

m_a – masa prazne posude za uparavanje ili lončića (g)

m_b – masa posude za uparavanje ili lončića sa uzorkom (g)

m_c – masa posude za uparavanje ili lončića sa suvom materijom iz mulja (g)

f – faktor konverzije, $f = 100$ za izražavanje rezultata u procentima i $f = 1000$ za izražavanje rezultata u g/kg

Vrednosti se zaokružuju sa tačnošću od 0,1 % ili alternativno sa tačnošću od 1 g/kg.

Vežba 2.2. Određivanje gubitka žarenjem suve mase sedimenta i zemljišta gravimetrijski

2.2.1. Princip metode

Metoda se koristi za određivanje gubitka žarenjem na 550°C suve mase sedimenta posle određivanja suvog ostatka u sedimentu.

Smetnje: Obično se ne javljaju smetnje prilikom određivanja gubitka žarenjem. Međutim, ovo određivanje se koristi u razne svrhe, kao što je procenjivanje organskog udela u suvoj masi mulja. U tom slučaju može doći do gubitka isparljivih neorganskih supstanci, što dovodi do manje tačnih rezultata.

2.2.2. Aparati i pribor

- Sušnica
- Eksikator
- Analitička vaga
- Peć za žarenje
- Lončić za žarenje

2.2.3. Postupak izvođenja vežbe

Ako se za određivanje gubitka žarenjem koristi isti lončić koji se koristio za određivanje vlage i suve materije, pre početka rada lončić je potrebno žariti na 550°C najmanje 30 min. Posle hlađenja u eksikatoru do temperature okoline, lončić se izmeri sa tačnošću od 1 mg (m_a). Ako se određivanje gubitka žarenjem vrši u suvom uzorku izmeri se u lončiću od 0,5 do 5 g osušenog mulja i žari u pećina ($550 \pm 23^\circ\text{C}$) najmanje 60 minuta. Vreo lončić sa ostatkom posle žarenja hladi se u eksikatoru. Ako su još uvek prisutne crne čestice, ovlaži se ostatak sa rastvorom amonijum-nitrata koji je pripremljen rastvaranjem 10 g amonijum-nitrata analitičke čistoće u 100 ml destilovane vode. Posle ponovnog sušenja, ostatak se polako zagreje do temperature žarenja. Posle hlađenja u eksikatoru do temperature okoline, izmeri se lončić sa suvim ostatkom (m_c). Masa ostatka posle žarenja smatra se konstantnom ako se masa dobijena posle dodatnog žarenja tokom 30 minuta na 550°C u prethodno zagrejanoj peći ($m_c - m_a$) ne razlikuje više od 0,5% prethodne vrednosti ili 2 mg, pri čemu se uzima viša vrednost.

2.2.4. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Gubitak žarenjem suve mase sedimenta, izražen u procentima, izračunava se prema jednačini:

$$w_v = \frac{(m_b - m_c)}{(m_b - m_a)} \times 100 \quad (2.4)$$

Ostatak posle žarenje suve mase sedimenta/zemljišta, izražen u procentima, izračunava se iz jednačine:

$$w_R = 100 - w_v \quad (2.5)$$

gde je:

w_v – gubitak žarenjem suve mase sedimenta (%)

w_R – ostatak posle žarenja suve mase sedimenta (%)

m_a – masa praznog lončića (g)

m_b – masa lončića sa suvom masom uzorka (g)

m_c – masa lončića sa izarenom suvom masom (g)

Vežba 2.3. Određivanje granulometrijskog sastava sedimenta (frakcije < 0.063 mm) gravimetrijski

2.3.1. Princip metode

Određivanje raspodele čestica prema veličini zasniva se na kombinaciji prosejavanja i sedimentacije uzorka. Frakcije veće od 0,063 mm se određuju kombinacijom suvog i mokrog sejanja, dok se frakcije manje od 0,063 mm određuju sedimentacijom primenom pipet metode.

2.3.2. Aparati i pribor

- Sušnica
- Eksikator
- Analitička vaga
- Posuda za uparavanje ili lončić za žarenje
- Test sita za suvo i mokro sejanje (od 2 mm i 0,063 mm i nekoliko sita između ova dva sita)
- mehanička tresilica za sita
- cilindri od 500 ml ili 1000 ml za pipet metodu, prečnik cilindra mora biti najmanje 50 mm, a dužina 350 mm.
- pipeta od 25 ml
- štoperica
- termometar
- staklene čaše od 500 ml
- menzura od 100 ml
- centrifuga
- Lončić za žarenje
- Peć za žarenje
- Eksikator
- Analitička vaga

2.3.3. Postupak izvođenja vežbe - određivanje frakcija < 0,063 mm

Oko 30 g suve mase uzorka koja je prošla kroz sito od 2 mm stavi se u čašu od 500 ml i doda 30 ml dejonizovane vode, zatim se doda i 30 ml 30% vodonik-peroksida kako bi se razgradila organska materija, polako se meša staklenim ili plastičnim štapićem. Ukoliko uzorak peni potrebno je dodati nekoliko ml metanola. Prekriti čašu i ostaviti da stoji preko noći. Zatim blago zagrevati čašu na rešou, uz dodatak vode, da uzorak ne bi upario. Pustiti da uzorak blago ključa sve dok se

izdvajaju mehurovi od dekompozicije vodonik-peroksida. Ukoliko još postoji organske materije ohladiti uzorak i postupak ponoviti, za uzorke koji sadrže mnogo organske materije potrebno je i do 2-3 ovakva tretmana.

Nakon destrukcije organske materije uzorak kvantitativno preneti u kivete za centrifugu i centrifugirati uzorak minimum 15 min na 3000 obrtaja/min na sobnoj temperaturi kako bi se dobio bistar supernatant. Nakon centrifugiranja odliti supernatant kako bi se iz uzorka uklonile prisutne soli i gips, a ostatku uzorka nakon centrifugiranja dodati dejonizovanu vodu i izmešati uzorak. Ponoviti centrifugiranje, dok izmerena provodljivost u supernatantu ne bude niža od 0,4 dS/m.

Nakon uklanjanja soli i gipsa, uzorak iz kiveta za centrifugu kvantitativno preneti u plastičnu bocu od oko 300 ml i dodati vode do 150-200 ml, zatim dodati 25 ml $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. Uzorak postaviti na mućkalicu i mešati 18 h.

Uzorak koji se nalazi u cilindru za pipet metodu dopuniti vodom do 500 ml ili do 1000 ml u zavisnosti od zapremine cilindra. Izmeriti temperaturu prostorije gde se vrši određivanje. Izmešati uzorak mućkanjem cilindra. Postaviti cilindar uspravno i odmah uključiti štopericu. Oko 15 sekundi pre nego što treba da se otpipetira uzorak uroniti pipetu do određene dubine (oznaka A ili B nacrtana na pipeti) u uzorak pažljivo. Odpipetirati 25 ml uzorka u roku od oko 10 sekundi u određenom vremenskom intervalu u zavisnosti od određivane veličine čestica i temperature okoline prema tabeli 2.4. Odpipetirane uzorke staviti u izmereni lončić za žarenje, upariti do suva isušiti u sušnicina 105-110°C do konstantne mase.

2.3.4. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Izračunavanje frakcija čestica u ukupnoj masi uzorka nakon suvog ili mokrog sejanja:

$$\% \text{ frakcija } [>2 \text{ mm}] = m_1 \cdot 100/m_u \quad (2.6)$$

gde je

m_u – ukupna suva masa uzorka odmerena za prosejavanje na situ od 2 mm (g)

m_1 – masa uzorka koja je ostala na situ nakon prosejavanja kroz sito od 2mm (g)

Tabela 2.4. Vremena pipetiranja i veličine čestica (d_p) na dubini uzorkovanja od 10cm

Temperatura °C	Vreme, nakon mešanja, za početak uzorkovanja								
	I uzorak ^a		II uzorak		III uzorak		IV uzorak		
	min	s	min	s	min	s	h	min	s
20	0	56	4	38	51	35	7	44	16
21	0	54	4	32	50	27	7	34	4
22	0	53	4	26	49	19	7	23	53
23	0	52	4	19	48	8	7	13	13
24	0	51	4	13	47	0	7	3	2
25	0	49	4	7	45	52	6	52	50
26	0	48	4	2	44	53	6	44	2
27	0	47	3	57	43	58	6	35	42
28	0	46	3	52	42	59	6	26	53
29	0	45	3	47	42	3	6	18	33
30	0	44	3	41	41	5	6	9	45
d_p (mm)	0,063		0,020		0,006		0,002 Glina		

^aDubina uzorkovanja 200 mm

Izračunavanje % frakcija čestica u ukupnoj masi uzorka određen pipet metodom:

Frakcija (mm)	Formula
<0,063	$(mN_1 - mT_1) \cdot V_c/V_p \cdot 100/m_s \cdot (1 - \%[> 2 \text{ mm}]/100)$ (2.7)
<0,020	$(mN_2 - mT_2) \cdot V_c/V_p \cdot 100/m_s \cdot (1 - \%[> 2 \text{ mm}]/100)$ (2.8)
<0,006	$(mN_3 - mT_3) \cdot V_c/V_p \cdot 100/m_s \cdot (1 - \%[> 2 \text{ mm}]/100)$ (2.9)
<0,002	$(mN_4 - mT_4 - 0,0166205) \cdot V_c/V_p \cdot 100/m_s \cdot (1 - \%[> 2 \text{ mm}]/100)$ (2.10)

gde je:

 V_c – zapremina cilindra (ml) V_p – zapremina pipete (ml) m_s – ukupna suva masa uzorka (g) mN_1 – masa lončića za žarenja sa ostatkom nakon pipetiranja prvog uzorka (g) mT_1 – masa praznog lončića za žarenje (g) mN_2 – masa lončića za žarenja sa ostatkom nakon pipetiranja drugog uzorka (g) mT_2 – masa praznog lončića za žarenje (g)

mN_3 – masa lončića za žarenja sa ostatkom nakon pipetiranja trećeg uzorka (g)

mT_3 – masa praznog lončića za žarenje (g)

mN_4 – masa lončića za žarenja sa ostatkom nakon pipetiranja četvrtog uzorka (g)

mT_4 – masa praznog lončića za žarenje (g)

0,0166205 – masa disperzanta u 25 ml uzorka (g).

Raspodela frakcija:

$\% [0,063-0,020\text{mm}] = \% [<0,063\text{mm}] - \% [<0,020\text{mm}]$

$\% [0,020-0,006 \text{ mm}] = \% [<0,020\text{mm}] - \% [<0,006\text{mm}]$

$\% [0,006-0,002 \text{ mm}] = \% [<0,006\text{mm}] - \% [<0,002\text{mm}]$

Izračunavanje frakcije gline ukoliko se samo ona određuje u uzorku:

$$\% <0,002 \text{ mm} = (mN_4 - mT_4 - a) \cdot V_c/V_p \cdot 100/m_s \quad (2.11)$$

gde je

mN_4 – masa lončića za žarenja sa ostatkom nakon pipetiranja četvrtog uzorka (g)

mT_4 – masa praznog lončića za žarenje (g)

V_c – zapremina cilindra (ml)

V_p – zapremina pipete (ml)

m_s – ukupna suva masa uzorka (g)

a – 0,0166205 – masa disperzanta u 25 ml uzorka, g za uzorke određivane u cilindre od 1000 ml ili 0,03324 1 za uzorke određivane u cilindrima od 500 ml.

3. Priprema uzoraka iz životne sredine za analizu teških metala

U cilju ekstrakcije metala vezanih za čestice u oblik koji se može odrediti primenom AAS ili ICP-MS, primenjuje se neka od tehnika za digestiju.

Kisela digestija. Digestija se može adekvatno uraditi pomoću azotne kiseline. Nitratni jon ne pravi smetnje, međutim neki uzorci mogu zahtevati perhlornu, hlorovodoničnu ili sumpornu kiselinu za kompletnu digestiju. Ove kiseline mogu praviti smetnje u analizi nekih metala i “osiromašiti” matriks. Pri tom, važi opšte pravilo, sama HNO_3 je adekvatna za čiste uzorke ili lako oksidabilne materijale; $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ ili $\text{HNO}_3\text{-HCl}$ digestija pogodna je za lako oksidabilne organske materije; $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ ili $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-HF}$ digestija je neophodna za teško oksidabilne organske materije ili minerale.

Potrebno je naglasiti da kisele tehnike digestije, azotnom kiselinom i kombinacijom azotne ili hlorovodonične kiseline, obično nisu potpune, zbog čega se kao alternativa primenjuje mikrotalasna digestija.

Mikrotalasna digestija. Mikrotalasna digestija je posebno značajna kada se radi o uzorcima koji su izuzetno bogati organskim materijama, a koje ometaju efikasno rastvaranje metala (npr. otpadne vode). Metoda mikrotalasne digestije se preporučuje za analizu Ag, Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, V i Zn.

Mikrotalasna digestija se smatra jednim od najboljih rešenja digestione tehnologije za primenu u analizi metala u tragovima i ultra-tragovima. Visoka temperatura, zatvorene kivete i kisela digestija omogućuju pripremu uzoraka za mnogo manje vremena nego što je slučaj sa konvencionalnim metodama zagrevanja, koristi mnogo manje kiseline, pri čemu ne dolazi do gubitka volatilnihe lemenata.

Kivete za uzorke su izrađene od teflona ili drugog jakog materijala koji je transparentan za mikrotalasne zrake. Praktična radna temperatura je do 260°C (tačka omekšavanja teflona) i pritisak od 60 – 100 bara. Ovaj sistem je idealan za uzorke koji se rastvaraju u HNO_3 i/ili HCl , a nije pogodan za uzorke za koje je potrebno koristiti H_2SO_4 kao što su naftni produkti (330°C). Mikrotalasni zagrevaju samo tečnu fazu dok para ne apsorbuje mikrotalasnu energiju. Zbog toga je temperatura pare manja od temperature tečnosti i dolazi do kondenzacije, a kao rezultat stvarni

napon pare niži je od predviđenog. Upravo ova termalna neravnoteža je ključna prednost mikrotalasne tehnologije, obzirom da se visoke temperature mogu postići pri relativno niskom pritisku. Ovako ekstremni uslovi mikrotalasne digestije će dovesti do rastvaranja većine materijala, ali predstavljaju i potencijalnu opasnost, te je stoga neophodno pridržavati se bezbednosnih pravila prilikom primene ovog sistema.

Vežba 3.1. Priprema vodenih uzoraka i uzoraka sedimenta mikrotalasnom digestijom

3.1.1. Princip metode

Vodeni uzorak ili uzora sedimenta se ekstrahuje sa koncentrovanom azotnom kiselinom, ili smešom koncentrovane azotne kiseline i koncentrovane hlorovodonične kiseline, koristeći mikrotalasno zagrevanje odgovarajuće laboratorijske mikrotalasne jedinice. Uzorak i kiselina se stavljaju u mikrotalasne kivete. Kiveta se zatvara i zagreva se u mikrotalasnoj jedinici određeno vreme. Posle hlađenja, sadržaj kivete se filtrira, centrifugira ili taloži, a zatim ukoliko je potrebno, razblaži do potrebne zapremine i analizira na AAS ili ICP-MS.

Smetnje:

- Rastvarači, reagensi i staklo mogu dovesti do smetnji pri analizi uzoraka.
- Digestija uzoraka koji sadrže organske materije će stvoriti visoke pritiske zbog razvijanja gasovitih proizvoda digestije.
- Ako uzorak sadrži suspendovane materije koje su sačinjene od teško topljivih jedinjenja, kao što su silicijum dioksid, titanijum dioksid, glinica i drugih oksida, oni neće biti rastvoreni i u nekim slučajevima mogu inkapsulirati ciljani analit elemenata.
- Uzorci koji su visoko reaktivni ili kontaminirani mogu zahtevati razblaživanje pre analize.

3.1.2. Hemikalije, reagensi i pribor

- Sve kiseline treba da budu destilovane i/ili visoke čistoće da bi minimizirale nivo kontaminacije slepe probe
- Koncentrovana azotna kiselina (HNO_3)
- Koncentrovana hlorovodonična kiselina (HCl)
- Reagens voda

3.1.3. Digestija uzoraka vode

Odmeriti 45 ml uzorka koristeći graduisanu pipetu i kvantitativno preneti uzorak u kivetu. Uzorci koji su reaktivni ili visoko kontaminirani mogu zahtevati razblaženje. Dodati $5 \pm 0,1$ ml koncentrovane azotne kiseline u kivetu. Proceduru obavezno izvoditi u digestoru. Kivete zatvoriti i postaviti u mikrotalasnu peć. Temperatura svakog uzorka treba da raste do $170 \pm 5^\circ\text{C}$ u otprilike 10 minuta i da ostane $170 \pm 5^\circ\text{C}$ takođe otprilike 10 minuta. Treba voditi računa o broju kiveta u mikrotalasnoj peći, s obzirom da temperatura može da varira u slučaju manjeg ili većeg broja kiveta, te tako treba prilagoditi količinu energije u dizajniranom

programu za digestiju. Na kraju mikrotalasnog programa, ostaviti kivete da se ohlade minimum 5 minuta pre njihovog vađenja iz peći. Kada se kivete ohlade na približno sobnu temperaturu, može se pažljivo izvršiti njihovo otvaranje. Sadržaj kiveta pažljivo profiltrirati u normalni sud poznate zapremine (najčešće od 50 ml).

Ovako pripremljeni uzorci spremni su za dalju analizu na AAS odnosno ICP-MS.

3.1.4. Digestija uzoraka sedimenta

Odmeriti 1 g suvog uzorka u kivetu na analitičkoj vagi i zabeležiti tačnu masu odmerenog uzorka. U kivetu sa odmerenim uzorkom dodati $9\pm 0,1$ ml koncentrovane azotne kiseline i $3\pm 0,1$ ml koncentrovane hlorovodonične kiseline. Proceduru obavezno izvoditi u digestoru. Kivete zatvoriti i postaviti u mikrotalasnu peć. Temperatura svakog uzorka treba da raste do $175\pm 5^{\circ}\text{C}$ otprilike 5 minuta i da ostane $175\pm 5^{\circ}\text{C}$ konstantna 10 minuta. Treba voditi računa o broju kiveta u mikrotalasnoj peći, s obzirom da temperature može da varira u slučaju manjeg ili većeg broja kiveta, te tako treba prilagoditi količinu energije u dizajniranom programu za digestiju.

Na kraju mikrotalasnog programa, postupiti na napred opisan način.

3.1.5. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Pripremiti uzorke otpadnih voda i sedimenta mikrotalasnom digestijom za analizu teških metala na AAS.

4. Atomska apsorpciona spektroskopija

Atomska apsorpciona spektroskopija (AAS) se zasniva na apsorpciji elektromagnetnog zračenja od strane slobodnih atoma, koji se nalaze u osnovnom energetskom stanju. Ako propustimo elektromagnetno zračenje rezonantne talasne dužine, koje ima upravo onoliku energiju koja je potrebna da izazove ekscitaciju atoma, doći će do apsorpcije zračenja. Stepem apsorpcije elektromagnetnog zračenja od strane slobodnih atoma biće srazmeran njihovoj koncentraciji, što omogućava kvantitativnu analizu.

Za razliku od atomske apsorpcione spektroskopije, kod atomske emisione spektroskopije (AES) meri se intenzitet elektromagnetnog zračenja koje emituju ekscitovani atom pri povratku u osnovno stanje, pri čemu izvor svetlosti za ekscitaciju atoma nije potreban, kao što je slučaj sa AAS.

U opštem slučaju, atomi u energetski osnovnom stanju (Me) mogu da prime određeni iznos energije ($h\nu$) i da pri tom pređu u određeno energetski više stanje, tzv. ekscitovano stanje (Me^*)



U ekscitovanom stanju atomi ostaju oko 10^{-8} sekundi, nakon čega se ponovo vraćaju u osnovno stanje, oslobađajući se viška energije delimično (preko sudara) kao toplotne energije, a delimično u vidu elektromagnetnog zračenja u okolni prostor.

Količina energije koja može da izazove prelaz atoma iz osnovnog u ekscitovano stanje zavisi od elektronske strukture atoma u osnovnom stanju, odnosno od vrste elementa. Energija potrebna za prelaz elektrona iz osnovnog u prvo pobuđeno stanje prema Planck-ovoj relaciji iznosi:

$$E_1 - E_2 = h\nu \quad (4.2)$$

odnosno

$$\Delta E_a = h \frac{c}{\lambda} \quad (4.3)$$

gde je

E_1 – energija višeg energetskog stanja atoma (J)

E_2 – energija nižeg energetskog stanja atoma (J)

ΔE – promena unutrašnje energije atoma (J)

h – Planck-ova konstanta (J Hz^{-1})

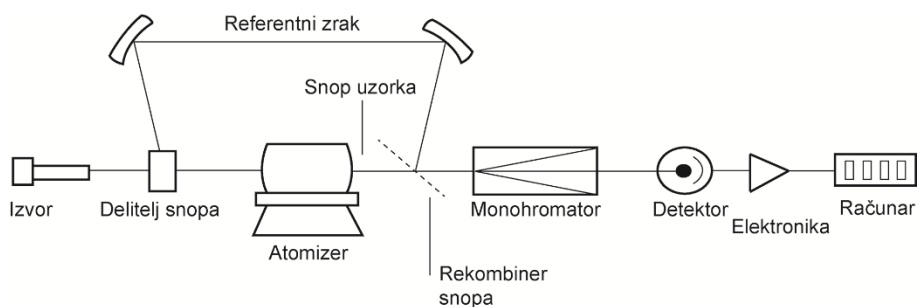
ν - frekvencija zračenja (Hz)

c - brzina svetlosti (m s^{-1})

λ - talasna dužina (m)

Talasna dužina svetlosti koja je potrebna za pobuđivanje prvog valentnog elektrona slobodnog atoma na prvi pobuđeni nivo, naziva se *rezonantna talasna dužina*, a svetlost koja se emituje pri povratku ovog pobuđenog elektrona u osnovno stanje, naziva se *rezonantni izrak*.

Instrumenti za merenje atomske apsorpcije. Atomski apsorpcioni spektrometri se u osnovi sastoje od sledećih delova: 1) primarnog izvora zračenja, 2) atomizera (izvor slobodnih atoma), 3) disperzionog sistema (monohromatora) i uređaja za akviziciju i obradu podataka (slika 4.1).

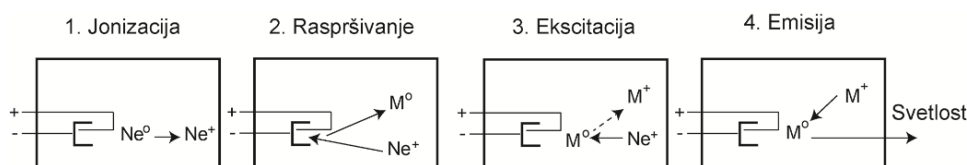


Slika 4.1. Šematski prikaz atomskog apsorpcionog spektrometra

Primarni izvor zračenja. Uloga primarnog izvora zračenja je da obezbedi izvor zračenja rezonantne talasne dužine i obuhvata sistem za električno napajanje izvora svetlosti i izvor svetlosti rezonantnog zračenja. U atomskoj apsorpcionoj spektroskopiji kao izvor zračenja, najčešće se koristi lampa (cev) sa šupljom katodom. Šuplja katoda je napravljena od metala (visoke čistoće) čiji emisijski spektar se želi dobiti (odnosno od elementa koji se određuje), dok je anoda najčešće nit izrađena od volframa. Lampa se napaja jednosmernom ili modulisanom jednosmernom strujom, jačine 5 - 30 mA, a kako bi se dobilo električno pražnjenje, koje je skoncentrisano unutar šuplje katode, primenjuje se visoki napon, reda veličine 300 V.

Mehanizam rada lampe sa šupljom katodom je prikazan na slici 4.2. Električno pražnjenje izazvano unutar balona proizvodi pozitivno naelektrisane jone inertnog gasa, koji se ubrzavaju u električnom polju i udaraju u katodu. Iz katode izbijaju atome metala, koji se dalje sudaraju sa jonima gasa kojim je napunjena katoda i

bivaju ekscitovani. Radijacionom deekscitacijom pobuđenih atoma metala proizvodi se intenzivan linijski emisijski spektar elementa koji želimo da određujemo (analita). Ceo proces je skoncentrisan unutar šuplje katode.



Slika 4.2. Šematski prikaz principa rada lampe sa šupljom katodom

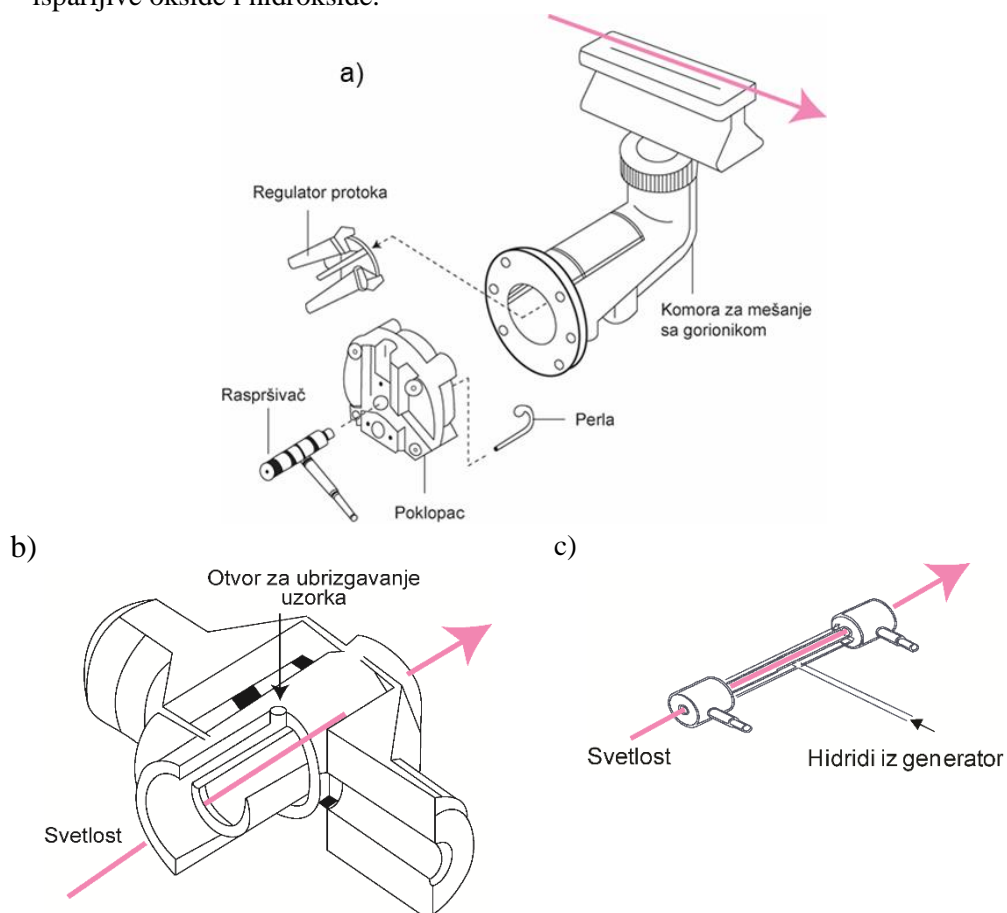
Osim lampe sa šupljom katodom, u AAS kao primarni izvor zračenja koriste se i lampe sa električnim pražnjenjem (electrodeless discharge lamp -EDL). Ove lampe, u poređenju sa šupljom katodnom lampom, obezbeđuju jači intenzitet zračenja a samim tim i veću osetljivost određivanja. Naime, ovi izvori nude veću preciznost a njihova primena se preporučuje za analize u kojima je velik intenzitet šuma posledica slabe katodne emisije. Izvori ovog tipa su dostupni za sledeće elemente: As, Bi, Cd, Cs, G, Hg, K, P, Pb, Rb, Sb, Se, T, Ti, Tl i Zn.

Atomizer. Uloga apsorpcionog dela atomskog apsorpcionog spektrometra odnosno atomizera je da stvara atome ispitivanog metala u osnovnom stanju, koji će apsorbovati upadnu svetlost iz izvora svetlosti. Ovaj deo je ujedno i najvažniji deo atomskog apsorpcionog spektrometra, jer osetljivost određivanja neposredno zavisi od broja nastalih atoma metala u osnovnom stanju po jedinici zapremine kroz koju prolazi rezonantni svetlosni zrak, odnosno od efikasnosti atomizacije.

U atomskom apsorpcionom spektrometru se najčešće koristi nekoliko tipova atomizera: plameni, elektrotermalni i apsorpciona ćelija za analizu hidrida (slika 4.3).

Plameni atomizer (slika 4.3a) se sastoji od raspršivača i gorionika. Raspršivač je dizajniran tako da rastvor uzorka konvertuje u finu maglu ili aerosol. Ovo se postiže aspiriranjem uzorka kroz kapilaru u komoru kroz koju teku oksidant i gorivo. Komora sadrži pregrade koje uklanjaju veće kapljice ostavljajući finu maglu. Samo oko 1% od ukupne količine uzorka stigne do plamena, smeše oksidanta i goriva. Veće kapljice padaju na dno komore za mešanje i prikupljaju se kao otpad. Glava gorionika sadrži dugi, uski prorez koji proizvodi i plamen koji može biti dužine 5-10 cm. Ovaj prorez obezbeđuje veću dužinu puta koja povećava osetljivost merenja. U atomskoj apsorpcionoj spektrometriji uglavnom se primenjuje laminarni plamen, pri čemu izbor smeše gasova zavisi od osobine ispitivanog metala. Najvažnije smeše za sagorevanje, njihove radne temperature i metali za koje su ove smeše najpogodnije date su u tabeli 4.1.

Najčešće korišćen plamen je vazduh/acetilen, mada plamen vazduh/propan daje veću osetljivost za alkalne i druge elemente koji lako ekscituju i jonizuju, dok je plamen smeše azotsuboksid/acetilen neophodan za elemente koji grade teško isparljive okside i hidrokside.



Slika 4.3. Različiti tipovi atomizera a) Plameni atomizer b) Elektrotermalni atomizer (šuplja grafitna peć) c) Apsorpciona ćelija za analizu hidrida

Za razliku od plamene atomske apsorpcije, kod elektro termalnog atomizera, atomska para se dobija zagrevanjem električnom energijom. Elektrotermalna atomizacija se primenjuje kao dopunska tehnika atomskoj apsorpciji u plamenu i ne smatra se alternativnom tehnikom. Glavni deo uređaja za elektrotermalnu atomizaciju, koji se uobičajeno naziva „peć”, je grafitna cev, kiveta (slika 4.3b) koja je tako konstruisana i optimizirana da je pri električnom zagrevanju temperatura duž čitave cevi optimalna. Kiveta ima mali otvor u sredini za ubrizgavanje uzorka mikropipetom ili špricom za automatsko uzimanje uzoraka. Kiveta se montira na dva elektrodna nosača koji dovode struju za brzo zagrevanje. Kroz centar kivete

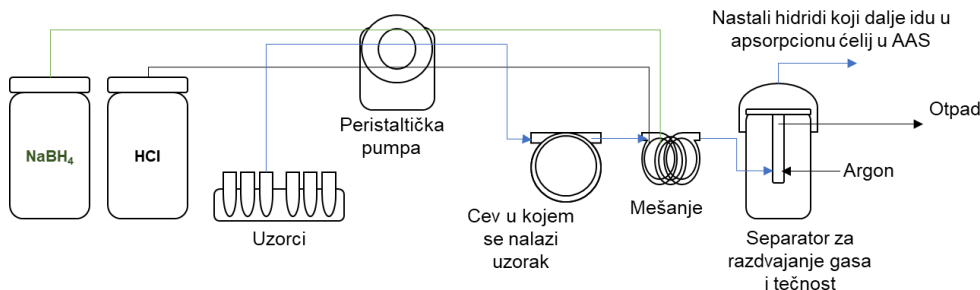
fokusiran je izvorni zrak šuplje katodne lampe ili lampe sa električnim pražnjenjem. Grejanje se vrši u određenim fazama: sušenje, piroliza, atomizacija i čišćenje cevi. Signal koji se stvara kod elektrotermalne atomizacije je brz i prolazan. Upotreba korekcije pozadinske apsorpcije je neophodna zbog lažnih pikova koji se stvaraju iz dima i para, koje nastaju za vreme raznih ciklusa zagrevanja. Reproductivnost zavisi od tačnog i stabilnog pipetiranja uzorka koje vrši operater – ista zapremina u istoj tački kivete.

Tabela 4.1. Smeše za sagorevanje koje se najčešće primenjuju

Goreći gas	Oksidant	Približne temperature [°C]	Elementi za koje je plamen pogodan
Acetilen (smeša siromašna acetilenom)	Vazduh	2300	Najbolja za zemnoalkalne metale
Acetilen (smeša bogata acetilenom)	Vazduh	2300	Sn, Ba, Cr i dr.
Azot-suboksid	Vazduh	2955	Metali koji grade teško rastvorljive okside i hidrokside kao što su: Al, Si i Ti

Tehnika hladnih para (*eng. cold vapor technique*) se koristi samo za određivanje žive, jer je živa jedini metal koji može da postoji kao slobodni atom u gasovitom stanju na sobnoj temperaturi. U ovoj tehnici, jedinjenja žive u uzorku se redukuju do elementarne žive pomoću kalajhlorida ili natrijum borhidrida, kao jakog redukcionog agensa. Elementarna živa se zatim sprovodi u struji vazduha ili argona u apsorpcionu ćeliju (slika 4.3c) i atomska apsorpcija se meri na isti način kao u plamenoj jonizaciji i elektrotermalnom instrumentu. Prednost ove metode je visoka osetljivost, jer se sva živa iz uzorka može preneti na apsorpcionu ćeliju i meriti.

Hidridni generator (slika 4.4) formira isparljive hidride elemenata reakcijom uzorka sa natrijum borhidridom (NaBH₄). Hidridi se zatim sprovode u apsorpcionu ćeliju i zagrevanjem se prevode u slobodne atome. Merenje atomske apsorpcije se vrši na isti način kao i kod drugih tehnika atomizacije. Kao i kod tehnike hladnih para žive osetljivost je velika, jer je veoma malo gubitaka. Međutim, ova tehnika je ograničena na relativno mali broj elemenata koji su u stanju da formiraju isparljive hidride, a to su: As, Pb, Sn, Bi, Sb, Te, Ge i Se.



Slika 4.4. Sistem za generisanje hidrida

Monohromator. Monohromator, ima ulogu da iz snopa svetlosnih zraka odvoji rezonantni zrak emitovan iz lampe, a koji je prošao kroz apsorpcijski sloj slobodnih atoma. Naime, u atomskoj apsorpcijskoj spektrometriji primenjuju se visoke temperature pa je moguće pobuđivanje velikog broja elemenata. Zbog toga se učestalije javljaju emisione linije iz uzorka. A takođe brojne su i emisione linije primarne lampe. Zbog svega toga potreban je efikasan sistem za odvajanje karakterističnih zraka. Ovom zahtevu udovoljavaju monohromatori sa prizmom ili difrakcionom rešetkom. Difrakciona rešetka je pločica dimenzija oko 2 cm², na kojoj je fino urezano oko 1200 ili više razreza po jednom milimetru. Na ovim razrezima se vrši difrakcija upadne svetlosti. Na monohromatorima sa difrakcionim rešetkama vrši se efikasnije odvajanje zraka u odnosu na one sa prizmama. Veličina ulaznih i izlaznih proreza (slitova) monohromatora je obično istovetna. Svetlost koja uđe na ulazni prorez usmerava se na izlazni rotiranjem difrakcione rešetke.

Kod dobrih monohromatora sa difrakcionom rešetkom moguće je postići propusnu širinu i ispod 0,05 nm, čime se omogućava visok stepen razdvajanja bliskih linija. Ako su ulazni i izlazni prorezi istih dimenzija, fotostruja spektralne linije je proporcionalna širini proreza. Fotostruja kontinualnog zračenja D2 lampe proporcionalna je površini proreza. Smanjenjem veličine proreza raste udeo spektralne linije, a time i osetljivost određivanja. Međutim, pri malim veličinama proreza raste šum digitalnog signala. Optimalna širina proreza zavisi od niza faktora, pre svega od intenziteta emisije plamena, svetlosne jačine monohromatora, detektora, elektronike i dr.

Detektor. Kao detektor u AAS se koristi fotoćelija ili fotomultiplikator. Ugradnja osetljivijeg fotomultiplikatora ne povećava analitičku osetljivost instrumenta, ali povećava odnos signal/šum, što povećava preciznost konačnog merenja.

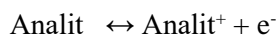
Smetnje kod atomske apsorpcijske spektroskopije. Smetnje kod atomske apsorpcijske spektroskopije se mogu podeliti na: spektralne i hemijske.

Spektralne smetnje potiču od pozadinske apsorpcije ili emisije hemijskih vrsta koje se nalaze u plamenu, a koje su bliske analitičkoj liniji toliko da ih monohromator ne može razdvojiti. Primer za to su linije Cd 228,802 nm i As 228,812 nm; Al 308,215 nm i V 308,211 nm; Sb 217,023 nm i Pb 216,999 nm itd. Drugi problem predstavlja rasejavanje primarnog zračenja na čvrstim i tečnim česticama još prisutnim u atomizeru. To može dovesti do znatnog smanjenja upadnog zračenja, odnosno do povećanja apsorpcije upadnog zračenja. Da bi se izvršila pozadinska korekcija, odnosno dobio signal koji potiče samo od apsorpcije analita, potrebno je oduzeti signal koji potiče od pozadinskog rasejavanja i apsorpcije od ukupnog signala koji potiče od analita zajedno sa pozadinom. To se može postići na više načina: metodom dve linije, metodom kontinualnog izvora, metodom zasnovanom na Zeeman-ovom efektu i Smith-Heiftje metodu.

Metoda dve linije koristi drugu liniju iz izvora primarnog zračenja kao referentnu. Ta linija treba da je što bliža analitičkoj liniji ali ne sme biti apsorbovana od strane analita. Pod tim uslovima, smanjenje intenziteta referentne linije će poticati jedino od pozadinske apsorpcije i rasipanja zračenja na česticama iz uzorka. Kao referentna linija se može koristiti linija od nečistoća u šupljoj katodi, linija neona ili argona kojim je lampa napunjenja, ili nerezonantna linija elementa koji se određuje (analita).

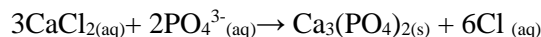
Metoda kontinualnog izvora. Kod ove metode se koristi dodatni izvor zračenja koji emituje kontinualno zračenje u ultraljubičastoj oblasti (najčešće deuterijumska lampa). Disperzioni sistem naizmenično prima signal koji potiče od izvora primarnog i izvora kontinualnog zračenja. Dok apsorpcija signala izvora primarnog zračenja potiče od apsorpcije analita i pozadinske apsorpcije, dotle smanjenje intenziteta pozadinskog zračenja uglavnom potiče od pozadinske apsorpcije i rasejavanja zračenja. Razlog ovome je mnogo veća propusna moć (širina razreza monohromatora) u odnosu na poluširinu analitičke linije, pa je apsorpcija koja potiče od analita, u slučaju kontinualnog zračenja, zanemarljiva.

Hemijske smetnje (interferencije) kod AAS se uglavnom javljaju zbog jonizacije slobodnih atoma analita i formiranja novih molekulskih vrsta u atomizeru. Kod određivanja lako jonizujućih elemenata, dolazi do smanjenja koncentracije slobodnih atoma na račun njihove jonizacije:



Suzbijanje jonizacije se vrši dodavanjem lako jonizujućih elemenata, najčešće cezijuma, čime se ravnoteža pomera na levu stranu, tj. u pravcu stvaranja neutralnih atoma analita. Drugi vid smetnji koji se često javlja u AAS je stvaranje novih molekulskih vrsta koje nisu isparljive na datoj temperaturi plamena. Tipičan primer

je određivanje Ca u prisustvu fosfata u nisko temperaturnim plamenovima (recimo vazduh - acetilen), gde se gradi neisparljivi kalcijum fosfat:



Rešenje ovog problema je ili u korišćenju viskotemperaturnih plamenova (recimo (N₂O – acetilen)) ili se dodaju tzv. oslobađajući agensi. U slučaju određivanja kalcijuma, oslobađajući agens je lantan, koji se u jednakoj količini dodaje i standardima i uzorku. Lantan sa fosfatima gradi LaPO₄, koji je stabilniji od kalcijum fosfata.

Kvantitativna analiza. Kao i kod drugih spektroskopskih metoda, kvantitativno određivanje koncentracije analita u AAS, zasniva se na Lambert-Beer-ovom zakonu:

$$I = I_0 10^{-kcl} \quad (4.4)$$

gde je:

I - intenzitet propuštenog zračenja kroz apsorpcioni sloj

I_0 - intenzitet upadnog zračenja

k - apsorpcioni koeficijent, koji zavisi od talasne dužine i prirode analita koji apsorbuje

l - dužina apsorpcionog sloja (cm)

c - koncentracija slobodnih atoma (mol/cm).

Ako se prethodna jednačina predstavi u logaritamskom obliku, kao:

$$\log \frac{I_0}{I} = kcl \quad (4.5)$$

i ako se uzme da je dužina apsorpcionog sloja konstantna, dobija se:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = kc \quad (4.6)$$

Logaritam odnosa intenziteta upadne (I_0) i intenziteta propuštene svetlosti (I), naziva se apsorbanca. Iz ove jednačine sledi da postoji linearna zavisnost između koncentracije i apsorbance odnosno da je apsorbanca analita direktno proporcionalna njegovoj koncentraciji.

Vežba 4.1. Određivanje sadržaja kalijuma i natrijuma u vodi plamenom atomskom emisionom tehnikom

4.1.1. Princip metode

Princip rada plamenog fotometra zasnovan je na merenju intenziteta karakteristične emitovane svetlosti, koju emituje rastvor ispitivanog elementa raspršen u obliku magle u plamenu.

Uzorci koji sadrže suspendovane ili organske materije, generalno zahtevaju predtretman pre analize. Bezbojni, transparentni uzorci, mutnoće <1 NTU, bez mirisa, i jednom fazom mogu biti analizirani direktno na AAS za sadržaj ukupnih metala nakon zakišeljavanja uzorka. „Ukupni“ metali podrazumevaju sve oblike metala, organski ili neorganski vezane, rastvorene i adsorbovane na suspendovanim česticama. Analiza rastvorenih metala ne zahteva digestiju, zahteva prethodnu filtraciju uzorka kroz filter od 45µm, a zatim zakišeljavanje.

Talasne dužine:

Kalijum 766,5 nm

Natrijum 590,0 nm

Smetnje:

- Rastvarači, reagensi, posuđe i ostali pribor može kontaminirati i/ili interferirati analizu.
- Za pripremu rastvora i pranje posuđa uvek koristiti dejonizovanu vodu.
- *Specifično za kalijum:* Mogu se pojaviti smetnje pri odnosu natrijuma i kalijuma 5:1 ili većem. Kalcijum može da ometa određivanje ako je odnos kalcijuma i kalijuma 10:1 ili veći. Magnezijum počinje da ometa određivanje kada je odnos magnezijuma i kalijuma 100:1 ili veći u tom slučaju dodati rastvor litijum hlorida.
- *Specifično za natrijum:* Mogu se pojaviti smetnje u prisustvu kalijuma i kalcijuma, pri odnosu kalijuma i natrijuma 5:1 ili većem, odnosno pri odnosu kalcijuma i natrijuma 10:1 i većem. Ukoliko se ovi odnosi nalaze u većem opsegu, tada je potrebno najpre izmeriti kalcijum i kalijum, tako da približna koncentracija interferirajućih jona može biti dodata u kalibracione standarde. Interferencije koje potiču od magnezijuma se ne pojavljuju, dok odnos magnezijum:natrijum ne premaši 100, što je redak slučaj. Za otklanjanje smetnji koristiti standard litijuma (litijum hlorid).

4.1.2. Hemikalije, reagensi i pribor

- Koncentrovana azotna kiselina, HNO₃

- Koncentrovana hlorovodonična kiselina, HCl
- Rastvor 1 % v/vHNO₃: 20 ml konc. HNO₃ razblažiti reagens vodom do 2 l
- Osnovni standardni rastvori kalijuma: 1000 mg/l (Komerцијalno dostupni ili čvrsti KCl p.a. čistoće)
- Osnovni standardni rastvori natrijuma: 1000 mg/l (Komerцијalno dostupni ili čvrsti KCl p.a. čistoće)

4.1.3. Postupak izvođenje vežbe

Priprema vodenih uzoraka za analizu rastvorenih analita. Za određivanje rastvorenih analita u vodi, alikvot od 20 ml je potrebno profiltrirati kroz membransku filter hartiju. Nakon toga, uzorak je potrebno koncentrisati, dodatkom cHNO₃ tako da pH u alikvotu bude < 2. Pripremljeni uzorak je spreman za analizu.

Priprema vodenih uzoraka za analizu ukupnih analita. Uzorke vode pripremiti na način opisan u Vežbi 3.1. (Priprema vodenih uzoraka mikrotalasnom digestijom).

Priprema kalibracionih standarda. Pripremiti radne rastvore metala od 100 mg/l (razblaživanjem 5 ml osnovnog standardog rastvora od 1g/l na 50 ml u 1% rastvoru HNO₃). Od dobijenog radnog rastvora ili osnovnog rastvora napraviti ostale kalibracione rastvore razblaživanjem. Za kalibraciju je potrebno pripremiti slepu probu i najmanje pet kalibraciona standarda u odgovarajućem opsegu linearnog dela krive.

Kalibracioni standardi se potom analiziraju na AAS plamenom tehnikom pri čemu se generiše kalibraciona kriva. Kalibraciona kriva mora imati koeficijent korelacije najmanje 0,995. Koncentracija metala u ispitivanom uzorku se očitava sa kalibracione krive u softveru instrumenta.

Ukoliko koncentracija analita u uzorku izlazi izvan opsega kalibracione krive potrebno je razblažiti uzorak, ili pripremiti i analizirati dodatne standarde (ukoliko to radni opseg dozvoljava).

4.1.4. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Koncentracija metala u uzorku se izračunava prema formuli:

$$C = \frac{C_{fin.rast} V}{V_{uz}} \quad (4.7)$$

gde je

C – koncentracija metala u uzorku (mg/l)

$C_{fin.rast}$ – očitana koncentracija metala u finalnom rastvoru (mg/l)

V – finalna zapremina uzorka nakon uparavanja/razblaženja (ml)

V_{uz} – finalna zapremina uzorka (ml)

Ako se za analizu koristio razblažen uzorak, pomnožiti rezultat sa faktorom razblaženja.

Izraditi kalibracionu krivu (npr. koristeći program Microsoft Excel) i prikazati je kao zavisnost apsorbance (y -osa) u odnosu na koncentraciju metala (mg/l) u kalibracionim standardima (x -osa). Na osnovu dobijene jednačine prave izračunati koncentraciju natrijuma odnosno kalijuma u ispitivanom uzorku.

Vežba 4.2. Određivanje sadržaja odabranih metala u vodi i sedimentu plamenom tehnikom

4.2.1. Princip metode

Princip rada plamenog fotometra zasnovan je na merenju intenziteta svetlosti, koju apsorbuje rastvor ispitivanog elementa, raspršen u obliku magle u plamenu.

Uzorci koji sadrže suspendovane ili organske materije, generalno zahtevaju predtretman pre analize.

Bezbojni, transparentni uzorci, mutnoće <1 NTU, bez mirisa, i jednom fazom mogu biti analizirani direktno na AAS za sadržaj ukupnih metala nakon zakišeljavanja uzorka. Analiza rastvorenih metala ne zahteva digestiju, zahteva prethodnu filtraciju uzorka kroz filter od $45\mu\text{m}$, a zatim zakišeljavanje.

Uzorke sedimenta je potrebno podvrgnuti mikrotalasnoj digestiji pre analize metala na atomskom apsorpcionom spektrometru.

Smetnje:

- Rastvarači, reagensi, posuđe i ostali pribor može kontaminirati i/ili interferirati analizu
- Za pripremu rastvora i pranje posuđa uvek koristiti dejonizovanu vodu
- *Specifično za hrom:* Mogu se pojaviti jonizacione interference ako se u uzorku nalaze značajno veće koncentracije alkalnih metala nego u standardnim rastvorima. U ovom slučaju treba dodati KCl i u uzorke i u standarde, dodati 2 ml KCl (1 g/l) na 100 ml rastvora.
- *Specifično za nikel:* Visoke koncentracije gvožđa, kobalta i hroma mogu ometati određivanje pri čemu je potrebno primeniti azot-suboksid/acetylen plamen.
- *Specifično za cink:* Visoke koncentracije silicijuma, bakra ili fosfata mogu ometati određivanje. Dodatkom stroncijuma (1,5 g/l) uklanjaju se interference koje potiču od bakra i fosfata dodati 2 ml $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ (1,5 g/l) na 100 ml rastvora.
- *Specifično za kalcijum i magnezijum:* Svi elementi koji formiraju stabilne oksianjone (P, B, Si, Cr, S, V, Ti, Al) će kompleksirati kalcijum i magnezijum, i ometati određivanje osim u slučaju dodatka lantana. Dodatak lantana tokom pripreme uzoraka retko predstavlja problem, zbog toga što svi uzorci iz životne sredine sadrže dovoljno kalcijuma i magnezijuma da zahtevaju razblaživanje u linearnom opsegu metode. Uzorci i standardi treba da imaju oko 1% La (10 ml rastvora lantana pripremljenog prema 5,7 na 100 ml uzorka ili standarda).

4.2.2. Hemikalije, reagensi i pribor

- Koncentrovana azotna kiselina, HNO₃
- Koncentrovana hlorovodonična kiselina, HCl.
- Rastvor 1 % v/vHNO₃: 20 ml konc. HNO₃ razblažiti reagens vodom do 2 l
- Osnovni standardni rastvori metala (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn) od 1000 mg/l.

4.2.3. Postupak izvođenja vežbe

Priprema vodenih uzoraka za analizu rastvorenih metala. Za određivanje rastvorenih analita u vodi profiltrirati alikvot (≥20 ml) kroz membransku filter hartiju. Dodati odgovarajuću zapreminu cHNO₃ i promešati. Uzorak je spreman za analizu.

Priprema vodenih uzoraka za analizu ukupnih metala. Uzorke vode pripremiti na način opisan u Vežbi 3.1.

Priprema uzorka sedimenta za analizu ukupnih metala. Uzorke sedimenta pripremiti na način opisan u Vežbi 3.1.

Priprema kalibracionih standarda. Pripremiti radne rastvore metala od 100 mg/l. Od dobijenog radnog rastvora ili osnovnog rastvora napraviti kalibracione rastvore razblaživanjem. Za kalibraciju je potrebno pripremiti slepu probu i najmanje tri kalibraciona standarda u odgovarajućem opsegu linearnog dela krive.

Nakon pripreme, kalibracioni standardi se analiziraju na AAS plamenom tehnikom pri čemu se generiše kalibraciona kriva. Kalibraciona kriva mora imati koeficijent korelacije najmanje 0,995.

Koncentracija metala u ispitivanom uzorku se očitava sa kalibracione krive u softveru instrumenta.

Ukoliko koncentracija metala u uzorku izlazi izvan opsega kalibracione krive potrebno je razblažiti uzorak, ili pripremiti i analizirati dodatne standarde (ukoliko to radni opseg dozvoljava).

4.2.4. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Koncentracija metala u uzorku *vode* se izračunava prema formuli:

$$C = \frac{C_{fin.rast} \cdot V}{V_{uz}} \quad (4.8)$$

gde je:

C – koncentracija metala u uzorku (mg/l)

$C_{fin.rast}$ – očitana koncentracija metala u finalnom rastvoru (mg/l)

V – finalna zapremina uzorka nakon uparavanja/razblaženja (ml)

V_{uz} – finalna zapremina uzorka (ml)

Ako se za analizu koristio razblažen uzorak, pomnožiti rezultat sa faktorom razblaženja.

Koncentracija metala u uzorku sedimenta se izračunava prema formuli:

$$C = \frac{C_{fin.rast} \cdot V_{fin.zap}}{m} \quad (4.9)$$

gde je:

C – koncentracija metala u uzorku (mg/kg)

$C_{fin.rast}$ – očitana koncentracija metala u finalnom rastvoru (mg/l)

m – suva masa uzorka sedimenta odmerenog za digestiju (g)

V_{uz} – finalna zapremina uzorka (ml)

Ako se za analizu koristio razblažen uzorak, pomnožiti rezultat sa faktorom razblaženja.

Izraditi kalibracionu krivu (npr. koristeći program Microsoft Excel) i prikazati je kao zavisnost apsorbance (y -osa) u odnosu na koncentraciju metala (mg/l) u kalibracionim standardima (x -osa). Na osnovu dobijene jednačine prave izračunati koncentraciju metala u vodi i sedimentu.

Vežba 4.3. Određivanje tragova odabranih metala u vodi i sedimentu grafitnom tehnikom

4.3.1. Princip metode

Princip rada AAS, grafitnom tehnikom, zasnovan je na merenju intenziteta svetlosti, koju apsorbuje rastvor ispitivanog elementa, raspršen u grafitnoj peći.

Uzorci koji sadrže suspendovane ili organske materije, generalno zahtevaju predtretman pre analize. „Ukupni“ metali podrazumevaju sve oblike metala, organski ili neorganski vezane, rastvorene i adsorbovane na suspendovanim česticama. Uzorke sedimenta/zemljišta je potrebno podvrgnuti mikrotalasnoj digestiji pre analize metala na atomskom apsorpcionom spektrometru.

Smetnje:

- Rastvarači, reagensi, posuđe i ostali pribor može kontaminirati i/ili interferirati analizu.
- Za pripremu rastvora i pranje posuđa uvek koristiti dejonizovanu vodu.
- Iako je problem formiranja oksida veoma smanjen u proceduri grafitne tehnike (jer se atomizacija vrši u inertnoj atmosferi), ova tehnika je ipak podložna hemijskim interferencama. Sastav matriksa uzorka može imati veliki efekat na analizu. Ovi efekti se moraju imati u vidu pri analizi različitih matriksa.
- Studije o interferencama anjona u grafitnoj peći ukazuju da u uslovima sem (izotermalnim) se preferira nitratni anjon. Zbog toga, azotna kiselina se preferira za bilo koji korak digestije ili rastvaranja. Ako se koristi druga kiselina, trebalo bi je koristiti u što manjoj meri. Ovo se posebno odnosi na hlorovodoničnu kiselinu, i sa manjim naglaskom na sumpornu i fosforu kiselinu.
- Preporučuje se da se za analize u grafitnoj peći koriste odgovarajući modifajeri ako je to potrebno. Izbor modifajera koji će se koristiti zavisi od analita, uslova i instrumenta koji se koristi i trebao bi biti izabran na osnovu konkretne situacije. Najbolje je pratiti uputstva proizvođača.
- Preporučuje se da se koristi platforma stabilizovane temperature da bi se maksimizirala izotermalna sredina radi smanjenja interferenci.

Specifični problemi interferencije vezani za individualne analite:

- *Specifično za arsen:* Elementaran arsen i njegove komponente su volatilni, te se zbog toga u uzorku pre analize mogu dogoditi gubici. Moraju se odabrati odgovarajuće temperature i vremena atomizacije da bi se sprečilo isparavanje prilikom analize. Ukoliko je neophodno dodati modifajer prema uputstvima metode i proizvođača ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ i $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$).

- *Specifično za kadmijum:* analiza kadmijuma može biti otežan nespecifičnim apsorpcijama i rasipanjem svetlosti uzrokovano komponentama koje se nalaze u matriksu u toku atomizacije. Višak hlorida može uzrokovati preranu volatilizaciju kadmijuma, ukoliko je neophodno dodati modifajer prema uputstvima metode i proizvođača (npr. $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$).

- *Specifično za hrom:* Niske koncentracije kalcijuma i/ili fosfata mogu prouzrokovati smetnje: pri koncentracijama višim od 200 mg/l efekat kalcijuma je konstantan i eliminiše efekat fosfata. Ukoliko je neophodno dodati modifajer prema uputstvima proizvođača.

- *Specifično za olovo:* Ako se dobijaju loše vrednosti za „recovery” neophodno je koristiti matriks modifajer (npr. $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$).

4.3.2. Hemikalije, reagens i pribor

- Koncentrovana azotna kiselina, HNO_3
- Rastvor 0,1% v/v HNO_3 : 1,5 ml konc. HNO_3 razblažiti reagens vodom do 1 l
- Koncentrovana hlorovodonična kiselina, HCl
- Osnovni standardni rastvori metala (As, Sn, Cd, Pb, Ni, Cr, Cu) od 1000 mg/l ili multielement standardi 10000 $\mu\text{g/l}$.
- Rastvor $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ – komercijalno dostupan ili se može pripremiti rastvaranjem 300 mg Pd praha u koncentrovanj HNO_3 (1 ml HNO_3 , 0.1 ml HCl ako je neophodno)
- Rastvor $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ – komercijalno dostupan ili se može pripremiti rastvaranjem 200 mg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ u reagens vodi.

4.3.3. Postupak izvođenja vežbe

Priprema vodenih uzoraka za analizu rastvorenih metala. Za određivanje rastvorenih metala u vodi profiltrirati alikvot (≥ 20 ml) kroz membransku filter hartiju. Dodati odgovarajuću zapreminu cHNO_3 i promešati. Uzorak je spreman za analizu.

Priprema vodenih uzoraka za analizu ukupnih metala. Uzorke vode pripremiti na način opisan u Vežbi 3.1.

Priprema uzorka sedimenta za analizu ukupnih metala. Uzorke sedimenta pripremiti na način opisan u Vežbi 3.1.

Priprema kalibracionih standarda. Pripremiti radne rastvore metala od 1000 $\mu\text{g/l}$, od standarda *ICP multi-element standard solution* (razblaživanjem 10 ml osnovnog standardnog rastvora (10 mg/l) na 100 ml 1 % rastvorom HNO_3). Od dobijenog radnog rastvora napraviti ostale kalibracione rastvore razblaživanjem (5, 10, 25, 50 i 100 $\mu\text{g/l}$).

Nakon pripreme, kalibracioni standardi se analiziraju na AAS grafitnom tehnikom pri čemu se generiše kalibraciona kriva.

Koncentracija metala u ispitivanom uzorku se očitava sa kalibracione krive u softveru instrumenta.

Ukoliko koncentracija metala u uzorku izlazi izvan opsega kalibracione krive potrebno je razblažiti uzorak, ili pripremiti i analizirati dodatne standarde (ukoliko to radni opseg dozvoljava).

4.3.4. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Koncentracija metala u uzorku vode se izračunava prema formuli:

$$C = \frac{C_{fin.rast} \cdot V}{V_{uz}} \quad (4.10)$$

gde je:

C – koncentracija metala u uzorku ($\mu\text{g/l}$)

$C_{fin.rast}$ – očitana koncentracija metala u finalnom rastvoru ($\mu\text{g/l}$)

V – finalna zapremina uzorka nakon uparavanja/razblaženja (ml)

V_{uz} – finalna zapremina uzorka (ml)

Ako se za analizu koristio razblažen uzorak, pomnožiti rezultat sa faktorom razblaženja.

Koncentracija metala u uzorku sedimenta se izračunava prema formuli:

$$C = \frac{C_{fin.rast} \cdot V_{uz}}{m \cdot 1000} \quad (4.11)$$

gde je:

C – koncentracija metala u uzorku (mg/kg)

$C_{fin.rast}$ – očitana koncentracija metala u finalnom rastvoru ($\mu\text{g/l}$)

m – suva masa uzorka sedimenta odmerenog za digestiju (g)

V_{uz} – finalna zapremina uzorka (ml)

Ako se za analizu koristio razblažen uzorak, pomnožiti rezultat sa faktorom razblaženja.

Izraditi kalibracionu krivu (npr. koristeći program Microsoft Excel) i prikazati je kao zavisnost apsorbance (y -osa) u odnosu na koncentraciju metala ($\mu\text{g/l}$) u kalibracionim standardima (x -osa). Na osnovu dobijene jednačine prave izračunati koncentraciju metala u vodi i sedimentu.

Vežba 4.4. Određivanje sadržaja žive u vodi i sedimentu nakon redukcije sa natrijum tetraborhidridom

4.4.1. Princip metode

Mono- ili divalentna živa se redukuje do elementarne forme, uz pomoć natrijum tetraborhidrida, u kiseloj sredini. Elementarna živa se zatim izduvava iz rastvora uz pomoć argona, i u formi atoma gasa zajedno sa oslobođenim vodonikom se transportuje u kivetu. Apsorbancija se meri na 253,7 nm u atomskom apsorpcionom spektrometru. Koncentracija se izračunava primenom kalibracione krive.

Uzorke sedimenta je potrebno podvrgnuti mikrotalasnoj digestiji pre analize žive na atomskom apsorpcionom spektrometru.

Smetnje:

- Kod žive postoji rizik od reakcija izmene npr. adsorpcija i desorpcija na zidovima reakcionog suda.
- Pare žive mogu difundovati kroz razne tipove plastike; ovaj fenomen mora biti uzet u razmatranje prilikom izbora materijala za creva. Staklena ili specijalna plastična creva npr., perfluoro (etil-propilen) creva se mogu koristiti. Silikonska creva su nestabilna.
- Volatilne organske supstance mogu adsorbovati u UV oblast i i mogu biti pomešana sa živom. Ovo se najvećim delom uklanja prethodnom digestijom uzorka. Ali se takođe ove ne specifične apsorbance mogu ukloniti primenom pozadinske korekcije.
- Svi rastvori moraju da budu temperirani na istu temperaturu (<25°C) pre redukovanja i prodivavanje živinih para. Kondenzacija para vode u ćeliji sprečava se zagrevanjem kivete.
- Interferencije koje potiču od Ni (preko 1 mg/l) se mogu ukloniti u prisustvu 1:1 HCl sa gvožđe(III) rastvorom, nikal do 500 mg/l u ovim uslovima ne daju interferencije.

4.4.2. Hemikalije, reagensi i pribor

- Koncentrovana azotna kiselina, HNO₃
- Koncentrovana hlorovodonična kiselina, HCl
- Osnovni standardni rastvori žive: 1000 mg/l.
- 3% HCl rastvor: 86 ml cHCl razblažiti u 1000 ml reagens vode
- 0,05% natrijum-hidroksid: rastvoriti 0,5 g NaOH u 1000 ml reagens vode

- 0,2% natrijum tetrahidroborata: rastvoriti 2 g NaBH₄ u 1000 ml 0,05% NaOH
- Rastvor pufera gvožđa: rastvoriti 14 g Fe(NO₃)*9H₂O u 100 ml vode.

4.4.3. Postupak izvođenje vežbe

Priprema uzorka sedimenta. Uzorke vode i sedimenta pripremiti na način opisan u Vežbi 3.1.

Priprema kalibracionih standarda. Pripremiti radne rastvore žive od 1000 µg/l od komercijalnog standarda Hg od 1 g/l (razblaživanjem 1 ml osnovnog standardnog rastvora od 1 g/l na 100 ml u 3% rastvoru HCl dobija se rastvor koji sadrži 10 mg Hg/l a daljim razblaživanjem ovog rastvora: 1 ml u 10 ml u 3% rastvoru HCl dobija se rastvor koji sadrži 1000 µg/l Hg). Od dobijenog radnog rastvora daljim razblaživanjem napraviti kalibracione rastvore od 0,5 µg/l, 1 µg/l, 2,5 µg/l, 5 µg/l, 10 µg/l, 25 µg/l, 50 µg/l i 100 µg/l.

Nakon pripreme, apsorbanca kalibracionih standarda se meri na AAS na 253,7 nm pri čemu se generiše kalibraciona kriva.

Koncentracija žive u ispitivanom uzorku se očitava sa kalibracione krive u softveru instrumenta.

Ukoliko koncentracija žive u uzorku izlazi izvan opsega kalibracione krive potrebno je razblažiti uzorak, ili pripremiti i analizirati dodatne standarde (ukoliko to radni opseg dozvoljava).

4.4.4. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Koncentracija žive u uzorku vode se izračunava prema formuli:

$$C = \frac{C_{fin.rast} \cdot V}{V_{uz}} \quad (4.12)$$

gde je:

C – koncentracija metala u uzorku (µg/l)

$C_{fin.rast}$ – očitana koncentracija metala u finalnom rastvoru (µg/l)

V – finalna zapremina uzorka nakon uparavanja/razblaženja (ml)

V_{uz} – finalna zapremina uzorka (ml)

Ako se za analizu koristio razblažen uzorak, pomnožiti rezultat sa faktorom razblaženja.

Koncentracija žive u uzorku sedimenta se izračunava prema formuli:

$$C = \frac{C_{fin.rast} \cdot V_{uz}}{m \cdot 1000} \quad (4.13)$$

gde je:

C – koncentracija žive u uzorku (mg/kg)

$C_{fin.rast}$ – očitana koncentracija žive u finalnom rastvoru ($\mu\text{g/l}$)

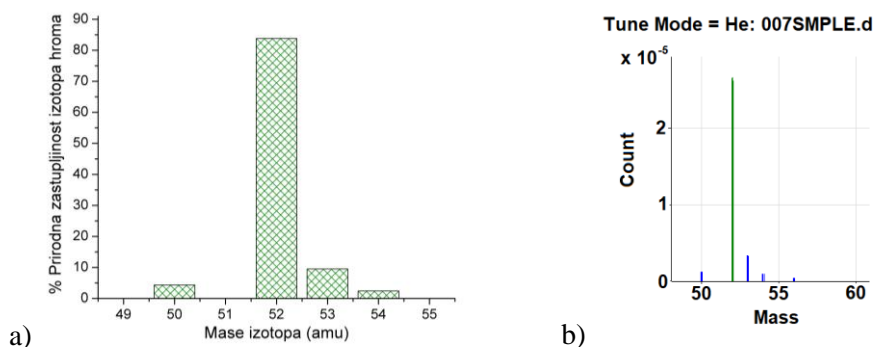
m – suva masa uzorka sedimenta odmerenog za digestiju (g)

V_{uz} – finalna zapremina uzorka (ml).

Ako se za analizu koristio razblažen uzorak, pomnožiti rezultat sa faktorom razblaženja.

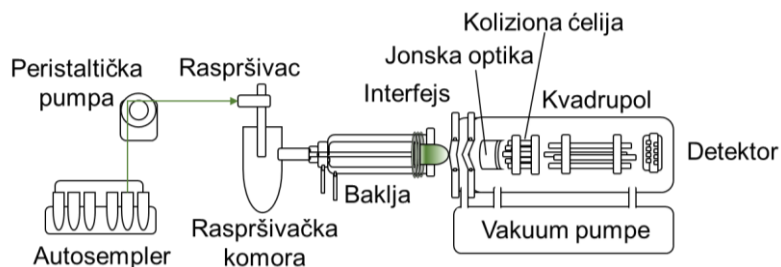
5. ICP-MS analiza

Masena spektrometrija sa indukovanom kuplovanom plazmom (ICP-MS) je tehnika koja se primenjuje za analizu vrlo niskih koncentracija (ppb) velikog broja metala i pojedinih nemetala. U ICP-MS, uloga ICP je da sve prisutne molekule uzorka prevede u atome a potom i jone. Primenom masene spektrometrije (MS) nastali joni se dalje razdvajaju na osnovu njihovog odnosa mase i naelektrisanja (m/z). Merenjem relativne obilnosti jona (prinos jona na određenoj masi) na datom m/z odnosu vrši se kvantitativna analiza. Treba imati na umu da veliki broj hemijskih elemenata poseduje različite izotope (atomi istog elementa koji imaju isti broj protona ali različiti broj neutrona), koji se karakterišu različitim masama i koji se shodno tome pojavljuju na različitom m/z odnosu (na primer Cr, slika 5.1). Obzirom da je odnos između izotopa jednog elementa uglavnom konstantan, kvantitativna analiza u tom slučaju obuhvata određivanje mase najzastupljenijeg izotopa.



Slika 5.1. Zastupljenost izotopa hroma u prirodi: a) teorijska
b) eksperimentalno određena na ICP-MS (scan opseg m/z 48-60)

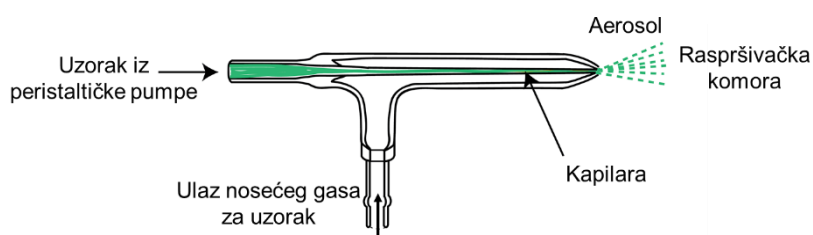
Osnovne komponente ICP-MS sistema uključuju sistem za uvođenje uzorka, sistem za generaciju plazme i maseni spektrometar (slika 5.2). Uvođenjem u plazmu, uzorak se prvo suši a potom atomizuje, pri čemu visoka energija plazme dovodi do raskidanja veza u svim prisutnim molekulima. Nastali atomi se u plazmi dalje jonizuju i kroz interfejs stižu do masenog spektrometra. U masenom spektrometru, joni se razdvajaju, u zavisnosti od njihovog odnosa mase i naelektrisanja (m/z), a potom prebrojavaju uz pomoć detektora.



Slika 5.2. Osnovne komponente masenog spektrometra sa indukovanom kuplovanom plazmom (ICP-MS)

Sistem za uvođenje uzorka. U opštem slučaju, uloga sistema za uvođenje uzorka je da uzorak uvede u plazmu, u obliku aerosola. U zavisnosti od agregatnog stanja uzorka, postoje različiti sistemi za uvođenje uzoraka. Glavne komponente sistema za uvođenje vodenih uzorka su peristaltička pumpa, (koja služi za transport uzorka iz vijala postavljenih na autoempleru, do raspršivača); raspršivač (*nebuliser*), koji konvertuje rastvor u aerosol i raspršivačka komora (*spray chamber*). Raspršivačka komora odvaja krupnije kapljice iz aerosola, obezbeđujući na taj način da do plazme stignu veoma sitne kapljice (manje od 10 μm). Kako bi se postiglo efikasno razdvajanje kapljica, temperatura raspršivačke komore treba da bude 2°C.

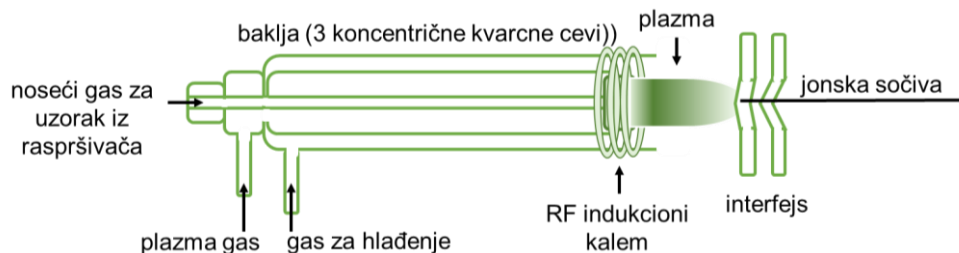
Različiti tipovi raspršivača su dostupni, u zavisnosti od brzine protoka i otpornosti prema ukupnim rastvorenim česticama (TDS). U ICP-MS, najčešće se primenjuju koncentrični raspršivači (slika 5.3), koji su dizajnirani da rade pri protocima od 0,1-1 ml/min i uzorke koji sadrže do 15% TDS. Za razliku od tečnih uzoraka, sistemi za uvođenje čvrstih uzoraka zasnovani su na laserskoj ablaciji.



Slika 5.3. Koncentrični raspršivač

Sistem za generisanje plazme. Plazma je jonizovani gas koja se zbog svojih jedinstvenih osobina smatra četvrtim agregatnim stanjem materije posle čvrstog, tečnog i gasovitog. U ICP-MS, sistem za generisanje plazme sastoji se iz kvarcne baklje, radiofrekventnog (RF) generatora i RF inducionog kalema (slike 5.4). Kvarcna baklja sačinjena od tri koncentrične cevi, centralno je pozicionirana u RF indukcionom kalem. Prolaskom kroz kvarcnu baklju, u radiofrekventnom polju koje se

generiše uz pomoć kalem, argon se zagreva i jonizuje. Argon ima skoro najveći prvi jonizacioni potencijal (uz izuzetak He, Ne i F), zbog čega se u argon plazmi mogu jonizovati svi elementi sa nižim jonizacionim potencijalom. Naime, što je prvi jonizacioni potencijal elementa niži, to je efikasnost jonizacije veća a time je i osetljivost instrumenta za analizu datog elementa veća.



Slika 5.4. ICP baklja za plazmu

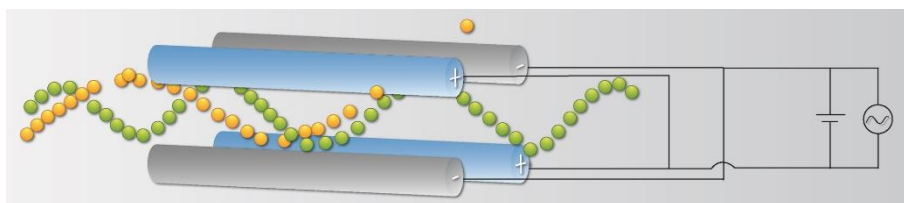
Osnovni protok argona koji služi za generisanje plazme označava se kao plazma gas. Za inicijalno generisanje plazme, električna varnica proizvodi slobodne elektrone u struji argona, koji se ubrzavaju u elektromagnetnom polju (frekvencije oko 27 miliona ciklusa/sekundi), uzrokujući koliziju i jonizaciju gasa argona. Nastali Ar^+ joni i elektroni se dalje ubrzavaju u elektromagnetnom polju uzrokujući dalju jonizaciju argona. Agregatno stanje plazme postiže se kada plazma gas ima dovoljno energije da se samostalno jonizuje. U opštem slučaju, da bi se obezbedila stabilnost plazme, neophodan je protok argona od 15 l/min i snaga RF generatora od 1550 W.

Dodatni protok argona (između zidova plazme i zidova baklje) primenjuje se kako bi se kvarcna baklja (tačka topljenja oko 2000 K), zaštitila od visokih temperatura plazme (gas za hlađenje). Treći tok argona, kontinualno nosi aerosol uzorka, iz sistema za uvođenje uzorka kroz centar baklje u plazmu (noseći gas za uzorak). Pri ekstremno visokim temperaturama uzorak isparava, molekuli se razbijaju a nastali atomi jonizuju.

Interfejs region, ima ulogu da efikasno transportuje jone, konzistentno i sa električnim integritetom od plazme (koja je na atmosferskom pritisku (101,3 kPa) i temperaturi do 10.000 K) do regiona masenog analizatora (koji je pod visokim vakumom od 10^{-5} Pa). Sastoji se od dve metalne kupe (obično napravljene od nikla) sa malim otvorima koji se održavaju pod vakumom od oko 10 Pa. Nakon što joni nastanu u plazmi oni prolaze kroz prvu kupu interfejsa (*sampler cone*) i dolaze do "skimmer" kupe koja je generalno manja i ima manje otvore. Joni koji izlaze iz *skimmer* kupe se uz pomoć jonske optike fokusiraju u deo masenog spektrometra koji se naziva maseni analizator. Osnovna uloga sistema za fokusiranje jona - jonske optike je da transportuje maksimalan broj jona analita sa interfejsa do masenog

analizatora, uz istovremeno odbacivanje matriks komponente i jedinjenja koja nisu od interesa.

Maseni analizator koji se najčešće primenjuje u većini ICP-MS instrumenata je kvadrupolni analizator (slika 5.5), koji filtrira/razdvaja jone na osnovu njihovog m/z odnosa, prilikom njihovog prolaska kroz aksijalno simetrično radiofrekventno polje.



Slika 5.5. Kvadrupolni analizator

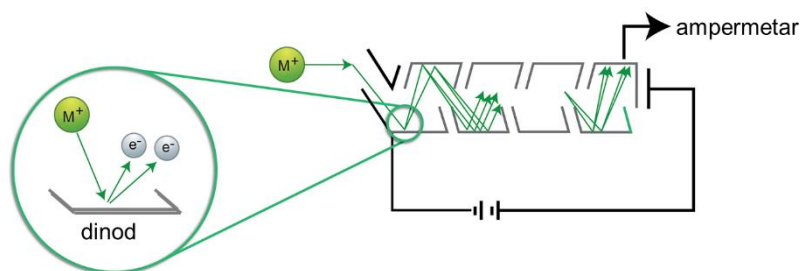
Kvadrupol se sastoji od 2 para cilindričnih elektroda, koje su paralelno postavljene. Kombinovanom primenom radiofrekventne direktne (DC) i naizmenične struje (AC), dolazi do polarizacije elektroda, i to tako da u svakom momentu susedno postavljene elektrode karakteriše suprotan, a dijagonalno postavljene elektrode identičan polaritet. Na taj način, nakon primene određenog napona DC i AC struje, ostvaruje se mogućnost da samo joni odgovarajućeg m/z odnosa prođu između elektroda i dospeju do detektora (zelena putanja na slici 5.5). Nasuprot tome, svi ostali joni (drugaijeg m/z odnosa) sudaraju se sa elektrodama ili ostalim površinama vakuum komore, i bivaju evakuisani iz instrumenta posredstvom vakuum sistema (žuta putanja na slici 5.5).

Joni koji su prošli kroz kvadrupol i dospeli do detektora se uz pomoć elektronmultiplikatora pretvaraju u merljivi električni signal, koji je direktno proporcionalan broju jona koji napuste kvadrupol. Treba imati na umu da kvadrupol i detektor moraju biti pod visokim vakuumom (oko 10^{-5} Pa) kako bi pravilno funkcionisali.

Detektor je diskretni dinodni elektronmultiplikator, koji sadrži seriju metalnih dinoda (slika 5.6). Niz dinoda koji je postavljen duž detektora omogućava kaskadu elektrona. Naime, joni koji dolaze iz kvadrupola, sudaraju se sa prvom dinodom pri čemu dolazi do oslobađanja elektrona. Kada elektroni dođu do druge dinode, oni iz nje izbijaju još elektrona, pri čemu dolazi do njihovog umnožavanja. Kao rezultat, velika količina elektrona izlazi sa poslednje dinode, stvarajući pri tome struju koja se može izmeriti i koja je direktno proporcionalna broju jona koji dolaze do detektora u sekundi.

Smetnje. Glavni nedostaci u ICP-MS analizi predstavljaju različite spektralne interferencije, fizičke interferencije i interferencije matriksa. Spektralne

interferencije su najozbiljnije interferencije u ICP-MS analizi i javljaju se kada joni u plazmi imaju isti m/z odnos kao i analit od interesa (tabela 5.1). Najčešći tip ovih interferencija potiče od poliatoma ili molekula, koji se generišu u plazmu (npr. argidi, oksidi, hidridi i hidroksidi). Pored poliatomskih smetnji, postoje i izobarni izotopi (izotopi različitih elemenata koji imaju istu atomsku masu, npr. ^{64}Zn i ^{64}Ni) i dvostruko naelektrisani joni, koji su dva puta teži i kao takvi imaju isti odnosa m/z kao i jednostruko naelektrisani joni (npr. $^{138}\text{Ba}^{2+}$ i $^{69}\text{Ga}^+$).



Slika 5.6. Detektor: diskretni dinodni elektronmultiplikator

U opštem slučaju, uprkos visokim temperaturama, u plazmi je favorizovana kolizija jona i formiranje poliatoma. Vrste poliatomskih jona koji će se formirati zavisice u prvom redu od vrste elementa koji dominira u plazmi (npr. argon, hlor i azot poreklom iz kiselina, kiseonik i vodonik iz vode, kiseonik/azot iz okolnog vazduha itd.) i odgovarajućeg jonizacionog potencijala.

U argon plazmi, argon je najzastupljeniji gas i kao takav ima najveći potencijal da formira različita spektralne odnosno poliatomske smetnje. Najzastupljeniji izotop argona ima masu 40, što u velikoj meri ometa određivanje najzastupljenijeg izotopa kalcijuma (^{40}Ca). Dalje, kombinacijom argona i argona nastaju $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$, koji ometaju određivanje najzastupljenijeg izotopa ^{80}Se . Osim toga, hlor i azot, koji se nalaze u kiselinama za digestiju i zakišeljavanje uzoraka, mogu takođe da se kombinuju sa argonom i formiraju različita poliatomska jedinjenja. U slučaju kada matriks sadrži i veliku količinu organskih materija, argon se kombinuje sa ugljenikom u obliku $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, koji ometa određivanje najzastupljenijeg izotopa hroma ($^{52}\text{Cr}^+$).

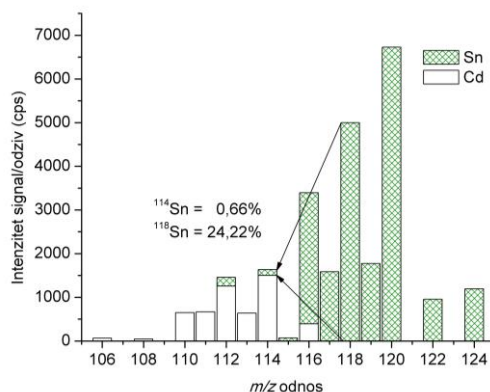
Različiti oksidi metala takođe mogu da izazovu spektralna preklapanja, obzirom da je formiranje oksida metala (MO^+) u plazmi energetski favorizovan proces za veliki broj elemenata (tabela 5.1).

Tabela 5.1. Najčešće spektralne interferencije

Element/izotop	Matriks	Interferenca
²⁴ Mg	Organski	¹² C ¹² C ⁺
²⁸ Si	HNO ₃	¹⁴ N ¹⁴ N ⁺
³⁹ K	H ₂ O	³⁸ ArH ⁺
⁴⁰ Ca	H ₂ O	⁴⁰ Ar ⁺
⁴⁴ Ca	HNO ₃	¹⁴ N ¹⁴ N ¹⁶ O ⁺
⁴⁸ Ti	H ₂ SO ₄	³² S ¹⁶ O ⁺
⁵¹ V	HCl	³⁵ Cl ¹⁶ O ⁺
⁵² Cr	H ₂ SO ₄	³⁴ S ¹⁸ O ⁺
⁵² Cr	Organski	⁴⁰ Ar ¹² C ⁺
⁵⁵ Mn	HNO ₃	⁴⁰ Ar ¹⁵ N ⁺
⁵⁶ Fe	H ₂ O	⁴⁰ Ar ¹⁶ O ⁺
⁵⁶ Fe	H ₂ O	⁴⁰ Ca ¹⁶ O ⁺
⁵⁷ Fe	H ₂ O	⁴⁰ Ca ¹⁶ OH ⁺
⁶³ Cu	H ₃ PO ₄	³¹ P ¹⁶ O ¹⁶ O ⁺
⁶³ Cu	Morska voda	⁴⁰ Ar ²³ Na ⁺
⁶⁴ Zn	H ₂ SO ₄	³² S ¹⁶ O ¹⁶ O ⁺
⁶⁴ Zn	Neorganski	⁴⁸ Ca ¹⁶ O ⁺
⁶⁴ Zn	H ₂ O	⁴⁸ Ti ¹⁶ O ⁺
⁶⁴ Zn	H ₂ O	³¹ P ¹⁶ O ₂ H ⁺
⁶⁵ Cu	Neorganski	⁴⁸ Ca ¹⁶ OH ⁺
⁶⁶ Zn	H ₂ O	³¹ P ¹⁶ O ¹⁶ OH ⁺
⁶⁹ Ga	H ₂ O	¹³⁸ Ba ²⁺
⁶⁹ Ga	H ₂ O	¹³⁹ La ²⁺
⁷⁰ Ge, ⁷⁰ Zn	H ₂ O	¹⁴⁰ Ce ²⁺
⁷⁵ As	HCl	⁴⁰ Ar ³⁵ Cl ⁺
⁸⁰ Se	H ₂ O	⁴⁰ Ar ⁴⁰ Ar ⁺
⁸⁰ Se	H ₂ O	⁷⁹ BrH ⁺
¹¹⁴ Cd	H ₂ O	⁹⁸ Mo ¹⁶ O ⁺
¹⁵⁴ Sm, ¹⁵⁴ Gd	H ₂ O	¹³⁸ Ba ¹⁶ O ⁺
¹⁵⁵ Gd	H ₂ O	¹³⁹ La ¹⁶ O ⁺
¹⁵⁶ Gd, ¹⁵⁶ Dy	H ₂ O	¹⁴⁰ Ce ¹⁶ O ⁺

Načini na koji se spektralne interferencije mogu ukloniti uključuju uklanjanje matriksa koji izaziva ovaj vid interferencija. Ranije je to podrazumevalo taloženje matriksa sa kompleksirajućim agensom, a zatim filtriranje uzorka. Međutim, u novije vreme koriste se automatski sistemi za prekoncentrisanje uzorka/uklanjanje interferencija korišćenjem hromatografske opreme. Drugi način za uspešno prevazilaženje izobarnih preklapanja i neka manja poliatomska preklapanja uključuje korišćenje matematičkih jednačina. Prvo se izračunava/određuje intenzitet ometajućeg izotopa na m/z od interesa, indirektno merenjem signala koji se dobija za drugi izotop datog ometajućeg elementa korišćenjem njihove zastupljenosti u prirodi. U nastavku, intenzitet koji potiče od analita na m/z od interesa se dobija oduzimanjem ukupnog intenziteta na m/z (koji potiče i od ometajućeg izotopa i od analita), od intenziteta koji potiče samo od ometajućeg izotopa (koji je određen na gore pomenuti način).

Na primer, najzastupljeniji izotop kadmijuma je u masi 114. Međutim, jedan od izotopa kalaja takođe se nalazi na masi od 114 (slika 5.7). Iz tog razloga, kvantifikacija $^{114}\text{Cd}^+$ u prisustvu kalaje se može sprovesti samo ukoliko se prethodno izvrši korekcija za $^{114}\text{Sn}^+$.



Slika 5.7. Uticaj ^{114}Sn na kvantitativno određivanje ^{114}Cd (prikazani su svi prirodni izotopi Cd i Sn)

Korekcija za $^{114}\text{Sn}^+$ vrši se merenjem intenziteta na jednom od njegovih najzastupljenijih izotopa (obično $^{118}\text{Sn}^+$) i na osnovu njegovog poznatog odnosa sa izotopom $^{114}\text{Sn}^+$ (prirodna zastupljenosti ova dva izotopa Sn su: $^{114}\text{Sn} = 0,66\%$, $^{118}\text{Sn} = 24,22\%$), kao što je prikazano jednačinama:

$$\text{Ukupni signal na } m/z \text{ 114} = ^{114}\text{Cd}^+ + ^{114}\text{Sn}^+ \quad (5.1)$$

$$^{114}\text{Cd}^+ = \text{Ukupni signal na } m/z \text{ 114} - ^{114}\text{Sn}^+ \quad (5.2)$$

$$^{114}\text{Sn}^+ = ^{118}\text{Sn}^+ \times (0,66/24,55) \quad (5.3)$$

$$^{114}\text{Cd}^+ = \text{Ukupni signal na } m/z \text{ 114} - ^{118}\text{Sn}^+ \times 0,0269 \quad (5.4)$$

Treba imati u vidu da je u slučaju primene jednačina za korekciju intenziteta, analitička greška dva puta veća zbog toga što rezultati merenja zavise od dva m/z odnosa.

Kvalitativna analiza. Primenom ICP-MS analize moguće je napraviti pregled (SCAN) svih m/z odnosa, počevši od 6 (^6Li kao najlakši prirodni izotop koji se može detektovati konvencionalnom ICP-MS) do 238 (^{238}U , najteži prirodni izotop), tokom nekoliko sekundi. Na ovaj način omogućava se brzi *screening* nepoznatog uzorka iz životne sredine i identifikacija potencijalnih kontaminanata koji izazivaju zabrinutost. Kako bi se izbegla primena kalibracionih standarda, SCAN mode u ICP-MS analizi je fabrički kalibrisan samo sa jednom tačkom kalibracije. Pored toga, zbog gore pomenutih interferencija, softver instrumenta koristi algoritam, kako bi napravio razliku između odziva koji se dobijaju za analit od interesa u odnosu na smetnje. Na taj način, sa ograničenom tačnošću i preciznošću, iz SCAN mode, moguće je odrediti i sadržaj svih metala (semikvantitativna analiza).

Kvantitativna analiza. Većina analiza u ICP-MS je kvantitativna. U tu svrhu najčešće se primenjuje eksterna kalibracija, koja podrazumeva pripremu i analizu kalibracionih standarda sa različitim koncentracijama analita. Na osnovu dobijenih odziva za svaki pojedini standard, konstruiše se kalibraciona kriva (odziv instrumenta vs koncentracija analita u standardnim rastvorima). Koncentracija analita u nepoznatom uzorku izračunava se iz jednačine prave, korišćenjem nagiba i odsečka, odnosno odziva dobijenog za uzorak.

Vežba 5.1. Upoznavanje sa radom na ICP-MS

5.1.1. Princip vežbe

Za pravilan i bezbedan rad na ICP-MS instrumentu potrebno je upoznati se sa osnovnim delovima hardvera i softvera. Iz tog razloga, u tabeli 5.2 prikazani su najznačajniji operativni parametri koje je potrebno proveriti pre svake analize uzoraka na ICP-MS.

Tabela 5.2. Stavke koje je potrebno proveriti pre svake analize na ICP-MS

Delovi	Parametar	Kriterijum	
HARDVER	Argon gas	Pritisak argona Ventili	> 50 bar Otvoren
	Hladnjak	Uključen Temperatura	Da 20°C
	Vakum	Nivo ulja u pumpi Kvalitet ulja Analizator pritiska	Između oznaka Bistar (svetlo braon boje) < 10 ⁻⁵ Pa
	Autosempler	Bočice za rastvore za optimizaciju (tune) i ispiranje Položaj igle	Dopunjene i postavljene u autosempler U početnom položaju (tzv. <i>home position</i>)
	Peristaltička pumpa	Kvalitet cevi Položaj cevi na glavi pumpe	Meke, bez oštećenja Cevi postaviti na glavu pumpe od nazad ka napred
	Raspršivač (<i>nebuliser</i>)	Stanje raspršivača i cevi	Dobro zavrnutе
	Baklja (<i>torch</i>)	Kvalitet	Čista
	Kupa (<i>cones</i>)	Kvalitet	Čista

5.1.2. Zadatak vežbe

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 5.2, navesti najznačajnije faktore koji utiču na kvalitet ICP-MS analize.

Nastavak tabele 5.2. Stavke koje je potrebno proveriti pre svake analize na ICP-MS

	Delovi	Parametar	Kriterijum
SOFTVER	Početni uslovi (<i>Startup</i>)	Položaj baklje (<i>Torch axis</i>)	Uključen
		Izveštaj o performansama (<i>Performance report</i>)	Uključen
		Položaj rastvora za tuning (<i>Standard setting vial</i>)	Lokacija 3
	Sekvenca (<i>Batch</i>)	Pravljenje nove sekvence (<i>New batch created</i>)	Datum i naziv sekvence
	Metoda analize (<i>Acq. Method</i>)	Odabir elemenata i provera izotopa (<i>Elements selected</i>)	Željeni analit koji se određuje u uzorku
	Metoda analize (<i>Acq. Method</i>)	Vreme integracije (<i>Integ Time /sec</i>)	0.21
	Metoda analize (<i>Data Analysis Method</i>)	Analit	Analiti
	Metoda analize (<i>Data Analysis Method</i>)	Nivo koncentracionog standardnog rastvora (<i>Full Quant - Calibration levels</i>)	Definisati koncentracije standardnih rastvora
	Spisak kalibracionih standarda (<i>Sample list</i>)	Kalibracioni standardi: tip, lokacija i nivo	Definisati za sve kalibracione standarde
	Spisak uzoraka (<i>Sample list</i>)	Nepoznati uzorci: tipe, naziv i lokacija	Definisati za sve uzorke
	Sekvenca (<i>Batch</i>)	Provera sekvence	Ispravna, bez greške

Vežba 5.2. Semikvalitativno određivanje metala u sedimentu primenom ICP-MS

5.2.1. Princip metode

Semikvalitativno određivanje metala, primenom ICP-MS zasnovan je na merenju svih prirodnih izotopa počevši od ${}^6\text{Li}$ do ${}^{238}\text{U}$ (SCAN MODE), i sagledavanju njihovog međusobnog odnosa. Teoretski, ukoliko je odnos izotopa približan njihovoj prirodnoj raspodeli, koncentracija metala se može izračunati. Razlog za međusobno neslaganje između izotopa su u najvećem broju slučajeva spektralne smetnje.

5.2.2. Hemikalije, reagensi i pribor

- Dejonizovana voda
- Osnovni multielement standard od 500 $\mu\text{g/l}$.

5.2.3. Postupak izvođenja vežbe

Uzorak sedimenta koji je prethodno podvrgnut digestiji (Vežba 3.1) razblažiti tako da koncentracija kiseline u uzorku bude manje od 2%. Razblaženi uzorak i multielement standard od 500 $\mu\text{g/l}$, sipati u kivete za ICP i podvrgnuti kvalitativnoj analizi. Analiza se vrši u Quick Scan mode.

5.2.4. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Nakon analize, dobijeni podaci se eksportuju u Excel. Rezultati koji su izraženi u ng/l , ne uzimaju se u razmatranje obzirom da se u najvećem broju slučajeva radi o pozadinskim šumovima. Takođe, u obzir se ne uzimaju ni rezultati analize za C i N.

Na osnovu kvalitativne analize uzorka, napraviti tabelu sa najznačajnijim rezultatima. Navesti prednosti i nedostatke ove metode.

Vežba 5.3. Kvantitativno određivanje teških metala u sedimentu primenom ICP–MS

5.3.1. Princip metode

Kvantitativno određivanje metala, primenom ICP–MS zasniva se na atomizaciji i jonizaciji analita, koji su prisutni u uzorku, uz pomoć plazme. Primenom masenog spektrometra nastali joni se filtriraju, na osnovu njihovog odnosa mase i naelektrisanja (m/z) i dalje usmeravaju u detektor, gde se prebrojavaju.

5.3.2. Hemikalije, reagensi i pribor

- Dejonizovana voda
- Koncentrovana azotna kiselina, HNO_3
- ICP multielement standard od 10 mg/l.

5.3.3. Postupak izvođenja vežbe

Priprema kalibracionih standarda. Razblaživanjem ICP multielement standarda od 10 mg/l pripremiti kalibracione rastvore od 1, 5, 50, 100 i 500 $\mu\text{g/l}$.

Priprema uzorka sedimenta za analizu teških metala. Uzorak sedimenta koji je prethodno podvrgnut digestiji (Vežba 3.1) razblažiti tako da koncentracija kiseline u uzorku bude manje od 2%.

Nakon pripreme, kalibracioni standardi se analiziraju na ICP-MS pri čemu se generiše kalibraciona kriva. Koncentracija teških metala u ispitivanom uzorku se očitava u softveru instrumenta, na osnovu kalibracione krive.

Ukoliko koncentracija metala u uzorku izlazi izvan opsega kalibracione krive potrebno je razblažiti uzorak, ili pripremiti i analizirati dodatne standarde (ukoliko to radni opseg dozvoljava).

5.3.4. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Koncentracija metala u uzorku sedimenta se izračunava prema formuli:

$$C = \frac{C_{fin.rast} \cdot V_{fin.zap}}{m} \quad (5.5)$$

gde je:

C – koncentracija metala u uzorku (mg/kg)

$C_{fin.rast}$ – očitana koncentracija metala u finalnom rastvoru (mg/l)

m – suva masa uzorka sedimenta odmerenog za digestiju (g)

$V_{fin.zap}$ – finalna zapremina uzorka (ml)

Ako se za analizu koristio razblažen uzorak, pomnožiti rezultat sa faktorom razblaženja.

Izraditi kalibracionu krivu (npr. koristeći program Microsoft Excel) i prikazati je kao odziv/signal instrumenta (y -osa) u odnosu na koncentraciju metala ($\mu\text{g/l}$) u kalibracionim standardima (x -osa). Na osnovu dobijene jednačine prave i odgovarajućih odziva izračunati koncentraciju teških metala u sedimentu.

Vežba 5.4. Određivanje spektralnih interferencija u ICP-MS analizi

5.1.1. Princip metode

Određivanje spektralnih interferencija (izobarskih i poliatomskih smetnji), zasniva se na principu merenja intenziteta ometajućih izotopa ili ometajućih jedinjenja na drugoj masi i primeni matematičkih jednačina za korekciju dobijenih intenziteta.

5.1.2. Zadatak vežbe

- a) Uz pomoć tabele 5.3 u kojoj su prikazani prirodni izotopi različitih elemenata, utvrditi koje poliatomske smetnje utiču na određivanje gvožđa na ICP-MS. Predložiti na koji način se utvrđena smetnja može izbeći?
- b) Uz pomoć tabele 5.3, utvrditi koje poliatomske smetnje utiču na određivanje arsena na ICP-MS. Razmotriti i napisati matematičku jednačinu za korekciju intenziteta koji je dobijen za $m/z = 75$, kako bi se napravila razlika između signala koji je dobijen za As u odnosu na smetnje?

Tabela 5.3. Prirodni izotopi i njihova zastupljenost u prirodi

Atom- ski broj	Element	Izotopi	Mase (u)	% zastu- pljenosti	Atom- ski broj	Element	Izotopi	Mase (u)	% zastu- pljenosti
6	Ugljenik	¹² C	12,000	98,93	26	Gvožđe	⁵⁴ Fe	53,940	5,85
		¹³ C	13,003	1,07			⁵⁶ Fe	55,935	91,75
7	Azot	¹⁴ N	14,003	99,63			⁵⁷ Fe	56,935	2,12
		¹⁵ N	15,000	0,37			⁵⁸ Fe	37,933	0,28
8	Kiseonik	¹⁶ O	15,995	99,76	27	Kobalt	⁵⁹ Co	58,933	100,00
		¹⁷ O	16,999	0,04	28	Nikl	⁵⁸ Ni	57,935	68,08
		¹⁸ O	17,999	0,20			⁶⁰ Ni	39,931	26,22
9	Fluor	¹⁹ F	18,998	100,00			⁶¹ Ni	60,931	1,14
10	Neon	²⁰ Ne	19,992	90,48			⁶² Ni	61,928	3,63
		²¹ Ne	20,994	0,27	29	Bakar	⁶³ Cu	62,930	69,17
		²² Ne	21,991	9,25			⁶⁵ Cu	64,928	30,83
14	Silicijum	²⁸ Si	27,977	92,23	30	Cink	⁶⁴ Zn	63,929	48,63
		²⁹ Si	28,976	4,68			⁶⁶ Zn	65,926	27,90
		³⁰ Si	29,974	3,09			⁶⁷ Zn	66,927	4,10
15	Fosfor	³¹ P	30,974	100,00			⁶⁸ Zn	67,925	18,75
							⁷⁰ Zn	69,925	0,62
16	Sumpor	³² S	31,972	94,93	33	Arsen	⁷⁵ As	74,922	100,00
		³³ S	32,971	0,76			34	Selen	⁷⁴ Se
		³⁴ S	33,968	4,29	⁷⁶ Se	75,919			9,37
		³⁶ S	35,967	0,02	⁷⁷ Se	76,920			7,63
17	Hlor	³⁵ Cl	34,969	75,78	⁷⁸ Se	77,917			23,77
		³⁷ Cl	36,966	24,22	⁸⁰ Se	79,917	49,61		
18	Argon	³⁶ Ar	35,968	0,34	⁸² Se	81,917	8,73		
		³⁸ Ar	37,963	0,06	35	Brom	⁷⁹ Br	78,918	50,69
		⁴⁰ Ar	39,962	99,60			⁸¹ Br	80,916	49,31
24	Hrom	⁵⁰ Cr	49,746	4,35	36	Kripton	⁷⁸ Kr	77,920	0,35
		⁵² Cr	51,941	83,79			⁸⁰ Kr	79,916	2,28
		⁵³ Cr	52,941	9,50			⁸² Kr	81,913	11,58
		⁵⁴ Cr	53,939	2,37			⁸³ Kr	82,914	11,49
25	Mangan	⁵⁵ Mn	54,938	100,00			⁸⁴ Kr	83,912	57,00
							⁸⁶ Kr	85,911	17,30

Vežba 5.5. Korekcija interferencija koje potiču iz matriksa primenom internog standarda

5.5.1. Princip metode

Interferencije koje potiču iz matriksa, mogu se kompenzovati primenom internog standarda. U tom slučaju niska koncentracija (ppb) elementa se spajkuje u uzorke, kalibracione standarde i slepu probu. Korekcija odziva za analit vrši se na osnovu odziva internog standarda.

5.5.2. Hemikalije, reagensi i pribor

- Dejonizovana voda
- Koncentrovana azotna kiselina, HNO₃
- ICP multielement standard od 10 mg/l.
- Interni standard mix od 100 mg/l (Li, Sc, Ge, Rh, In, Tb, Lu, Bi)

5.5.3. Postupak izvođenje vežbe

Priprema kalibracionih standarda sa dodatkom internog standarda. Razblaživanjem ICP multielement standarda od 10 mg/l pripremiti kalibracione rastvore od 1, 5, 50, 100 i 500 µg/l. U svaki kalibracioni standard spajkovati interni standard u koncentraciji od 50 µg/l.

Priprema uzorka. U uzorak vode dodati interni standard u koncentraciji od 50 µg/l. Pre ICP/MS analize, uzorak konzervirati za cHNO₃.

5.5.4. Obrada rezultata i zadatak vežbe

U cilju konstruisanja kalibracione krive, potrebno je izvršiti korekciju odziva koji je dobijen za analit u odnosu na odziv internog standarda, prema formuli:

$$\text{Odnos odziva} = \text{Odziv}_{\text{analita}} / \text{Odziv}_{\text{internog standarda}} \quad (5.6)$$

Dobijene vrednosti se nanose na y osu se dok se na x-osi nalaze koncentracije analita u kalibracionim standardima. Koncentracija analita u uzorku se takođe koriguje u odnosu na interni standard i dalje izračunava iz nagiba i odsečka kalibracione krive.

Izraditi kalibracione krive sa i bez internog standarda (npr. koristeći program Microsoft Excel). Kalibracionu krivu bez internog standarda, prikazati kao odnos odziva koji se dobija za analit (y-osa) u odnosu na koncentraciju analita (µg/l) u kalibracionim standardima (x-osa). Kalibracionu krivu sa dodatkom internog

standarda prikazati na napred opisan način ($Odziv_{analita}/Odziv_{internog\ standarda}$ vs koncentracija analita u standardu). Na osnovu dobijene jednačine prave i odgovarajućih odziva izračunati koncentraciju analita u uzorku.

Uporediti rezultate analize koji se dobijaju u slučaju korišćenja kalibracije sa odnosno bez dodatka internog standarda.

6. UV-Vis spektroskopske metode analize

UV-Vis spektroskopija je instrumentalna tehnika koja je pronašla veliku primenu u analizi uzoraka iz životne sredine usled široke dostupnosti standardnih metoda analize, jednostavnosti procedura i relativno malih troškova. UV-Vis spektroskopija obuhvata područje apsorpcije elektromagnetnog zračenja u oblasti između 200 i 800 nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Ukoliko energija elektronskog prelaza odgovara energiji upadnog elektromagnetnog zračenja, doći će do apsorpcije zračenja od strane molekula. Imajući u vidu da se molekuli na sobnoj temperaturi većinom nalaze u osnovnom elektronskom stanju, prelaz iz osnovnog u pobuđeno stanje molekula se dešava ukoliko energetska razlika ova dva nivoa odgovara energiji elektromagnetnog zračenja. Elektronski prelazi u molekulima po energiji odgovaraju zračenju u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti, što znači da u ovoj oblasti zračenje apsorbuju elektroni, a ova vrsta spektroskopije se naziva još i *elektronska spektroskopija*.

Apsorpcija elektromagnetnog zračenja i energetske nivoi. Apsorpcija elektromagnetnog zračenja je kvantni proces i u osnovi zavisi od elektronske strukture molekula. Pri sudaru fotona (kvanta radijacije) i molekula dolazi do apsorpcije energije samo ako je energija fotona jednaka razlici između energije osnovnog i pobuđenog stanja ΔE :

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

gde je:

$h = 6,6261 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{Hz}^{-1}$ konstanta proporcionalnosti (Plankova konstanta)

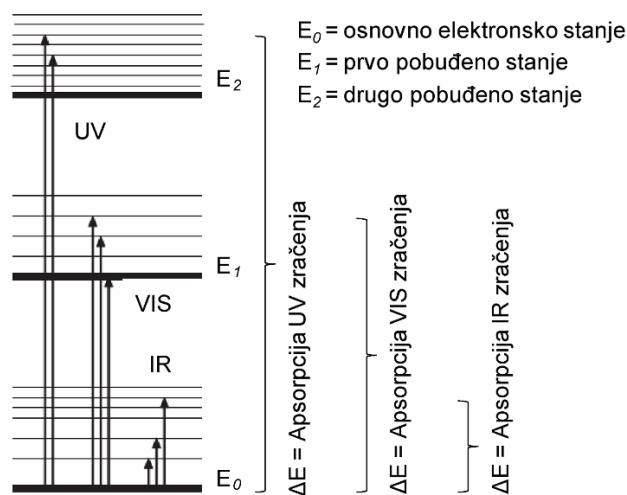
c – brzina svetlosti u vakuumu ($2,9979 \times 10^8 \text{ m/s}$)

λ – talasna dužina zračenja (m)

ν – frekvencija (Hz)

Molekulske energije se mogu menjati na tri načina: promenom rasporeda njihovih elektrona, promenom njihovih oscilacija i promenama njihovih brzina rotacije. Promene energija izazvane rotacijom i oscilacijom molekula mnogo su manje od onih izazvanih promenama elektronske strukture. Stoga se apsorpcije koje

vode oscilacionim i rotacionim promenama dešavaju na mnogo nižim frekvencijama (većim talasnim dužinama), odnosno u infracrvenoj oblasti (poglavlje 7), dok se elektronski prelazi dešavaju u vidljivom i ultraljubičastom području spektra. Na slici 6.1 prikazana je veza između različitih energetskih nivoa u molekulu sa odgovarajućim elektronskim prelazima u zavisnosti od tipa apsorbovanog zračenja.



Slika 6.1. Apsorpcija UV, Vis i IR zračenja i energetski nivoi u molekulu

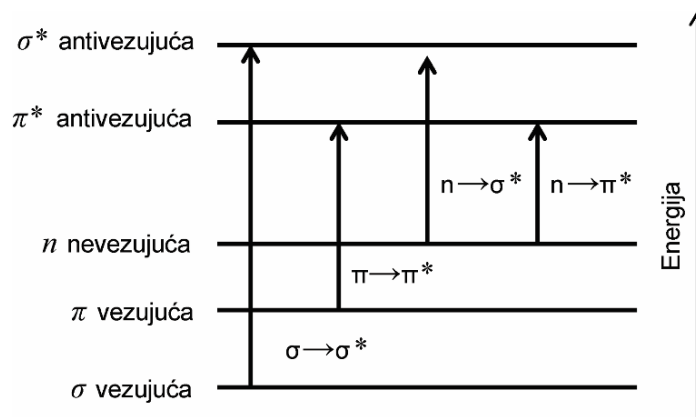
Položaj apsorpcione trake u spektru zavisi od razlike između dva energetska nivoa, dok karakter spektra zavisi od interakcije elektronskih prelaza sa drugim oblicima kretanja u molekulu kao što su npr. oscilacije i rotacije. Primenom UV-Vis spektroskopije najviše se ispituju organska jedinjenja. Značajan uticaj na spektre takođe ima i rastvarač u kome se apsorbujuće vrste rastvaraju. Spektar je sastavljen od traka i može biti relativno jednostavan (jedna ili nekoliko širokih traka u rastvorima) ili može imati finu strukturu u vidu dobro definisanih uzanih traka, kao što je to slučaj sa spektrom gasova.

Vrste elektronskih prelaza. Elektronske prelaze generalno možemo podeliti na:

- prelaze kod poliatomnih organskih molekula,
- prelaze sa prenosom naelektrisanja i
- prelaze kod kompleksa prelaznih metala.

Apsorpcija zračenja u UV-Vis oblasti praćena je prelazima elektrona između vezujućih (σ , π), navezujućih (n) i antivezujućih (σ^* , π^*), orbitala, pri čemu su na osnovu kvantno-mehaničkih selekcionih pravila dozvoljeni prelazi: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ i $n \rightarrow \pi^*$ (slika 6.2). $\sigma \rightarrow \sigma^*$ prelazi javljaju se kod zasićenih ugljovodonika kod kojih postoje samo proste veze, dok su $n \rightarrow \sigma^*$ prelazi karakteristični za kovalentno

zasićena jedinjenja koja imaju atome sa slobodnim elektronskim parovima (kao što su kiseonik, azot, sumpor, hlor, brom i jod). Prelazi tipa $\pi \rightarrow \pi^*$ i $n \rightarrow \pi^*$ javljaju se kod jedinjenja sa nezasićenim vezama i slobodnim elektronskim parovima.



Slika 6.2. Šematski prikaz mogućih elektronskih prelaza

Brojni prelazni joni metala kao što su npr. Cu^{2+} i Co^{2+} daju intenzivno obojene rastvore usled apsorpcije zračenja u vidljivoj oblasti. Ove trake se javljaju usled prelaska valentnih elektrona iz nižih d orbitala u više d orbitale metalnog jona ($d \rightarrow d$ prelazi).

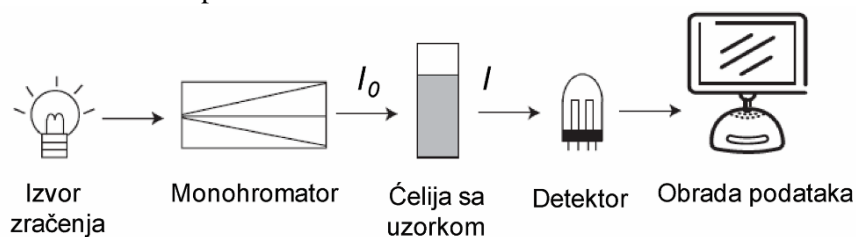
Mnogo značajniji u UV-Vis oblasti su spektri prenosa naelektrisanja, koji nastaju kada se apsorpcijom fotona u kompleksima prelaznih metala elektron premešta sa liganda na metal ili sa metala na ligand. Mnogi neorganski i organski kompleksi podležu takvoj vrsti apsorpcije, te se stoga nazivaju kompleksima sa prenosom naelektrisanja. Kompleksi sa prenosom naelektrisanja sadrže elektron donorsku grupu vezanu za akceptor elektrona. Kada takvo jedinjenje apsorbuje zračenje, elektron se sa donorske grupe premešta u orbitalu uglavnom povezanu za elektron akceptorsku grupu, a pobuđeno stanje je rezultat neke vrste “unutrašnje” oksido-redukcije. Najpoznatiji primeri kompleksa sa prenosom naelektrisanja su fenolni kompleks gvožđa(III) i kompleks gvožđa(II) sa 1,10-fenantrolinom.

Kvantitativna analiza. Kvantitativno određivanje koncentracije apsorbujuće komponente u rastvoru temelji se na *Lambert-Beer*-ovom zakonu, koji povezuje pri određenim uslovima koncentraciju i apsorbanciju analita (poglavlje 4, jednačina 4.4).

Instrumenti. Spektrofotometri koji se koriste u UV-Vis oblasti mogu biti jednozračni i dvozračni i sastoje se od (slika 6.3):

- izvora kontinualnog polihromatskog zračenja u UV i vidljivoj oblasti,
- disperzionog elementa,

- prostora za smeštaj kivete sa uzorkom,
- detektora i
- sistema za obradu podataka.



Slika 6.3. Šematski prikaz jednozračnog UV-Vis spektrofotometra

Kod jednzračnih instrumenata svi svetlosni zraci prolaze kroz ćeliju sa uzorkom. Kako bi se odredio intenzitet upadnog zračenja I_0 uzorak mora da se pomeri. Kod dvozračnih instrumenata svetlost se deli na dva snopa pre nego što dospe do uzorka. Jedan snop svetlosti se koristi kao referentni, dok drugi snop prolazi kroz uzorak. Za intenzitet referentnog uzorka se usvaja da je transmitancija 100%, odn. apsorbancija 0, i merenjem se dobija odnos intenziteta dva svetlosna snopa.

Kao izvor zračenja najčešće se primenjuju vodonična ili deuterijumska lampa u UV oblasti (185 – 375 nm) i volframova lampa u vidljivoj oblasti (325 nm – 3 μm), koja se primeniti i za blisku UV i blisku IR oblast. Alternativno, kao izvor zračenja za ceo UV-Vis region može se primeniti ksenon lučna lampa.

Monohromator je optički uređaj koji polihromatsku svetlost razlaže na monohromatsku svetlost (svetlost jedne talasne dužine). Sastoji se od ulaznog proreza, sistema za kolimaciju (sočiva i ogledala), disperzionog elementa koji može biti optička rešetka ili optička prizma, ređe optički filter, i izlaznog proreza. Odabirom ugla pod kojim svetlost upada na optičku rešetku/prizmu može se odabrati talasna dužina zračenja koju će monohromator propustiti. Staklene prizme i sočiva, kao i staklene kivete za uzorke, mogu se koristiti u vidljivom delu spektra, dok je za UV oblast pogodan kvarc.

Detektori pretvaraju optički signal u električni i najčešće se koriste fotoćelije i fotomultiplikatori kod jednozračnih i dvozračnih instrumenata, a tzv. DAD detektori (eng. *diode array detector*) za simultano praćenje više talasnih dužina.

Primena UV-Vis spektroskopije u analizi uzoraka iz životne sredine. UV-Vis spektroskopija ima široku primenu u analizi uzoraka iz životne sredine (tabele 6.1 i 6.2), uključujući određivanje različitih zagađujućih materija prisutnih kako u vodama, tako i u vazduhu i čvrstim medijumima kao što su sediment i zemljište.

U tabeli 6.1 dati su primeri i osnovni principi određivanja odabranih analita u vodenim uzorcima.

Tabela 6.1. Princip određivanja odabranih analita u vodenim uzorcima primenom UV-Vis spektroskopije

Analit	Princip metode
Amonijak	Alkalni rastvor živa(II)-jodida reaguje sa amonijakom, produkujući koloidni narandžasto-braon kompleks, koji apsorbuje zračenje na talasnoj dužini od 425 nm.
Nitriti	Nitriti reaguju sa 4-aminobenzensulfonamidom i dalje grade sa N-(1-naftil)-etilendiamin dihidrohloridom jako obojenu ružičastu azo boju koja apsorbuje zračenje na talasnoj dužini od 540 nm.
Nitrati	Metoda se zasniva na reakciji nitrata sa sulfosalicilnom kiselinom, a nakon obrade uzorka meri se apsorbancija nastalog proizvoda žute boje na talasnoj dužini od 415 nm.
Fosfati	Reakcijom sa molibdatom formira se fosfomolibdat koji se selektivno redukuje do intenzivno obojenog molibdensko plavog kompleksa, sa maksimumom apsorpcije na talasnoj dužini od 880 nm.
Gvožđe	Redukuje se do Fe(II) koji dalje reaguje sa <i>o</i> -fenantrolinom i gradi narandžasto-crveni kompleks sa maksimumom apsorpcije na talasnoj dužini od 510 nm
Hrom	Oksidacija do Cr(VI) koji reaguje sa 1,5-difenilkarbohidrazidom formirajući crveno-ljubičasti proizvod sa maksimumom apsorpcije na talasnoj dužini od 540 nm.
Kadmijum	Ekstrakcija hloroformom koji sadrži ditizon iz jako baznog rastvora pri čemu se forma kompleks ružičaste do crvene boje. Apsorbacija se meri na talasnoj dužini od 505 nm.
Fenol	Reakcijom sa 4-aminoantipirinom (pH 10) u prisustvu $K_3Fe(CN)_6$ formira se antipirin boja koja se ekstrahuje hloroformom i određuje merenjem apsorbancije na talasnoj dužini od 460 nm.
Anjonski surfaktanti	Reakcijom sa metilenskim plavim formira se plava so sa maksimumom apsorpcije zračenja na talasnoj dužini od 625 nm.

Iako se kvantitativna analiza metala u vodama i otpadnim vodama primarno sprovodi primenom tehnika atomske apsorpcione ili atomske emisijone spektroskopije (poglavlje 4), brojni metali u vodenim uzorcima mogu se određivati i primenom UV-Vis spektroskopije nakon formiranja obojenih metal-ligand kompleksa, kao što je prikazano u tabeli 6.1. Pored toga, jedan ligand, kao što je na primer difeniltiokarbazon (poznat i kao ditizon) ukoliko se koristi sa hloroformom

može se primeniti za određivanje nekoliko metala npr. kadmijuma(II), olova(II) i žive(II), a selektivnost metode se podešava korekcijom pH vrednosti.

Tabela 6.2. Princip određivanja odabranih polutanata u gasovitim uzorcima primenom UV-Vis spektroskopije

Analit*	Princip metode
Sumpor(IV)-oksid (SO ₂)	Uvođenje gasovitih uzoraka u rastvor koji sadrži tetrahloromerkurat (HgCl ₄ ²⁻) pri čemu se SO ₂ oksiduje do bisulfita (Hg(SO ₃) ₂ ²⁻). Dodatkom <i>p</i> -rosanilina i formaldehida formira se ružičasti kompleks koji apsorbuje na talasnoj dužini od 569 nm.
Ozon (O ₃)	Uvođenje gasovitih uzoraka u rastvor koji sadrži kalijum-jodid, pri čemu se oksidacijom formira jod koji se može određivati spektrofotometrijski merenjem apsorbancije na talasnoj dužini od 352 nm.
Oksidi azota (NO i NO ₂)	Koncentracija NO ₂ može se odrediti oksidacijom NO ₂ do NO ₃ ⁻ . Koncentracija NO ₃ ⁻ se potom određuje redukcijom do NO ₂ ⁻ sa Cd, a zatim NO ₂ ⁻ u reakciji sa sulfanilamidom i <i>N</i> -(1-naftil)-etilendiaminom formira crvenu azo boju sa maksimumom apsorbancije na talasnoj dužini od 550 nm.

*Primena IR spektroskopije za analizu odabranih gasovitih polutanata vazduha biće prikazana u poglavlju 7.

Kao što je prikazano kroz primere date u tabeli 6.2 UV/Vis spektroskopija se takođe može primeniti i za analizu najznačajnijih polutanata vazduha. U većini slučajeva, analiza se zasniva na uvođenju gasovitih uzoraka u pogodan apsorpcioni rastvor što je često praćeno reakcijama oksidacije (npr. oksidacija kalijum-jodida ozonom), pri čemu dolazi do prevođenja analita u oblik pogodan za spektrofotometrijsko određivanje.

Vežba 6.1. UV-Vis spektroskopska karakterizacija organskih materija u vodi

6.1.1. Princip metode

Organske materije prisutne u prirodnim vodama i otpadnim vodama, kao što su lignin, tanin, huminske materije i brojne druge aromatične komponente apsorbuju zračenje u UV oblasti, što omogućava primenu ove metode za procenu sadržaja i karakterizaciju organskih materija u vodi.

Generalno, svaka talasna dužina u intervalu od 220 do 280 nm smatra se pogodnom za procenu sadržaja prirodnih organskih materija (POM), pri čemu molarna apsorptivnost varira u zavisnosti od tipa hromofora zastupljenih u strukturi POM. Tako je na primer, apsorbanacija na 220 nm indikator prisustva i karboksilnih i aromatičnih hromofora, dok je apsorbanacija na 254 nm tipična za aromatične funkcionalne grupe.

Merenje apsorbanacije vode na talasnoj dužini od 254 nm i određivanje specifične UV apsorbanacije (SUVA vrednost) predstavlja jedan od najjednostavnijih pristupa za karakterizaciju prirodnih organskih materijama u akvatičnim ekosistemima. SUVA vrednost se izražava u m^{-1} po jediničnoj koncentraciji rastvorenih organskih materija (eng. *dissolved organic carbon*, DOC) izraženih u mg/l , prema jednačini 6.2:

$$SUVA = \frac{UV_{254} \cdot 100}{DOC} \quad (6.2)$$

Visoka SUVA vrednost ($>4 \text{ l}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) ukazuje da su u strukturi prirodnih organskih materija dominantno zastupljene hidrofobne, visokomolekularne organske materije kao što su huminske i fulvinske kiseline, dok niska SUVA vrednost ($<2 \text{ l}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) ukazuje da su u vodi najzastupljenija hidrofilna organska jedinjenja, niskih molekularnih masa i sa malom gustinom naelektrisanja. SUVA vrednost u opsegu od $2\text{-}4 \text{ l}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ upućuje na kombinovanu zastupljenost hidrofobnih i hidrofilnih jedinjenja u strukturi prirodnih organskih materija.

Određivanje SUVA vrednosti takođe ima široku primenu i u tretmanu vode za piće, gde se koristi kao surogat parameter za procenu sadržaja prekursora trihalometana i drugih nusprodukata dezinfekcije, kao i u monitoringu efluenata industrijskih otpadnih voda u cilju praćenja efikasnosti pojedinih tretmana.

6.1.2. Pribor i oprema

- Filter sa staklenim vlaknima (eng. glass fiber filter) (npr. Whatman® glass filters, grade 934AH) i membranski filter (0,45 µm filter)
- Stakleni vijali za analizu uzoraka za određivanje sadržaja DOC
- Set za membransku filtraciju
- Analitička vaga
- UV-Vis spektrofotometar sa kvarcnim kivetama (1 cm)
- Laboratorijsko posuđe.

6.1.3. Hemikalije i reagensi

- Reagens voda, bez organskih materija. Za optimalne performase, reagens voda treba da sadrži manje od $< 0,0045 \text{ cm}^{-1}$ UV apsorbujućih komponenti.
- Surogat za organski ugljenik. Rastvaranjem 2,1254 g standarda anhidrovanog kalijum hidrogen ftalata, $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ (KHP) u 1 l reagens vode dobija se osnovni rastvor (1 ml=1 mg C).

6.1.4. Postupak izvođenja vežbe

Kroz jednostavan primer skeniranja celog spektra i merenjem apsorbancije vodenog uzorka na specifičnoj talasnoj dužini biće prikazana primena UV-Vis apsorpcione spektroskopije za karakterizaciju prirodnih organskih materija u vodi.

Za analizu i poređenje rezultata koristiti dve različite prirodne vode, jednu površinsku vodu i jednu podzemnu vodu, sa poznatim sadržajem rastvorenog organskog ugljenika. U cilju uklanjanja interferirajućih materija koje mogu da apsorbuju UV zračenje na 254 nm uključujući koloidne čestice i neorganske materije (gvožđe, nitrati, nitriti, bromidi) uzorke je pre spektroskopske analize potrebno profiltrirati kroz filter sa staklenim vlaknima. Za spektroskopsku analizu primeniti odgovarajuće kvarcne kivete dužine optičkog puta 1 cm ili 5 cm, tako da izmerena apsorbancija uzorka na željenoj talasnoj dužini (254 nm) bude u intervalu od $0,005\text{-}0,95 \text{ cm}^{-1}$.

Uključiti UV-Vis spektrofotometar i podesiti nuliranje apsorbancije primenom reagens vode, bez organskih materija. Podesiti skeniranje spektra u intervalu od 200-600 nm. Za određivanje SUVA vrednosti koristiti izmerenu apsorbanciju na talasnoj dužini od 254 nm, prema jednačini 6.2. Spektrofotometrijska merenja prirodnih voda izvršiti u duplikatu.

Za kontrolu kvaliteta analitičkog postupka primeniti pripremljen standard kalijum hidrogen ftalata ili komercijalno dostupan standard KHP. Korelacija između

KHP (izračeno u mg C/l) i UV apsorbancije na 254 nm (UV_{254}) prikazan je jednačinom 6.3:

$$UV_{254} = 0,0144KPH + 0,0018 \quad (6.3)$$

U cilju kontrole kvaliteta primenjene metode potrebno je pripremiti najmanje jedan KHP standard koncentracije približne analiziranim uzorcima. Dozvoljena odstupanja su do 13%, izraženo na osnovu relativne standardne devijacije (RSD) (jednačina 6.4):

$$RSD, \% = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (6.4)$$

gde je s - standardna devijacija, a \bar{x} standardna devijacija merenja.

6.1.5. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Prikazati UV-Vis spektar analiziranih uzoraka površinske i podzemne vode, kao odnos intenziteta apsorbancije u funkciji talasne dužine.

Na osnovu izmerene UV_{254} apsorbancije i sadržaja ukupnih organskih materija (na osnovu DOC vrednosti) izračunati SUVA vrednost za ispitivane uzorke.

Na osnovu SUVA vrednosti i opšteg izgleda spektra dati procenu karakteristika prirodnih organskih materija prisutnih u vodenim uzorcima i uporediti njihovu strukturu.

Vežba 6.2. Određivanje amonijaka u podzemnoj vodi spektrofotometrijskom metodom sa Nessler-ovim reagensom

6.2.1. Princip metode

Neorganska jedinjenja azota obuhvataju amonijačni azot, nitrite i nitrate i nastaju prilikom razlaganja organskih jedinjenja koja sadrže azot ili mogu dospeti u površinske vode atmosferskim padavinama koje spiraju mineralna đubriva iz zemljišta. Sadržaj i distribucija različitih oblika azota zavise od uslova dospevanja azotnih jedinjenja u vodu, odnosno režima voda. Njihov sadržaj u prirodnim vodama obično je mali. Međutim, mineralnim oblicima azota i fosfora pripada glavna uloga u veštačkoj eutrofizaciji površinskih voda, što predstavlja najveći problem njihovog dospevanja prirodne vode.

Za određivanje sadržaja amonijačnog azota u vodi najčešće se primenjuje spektrofotometrijska metoda, koja se zasniva na reakciji amonijum-jona, NH_4^+ i alkalnog rastvora *Nessler*-ovog reagensa, pri čemu se formira jedinjenje žućkasto-smeđe boje prema reakciji 6.5.



Spektrofotometrijskim merenjem apsorbcije na talasnoj dužini od 425 nm određuje se sadržaj amonijaka. Ova metoda omogućuje određivanje sadržaja amonijaka u koncentracionom opsegu od 0,02 do 5,0 mg/l. Ukoliko se uzorak vode direktno tretira sa *Nessler*-ovim reagensom može se odrediti sadržaj amonijačnog azota iznad 2 mg/l, dok je za određivanje nižih koncentracija uzorak potrebno prethodno destilisati.

6.2.2. Pribor i oprema

- Analitička vaga
- UV-Vis spektrofotometar sa kvarcnim kivetama (1 cm)
- Trbušasta pipete, graduisane pipete, normalni sudovi različitih zapremina, tikvica po Erlenmajeru od 200 ml i ostalo laboratorijsko posuđe.

6.2.3. Hemikalije i reagensi

- Destilovana voda bez amonijaka.
- *Nessler*-ov reagens. Priprema se rastvaranjem 100 g HgI_2 i 70 g KI u malo vode i ova smeša se lagano uz mešanje dodaje ohlađenom rastvoru od 160 g NaOH

u 500 ml vode. Nakon mešanja rastvor se razblaži do 1 l i čuva se u boci od pyrex stakla sa gumenim zaptivačem, na mestu zaštićenom od svetlosti.

- Senjetov (Seignett) reagens. Priprema se rastvaranjem 50 g kalijum-natrijum-tartarata tetrahidrata u 100 ml destilovane vode i čuva u tamnoj boci.
- Fosfatni pufer. Priprema se rastvaranjem 14,3 g KH_2PO_4 i 68,8 K_2HPO_4 u 1 l destilovane vode.
- Rastvor cink-sulfata. Priprema se rastvaranjem 100 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ u 1 l destilovane vode.
- Rastvor natrijum-hidroksida. Priprema se rastvaranjem 240 g NaOH u 1 l destilovane vode.
- Amonijum-hlorid, osnovni rastvor (1 mg N/ml). Priprema se rastvaranjem 3,819 g bezvodnog amonijum hlorida u 1 l destilovane vode.
- Radni rastvor amonijum-hlorida (0,01 mg N/ml) priprema se razblaživanjem osnovnog rastvora.
- Rastvor natrijum-arsenita. Priprema se rastvaranjem 1,0 g NaAsO_2 u 1 l destilovane vode.

6.2.4. Postupak izvođenja vežbe

Određivanje amonijaka obradom uzorka Nessler-ovim reagensom. Pri određivanju sadržaja amonijaka prema opisanoj metodi glavne smetnje čine organske materije. Gvožđe i kalcijum se tretiraju u rastvoru dodavanjem Senjetove soli. Sulfidi se talože dodavanjem cink-sulfata, a nastali talog se izdvaja filtriranjem.

Za ispitivanja koristiti uzorak podzemne vode. Ukoliko je ispitivani uzorak podzemne vode mutan ili obojen, dodati na 100 ml uzorka 1 ml rastvora cink-sulfata, dobro promešati i dodati 0,5 ml rastvora natrijum-hidroksida. Posle nekoliko minuta stajanja, rastvor profiltrirati, a filtrat koristiti za određivanje amonijaka. U 50 ml filtrata ili vodenog uzorka, dodati 2 ml rastvora Senjetove soli i 1 ml *Nessler*-ovog reagensa i dobro promešati. Nakon 5 minuta izmeriti apsorbciju nastalog žutog obojenja na talasnoj dužini od 425 nm u kvarcnoj kivetu od 1 cm, u odnosu na slepu probu.

Priprema kalibracionih standarda. Kalibracioni standardi se pripremaju u normalnim sudovima od 50 ml odmeravanjem odgovarajuće zapremine radnog rastvora NH_4Cl , prema proceduri prikazanoj u tabeli 6.3. Nakon pripreme kalibracionih standarda tretirati ih prema proceduri za pripremu vodenih uzoraka.

6.2.5. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Izraditi kalibracionu krivu (npr. koristeći program Microsoft Excel) i prikazati je kao zavisnost apsorbcije (y-osa) u odnosu na koncentraciju amonijačnog azota

(mg N/l) u kalibracionim standardima (x -osa). Na osnovu dobijene jednačine prave izračunati koncentraciju amonijačnog azota u podzemnoj vodi.

Tabela 6.3. Procedura za pripremu kalibracionih standarda

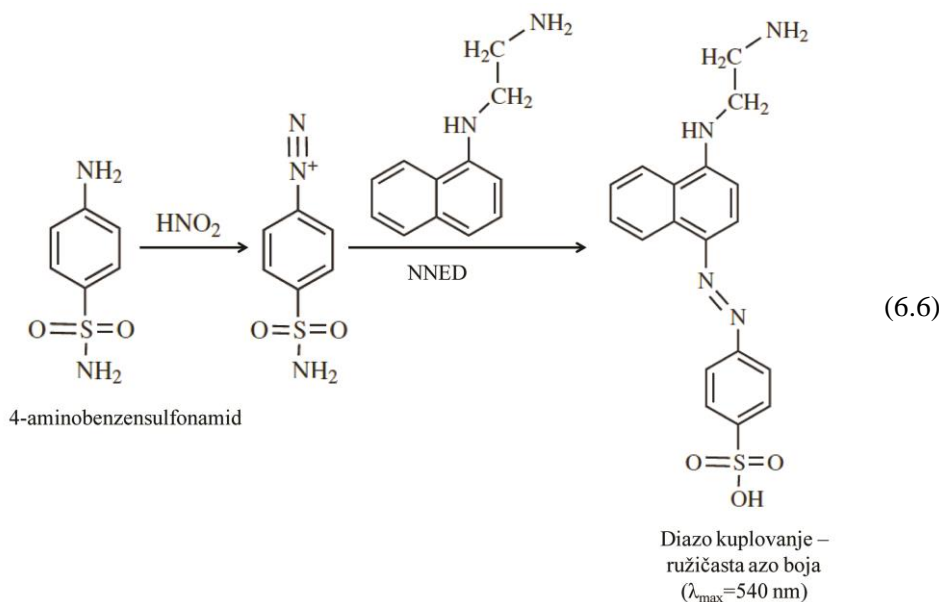
Zapremina radnog rastvora amonijum-hlorida (0,01 mg N/ml) (ml)	Koncentracija (mg N/l)
0	0
0,2	0,04
0,5	0,1
1,0	0,2
5,0	1,0
10,0	2,0

Za konverziju rezultata koristiti sledeće faktore: 1 mg N/l = 0,7761 mg NH_4^+ /l, odnosno 0,822 NH_3 /l. Dobijene vrednosti za sadržaj amonijačnog azota u analiziranim uzorcima podzemne vode uporediti sa standardima kvaliteta vode za piće definisanim važećim *Pravilnikom o higijenskoj ispravnosti vode za piće* (Sl. list SRJ 42/1998-4, 44/1999-19 i Sl. glasnik RS 28/2019-114) i dati komentar o mogućem uticaju ovog parametra na kvalitet vode za piće.

Vežba 6.3. Određivanje nitrita u vodi spektrofotometrijski sa Griess-ovim reagensom

6.3.1. Princip metode

Spektrofotometrijska metoda za određivanje nitrita u vodama primenom UV/Vis spektroskopije se zasniva na reakciji sa 4-aminobenzensulfonamidom u prisustvu ortofosforne kiseline (pH 1,9), pri čemu se formira diazonijumova so koja sa N-(1-naftil)-1,2-diaminoetan-dihidrohloridom (NNED) formira kompleks ružičaste boje sa maksimumom apsorpcije zračenja na talasnoj dužini od 540 nm. Diazo kuplovanje vrsta bogatih elektronima prikazano je reakcijom 6.6. Ova metoda se može koristiti za određivanje nitrita u vodi za piće, prirodnim vodama i otpadnoj vodi u opsegu 0,001-0,002 mg/l.



6.3.2. Pribor i oprema

- Analitička vaga
- pH metar
- UV-Vis spektrofotometar opremljen kivetama sa dužinom optičkog puta od 1 cm ili 5 cm
- Normalni sud od 50 ml; graduisana pipeta (1 ml, 5 ml, 10 ml i 50 ml) i ostalo laboratorijsko posuđe.

Potrebno je sav stakleni pribor pažljivo oprati koristeći hlorovodoničnu kiselinu (2 mol/l), a zatim isprati destilovanom vodom.

6.3.3. Hemikalije i reagensi

Za pripremu reagenasa koriste se samo reagensi čistoće „*pro-analysi*“ i destilovana voda ili voda ekvivalentne čistoće. Za izvođenje metode potrebno je pripremiti hemikalije i reagense koji su dati u nastavku.

- Ortofosforna kiselina (15 mol/l, $\rho = 1,70 \text{ g/cm}^3$; 1,5 mol/l).
- Reagens za bojenje - Griess-ov reagens. U smeši od 100 ml ortofosforne kiseline i 500 ml vode rastvoriti 40 g 4-aminobenzensulfonamida. U tako dobijenom rastvoru rastvoriti 2 g N-(1-naftil)-1,2-diaminoetan-dihidrohlorida, preneti u normalni sud od 1 l i dopuniti vodom do oznake. Rastvor je potrebno dobro promešati i čuvati u tamnoj staklenoj boci. Stabilan je mesec dana, ako se čuva u frižideru na 2 do 5°C.
- Osnovni rastvor nitrita (100 mg N/l). Priprema se odmeravanjem 0,4922 g natrijum-nitrita (prethodno sušenog 2 h na 105°C) i rastvaranjem u 1 l vode. Rastvor se čuva u zatvorenoj staklenoj boci na temperaturi od 2-5°C.
- Radni rastvor nitrita (1 mg N/l) priprema se razblaživanjem osnovnog rastvora nitrita.

6.3.4. Postupak izvođenja vežbe

Priprema vodenih uzoraka. Za određivanje nitrita u vodi maksimalna zapremina uzorka iznosi 40 ml. Manje zapremine uzoraka se primenjuju za određivanje većih koncentracija nitrita. Ukoliko uzorak sadrži suspendovane materije, potrebno ih je pre analize odvojiti taloženjem, centrifugiranjem ili filtriranjem uzoraka.

Odmeriti graduisanom pipetom 40 ml uzorka podzemne vode za ispitivanje u normalni sud od 50 ml. U uzorak dodati 1 ml *Griess-ovog* reagensa, odmah promućkati i dopuniti normalni sud vodom do oznake. Tako pripremljen uzorak promešati i ostaviti da stoji. U ovoj fazi pH uzorka treba da bude $1,9 \pm 0,1$. Najmanje 20 minuta nakon dodavanja reagensa izmeriti apsorbanciju rastvora na talasnoj dužini od 540 nm, u kivetu sa pogodnom dužinom optičkog puta (1 cm), pri čemu se kao referentni uzorak upotrebljava destilovana voda.

Korekcija za boju. Ukoliko je inicijalna boja uzorka takva da može praviti smetnje prilikom merenja apsorbancije, uzeti drugi deo uzorka za ispitivanje, pri čemu je potrebno *Griess-ovog* reagens za bojenje zameniti sa 1 ml rastvora ortofosforne kiseline (1,5 mol/l). Izmerena apsorbancija obeležava se kao A_k .

Paralelno sa svakim određivanjem analizira se i slepa proba. Izmerena apsorbancija slepe probe obeležava se kao A_s .

Priprema kalibracionih standarda. U seriju normalnih sudova od 50 ml odmeriti odgovarajuće zapremine standardnog rastvora nitrita (1 mg N/l), prema proceduri prikazanoj u tabeli 6.4, razblažiti vodom do zapremine od 40 ml, a zatim postupati na isti način kao i sa uzorcima.

Tabela 6.4. Procedura za pripremu kalibracionih standarda nitrita

Zapremina standardnog rastvora nitrita, 1 mg N/l (ml)	Koncentracija nitrita ($\mu\text{g N/l}$)
0	0
0,5	10
1,0	20
2,5	50
5,0	100
7,5	150
10,0	200
12,5	250

6.3.5. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Nakon očitavanja apsorbancije kalibracionih standarda, potrebno je izvršiti korekciju apsorbancija u odnosu na slepu probu. Izraditi kalibracionu krivu (npr. koristeći program Microsoft Excel) i prikazati je kao zavisnost apsorbancije (y -osa) u odnosu na koncentraciju nitrita ($\mu\text{g N/l}$) u kalibracionim standardima (x -osa).

Apsorbancija koja potiče od nitritnog azota u delu uzorka za ispitivanje, izračunava se iz izraza:

$$A_r = A_u - A_s \quad (6.7)$$

ili, ako se vrši korekcija za apsorpciju uzorka, iz izraza:

$$A_r = A_u - A_s - A_k \quad (6.8)$$

gde je:

A_u – izmerena apsorbancija uzorka

A_s – apsorbancija slepe probe

A_k – korektivna apsorbancija

A_r – preračunata apsorbancija uzorka.

Na osnovu dobijene jednačine prave izračunati koncentraciju nitrita u podzemnoj vodi ($1 \text{ mg N/l} = 3,29 \text{ mg NO}_2^-/\text{l}$).

Vežba 6.4. UV spektrofotometrijska metoda za "skrining" nitrata u vodi

6.4.1. Princip metode

UV spektrofotometrijska metoda za skrining nitrata u vodenim uzorcima primenljiva je samo za vode sa niskim sadržajem organskih materija, kao što su na primer nezagađene prirodne vode ili voda za piće. Za brzu detekciju nitrata u uzorcima vode koristi se merenje apsorbancije na talasnoj dužini od 220 nm. Imajući u vidu da organske materije prisutne u vodi takođe mogu da apsorbuju UV zračenje na ovoj talasnoj dužini, za korekciju rezultata se može primeniti merenje apsorbancije na talasnoj dužini od 275 nm, na kojoj ne apsorbuju nitrati. Imajući u vidu da ne postoji jasna empirijska korelacija između koncentracije nitrata i organskih materija, primena ove metode se ne preporučuje u slučaju voda sa povišenim koncentracijama organskih materija.

Smetnje koje potiču od suspendovanih čestica mogu se ukloniti filtracijom. Korekcija pH vrednosti uzoraka primenom hlorovodonične kiseline se koristi za uklanjanje smetnji koje potiču od hidroksida ili karbonata, ukoliko su prisutni u visokim koncentracijama (1000 mg CaCO₃/l). Surfaktanti, nitriti, hrom(VI), hloriti i hlorati takođe mogu da prave smetnje, tako da se njihov doprinos mora odrediti zasebnim metodama analize.

6.4.2. Pribor i oprema

- Filter sa staklenim vlaknima (eng. *glass fiber filter*) (npr. Whatman[®] glass filters, grade 934AH);
- Set za membransku filtraciju;
- UV-Vis spektrofotometar opremljen kvarcnim kivetama sa dužinom optičkog puta od 1 cm ili 5 cm;
- Normalni sud od 50 ml; trbušaste i graduisane pipete različitih zapremina i ostalo laboratorijsko posuđe.

6.4.3. Hemikalije i reagensi

- Reagens voda koja ne sadrži nitrata (eng. *nitrate-free water*) (može se koristiti destilovana ili dejonizovana voda).
- Osnovni rastvor nitrata. Priprema se odmeravanjem i rastvaranjem 0,7218 g KNO₃ (prethodno osušenog tokom 24 h na 105 °C) u 1 l vode (1 ml = 100 µg NO₃⁻-N).

- Radni rastvor nitrata ($1 \text{ ml} = 10 \text{ } \mu\text{g NO}_3^- \text{-N}$), priprema se razblaživanjem osnovnog rastvora. Kao stabilizator osnovnog i radnog rastvora koristi se hloroform ($2 \text{ ml CHCl}_3/\text{l}$), a rastvor je stabilan 6 meseci.
- Hlorovodonična kiselina, HCl (1N).

6.4.4. Postupak izvođenja vežbe

Odmeriti 50 ml bistrog uzorka podzemne vode, po potrebi prethodno profiltriranog kroz filter sa staklenim vlaknima, dodati 1 ml hlorovodonične kiseline i snažno promešati. Uzorak preneti u kvarcnu kivetu dužine optičkog puta 1 cm ili alternativno 5 cm i izmeriti apsorbanciju vodenog uzorka na talasnoj dužini od 220 nm u odnosu na reagens vodu (slepa proba). Takođe je potrebno sprovesti i merenje apsorbancije uzorka na talasnoj dužini od 275 nm, koja se koristiti za korekciju smetnji koje potiču od rastvorenih organskih materija.

U normalne sudove od 50 ml pripremiti seriju kalibracionih standarda u intervalu od 0-7 mg $\text{NO}_3^- \text{-N/l}$ odmeravanjem 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7 ml radnog rastvora nitrata i dopuniti do oznake. Dalje rukovanje i analiza kalibracionih standarda nitrata treba da prati istu proceduru kao i za uzorke.

6.4.5. Obrada rezultata i zadatak vežbe

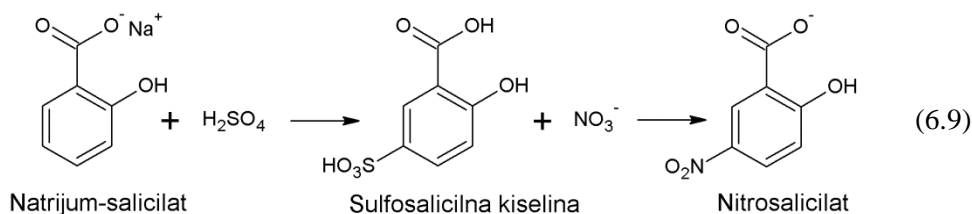
Nakon merenja apsorbancije uzoraka i kalibracionih standarda, oduzeti vrednosti izmerene na talasnoj dužini od 275 nm od apsorbancije izmerene na 220 nm ($A_{220} - A_{275}$), kako bi se dobila vrednost koja odgovara sadržaju nitrata u uzorcima. Izraditi kalibracionu krivu (npr. koristeći program Microsoft Excel) i prikazati je kao zavisnost apsorbancije (nanete na y -osu) od koncentracije nitrata (nanete na x -osu). Kalibraciona kriva mora da bude linearna i da prolazi kroz koordinatni početak. Na osnovu jednačine prave izračunati koncentraciju nitrata u uzorcima. Uporediti izmerenu koncentraciju nitrata u odnosu na standarde kvaliteta za podzemne vode prema *Uredbi o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i podzemnim vodama i sedimentu i rokovima za njihovo dostizanje* ("Sl. glasnik RS", br. 50/2012).

Potrebno je napomenuti da ukoliko je korekcija apsorbancije izmerene na dve talasne dužine (A_{220} i A_{275}) veća od 10%, ova metoda nije pogodna za analizu nitrata u ispitivanoj vodi i u tom slučaju je potrebno primeniti neku drugu metodu (npr. spektrofotometrijsku sa sulfsalicilnom kiselinom).

Vežba 6.5. Određivanje nitrata u vodi spektrofotometrijski sa sulfosalicilnom kiselinom

6.5.1. Princip metode

Spektrofotometrijska metoda za određivanje nitrata u vodama se zasniva na reakciji nitrata sa sulfosalicilnom kiselinom, koja se formira dodavanjem natrijum-salicilata i sumporne kiseline u uzorak, a nakon obrade alkalnim rastvorom meri se apsorbanacija nastalog proizvoda žute boje na talasnoj dužini od 415 nm. Predloženi pojednostavljeni reakcioni mehanizam prikazan je reakcijom 6.9.



EDTA se dodaje sa alkalijom kako bi se sprečilo taloženje soli kalijuma i magnezijuma, a natrijum-azid (ili alternativno sulfaminska kiselina) se dodaje za uklanjanje smetnji koje mogu da potiču usled prisustva nitrita. Ova metoda se može primeniti za određivanje nitrata u površinskim, podzemnim vodama, otpadnim vodama, kao i u vodi za piće, a granica detekcije metode određivanja nitratnog azota je $\sim 0,2$ mg/l.

6.5.2. Pribor i oprema

- Posude za uparavanje i peščano kupatilo ili ključajuće vodeno kupatilo
- Analitička vaga
- UV-Vis spektrofotometar opremljen kivetama sa dužinom optičkog puta od 5 cm
- Normalni sud od 25 ml; trbušaste pipete i graduisane pipete različitih zapremina i ostalo laboratorijsko posuđe.

6.5.3. Hemikalije i reagensi

Za pripremu reagenasa koriste se samo reagensi čistoće „*pro-analysi*“ i destilovana voda ili voda ekvivalentne čistoće. Za izvođenje metode potrebno je pripremiti hemikalije i reagense koji su dati u nastavku.

- Sumporna kiselina (koncentracije 18 mol/l; $\rho = 1,84$ g/cm³).

- Glacijalna sirćetna kiselina (17 mol/l; $\rho = 1,05 \text{ g/cm}^3$).
- Alkalni rastvor (200 g/l; $\rho = 50 \text{ g/l}$). Priprema se pažljivim rastvaranjem $200 \pm 2 \text{ g}$ natrijum-hidroksida u oko 800 ml vode, potom se doda $50 \pm 0,5 \text{ g}$ EDTANa₂ i rastvori. Rastvor je potrebno ohladiti na sobnu temperaturu i dopuni vodom do 1 l. Alkalni rastvor se čuva u polietilenskoj boci.
- Sulfaminska kiselina, H₃NSO₃ (0,75 g/l), koristi se kao alternativa natrijum-azidu zbog njegove toksičnosti.
- Natrijum-salicilat, C₇H₅NaO₃ (10 g/l). Priprema se rastvaranjem 1 g natrijum-salicilata u 100 ml vode, priprema se neposredno pre analize.
- Osnovni standardni rastvor nitrata (1000 mg N/l). Priprema se odmeravanjem 7,215 g kalijum-nitrata, KNO₃ (prethodno sušenog 2h na 105°C) i rastvaranjem u 1 l destilovane vode. Rastvor se čuva u staklenoj boci najviše 2 meseca.
- Radni rastvori nitrata, koncentracije 100 mg N/l i 1 mg N/l pripremaju se odgovarajućim razblaživanjem osnovnog rastvora, neposredno pre upotrebe.

6.5.4. Postupak izvođenja vežbe

Priprema vodenih uzoraka. U čistu posudu za uparavanje odmeriti trbušastom pipetom 25 ml uzorka površinske vode. U posudu dodati 0,5 ml sulfaminske kiseline i 0,2 ml glacijalne sirćetne kiseline. Nakon 5 minuta posudu je potrebno postaviti na peščano ili ključajuće vodeno kupatilo i sadržaj upariti do suva. Nakon uparavanja dodati 1 ml natrijum-salicilata, promešati i rastvor ponovo upariti do suva. Nakon uparavanja ostaviti posudu da se ohladi na sobnu temperaturu.

Nakon hlađenja u posudu dodati 1 ml sumporne kiseline, ostatak rastvoriti blagim mešanjem i ostaviti da stoji 10 minuta. Nakon toga, dodati 10 ml vode i 10 ml alkalnog rastvora. Smešu kvantitativno preneti u normalni sud od 25 ml, ne dopunjavajući do oznake, i postaviti na peščano ili vodeno kupatilo na 25 °C tokom 10 minuta. Nakon toga normalni sud dopuniti vodom do oznake.

Apsorbancija rastvora se meri na talasnoj dužini od 415 nm u kivetama sa dužinom optičkog puta od 4 ili 5 cm u odnosu na destilovanu vodu (slepa proba). Ukoliko je poznato ili ako se pretpostavlja da će apsorpcija uzorka (A_u) za ispitivanje na datoj talasnoj dužini obuhvatiti i interferirajuće materije, postupak je potrebno sprovesti paralelno, tako da se jednom uzorku ne dodaje natrijum-salicilat. U tom slučaju izmerena apsorbcija predstavlja korigovanu apsorbciju (A_k).

Priprema kalibracionih standarda. Pripremiti seriju kalibracionih standarda nitrata u opsegu od 0,04-0,2 mg/l. U niz čistih posuda za uparavanje odmeriti 1, 2, 3, 4 i 5 ml radnog rastvora nitrata (1 mg N/l), što odgovara količinama nitrata od 1, 2, 3, 4, 5 µg u odgovarajućim posudama. Zatim u svaku posudu dodati 0,5 ml sulfaminske kiseline i 0,2 ml sirćetne kiseline i nastaviti postupak pripreme prema

istoj proceduri, kao što je prethodno opisano za vodene uzorke. Nakon očitavanja apsorbancije kalibracionih standarda, apsorbancija slepe probe (A_s) se oduzme od apsorbancije svakog standardnog rastvora za upoređivanje.

6.5.5. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Apsorbancija koja potiče od nitratnog azota u delu uzorka za ispitivanje (A_r), izračunava se iz izraza:

$$A_r = A_u - A_s \quad (6.10)$$

ili, ako se vrši korekcija za apsorbanciju uzorka, iz izraza:

$$A_r = A_u - A_s - A_k \quad (6.11)$$

gde je

A_u – izmerena apsorbancija uzorka

A_s – apsorbancija slepe probe

A_k – korektivna apsorbancija

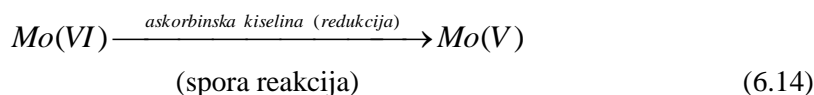
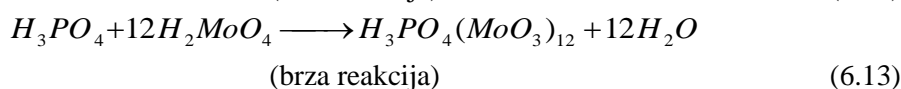
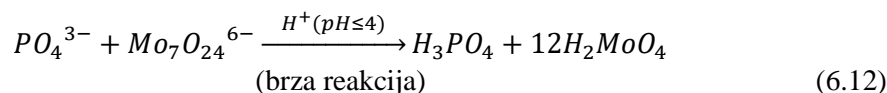
A_r – preračunata apsorbancija uzorka

Izraditi kalibracionu krivu (npr. koristeći program Microsoft Excel) i prikazati je kao zavisnost apsorbancije (nanete na y -osu) od koncentracije nitrata (nanete na x -osu). Kalibraciona kriva mora da bude linearna i da prolazi kroz koordinatni početak. Na osnovu jednačine prave izračunati koncentraciju nitrata u uzorcima ispitivane površinske vode. Izraziti rezultat u mg NO_3^-/l , pri čemu je $1 \text{ mg N/l} = 4,427 \text{ mg NO}_3^-/\text{l}$.

Vežba 6.6. Određivanje sadržaja ortofosfata spektrofotometrijskom metodom sa amonijum-molibdatom

6.6.1. Princip metode

Spektrofotometrijska metoda za određivanje ortofosfata u vodama se zasniva na reakciji ortofosfatnih jona sa kiselim rastvorom koji sadrži jone molibdata i antimona, kako bi se formirao antimon-fosfomolibdatni kompleks. Redukcijom kompleksa sa askorbinskom kiselinom formira se jako obojen molibdensko plavo kompleks. Koncentracija ortofosfata u vodi se određuje merenjem apsorbancije nastalog kompleksa na talasnoj dužini od 880 nm. Predloženi pojednostavljeni reakcioni mehanizam sa amonijum-molibdatom, L-askorbinskom kiselinom i fosfatima može se opisati sledećim reakcijama:



Kod zagađenijih uzoraka vode mnoge organofosforne komponente prevode se u ortofosfate mineralizacijom sa peroksidisulfatom, azotnom ili sumpornom kiselinom. Ova metoda se može primeniti za određivanje sadržaja ortofosfata u svim vodama, uključujući i efluente otpadnih voda i morsku vodu. Bez razblaživanja može se odrediti koncentracija fosfora u osegu od 0,005 mg/l do 0,8 mg/l.

6.6.2. Pribor i oprema

- Analitička vaga;
- UV-Vis spektrofotometar opremljen kivetama sa dužinom optičkog puta od 1 cm;
- Normalni sudovi, trbušaste pipete i graduisane pipete različitih zapremina, menzure i ostalo laboratorijsko posuđe.

Stakleni laboratorijski pribor koji se koristi za ovu metodu potrebno je oprati u razblaženoj hlorovodoničnoj kiselini (1:1). Ne smeju se koristiti komercijalni deterdženti za pranje posuđa.

6.6.3. Hemikalije i reagensi

Za pripremu reagenasa koriste se samo reagensi čistoće „*pro analysi*“ i destilovana voda ili voda ekvivalentne čistoće. Za izvođenje metode potrebno je pripremiti hemikalije i reagense koji su dati u nastavku.

- Sumporna kiselina ($\rho=1,84 \text{ g/cm}^3$; $\sim 9 \text{ mol/l}$; $\sim 4,5 \text{ mol/l}$ i $\sim 2 \text{ mol/l}$).
- Natrijum hidroksid (2 mol/l).
- Askorbinska kiselina (100 g/l). Priprema se rastvaranjem 10 g askorbinske kiseline u normalnom sudu od 100 ml . Ovako pripremljen rastvor je stabilan dve nedelje ako se čuva u tamnim staklenim bocama, u frižideru.
- Kiseli molibdat I. Priprema se rastvaranjem 13 g amonijum-heptamolibdat-tetrahidrata ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) u 100 ml vode. Potom rastvariti $0,35 \text{ g}$ antimon-kalijum-tartrat-hemihidrata u 100 ml vode. U pripremljeni rastvor molibdata dodati 300 ml sumporne kiseline (9 mol/l) uz konstantno mešanje, a zatim dodati pripremljeni rastvor tartarata i nastaviti sa mešanjem. Rastvor je stabilan najmanje 2 meseca ako se čuva u bocama sa tamnim staklom.
- Kiseli molibdat II. Priprema se pažljivim dodavanjem 230 ml sumporne kiseline ($4,5 \text{ mol/l}$) u 70 ml vode, uz mešanje i hlađenje rastvora. Napravljen rastvor treba ohladiti. U normalni sud od 100 ml rastvoriti 13 g amonijum-heptamolibdat-tetrahidrata, dodati u kiseli rastvor i promešati. Zatim, 35 g antimon-kalijum-tartrat-hemihidrata rastvoriti u 100 ml vode, i dodati molibdat-kiselom rastvoru. Dobro promešati. Kiseli molibdat II se koristi kada je uzorak zakišljen rastvorom sumporne kiseline ($4,5 \text{ mol/l}$).
- Rastvor za kompenzaciju mutnoće/boje. Priprema se mešanjem dva dela sumporne kiseline ($4,5 \text{ mol/l}$) i jednog dela askorbinske kiseline (100 g/l).
- Natrijum-tiosulfat pentahidrat (koncentracije 12 g/l). Priprema se rastvaranjem $1,20 \text{ g}$ natrijum-tiosulfata pentahidrata u 100 ml vode. Kao konzervans dodaje se anhidrovani natrijum karbonat ($0,05 \text{ g}$).
- Osnovni standardni rastvor ortofosfata (koncentracija 50 mg P/l). Priprema se odmeravanjem $0,2197 \text{ g}$ kalijum-dihidrogenfosfata (KH_2PO_4) (prethodno sušenog do konstantne mase na 105°C) i rastvaranjem u $\sim 800 \text{ ml}$ vode, u normalnom sudu od 1000 ml . U normalni sud od 1000 ml dodati još 10 ml sumporne kiseline ($4,5 \text{ mol/l}$) i dopuniti vodom do oznake.
- Radni rastvor ortofosfata (koncentracija 2 mg P/l), priprema se razblaživanjem osnovog standardnog rastvora (1 ml radnog rastvora = $2 \mu\text{g P}$). Rastvor se priprema svakodnevno.
- Hlorovodonična kiselina ($\rho = 1,19 \text{ g/cm}^3$; $2,5 \text{ mol/l}$).

6.6.4. Postupak izvođenja vežbe

Priprema vodenih uzoraka. Potrebo je napomenuti da se paralelno sa uzorcima, priprema i slepa proba prema istoj proceduri, korišćenjem istih količina svih reagenasa i reagens vode umesto alikvota uzorka. U normalne sudove od 50 ml odmeriti graduisanom pipetom 40 ml uzorka površinske vode. U svaki normalni sud dodati 1 ml askorbinske kiseline, a nakon toga 2 ml kiselog molibdata I, dopuniti vodom do oznake i dobro promešati.

U slučaju uzoraka sa velikom mutnoćom ili obojenih uzoraka neophodno je izvršiti korekciju. Za korekciju uzorka u normalne sudove od 50 ml odmeriti graduisanom pipetom 40 ml uzorka i dodati 3 ml rastvora za kompenzaciju mutnoće/boje. Dopuniti vodom do oznake, dobro promešati i izmeriti apsorbanciju (A_k). Ova apsorbancija se oduzima od apsorbance izmerene u istom uzorku koji je pripremljen sa askorbinskom kiselinom i kiselim molibdatom I (A_u). Apsorbancija rastvora se meri na talasnoj dužini od 880 nm u kivetama od 1 cm nakon 10 do 30 minuta. Kao referentni uzorak koristiti reagens vodu.

Priprema kalibracionih standarda. U normalne sudove od 50 ml, pipetom odmeriti pogodne zapremine 1, 3, 5, 7 i 10 ml radnog rastvora ortofosfata (koncentracija 2 mg P/l), što odgovara količinama od 0,04, 0,12, 0,20, 0,28 i 0,40 mg P/l. Reagens vodom razblažiti do oko 40 ml. U svaki normalni sud dodati 1 ml askorbinske kiseline i 2 ml kiselog molibdata I. Normalne sudove dopuniti vodom do oznake i dobro promešati. Izmeriti apsorbanciju kalibracionih standarda na talasnoj dužini od 880 nm u kivetama sa dužinom optičkog puta od 1 cm.

6.6.5. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Apsorbancija uzorka za ispitivanje (A_r), izračunava se iz izraza:

$$A_r = A_u - A_s - A_k \quad (6.15)$$

gde je:

A_u – apsorbancija uzorka

A_s – apsorbancija slepe probe

A_k – apsorbancija rastvora za korekciju

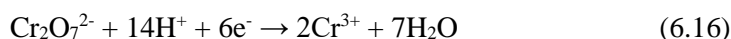
Nakon očitavanja apsorbancije kalibracionih standarda, izraditi kalibracionu krivu (npr. koristeći program Microsoft Excel) nanošenjem vrednosti za apsorbanciju na y-osu u odnosu na sadržaj fosfata (mg P/l, x-osa). Na osnovu jednačine prave izračunati koncentraciju ortofosfata u uzorcima ispitivane površinske vode i uporediti sa graničnim vrednostima ortofosfata u površinskoj vodi prema *Uredbi o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i*

*podzemnim vodama i sedimentu i rokovima za njihovo dostizanje ("Sl. glasnik RS",
br. 50/2012).*

Vežba 6.7. Određivanje hemijske potrošnje kiseonika u vodi spektrofotometrijskom metodom

6.7.1. Princip metode

Hemijska potrošnja kiseonika (HPK) se definiše kao masena koncentracija kiseonika ekvivalentna količini specifičnog oksidanta koju utroši rastvorena i suspendovana materija kada se uzorci vode tretiraju oksidantom, pri kontrolisanim uslovima. Zbog specifičnih hemijskih karakteristika, kao oksidant se koristi dihromat ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), pri čemu se tokom reakcije heksavalentni hrom redukuje do Cr^{3+} prema reakciji 6.16:



Mogućnost primene UV-Vis spektroskopije za određivanje ovog parametra zasniva se na činjenici da hrom u oba oksidaciona stanja apsorbuje zračenje u vidljivom delu elektromagnetnog spektra. Dihromatni jon apsorbuje zračenje u regionu od oko 400 nm, dok je u ovoj oblasti apsorpcija zračenja od strane Cr^{3+} značajno slabija. Apsorpcija zračenja od strane Cr^{3+} je najintenzivnija u oblasti od približno 600 nm. U 9M rastvoru sumporne kiseline molarni apsorpcioni koeficijent za Cr^{3+} iznosi 50 l/mol·cm (na 604 nm), odnosno 25 l/mol·cm (na 426 nm), dok vrednost molarnog apsorpcionog koeficijenta za $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ iznosi 380 l/mol·cm (na 444 nm). Iz tog razloga odabrana radna talasna dužina za ovu metodu je 420 nm, čime se prati promena koncentracije hroma(VI). U prisustvu visokih koncentracija suspendovanih materija ili obojenih komponenti, metoda nije pogodna i preporučuje se primena titrimetrijske procedure.

6.7.2. Pribor i oprema

- Reaktor za zagrevanje uzoraka na 150°C (slika 6.4) sa regulatorom ključanja, staklene kivete sa brušenim grlom povezane sa kondenzatorom koji se hladi vazduhom
- Analitička vaga
- UV-Vis spektrofotometar opremljen kivetama sa dužinom optičkog puta od 1 cm
- Normalni sud od 1 l; trbušaste pipete i graduisane pipete različitih zapremina, menzure i ostalo laboratorijsko posuđe.

6.7.3. Hemikalije, reagensi i pribor

Za pripremu reagenasa koriste se samo reagensi čistoće „*pro-analysi*“ i destilovana voda ili voda ekvivalentne čistoće. Za izvođenje metode potrebno je pripremiti hemikalije i reagense koji su dati u nastavku.

- Sumporna kiselina (4 mol/l).
- Srebro-sulfat/sumporna kiselina. Odmeriti 10 g Ag_2SO_4 i rastvoriti u oko 35 ml vode, potom pažljivo uz mešanje i hlađenje dodavati u porcijama 965 ml koncentrovane H_2SO_4 .
- Rastvor za digestiju. Standardni referentni rastvor kalijum-dihromata (0,040 mol/l). Rastvoriti 80 g živa(II)-sulfata u 800 ml vode. Pažljivo dodati 100 ml koncentrovane sumporne kiseline. Ostaviti da se ohladi i u rastvor dodati 11,92 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, prethodno sušenog 2h na 105°C . Rastvor se kvantitativno prenese u normalni sud i razblaži do 1 l.
- Standardni referentni rastvor kalijum-hidrogenftalata (KHP). Rastvoriti 425 mg $\text{KC}_8\text{H}_5\text{O}_4$ (prethodno sušenog 2h na 105°C) u 1 l vode. Teorijski, KHP ima HPK od 1,176 mg O_2/mg , odnosno ovaj rastvor ima teorijsku vrednost od 500 mg O_2/l i stabilan je nedelju dana kada se čuva na 4°C .



Slika 6.4. Reaktor za pripremu uzoraka digestijom za određivanje HPK vrednosti

6.7.4. Postupak izvođenja vežbe

Priprema vodenih uzoraka. Odmeriti 10 ml uzorka površinske vode u reakcionu posudu i dodati 5 ml rastvora za digestiju. Dodati 2-3 kuglice za ključanje. Potom polako dodati 15 ml srebro-sulfat/sumporne kiseline i bocu odmah povezati sa kondenzatorom i uključiti grejno telo. Temperatura reakcione mešavine treba da bude 150 °C tokom 2h. Bocu je potrebno ohladiti i kondenzator isprati sa malo vode. Nakon toga, reakcionu smešu razblaži do oko 75 ml i ohladiti na sobnu temperaturu. Ostaviti da se eventualno prisutne suspendovane materije istalože. Višak dihromata odrediti spektrofotometrijski merenjem apsorbancije na talasnoj dužini od 420 nm u kivetama dužine optičkog puta od 1 cm.

Merenje apsorbancije uzoraka, slepe probe i standarda se vrši u odnosu na reagens vodu (destilovana voda). Inicijana vrednost apsorbancije (A_0) za dihromat može se dobiti merenjem apsorbancije nedigestiranog uzorka slepe probe koji sadrži dihromatni jon. Apsorbancija opada u digestiranim uzorcima, slepoj probi i standardima koji sadrže organske materije. Analizira digestiranog uzorka slepe probe koristi se za korekcije koje potiču od nečistoća reagenasa.

Razlika između apsorbancije digestiranih uzoraka (A_u) i apsorbancije digestirane slepe probe (A_s) koristi se za određivanje HPK uzoraka. Za kalibracione standarde je takođe potrebno izvršiti korekciju za vrednost apsorbancije digestirane slepe probe.

Priprema kalibracionih standarda. Od standardnog referentnog rastvora kalijum-hidrogenftalata pripremiti najmanje pet kalibracionih standarda, tako da obuhvate koncentracioni opseg HPK u ispitivanim uzorcima (npr. opseg od 5-150 mg/l). Kalibracione standarde je potrebno tretirati na isti način kao i uzorke.

6.7.5. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Apsorbancija, A_r , koja potiče od dihromatnog jona koji nije izreagovao izračunava se iz izraza:

$$A_r = A_u - A_s \quad (6.17)$$

gde je:

A_u – izmerena apsorbancija uzorka

A_s – apsorbancija slepe probe

A_r – preračunata apsorbancija uzorka

Izraditi kalibracionu krivu (npr. koristeći program Microsoft Excel) i prikazati je kao zavisnost apsorbancije (y -osa) u odnosu na HPK vrednost (mg O_2/l , x -osa). Na osnovu izrađene kalibracione krive i jednačine direktno očitati HPK vrednosti (mg O_2/l) koja odgovara vrednosti apsorbancije uzorka. Na osnovu određene HPK

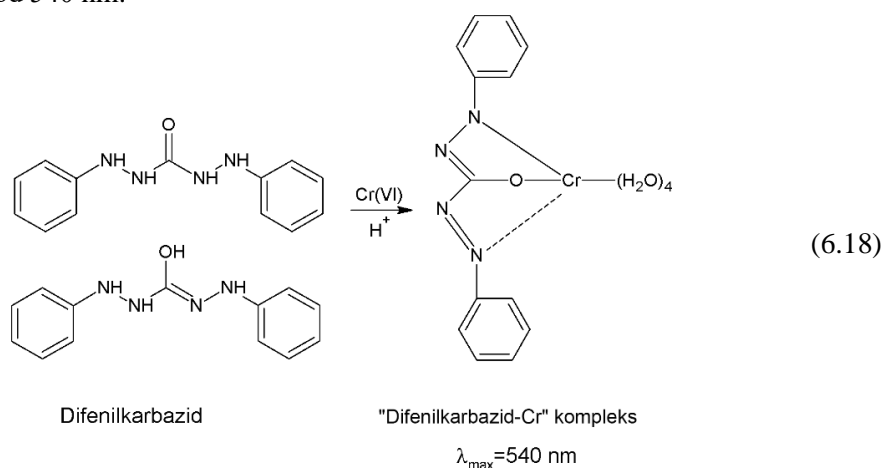
vrednosti dati komentar o kvalitetu ispitivane vode sa aspekta sadržaja organskih materija.

Vežba 6.8. Određivanje hroma u otpadnoj vodi spektrofotometrijskom metodom

6.8.1. Princip metode

Hrom se u prirodi nalazi u rudama, međutim glavni izvor njegovog dospevanja u površinske vode su ispuštanja otpadnih voda industrije galvanizacije, štavljenja, tekstila i boja, a koristi se i za izradu cevi, legura i prevlaka. Hrom je toksični element čija toksičnost varira u zavisnosti od oblika u kom se nalazi. Šestovalentni oblik se smatra znatno toksičnijim (svrstan je u grupu 1 kao kancerogen za ljude prema IARC). Zbog teškoća da se ova dva oblika hroma razdvoje analitičkim metodama, u standardima kvaliteta voda daje se njegova ukupna koncentracija (ukupan hrom) ili hrom(VI).

Spektrofotometrijska metoda se zasniva na određivanju šestovalentnog hroma koji reaguje sa difenilkarbazidom (reakcija 6.18) u kiseloj sredini formirajući stabilan crveno-ljubičasti kompleks sa maksimumom apsorpcije zračenja na talasnoj dužini od 540 nm.



Reakcija je veoma osetljiva, a molarni apsorpcioni koeficijent formiranog kompleksa na talasnoj dužini od 540 nm iznosi $40000 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Reakcija sa difenilkarbazidom gotovo je specifična za šestovalentni hrom. Molibden i živa takođe mogu da stupaju u reakciju sa difenilkarbazidom, međutim intenzitet obojenja formiranih kompleksa ovih soli je značajno slabiji u odnosu na kompleks hroma, pri specifičnoj pH vrednosti. Stoga, prisustvo Mo i Hg u koncentracijama do 200 mg/l se može tolerisati za ovu metodu. Prisustvo vanadijuma pravi značajnije smetnje, međutim koncentracije koje su i do deset puta veće u odnosu na hrom neće prouzrokovati značajniju analitičku grešku. Gvožđe ukoliko je prisutno u

koncentraciji većoj od 1 mg/l može da produkuje žutu boju, međutim obojenje nije intenzivno i ne pravi značajnije interferencije prilikom određivanja.

6.8.2. Pribor i oprema

- Membranski filter (0,45 μm filter)
- Set za membransku filtraciju
- pH metar
- Analitička vaga
- UV-Vis spektrofotometar opremljen kivetama sa dužinom optičkog puta od 1 cm
- Normalni sudovi, trbušaste pipete i graduisane pipete različitih zapremina, čaše, menzure i ostalo laboratorijsko posuđe.

6.8.3. Hemikalije i reagensi

Za pripremu reagenasa koriste se samo reagensi čistoće „*pro-analysi*“ i destilovana voda ili voda ekvivalentne čistoće. Za izvođenje metode potrebno je pripremiti hemikalije i reagense koji su dati u nastavku.

- Sumporna kiselina (koncentracije 18 mol/l, $\rho = 1,84 \text{ g/cm}^3$; 6 mol/l i 0,2 mol/l)
- Fosforna kiselina (15 mol/l, $\rho = 1,70 \text{ g/cm}^3$)
- Azotna kiselina ($\rho \sim 1,51 \text{ g/cm}^3$)
- Natrijum-hidroskid (1 mol/l)
- Osnovni rastvor kalijum-dihromata ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Za pripremu osnovnog rastvora hroma odmeri se 141,4 mg $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, rastvori se u čaši i kvantitativno prenese u normalni sud od 100 ml (1 ml = 500 $\mu\text{g Cr}$)
- Radni rastvor kalijum-dihromata (1 ml = 5 $\mu\text{g Cr}$) priprema se razblaživanjem osnovnog rastvora
- Rastvor difenilkarbazida. Priprema se rastvaranjem 250 mg 1,5-difenilkarbazida u 50 ml acetona. Rastvor se čuva u tamnoj bočici i priprema nedeljno.

6.8.4. Postupak izvođenja vežbe

Korekcija pH i razvijanje boje. Uzorke je pre analize potrebno profiltrirati kroz 0,45 μm membranski filter. U uzorke otpadne vode dodati 5 kapi koncentrovane fosforne kiseline. Podesiti pH uzorka na $2,0 \pm 0,5$ (ukoliko je potrebno koristiti 0,2 mol/l H_2SO_4). Preneti 50 ml uzorka u normalni sud od 100 ml, razblažiti reagens vodom do oznake i promešati. Dodati 2 ml rastvora difenilkarbazida, promešati i ostaviti 5-10 minuta da se razvije boja. Rastvor preneti u kivetu i izmeriti

apsorbanciju na talasnoj dužini od 540 nm, koristeći reagens vodu kao referentni rastvor. Korigovati vrednost apsorbcije uzorka (A_u) za vrednost apsorbcije slepe probe (A_s) koja se priprema na identičan način, kao i uzorci. Ukoliko su uzorci nakon razblaživanja (do 100 ml) mutni, izmeriti apsorbciju uzoraka pre dodatka difenilkarbazida (A_k) i korigovati finalnu vrednost apsorbcije nakon dodatka difenilkarbazida i razvijanja boje.

Priprema kalibracionih standarda. U niz normalnih sudova od 200 ml dodati 2, 5, 10, 15 i 20 ml radnog rastvora kalijum-dihromata, što odgovara koncentracijama od 10-100 $\mu\text{g Cr}$ u odgovarajućim normalnim sudovima, odn. 0,05-0,5 mg/l. Normalne sudove dopuniti do oznake reagens vodom i tretirati ih na identičan način kao i uzorke, uključujući i korak filtracije. Za izradu kalibracione krive koristiti istu zapreminu kalibracionih standarda kao i u slučaju uzoraka (50 ml standarda razblažiti reagens vodom do 100 ml i promešati). Ukupna zapremina kalibracionih standarda nakon dodatka difenilkarbazida iznosi 102 ml.

6.8.5. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Apsorbancija, A , koja potiče od hroma (VI) u uzorcima izračunava se iz izraza:

$$A_r = A_u - A_s - A_k \quad (6.19)$$

gde je:

A_u – izmerena apsorbcija uzorka

A_s – apsorbcija slepe probe

A_k – apsorbcija uzorka pre dodatka difenilkarbazida

A_r – preračunata apsorbcija uzorka

Izraditi kalibracionu krivu (npr. koristeći program Microsoft Excel) i prikazati je kao zavisnost apsorbcije (y -osa) u odnosu na koncentraciju hroma(VI) u kalibracionim standardima (mg/l, x -osa). Na osnovu izrađene kalibracione krive i dobijene jednačine prave izračunati koncentraciju hroma(VI) u uzorcima.

Na osnovu urađene analize dati komentar da li analizirana otpadna voda zadovoljava kriterijume za granične vrednosti emisije otpadnih voda iz postrojenja i pogona za preradu i proizvodnju tekstila na mestu ispuštanja u površinske vode. Dobijene rezultate uporediti sa trenutno važećom *Uredbom o graničnim vrednostima emisije zagađujućih materija u vode i rokovima za njihovo dostizanje* ("Sl. glasnik RS", br. 67/2011, 48/2012 i 1/2016).

:

Vežba 6.9. Određivanje rezidualnog ozona u vodi indigo spektrofotometrijskom metodom

6.9.1. Princip metode

Ozon je nestabilan gasoviti molekul i široko se primenjuje u tretmanu vode za piće i otpadnih voda u cilju dezinfekcije i/ili oksidacije. Merenje koncentracije rezidualnog ozona u vodi tokom tretmana vode za piće ili otpadne vode je veoma značajno usled mogućnosti njegove primene na različitim mestima u tehnološkoj liniji obrade vode i brojnih benefita njegove primene. Spektrofotometrijska merenja se generalno zasnivaju na reakciji ozona sa pogodnim reagensom, npr. N,N-dietil-p-fenilendiaminom (DPD) ili indigotrisulfonatom, čiji se produkti kvantitativno mogu odrediti spektrofotometrijski.

Indigosulfonat reaguje veoma brzo sa ozonom ($k=9,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). U kiselj sredini ozon brzo obezbojava rastvor indigotrisulfonata, što je praćeno opadanjem apsorbcije rastvora. Opadanje apsorbcije rastvora na talasnoj dužini od 600 nm je linearno povezano sa porastom koncentracije ozona u vodi i iznosi $0,42 \pm 0,01 \text{ cm}^{-1}$ po mg O_3/l . Molarni apsorpcioni koeficijent ozona određen merenjem na talasnoj dužini od 600 nm iznosi približno $20,000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Indigo kolorimetrijska/spektrofotometrijska metoda je veoma selektivna i jednostavna, pogodna za primenu kod rečnih, jezerskih voda, kod voda koje sadrže mangan, vode za piće, podzemnih voda sa izuzetno visokom tvrdoćom, čak i kod biološki tretiranih otpadnih voda. Granica kvantitacije ove metode za merenje rezidualnog sadržaja ozona iznosi 10-20 $\mu\text{g/l}$. Potrebno je napomenuti da vodonik-peroksid i organski peroksidi takođe obezbojavaju rastvor indiga, ali su te reakcije znatno sporije. Fe(III) i Mn(II) ne ometaju određivanje ozona indigo metodom, ali se oksiduju ozonom, tako da je u njihovom prisustvu potrebno izvršiti snimanje u odnosu na slepu probu iz koje je ozon selektivno uklonjen. Hlor pravi smetnje prilikom određivanja ozona primenom indigo metode, ali se smetnje mogu ukloniti dodatkom malonske kiseline.

6.9.2. Pribor i oprema

- Oprema za ozonizaciju vode (npr. generator ozona, ozonizacione kolone; merač protoka itd.)
- Analitička vaga
- UV-Vis spektrofotometar opremljen kivetama sa dužinom optičkog puta od 4 i 5 cm

- Normalni sudovi, trbušaste pipete i graduisane pipete različitih zapremina, čaše, menzure i ostalo laboratorijsko posuđe.

6.9.3. Hemikalije, reagensi i pribor

- Osnovni rastvor indiga. U normalni sud od 1 l dodati 500 ml destilovane vode, 1 ml koncentrovane fosforne kiseline i uz mešanje dodati i rastvoriti 770 mg kalijum-indigo-trisulfonata ($C_{16}H_7N_2O_{11}S_3K_3$) i dopuniti normalni sud do oznake destilovanom vodom. Rastvor dobijen razblaživanjem osnovnog rastvora 100 puta treba da ima apsorbanciju od $0,20 \pm 0,010 \text{ cm}^{-1}$ na 600 nm (čuva se u mraku i odbacuje kada je apsorbancija $< 0,16 \text{ cm}^{-1}$).
- Indigo rastvor I. U normalni sud od 1 l dodati 20 ml osnovnog rastvora indiga, 10 g natrijum-hidrogenfosfata (NaH_2PO_4) i 7 ml koncentrovane fosforne kiseline i dopuniti destilovanom vodom do oznake. Novi rastvor se priprema kada apsorbancija postojećeg rastvora opadne na manje od 80% od početne vrednosti (najčešće za nedelju dana).
- Indigo rastvor II. Priprema se na isti način kao prethodni rastvor I, ali se dodaje 100 ml osnovnog rastvora indiga.
- Malonska kiselina. Priprema se rastvaranjem 5 g malonske kiseline u 100 ml destilovane vode.
- Glicin. Priprema se rastvaranjem 7 g glicina u 100 ml destilovane vode.

6.9.4. Postupak izvođenja vežbe

Za određivanje koncentracije rezidualnog ozona u vodi, potrebno je izvršiti uzorkovanje vode sa pilot postrojenja za pripremu vode za piće nakon predozonizacije ili centralne ozonizacije. Voda se takođe može uzorkovati pomoću slavine staklene kolone za ozonizaciju vode u laboratorijskim uslovima, gde je prethodno izvršen tretman ozonom generisanim iz ambijentalnog vazduha ili kiseonika (slika 6.5). Koncentraciju rezidualnog ozona u vodi odrediti uzorkovanjem vode odmah nakon ozonizacije (1 minut), nakon perioda stabilizacije, odn. stajanja od 3, 5, 7 i 10 min. U zavisnosti od očekivane koncentracije ozona, potrebno je pratiti jedan od dva postupka navedena u nastavku.

Ukoliko je očekivani koncentracioni opseg rezidualnog ozona od 0,01-0,1 mg O_3/l , potrebno je dodati 10 ml rastvora indiga I u dva normalna sudića od 100 ml. Dopuniti jedan do marke destilovanom vodom (slepa proba), a drugi dopuniti sa uzorkom vode nakon ozonizacije (slika 6.5). Uzorak dodati tako da se obezbojene zone brzo uklone mešanjem uzorka, vodeći pritom računa da ne dođe do gubitka ozona. Izmeriti apsorbanciju oba rastvora što je pre moguće (najkasnije nakon 4 h) na talasnoj dužini od $600 \pm 5 \text{ nm}$ u kivetama sa dužinom optičkog puta od

5 cm. Koncentracija ozona se izračunava na osnovu razlike apsorbancija uzorka i slepe probe.

Ukoliko je očekivani koncentracioni opseg rezidualnog ozona od 0,05-0,5 mg O₃/l, određivanje se vrši kao što je napred opisano, ali se kao reagens primenjuje rastvor indiga II umesto indiga I. Preporučuje se merenje u kivetama sa dužinom optičkog puta od 4 ili 5 cm.



a)



b)

Slika 6.5. a) laboratorijske opreme za generisanje ozona i ozonizaciju vode i b) rastvora indiga i ozonizane vode

6.9.5. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Koncentracija rezidualnog ozona u vodi izračunava se na osnovu razlike apsorbancija uzorka i slepe probe (ΔA), na osnovu jednačine:

$$C(O_3) = \frac{100 \cdot \Delta A}{f \cdot b \cdot V} \quad (6.20)$$

gde je:

$C(O_3)$ – koncentracija rezidualnog ozona u vodi (mg/l)

ΔA – razlika apsorbancija uzorka i slepe probe

b – dužina optičkog puta (cm)

V – zapremina uzorka (najčešće 90 ml)

f – konverzioni faktor koji iznosi 0,42

Na osnovu izračunate koncentracije rezidualnog ozona u vodi nakon tretmana ozonom i različitih vremenskih perioda stabilizacije (3-10 minuta), izračunati

konstantu brzine raspada ozona na osnovu jednačine 6.21 i odrediti vreme poluraspada ozona u vodi (jednačina 6.22):

$$\ln\left(\frac{[O_3]}{[O_3]_0}\right) = -k_{obs} \cdot t \quad (6.21)$$

$[O_3]_0$ predstavlja početnu koncentraciju rezidualnog ozona u vodi, a $[O_3]$ koncentraciju ozona nakon vremena, t . Nagib krive zavisnosti $\ln([O_3]/[O_3]_0)$ u funkciji vremena predstavlja konstantu brzine raspada ozona, k_{obs} (eng. *observed rate constant*) (sec^{-1}). Vreme poluživota ozona $t_{1/2}$ izračunava se prema jednačini 6.22:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{0,69}{k_{obs}[O_3]} \quad (6.22)$$

7. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena (eng. *infrared*, IR) spektroskopija se zasniva na identifikaciji molekula na osnovu vibracija njihovih atoma, odnosno periodičnih promena uglova i međuatomskih udaljenosti. Generalno posmatrano, vibracione spektroskopske metode temelje se na apsorpciji ili raspršenju elektromagnetnog zračenja, tako da mogu podeliti infracrvenu spektroskopiju i Ramanovu spektroskopiju.

Infracrveno zračenje koje je od značaja za analitičku primenu se proteže od 300 do 12000 cm^{-1} . Apsorpcija energije u infracrvenom području od strane molekula nije dovoljna za ekscitaciju elektrona, odnosno prelazak na viši energetski nivo, već izaziva samo promene u energiji vibracije, odnosno oscilacije. Naime, molekuli osciluju tako da pojedinačne oscilacije veza između atoma i oscilacije atomskih grupa imaju karakteristične frekvencije na koje preostali deo molekula malo utiče. Postoje dva osnovna tipa oscilacija:

- valentne (promena dužina veza) i
- deformacione (promena ugla između susednih veza).

Molekul može apsorbovati infracrveno zračenje tokom oscilovanja samo ako ovo kretanje istovremeno prati i promena dipolnog momenta u molekulu. Proces apsorpcije IR zračenja je električne prirode i da bi do njega došlo neophodno je da budu zadovoljeni sledeći uslovi:

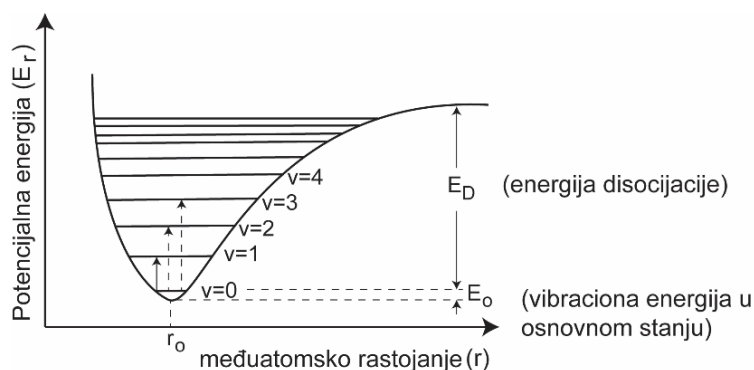
- frekvencija vibracije (oscilacije) hemijske veze (tzv. prirodna frekvencija) mora biti jednaka frekvenciji zračenja;
- hemijska veza mora da ima svojstva električnog dipola.

Talasne dužine koje obuhvata IR oblast nalaze se između vidljivog (~ 800 nm) i mikrotalasnog (~ 1 mm) dela elektromagnetnog spektra. Na osnovu vrste energetskih prelaza koji se pobuđuju apsorpcijom zračenja, IR oblast je podeljena na: blisku infracrvenu (800 nm - 2,5 μm), srednju (2,5 - 25 μm) i daleku infracrvenu (25 - 1000 μm) oblast.

Apsorpcija elektromagnetnog zračenja u infracrvenom delu spektra. Apsorpcija elektromagnetnog zračenja u osnovnom vibracionom delu infracrvenog spektra takođe predstavlja kvantiran proces, a raspon energija odgovara razlikama između vibracionih energetskih nivoa. Kao što je prikazano na slici 7.1, ovi nivoi su

okarakterisani vibracionim kvantnim brojevima, $v=0,1,2$ itd. U osnovnom stanju dvoatomni molekul (ili neka hemijska veza u složenijem molekulu) ima minimalan sadržaj vibracione energije (E_0) koji odgovara osnovnom nivou ($v=0$, u dvoatomnom molekulu).

Najveći broj apsorpcionih maksimuma u infracrvenom spektru potiče od osnovnih prelaza ($0 \rightarrow 1$), odn. prelaza iz osnovnog stanja u prvo pobuđeno stanje ($v=1$). Sa povećanjem vibracionog kvantnog broja, energetska razlika između susjednih nivoa postaje sve manja (slika 7.1). Energetski prelazi sa osnovnog na udaljene energetske nivoe ($0 \rightarrow 2$, $0 \rightarrow 3$ itd.) ($\Delta v > 1$) po selekcionim pravilima su zabranjeni, zbog čega se najčešće i ne javljaju, a ukoliko pak dođe do ove apsorpcije, odgovarajuće trake su veoma slabog intenziteta i nazivaju se višim tonovima. Najznačajniji deo u IR spektroskopiji predstavlja deo takozvane srednje ili osnovne vibracione IR oblasti, zbog toga što u njemu apsorbuje većina funkcionalnih grupa u organskim molekulima. Oblast frekvencija zračenja ovog dela elektromagnetnog spektra odgovara frekvencijama vibracija (oscilovanja) hemijskih veza u nepobuđenim molekulima, tzv. osnovne vibracije u molekulima.

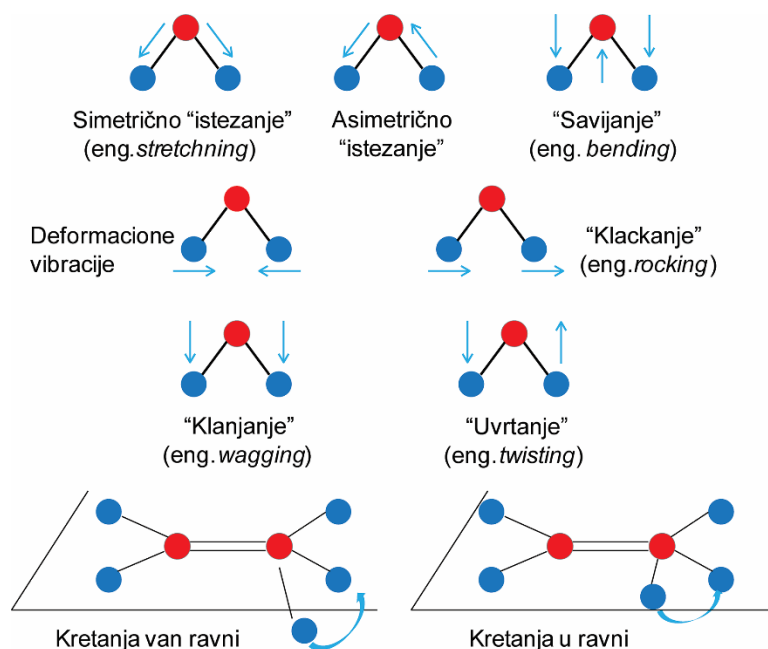


Slika 7.1. Dijagram zavisnosti potencijalne energije od međuatomske udaljenosti i raspored vibracionih energetskih za dvoatomni molekul

Vrste vibracija u molekulu. Kao što je navedeno, infracrveni spektri daju podatke o rotacionim i vibracionim stanjima molekula. Različite vrste vibracija istezanja i savijanja uzrokovanih apsorpcijom energije infracrvenog zračenja prikazane su na slici 7.2. Generalno, hemijske veze sa "lakšim" atomima uvek vibriraju brže od onih sa "težim" atomima. Trostruke veze koje su jače vibriraju pri višim frekvencijama od dvostrukih veza, dok dvostruke veze vibriraju pri višim frekvencijama od jednostrukih veza.

Činjenica da pojedinačna veza ili atomska (funkcionalna) grupa apsorbuje infracrveno zračenje određene karakteristične frekvencije, omogućava efikasnu primenu IR spektroskopije za identifikaciju jedinjenja i u strukturnoj analizi. Dakle,

apsorpcija zračenja i pobuđivanje vibracija u molekulu rezultuju nastankom apsorpcionih traka, koje karakteriše specifičan položaj, intenzitet i širina. Koncentracija određene komponente u uzorku takođe se može odrediti na osnovu intenziteta apsorpcije na određenoj frekvenciji. Infracrveni spektar se dobija kao zavisnost apsorpcije (ili transmitancije) od frekvencije (češće talasnog broja) infracrvenog zračenja.

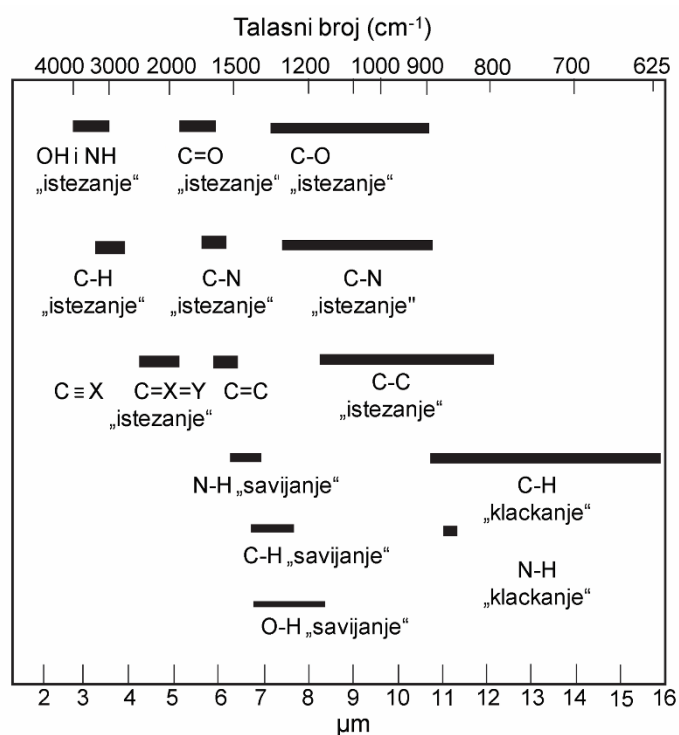


Slika 7.2. Vibracije u IR spektrima

Od frekvencije vibracije hemijske veze zavisi položaj njenog apsorpcionog maksimuma, a od veličine promene dipolnog momenta zavisi njegov intenzitet. Što je promena dipolnog momenta veća, veća je i verovatnoća rezonancije sa elektromagnetnim zračenjem, pa je samim tim i apsorpcija IR zračenja jača. Iz tog razloga najintenzivniji maksimumi u IR spektrima potiču od apsorpcije polarnih veza kao što su C=O, C-O, N=O itd., dok za razliku od njih, simetrično supstituisane veze kod kojih ne postoji promena dipolnog momenta, kao što je to slučaj sa npr. C=C, daju veoma slabe trake ili ih uopšte ne daju. Područje od $500\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, naziva se područje "otiska prsta" (eng. *fingerprint region*), karakteristično za svako jedinjenje. Na slici 7.3 šematski su prikazane smernice za tumačenje IR spaktra, odn. regioni u kojima apsorbuju pojedine funkcionalne grupe.

Instrumenti. Šematski prikaz IR spektrofotometra sa Furijeovom transformacijom (FTIR) prikazan je na slici 7.4. Kod FTIR spektrofotometara objedinjene su dve metode: interferometrija (Michelson-ov interferometar) i Fourier-

ova transformacija (matematička operacija koju je uveo J.B.J. Fourier). Infracrveni zrak iz svetlosnog izvora (1) stiže do specijalnog ogledala (2) (eng. *beam splitter*) koje propušta 50% zračenja u pravcu nepokretnog ogledala (4), a ostatak reflektuje ka pokretnom ogledalu (3). Oba zraka se po reflektovanju od ogledala (3) i (4) sjedinjuju u istoj tački (na ogledalu 2), gde dolazi do njihove interferencije. Interferisana svetlost prolazi kroz uzorak (5), a zatim stiže do detektora (6).

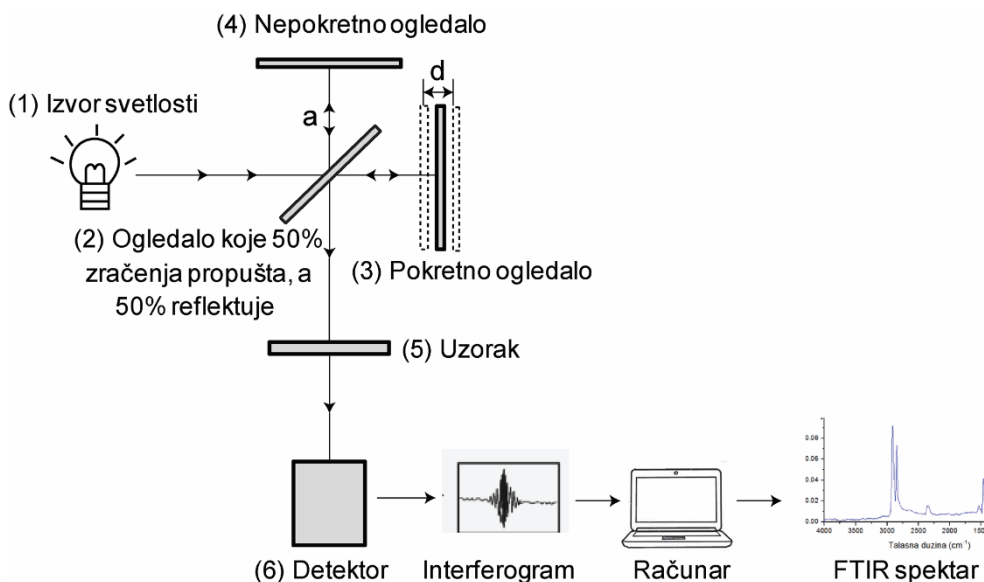


Slika 7.3. Dijagram karakterističnih molekularnih vibracija u infracrvenom delu spektra

Dužina putanje zraka reflektovanog od ogledala (4) je konstantna (a). Sa druge strane, pošto ogledalo (3) neprekidno osciluje između dva granična položaja ($a+d/2$ i $a-d/2$), dužina puta zraka reflektovanog od njega menja se između $a+d$ i $a-d$. Direktno snimljen signal zove se interferogram i on predstavlja svetlosni izlaz funkcije pozicije ogledala. Fourier-ova transformacija interferograma (pomoću elektronskog računara) direktno daje intenzitet zračenja (propuštenog kroz uzorak) u zavisnosti od frekvencije $I(\nu)$, što odgovara IR spektru snimljenom na jednozračnom instrumentu.

Svetlosni izvor, obično u obliku štapića, sačinjen je od materijala koji u usijanom stanju emituje IR svetlost u odgovarajućoj spektralnoj oblasti. Najčešće se koriste takozvani “Nernst-ov” (od sinterovanih oksida cirkonijuma, torijuma i

cerijuma) i “Globar-ov” izvor (silicijum karbid), a međusobno se razlikuju po spektralnom opsegu emitovanih zračenja, kao i po distribuciji intenziteta unutar spektralnih područja.



Slika 7.4. Šematski prikaz FTIR spektrofotometra

Optičke prizme i rešetke se primenjuju za razlaganje snopa zračenja prema frekvenciji. Jedan od prvih i najčešće korišćenih materijala za izradu prizmi bio je NaCl, koji je propustljiv za IR zračenje u oblasti od 4000 do 650 cm^{-1} . Pored ovog materijala, za izradu prizmi se koriste i drugi neorganski halogenidi, kao što su KBr, LiF, CaF_2 , itd., sa optimalnim karakteristikama u određenoj, relativno uzanoj spektralnoj oblasti. Značajno bolje i ujednačenije razlaganje zračenja se postiže pomoću optičke rešetke u odnosu na prizme, koja se danas gotovo isključivo koristi.

Kao detektori najčešće se primenjuju piroelektrični i fotokonduktometrijski detektori. Piroelektrični detektori sadrže piroelektrični materijal koji je izolator sa specijalnim termalnim i električnim karakteristikama (npr. triglicin sulfat). Piroilitički efekat zavisi od brzine promene temperature detektora pre nego od same temperature, što omogućava piroelektričnom detektoru da radi sa bržim odgovorima u FTIR instrumentima. Fotokonduktometrijski detektori (npr. živa-kadmijum-telurid detektor) imaju najveću osetljivost i zasnivaju se na interakcijama između fotona i poluprovodnika.

Priprema uzoraka za IR analizu zavisi od agregatnog stanja uzorka. Kroz primere različitih laboratorijskih vežbi biće prikazana priprema uzoraka i analiza tečnih, čvrstih i gasovitih uzoraka iz životne sredine.

Primena IR spektroskopije u analizi uzoraka iz životne sredine. U tabeli 7.1 dati su primeri primene IR spektroskopije za analizu zagađujućih materija u vodama i otpadnim vodama. IR spektroskopija ima značajnu primenu za određivanje sastava industrijskih otpadnih gasova, atmosferskih gasova i najvažnijih gasova staklene bašte (ugljen-dioksid, ugljen-monoksid, azot-monoksid, sumpor-dioksid, ozon), što je veoma važno za razumevanje i praćenje efekata globalnih klimatskih promena.

Tabela 7.1. Primena IR spektroskopije za analizu zagađujućih materija u vodama i otpadnim vodama

<i>Analit</i>	<i>Karakteristične trake u IR oblasti i opis metode</i>
Ukupna ulja i masti	Određivanje ugljovodonika, biljnih ulja, životinjskih masti, smolastih materija, masti, i sličnih komponenti u vodi i otpadnoj vodi (IR oblast 3200-2700 cm^{-1} , gde se prate karakteristične trake za CH_3 , CH_2 i CH grupe, sa maksimumom apsorbancije na 2930 cm^{-1}).
Semivolatilna organska jedinjenja (SVOC)	GC-FTIR analiza SVOC. Koristi se za identifikaciju specifičnih izomera koji se ne mogu odrediti primenom GC-MS tehnike.
Naftni ugljovodonici	Primenljivo za sediment, zemljište, muljeve, otpadne vode, nakon odgovarajuće pripreme uzoraka (npr. ekstrakcija superkritičnim ugljen-dioksidom). Oblast za određivanje ugljovodonika 2700-3200 cm^{-1} (maksimum apsorbancije na 2930 cm^{-1}), odnosno 1600-1800 cm^{-1} za estre.

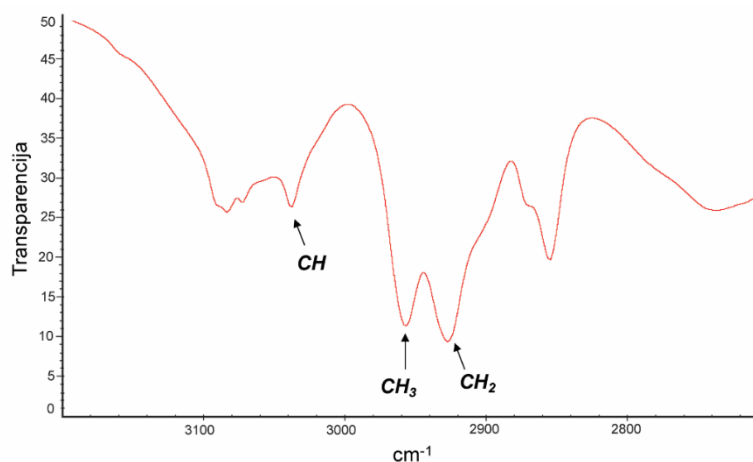
IR analizatori se koriste se kod automatskih mernih stanica za praćenje kvaliteta vazduha, zatim za analizu izduvnih gasova i gasova sagorevanja, kao i za analizu biogasa i deponijskih gasova. IR spektroskopija se takođe primenjuje i za određivanje naftnih ugljovodonika u uzorcima iz životne sredine, kao i za karakterizaciju materijala koji se koriste u tehnologiji zaštite životne sredine.

Vežba 7.1. Određivanje sadržaja mineralnih i ukupnih ugljovodonika u vodi metodom IR spektroskopije

7.1.1. Princip metode

Pod ukupnim ugljovodonicima, uljima i mastima u vodi podrazumevaju se organske supstance u vodi koje se mogu ekstrahovati iz kisele sredine pogodnim rastvaračem i odrediti metodom infracrvene spektroskopije. Ranije su kao rastvarači za ovu metodu korišćeni ugljentetra-hlorid ili 1,1,2-trihlor-1,2,2-trifluoretan – Freon 113, ali je njihova upotreba zabranjena zbog toksičnosti i potencijala da oštećuju ozonski omotač, što je definisano Montrealskim protokolom. Stoga se za ekstrakciju ugljovodonika naftnog porekla, kao alternativa navedenim rastvaračima može koristiti tetrahloretilen. Pod mineralnim uljima ili ugljovodnicima naftnog porekla podrazumevaju se organske supstance koje se u kiseljoj sredini ($\text{pH} < 2$) ekstrahuju pogodnim rastvaračem i ostaju u rastvaraču posle kontakta sa aktiviranim aluminijum-oksidiom (takođe mogu da se koriste i silika gel ili fluorisil).

Za kvantitativno određivanje koriste se karakteristične apsorpcione trake ugljovodonika: CH_3 , CH_2 i CH . Generalno, IR metode se zasnivaju na merenju apsorpcije koja potiče od C–H veze, tj. “istezanja” (eng. *stretching*) alifatičnih CH_2 (2930 cm^{-1}), CH_3 (2960 cm^{-1}) i aromatičnih C–H veza ($3010\text{--}3100 \text{ cm}^{-1}$). Tetrahloretilen ne apsorbuje IR zračenje u regionu karakterističnom za C–H veze. Na slici 7.5 prikazan je tipičan spektar u regionu alifatičnih grupa ugljovodonika naftnog porekla.



Slika 7.5. Tipičan IR spektar ugljovodonika naftnog porekla

Koncentracija mineralnih i ukupnih ulja određuje se merenjem intenziteta ovih apsorpcionih traka računajući od bazne linije (slika 7.6). Specifični apsorpcioni spektar zavisi od sastava ugljovodonične smese. Koncentracija se određuje u odnosu na smešu ugljovodonika standardnog rastvora sa kojom se vrši kalibracija, ili u odnosu na mineralno ulje kojim je voda zagađena. Metoda je primenljiva za određivanje ukupnih i mineralnih ugljovodonika u koncentraciji iznad 0,1 mg/l.

7.1.2. Pribor i oprema

- Levak za ekstrakciju od 1 l
- Kvalitativna filter hartija
- Staklena menzura od 10 ml
- Stakleni balon od 50 ml ili 100 ml
- Normalni sud od 10 ml, 20 ml i 50 ml
- Staklene kolone sa slavinom, za prečišćavanje
- Graduisana pipeta od 1 ml i 10 ml
- Analitička vaga
- FTIR spektrofotometar sa pripadajućim kivetama (5 ili 10 cm) i opremom.

7.1.3. Hemikalije, reagensi i pribor

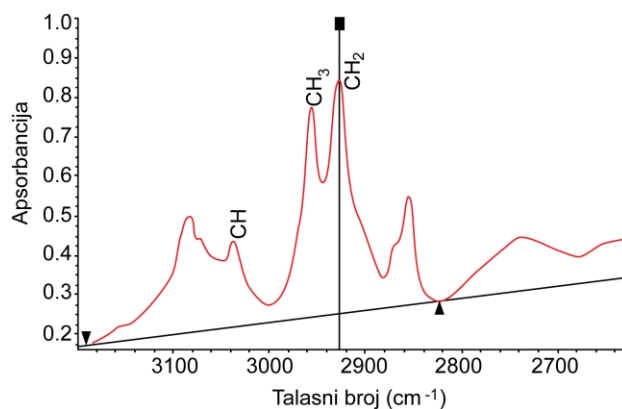
- Sumporna kiselina (0,5 M)
- Anhidrovani natrijum-sulfat, p.a., prethodno opran u rastvaraču i žaren na 600°C
- Aluminijum-oksidi (Al_2O_3) neutralan, za kolonsku hromatografiju (stepen aktivnosti I). Al_2O_3 se mora čuvati u eksikatoru, a pre upotrebe ga treba oprati rastvaračem i žariti na 800°C
- Tetrahloretilen (C_2Cl_4), čistoće za IR spektroskopiju
- n-heksadekan ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$), čistoće za IR spektroskopiju
- Izooktan ($(\text{CH}_3)_3\text{CCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), čistoće za IR spektroskopiju
- Benzen (C_6H_6), čistoće za IR spektroskopiju

Čistoća hemikalija proverava se snimanjem IR spektra u regionu od 3200-2700 cm^{-1} , u odnosu na čist rastvarač.

- Referentna smeša ugljovodonika. Za izradu kalibracionih standarda koristi se smeša ugljovodonika sledećeg sastava: 37,5 vol.% izooktana, 37,5 vol.% n-heksadekana i 25 vol.% benzena. Za pripremu ovog rastvora potrebno je u sud

od 20 ml odmeriti 7,5 ml izooktana, 7,5 ml n-heksadekana i 5 ml benzena. Ovaj rastvor se čuva u frižideru na $\sim 4^{\circ}\text{C}$.

- U normalni sud od 50 ml sipati tetrahloretilen skoro do oznake. Sud zatim izmeriti na analitičkoj vagi i merenje ponavljati posle određenog vremena do konstantne mase. Potom pipetom odmeriti 0,2 ml referentne smeše ugljovodonika i normalni sud izmeriti na analitičkoj vagi radi izračunavanja tačne koncentracije. Dopuniti rastvaračem do oznake.
- Priprema osnovnog rastvora. U sud od 50 ml sipati tetrahloretilen skoro do oznake. Sud zatim izmeriti na analitičkoj vagi, potom pipetom odmeriti 0,5-0,7 ml kalibracione smeše i normalni sud ponovo izmeriti na analitičkoj vagi. Iz razlike mase se dobija tačna masa odmerene smeše ugljovodonika. Normalni sud potom dopuniti rastvaračem do oznake i promućkati. Na ovaj način se priprema osnovni rastvor čija se tačna koncentracija određuje računski, ali približno iznosi 10 mg/l.
- Standardni rastvor I (1 mg/l). Potrebno je razblažiti 10 ml ili neku drugu poznatu zapreminu u normalnom sudu od 100 ml sa rastvaračem, tako da se dobija rastvor približne koncentracije 1 mg/l.
- Standard II (0,1 mg/ml). Od standarda I odmeri se 10 ml ili neka druga pogodna zapremina i razblaži se rastvaračem u normalnom sudu od 100 ml, tako da se dobije rastvor približne koncentracija 0,1 mg/ml.
- Kalibracioni standardi. Napraviti seriju kalibracionih rastvora, razblaženjem standardnog rastvora II, i to: 0; 0,4; 1; 2; 4; 8; 40 i 80 μg supstance u 1 ml organskog rastvarača. Snimiti IR spektre tako pripremljenih kalibracionih standarda. Za crtanje kalibracione krive od snimljenog IR spektra mere se apsorbancije na sledećim talasnim dužinama: 3030 cm^{-1} (CH), 2930 cm^{-1} (CH₂) i 2960 cm^{-1} (CH₃) (slika 7.6), ove apsorbancije se sabiraju i crta se njihova zavisnost od koncentracije.



Slika 7.6. IR spektar mineralnih ulja

7.1.4. Postupak izvođenja vežbe

Ekstrakcija uzorka. Odmeriti 1 l uzorka podzemne vode u levak za ekstrakciju i zakiseliti sumpornom kiselinom do $\text{pH} < 2$, pH proveriti pH indikatorskom hartijom. Dodati 10 ml tetrahloretilena, ekstrahovati 10 minuta i ostaviti da se vodeni i organski sloj razdvoje. Nakon razdvajanja slojeva odvojiti i prikupiti organski sloj u prihvatni balon. Ekstrakciju ponoviti još dva puta sa novim porcijama rastvarača i spojiti ekstrakte. Ekstrakt je nakon ekstrakcije potrebno propustiti kroz anhidrovani Na_2SO_4 koji je prethodno ispran rastvaračem, ceđenje se vrši u dva normalna suda od 10 ml.

Snimanje spektra. Pre snimanja spektra, proverava se čistoća kiveta, snimanjem spektra u području $3200\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$. Za ovu kontrolu koristiti organski rastvarač iz iste boce iz koje je uzet za ekstrakciju. Posle kontrole u kivetu sipati uzorak i snimiti spektar u istom području kao i pri kontroli čistoće kiveta. Ovako snimljen uzorak sadrži ukupna ulja, mineralna i polarna. Za određivanje mineralnih ulja uzorak iz drugog normalnog suda se propušta kroz kolonu sa ispunom 8 g Al_2O_3 , prethodno ispranog tetrahloretilenom. Ovako prečišćen ekstrakt se ponovo očitava na IR spektrofotometru. Za određivanje koncentracije ukupnih i mineralnih ulja potrebno je izmeriti apsorbancije uzorka na tri karakteristične talasne dužine: 2960 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} i 3030 cm^{-1} .

7.1.5. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Prikazati IR spektar analiziranog uzorka podzemne vode, kao odnos intenziteta apsorbancije ili transmitancije u funkciji talasnog broja (cm^{-1}). Za određivanje koncentracije ukupnih i mineralnih ulja potrebno je sabrati apsorbancije uzorka merene na tri karakteristične talasne dužine i na osnovu zbirne apsorbancije izraditi kalibracionu pravu. Sadržaj ugljovodonika u vodi izračunava se prema sledećoj formuli:

$$C_m = \frac{C \cdot V_1}{V} \quad (7.1)$$

gde je:

C_m - koncentracija mineralnih ulja u vodi ($\mu\text{g/l}$)

V_1 - zapremina ekstrakcionog sredstva (ml)

V - zapremina uzorka vode (l)

C - koncentracija očitana na osnovu kalibracione krive ($\mu\text{g/ml}$)

Vežba 7.2. Određivanje sadržaja naftnih ugljovodonika u zemljištu metodom IR spektroskopije

7.2.1. Princip metode

Prema standardnoj proceduri za određivanje sadržaja ukupnih naftnih ugljovodonika (eng. *total petroleum hydrocarbons*, TPH) u zemljištu metodom infracrvene spektroskopije koristi se ekstrakcija superkričnim ugljen-dioksidom. Alternativno, za ekstrakciju TPH iz kontaminiranog zemljišta, kao i u slučaju vodenih uzoraka (vežba 7.1), može se primeniti tetrahloretilen, a efikasnost ekstrakcije TPH iz zemljišta može se poboljšati intenzivnim mešanjem ili sonikacijom. U cilju uklanjanja polarnih materija koje uzrokuju pozitivne greške, odn. interferencije prilikom snimanja IR spektra koristi se silika gel (alternativno aluminijum-oksidi ili florisil), koji adsorbuje biljna ulja i životinjske masti. IR analiza obuhvata skeniranje spektra u opsegu $3200\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$, a za kvantitativno određivanje se primenjuje apsorpciona traka na $\sim 2930\text{ cm}^{-1}$, gde je zabeležen maksimum apsorpcije. Metoda je pogodna za određivanje sadržaja TPH u zemljištu u koncentracijama iznad 5 mg/kg.

7.2.2. Pribor i oprema

- Stakleni vijali od 40 ml sa teflonskim čepom
- Staklena menzura od 10 ml
- Graduisana pipeta od 1 ml i 10 ml
- Stakleni balon od 50 ml ili 100 ml
- Staklena kolona sa slavinom, za prečišćavanje
- Kvalitativna filter hartija
- Stakleni levak za filtriranje
- Normalni sud od 10 ml, 20 ml i 50 ml
- Analitička vaga
- Ultrazvučno kupatilo (V:230, Hz: 50/60, W: 50) za ekstrakciju
- FTIR spektrofotometar sa pripadajućim kivetama (5 ili 10 cm) i opremom

7.2.3. Hemikalije i reagensi

- Tetrahloretilen (C_2Cl_4), čistoće za IR spektroskopiju
- n-heksadekan ($CH_3(CH_2)_{14}CH_3$), čistoće za IR spektroskopiju
- Izooktan ($((CH_3)_3CCH_2CH(CH_3)_2$), čistoće za IR spektroskopiju
- Benzen (C_6H_6), čistoće za IR spektroskopiju
- Anhidrovani natrijum-sulfat, p.a., prethodno opran u rastvaraču i žaren na $600^\circ C$
- Silika gel, za kolonsku hromatografiju (60-200 mesh)
- Referentna smeša ugljovodonika, osnovni standard, radni rastvori i kalibracioni standardi pripremaju se prema proceduri datoj u vežbi 7.1.

Čistoća hemikalija proverava se snimanjem IR spektra u regionu od $3200-2700\text{ cm}^{-1}$, u odnosu na čist rastvarač.

7.2.4. Postupak izvođenja vežbe

Ekstrakcija i prečišćavanje. U stakleni vijal od 40 ml odmeriti na analitičkoj vagi oko 3 g suvog zemljišta. U vijal zatim dodati 10 ml rastvarača za ekstrakciju (tetrahloretilen), zatvoriti vijale i postaviti na ultrazvučno kupatilo u koje je predhodno sipana voda do oznake. Uzorke ekstrahovati primenom ultrazvučne ekstrakcije tokom 30 minuta. Nakon toga, odvojiti ekstrakt u prihvatni balon i ekstrakciju ponoviti sa svežim porcijama rastvarača još dva puta, spojiti ekstrakte i propustiti ih kroz stakleni levak sa anhidrovanim Na_2SO_4 , prethodno ispranim rastvaračem, u cilju uklanjanja eventualno zaostale vlage. Za uklanjanje interferirajućih polarnih materija ekstrakt propustiti kroz staklenu kolonu sa ispunom silika gela (oko 5 g, prethodno ispranog rastvaračem) i nakon propuštanja izvršiti eluiranje ispune sa 5 ml rastvarača. Sadržaj se prikuplja u normalni sud od 50 ml i nakon eluiranja dopuni do oznake.

Snimanje spektra. Pre snimanja spektra, proverava se čistoća kiveta, snimanjem spektra u području $3200-2700\text{ cm}^{-1}$. Za kontrolu koristiti organski rastvarač iz iste boce koja je korišćena za ekstrakciju. Posle kontrole u kivetu sipati uzorak i snimiti spektar u istom području kao i pri kontroli čistoće kiveta. Za određivanje koncentracije TPH u zemljištu i izradu kalibracione krive potrebno je izmeriti apsorbanciju na tri karakteristične talasne dužine: 2960 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} i 3030 cm^{-1} , kako je opisano u proceduri vežbe 7.1.

7.2.5. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Prikazati IR spektar analiziranog uzorka zemljišta, kao odnos intenziteta apsorpcije ili transmitancije u funkciji talasnog broja (cm^{-1}). Koncentracija TPH u zemljištu izračunava se prema sledećoj formuli:

$$C_{TPH} = \frac{C \cdot V_1}{V} \quad (7.2)$$

gde je:

C_m - koncentracija THP u zemljištu (mg/kg)

V_1 - finalna zapremina ekstrakcionog sredstva (ml)

V - masa uzorka zemljišta (g)

C - koncentracija očitana na osnovu kalibracione prave ($\mu\text{g/ml}$)

Vežba 7.3. Primena IR detektora za određivanje sadržaja ukupnog organskog ugljenika u vodi

7.3.1. Princip metode

Ukupan organski ugljenik (eng. *total organic carbon*, TOC) je surogat parametar ukupnih organskih materija u vodi. Ukupan organski ugljenik može biti prirodnog porekla ili može poticati iz otpadnih voda. Nema direktan zdravstveno/sanitarni značaj, ali je značajan indikator kvaliteta vode. TOC predstavlja sumu sadržaja organskog ugljenika u rastvorenoj i nerastvorenoj organskoj materiji koja je prisutna u vodenim uzorcima. Princip rada TOC analizatora zasniva se na oksidaciji organskog ugljenika prisutnog u vodi do ugljen-dioksida sagorevanjem, a CO₂ nastao oksidacijom određuje se direktno pomoću infracrvenog detektora.

Naime, odgovarajuća zapremina uzorka se spaljuje u reaktoru koji se nalazi u peći. U reaktoru se nalazi Pt katalizator koji omogućava da se na temperaturama peći od 680-900°C, a u sredini bogatoj kiseonikom, izvrši potpuna oksidacija jedinjenja koja sadrže organski ugljenik, što rezultuje formiranjem ugljen-dioksida. Pomoću gasa nosača obezbeđuje se proticanje uzorka i konstantni protok gasa generisanog iz uzorka kroz sistem do detektora. Pomoću IR detektora, koji je podešen da prati apsorpciju infracrvenog zračenja od strane CO₂ (u oblasti ~2350 cm⁻¹) u toku vremena, dobija se pik odgovarajuće površine srazmerne koncentraciji organskog ugljenika u uzorku. Potrebno je napomenuti da se pomoću nedisperzivnih IR instrumenata ne snima ceo spektar, već samo apsorbcija u tačno definisanoj oblasti IR dela spektra (npr. 2170 cm⁻¹ i 2350 cm⁻¹, za ugljen-monoksid i ugljen-dioksid, redom) i najveću primenu imaju u TOC analizatorima.

Pored organskog ugljenika, uzorci vode mogu da sadrži ugljen-dioksid ili jone ugljene kiseline. Pre određivanja sadržaja TOC nepohodno je da se ovaj oblik neorganskog ugljenika ukloni uparavanjem zakišljenog uzorka (pH<2), produvanjem gasa koji ne sadrži CO₂ i organska jedinjenja. Vлага i interferirajući gasovi se uklanjaju apsorpcijom pomoću sredstava u okviru TOC analizatora (npr. magnezijum perhlorat za apsorpciju vlage i Cu granule za apsorpciju halogenih gasova). Opisana metoda se primenjuje za određivanje TOC u uzorcima vode u opsegu od 0,5 mg C/l do 20 mg C/l, a veće koncentracije se mogu određivati nakon odgovarajućeg razblaženja.

7.3.2. Pribor i oprema

- Stakleni vijali za analizu uzoraka
- Normalni sud od 50 ml i 100 ml
- Laboratorijska čaša od 100 ml
- Pipete – trbušasta od 5 ml i graduisana od 1 ml, 5 ml, 25 ml
- Analitička vaga
- TOC analizator

7.3.3. Hemikalije i reagensi

- Sintetički vazduh ($\text{CO}_2 \leq 1$ ppm, pritisak primene 0,95-1 bar)
- Koncentrovana hlorovodonična kiselina, p.a. čistoće
- Dejonizovana voda ($< 0,5$ mg/l TOC)
- Magenzijum perhlorat
- Cu granule
- Pt katalizator
- Kalijum hidrogen ftalat (KHF) (najmanje p.a. kvaliteta)
- Osnovni rastvor kalijum hidrogen ftalata (1000 mg C/l), priprema se rastvaranjem 0,10625 g KHF (prethodno sušenog 1 h na 105-120 °C) u 50 ml dejonizovane vode. Rastvor se čuva u zatvorenoj boci u frižideru i stabilan je 2 meseca
- Radni rastvor kalijum hidrogen ftalata (50 mg C/l), priprema se odmeravanjem 5 ml osnovnog rastvora (1000 mg C/l) u normalni sud od 100 ml i dopuni se dejonizovanom vodom do označene zapremine
- Radni rastvor kalijum hidrogen ftalata (5 mg C/l), priprema se odmeravanjem 0,5 ml osnovnog rastvora (1000 mg/L) u normalni sud od 100 ml i dopuni se dejonizovanom vodom do označene zapremine. Radni rastvori KHP se čuvaju u zatvorenim bocama u frižideru i stabilni su nedelju dana

7.3.4. Postupak izvođenja vežbe

Priprema vodenih uzoraka. Uzorke površinske vode sipati u čiste i suve staklene vijale predviđene za instrument. Kada se TOC određuje direktno, pre analize potrebno je ukloniti ukupan neorganski ugljenik zakišeljavanjem uzorka vode do $\text{pH} < 2$. Pri tome, treba obratiti pažnju na to da gubitak isparljivih organskih supstanci treba svesti na najmanju moguću meru. Koncentracija TOC u vodenim uzorcima treba da bude u okviru radnog kalibracionog opsega. Ukoliko to nije slučaj uzorci se mogu razblažiti dejonizovanom vodom. Nakon zakišeljavanja uzoraka

propušta se inertni gas, bez ugljen-dioksida i drugih organskih nečistoća, kroz ceo sistem, radi uklanjanja CO₂.

Homogenizacija uzoraka. Ukoliko je potrebno uzorke homogenizovati, u vijale za određivanje TOC potrebno je postaviti magnet, koji je deo potrošnog materijala za TOC, i tokom analize vršiće se kontinualno mešanje uzorka što obezbeđuje njegovu homogenost.

Priprema kalibracionih standarda. Za pravljenje kalibracionih standarda, pipetom se prenese u svaki normalni sud od 50 ml, na primer 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml i 15 ml radnog rastvora kalijum-hidrogenftalata (50 mg C/l) i dopuni dejonizovanom vodom do označene zapremine. Na ovaj način pripremljeni kalibracioni standardi imaju koncentraciju od 1-15 mg C/l TOC. Takođe je potrebno uraditi i analizu slepe probe (dejonizovana voda). Kalibracioni standardi se pripremaju neposredno pre analize i zakišeljavaju koncentrovanom HCl do pH<2, neposredno pre analize.

Za pokretanje TOC analize potrebno je najpre pustiti gas, uključiti autosempler i instrument, pokrenuti softver, napraviti listu sa uzorcima u odnosu na definisanu poziciju na autosempleru, tako da se za svaki uzorak vrše po četiri ponavljanja analize i pokrenuti analizu. Nakon završene analize podaci se sačuvaju i prebace u *Microsoft Excel* gde se dalje obrađuju.

7.3.5. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Nakon završene analize, izraditi kalibracionu krivu i prikazati je kao zavisnost masene koncentracije TOC u mg C/l, u odnosu na jedinicu instrumentalnog očitavanja – površina ispod pika (I). Iz kalibracione krive se dobija jednačina zavisnosti apsorbancije od koncentracije, koja služi za izračunavanje koncentracije:

$$TOC(\text{mg C/l}) = \frac{I - a}{b} \quad (7.3)$$

gde je:

I - površina ispod pika koju očitava instrument

a - odsečak kalibracione krive

b - nagib kalibracione krive

Na osnovu prikazane jednačine izračunati sadržaj TOC u ispitivanim uzorcima površinske vode.

Vežba 7.4. Primena IR detektora za određivanje sadržaja ukupnog organskog ugljenika u čvrstim uzorcima

7.4.1. Princip metode

Ukupan ugljenik (eng. *total carbon*, TC) određuje se u originalnim čvrstim uzorcima, dok se sadržaj ukupnog organskog ugljenika (eng. *total organic carbon*, TOC) određuje nakon zakišeljavanja i sušenja čvrstih uzoraka pre analize. Sadržaj TOC u čvrstim uzorcima određuje se prema istom principu kao i za tečne uzorke, kao što je opisano u vežbi 7.3. Naime, u specijalnom reaktoru za čvrste uzorke (slika 7.7) odvija se sagorevanje i oksidacija organskih materija do ugljen-dioksida, koji se određuje direktno pomoću infracrvenog detektora. Maksimalna masa čvrstog uzorka za određivanje ukupnog organskog ugljenika ovom metodom iznosi 500 mg, a maksimalna apsolutna vrednost ugljenika 1,2 mg. Granica detekcije opisane metoda iznosi 2 µg C (npr. za približno 5 ppm ugljenika u 400 mg uzorka).

7.4.2. Pribor i oprema

- Analitička vaga
- TOC analizator sa modulom i opremom za analizu čvrstih uzoraka (npr. reaktor za čvrste uzorke, kvarcni čamčić (eng. *boat*) za čvrste uzorke)

7.4.3. Hemikalije i reagensi

- Sintetički vazduh ($\text{CO}_2 \leq 1$ ppm, pritisak primene 0,95-1 bar)
- Koncentrovana hlorovodonična kiselina, p.a. čistoće
- Dejonizovana voda (< 0,5 mg/l TOC)
- Analitički standard, poznate koncentracije TOC (4,1%). Za izradu kalibracione krive odmeriti seriju različitih masa standarda u zavisnosti od koncentracije TOC koja se očekuje u čvrstim uzorcima (na primer, 20 mg standarda sadrži 0,82 mg C; 60 mg standarda sadrži 2,46 mg C itd.)

Ostale hemikalije koje se koriste prilikom određivanja TOC navedene su u poglavlju 7.3.3.

7.4.4. Postupak izvođenja vežbe

Priprema čvrstih uzoraka. Čvrste uzorke, zemljište ili sediment, potrebno je pre same analize osušiti (na 105 °C tokom 5-6 sati). Homogenizovani uzorak potom

odmeriti u kvarcni čamčić i dodavati hlorovodoničnu kiselinu sve dok se izdvajaju mehurići gasa. Nakon izdvajanja mehurića gasa, uzorak je potrebno ponovo osušiti još 4-5 h na 105°C.

Analiza čvrstih uzoraka. Prilikom snimanja čvrstih uzoraka prvo se postavi prazan čamčić (slepa proba) u segment za čvrste uzorke (eng. *feeding unit*) i softverski se pokrene analiza u modulu za čvrste uzorke. Voditi računa da čamčići ostanu čisti i ne dirati ih prstima da ne bi došlo do kontaminacije. Nakon analize slepe probe spustiti "lift", ukloniti prethodni čamčić i postavi novi. Analizirati najmanje tri kalibraciona standarda, a potom i uzorke. Masu uzoraka je potrebno odabrati tako da ne premašuje opseg od 150 mg:

$$\frac{\text{masa uzorka}}{100} \cdot C (\%) \leq 150 \text{ mg} \quad (7.4)$$



Slika 7.7. Segmenti TOC analizatora za analizu čvrstih uzoraka – prikaz reakcione peći i jedinice za postavljanje čamčića sa uzorkom

7.4.5. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Nakon završene analize, izraditi kalibracionu krivu i prikazati je kao zavisnost apsolutne količine TOC (mg) u standardima, u odnosu na jedinicu instrumentalnog očitavanja – površina ispod pika (I) (jednačina 7.5). Na osnovu apsolutne količine TOC u čvrstom uzorku odrediti % zastupljenosti ukupnog organskog ugljenika.

$$TOC(\text{mg C}) = \frac{I - a}{b} \quad (7.5)$$

gde je:

I - površina ispod pika koju očitava instrument

a - odsečak kalibracione krive

b - nagib kalibracione krive

Vežba 7.5. Primena IR spektroskopije za karakterizaciju mikroplastike

7.5.1. Princip metode

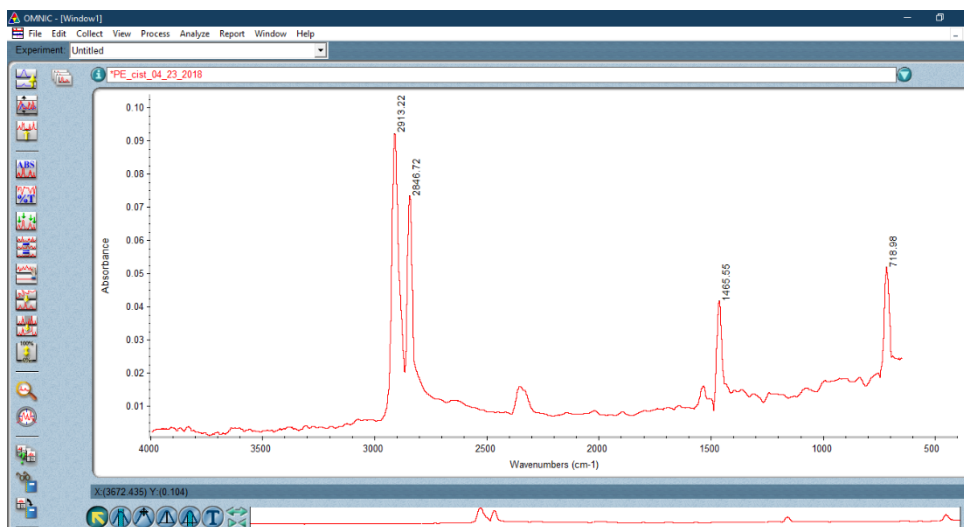
Mikroplastika predstavlja male čestice plastičnih materijala, uključujući one koje nisu vidljive golim okom. Za sada se, generalno, pod pojmom mikroplastika podrazumeva svaka sintetička polimerna čestica prečnika < 5 mm. Primarnu mikroplastiku čine mikroplastične čestice koje su proizvedene za određenu primenu u industriji ili domaćinstvu. Obuhvataju „mikro-perlice“ ili „mikro-ljuspice“ koje se koriste u sredstvima za čišćenje lica, pastama za zube i kozmetičkim proizvodima kao što su kupke, pilinzi, šminka, dezodoransi, puderi, farbe za kosu, lakovi za nokte i slično. Opseg vrsta mikroplastike koje se koriste u kozmetičkoj industriji je veoma širok i obuhvata polietilen, polipropilen, polietilen tereftalat, poliamid, politetrafluoroetilen (“teflon”), polimetilmetakrilat, polistiren, poliuretan i druge. Jedan od najznačajnijih izvora primarne mikroplastike koja dospeva u vodene ekosisteme su čestice polietilena, polipropilena i polistirena koje su prisutne u kozmetičkim proizvodima.

Za hemijsku karakterizaciju izolovanih čestica mikroplastike mogu se koristiti FTIR i Ramanova spektroskopija, kao pogodne, nedestruktivne i veoma česte tehnike izbora. FTIR analiza je pogodna za čestice do $20 \mu\text{m}$, dok je Ramanova spektroskopija pogodna za karakterizaciju manjih čestica (do $1 \mu\text{m}$). Naime, čestice mikroplastike se mogu relativno jednostavno i sa velikom preciznošću analizirati tehnikom snimanja čvrstih uzoraka u tabletama sa kalijum-bromidom i tehnikom oslabljene totalne refleksije (eng. *Attenuated total reflection*, ATR). Međutim, potrebno je napomenuti da je jedno od ograničenja FTIR spektroskopije moguće dobijanje spektara slabijeg kvaliteta zbog rasipanja svetlosti kod uzoraka mikroplastike nepravilnog oblika. Na slici 7.8 prikazani su primeri IR spektra polietilena (PE) i polietilen tereftalata (PET) sa karakterističnim trakama.

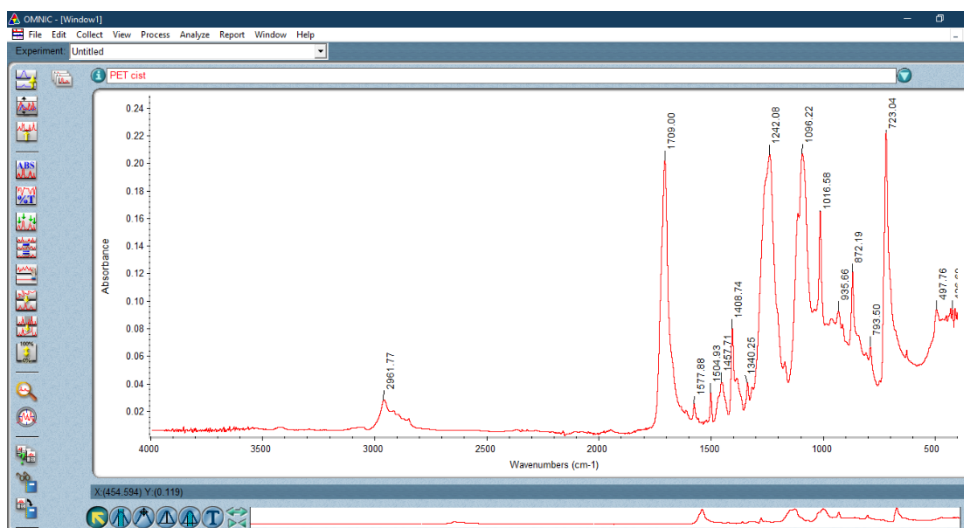
7.5.2. Pribor i oprema

- Staklena boca od 1 l
- Petrijeve ploče
- Set za vakuum filtraciju
- Celulozno nitratni membranski filteri (veličina pora $0,45 \mu\text{m}$)
- Laboratorijska mešalica
- Ahatni avan

- Metalna špatula
- Opema za tabletiranje (kalup, presa i držač tablete)
- FTIR spektrofotometar sa pripadajućom opremom



a)



b)

Slika 7.8. IR spektri: a) polietilena (PE) i b) polietilentereftalata (PET)

7.5.3. Hemikalije i reagensi

- Uzorak mikroplastike izolovane iz kozmetičkih sredstava
- Vodonik-peroksid (30%)
- Kalijum bromid, spektrometrijske čistoće
- Apsolutni etanol.

7.5.4. Postupak izvođenja vežbe

Izolovanje mikroplastike iz kozmetičkih sredstava. Odmeriti 100 ml odabranog kozmetičkog sredstava, a potom ga ključalom destilovanom vodom kvantitativno preneti u staklenu bocu od 1 l i postaviti na mešanje tokom 1 h pri brzini od 180 o/min. Nakon mešanja uzorak profiltrirati pomoću seta za vakuum filtraciju kroz 0,45 μm celulozno nitratni membranski filter. Potom filter papir prebaciti u petrijevu ploču i ostaviti da se osuši na sobnoj temperaturi tokom 24 h. U cilju dobijanja čistijeg uzorka mikroplastike, preneti u čašu prethodno osušeni uzorak koji je izolovan na filter papiru i dodati 10 ml 30% vodonik-peroksida. Dodatkom vodonik-peroksida dolazi do razgradnje rezidualnih organskih komponenti u uzorku koje se slabije rastvaraju u vodi. Uzorak se ostavlja 24 h da stoji, nakon čega se ponovo filtrira kroz 0,45 μm celulozno nitratni membranski filter i ostavlja da se osuši na sobnoj temperaturi (obavezno poklopiti petrijevu ploču kako bi se izbegla moguća kontaminacija).

Priprema uzorka mikroplastike i FTIR analiza. Hemijska i morfološka karakterizacija izolovane mikroplastike vrši se pomoću KBr tehnike, koja se zasniva na homogenizaciji uzorka sa čvrstim kalijum-bromidom i pripremi tablete koja se dalje snima u transmissionom modu.

Praškasti uzorak mikroplastike izolovane iz kozmetičkog sredstva staviti u čist avan, a potom pomoću špatule dodati malu količinu neapsorbujućeg materijala, čvrstog kalijum-bromida. Homogenizovati uzorak mikroplastke i KBr ručno u avanu pomoću tučka, a potom dobijenu smešu prebaciti u kalup za tabletiranje pomoću špatule. Kalup postaviti u presu, kako bi se tableta formirala. Napravljenju tabletu pažljivo postaviti u držač i snimiti spektar u opsegu 4000-400 cm^{-1} , pri rezoluciji od 4 cm^{-1} sa brzinom od 60 skenova po analizi pri sobnoj temperaturi.

7.5.5. Obrada rezultata i zadatak vežbe

Nakon završene analize, prikazati analizirani IR spektar uzorka mikroplastike izolovane iz kozmetičkog proizvoda. Na osnovu detektovanih karakterističnih traka, definisati koje vrste mikroplastike su zastupljene u ispitivanom preparatu. Potrebno je napomenuti da na prisustvo polietilena u uzorku upućuju karakteristične apsorpcione trake na 2914 cm^{-1} , 2847 cm^{-1} , 1470 cm^{-1} i 718 cm^{-1} , dok su za

polipropilen karakteristične trake u oblasti $2950\text{-}2838\text{ cm}^{-1}$, $1455\text{-}1453\text{ cm}^{-1}$ i 1376 cm^{-1} .

Vežba 7.6. Određivanje gasovitih polutanata IR spektroskopijom

7.6.1. Primena IR spektroskopije u analizi gasovitih polutanata

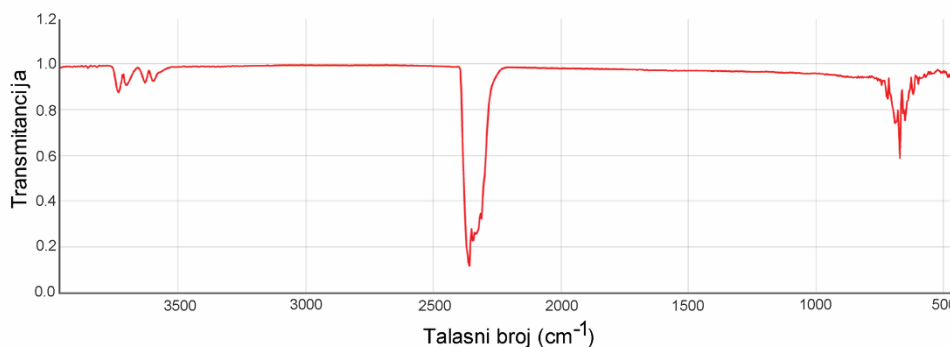
Najznačajniji gasoviti polutanti koji utiču na kvalitet vazduha su oksidi azota (NO_x) i sumpora (SO_x), ugljen-monoksid (CO), ugljen-dioksid (CO_2), volatilna organska jedinjenja (eng. *volatile organic compounds*, VOCs) i prizemni ozon (O_3). Navedeni polutanti vazduha doprinose formiranju tzv. industrijskog i fotohemijskog smoga, kao i nastanku kiselih kiša. Ugljen-dioksid, vodena para, metan (CH_4) i azot-suboksid (N_2O) su u najvećoj meri odgovorni za efekat staklene bašte, doprinoseći u značajnoj meri klimatskim promenama. Efekti zagađenja vazduha generalno se manifestuje negativnim posledicama po ljudsko zdravlje i životnu sredinu u celini. Stoga je neophodno pratiti i sprovoditi kontinuirani monitoring kvaliteta vazduha i vršiti procenu nastalih promena i trendova, a u skladu sa Zakonom o zaštiti vazduha.

Za određivanje sastava atmosferskih gasova i najvažnijih gasova staklene bašte (npr. CO_2 , CO, NO, SO_2 , O_3) značajnu primenu ima IR spektroskopija. Naime, za više od 100 zagađujućih materija vazduha poznato je da imaju karakteristične IR spektre. IR spektroskopija se takođe intenzivno koristi i za ispitivanje emisije izduvnih gasova automobila i analizu industrijskih otpadnih gasova. FTIR analiza je pogodna za određivanje gasovitih polutanata pri niskim koncentracijama, do ppb opsega, sa mogućnošću multikomponentne analize iz jednog kompleksnog IR spektra. Potrebno je napomenuti da je referentna metoda za određivanje koncentracije ugljen-monoksida prisutnog u vazduhu ambijenta upravo nedisperzivna infracrvena spektroskopija ("Sl. glasnik RS", br. 11/2010, 75/2010 i 63/2013). U tabeli 7.2 prikazane su karakteristične trake gasovitih polutanata u IR oblasti.

Tabela 7.2. Karakteristične trake najznačajnijih polutanata vazduha u IR oblasti

Gasoviti polutanti	Karakteristične trake/oblasti
Ugljen-monoksid	2165 - 2183 cm^{-1}
Ugljen-dioksid	~ 2347 cm^{-1}
Ozon	~ 1045 cm^{-1}
Azot-monoksid	1920 - 1870 cm^{-1}
Azot-dioksid	2940 - 2840 cm^{-1}
Sumpor-dioksid	~1361 cm^{-1}

Uprkos brojnim prednostima FTIR analize, neka jedinjenja, kao što je npr. vodonik-sulfid (H_2S), daju slab odziv, odn. trake slabog intenziteta u IR spektru, tako da se ne može postići željena osetljivost analize. Benzen ima najintenzivniju traku na 670 cm^{-1} gde se nalazi i jaka traka ugljen-dioksida (slika 7.9), tako da je u slučaju prisustva visoke koncentracije CO_2 za određivanje benzena potrebno koristiti traku mnogo slabijeg intenziteta (3000 cm^{-1}), što smanjuje osetljivost metode.



Slika 7.9. IR spektar ugljen-dioksida (NIST/EPA Gas-Phase Infrared Database)

U IR spektrima gasova rotacije se često kombinuju sa vibracijama, što dovodi do tzv. vibraciono-rotacionih prelaza u osnovnoj vibracionoj IR oblasti. Osnovna vibraciona traka kod gasova se pretvara u “šumu” bliskih maksimuma i dobija tzv. “finu strukturu”. Kod gasova se molekulske rotacije praktično nesmetano odvijaju, tako da su kod njih rotacioni energetski nivoi vrlo oštro definisani i izražena je fina struktura. Tako na primer, prikazani IR spektar ugljen-dioksida ukazuje na dve vibracione trake, na $\sim 2347\text{ cm}^{-1}$ usled asimetričnog “istezanja” (eng. *stretching*) i deformaciona vibracija na $\sim 667\text{ cm}^{-1}$, usled “savijanja” veze (eng. *bending*).

7.6.2. Snimanje IR spektara gasova

Za snimanje spektara gasova koriste se specijalne gasne ćelije sa prozorima od materijala propustljivog za IR zrake, kao što su neorganski halogenidi NaCl ili KBr . Kiveta se vakuumira, a zatim se kroz ventil ispuni ispitivanim gasom. Gasovi se analiziraju u ćelijama (kivetama) koje su obično dužine od 10 cm, ali mogu biti i do nekoliko desetina metara, koje su pogodne za analizu niskih koncentracija polutanata. Imajući u vidu da su gasoviti polutanti vazduha obično prisutni u niskim koncentracijama, u ćeliji se nalaze ogledala koja višestruko reflektuju zrake kroz uzorak, čime se povećava osetljivost određivanja.

7.6.3. Zadatak vežbe

Određivanje gasovitih polutanata vazduha biće demonstrirano kroz terensku nastavu i posetu odabranoj stanici za monitoring kvaliteta vazduha. Zadatak vežbe je da se opiše procedura analize gasovitih polutanata primenom IR spektroskopije. Potrebno je navesti koji parametri se određuju *on-site* IR spektroskopijom i uporediti ovu metodu sa manuelnim metodama analize gasovitih polutanata. Na terenu izmerene koncentracije gasovitih polutanata zabeležiti i uporediti ih sa maksimalno dozvoljenim koncentracijama u vazduhu.

Literatura

1. APHA-AWWA-WEF, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC, 22nd edn, 2012.
2. Farmaki, E., Kaloudis, T., Dimitrou, K., Thanasoulas, N., Kousouris, L., Tzoumerkas, F. (2007) Validation of a FT-IR method for the determination of oils and grease in water using tetrachloroethylene as the extraction solvent. *Desalination* 210, 52–60.
3. Jović, B. (2021) Infracrvena spektroskopija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine. https://www.pmf.uns.ac.rs/studije/epublikacije/hemija/jovic_infracrvena_spektroskopija.pdf
4. Milosavljević, S. (2004) Strukturne instrumentalne metode. Hemijski fakultet, Beograd.
5. Paíga, P., Mendes, L., Albergaria, J.T., Delerue-Matos, C.M. (2012) Determination of total petroleum hydrocarbons in soil from different locations using infrared spectrophotometry and gas chromatography. *Repositório Científico do Instituto Politécnico do Porto*. oai:recipp.ipp.pt:10400.22/2041
6. Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode za piće (Sl. list SRJ 42/1998-4, 44/1999-19 i Sl. glasnik RS 28/2019-114
7. Salman, M., Shafique, U., Zaman, W., Rehman, R., Yousaf, A., Azhar, F., Anzano, J.M. (2011) A Rapid Method for Measurement of Nickel and Chromium at Trace Level in Aqueous Samples. *J. Mex. Chem. Soc.* 55(4), 214-217.
8. Simonescu, C.M. (2012) Application of FTIR Spectroscopy in Environmental Studies (Chapter 2). IntechOpen, Open access peer-reviewed chapter. Pristupljeno 01.12.2021. <https://www.intechopen.com/chapters/38543>
9. Spectroscopic Methods (Chapter 10) u: *Analytical Chemistry 2.0* by David Harvey. Pristupljeno 01.12.2021. https://www.asdlib.org/onlineArticles/ecourseware/Analytical%20Chemistry%202.0/Text_Files_files/Chapter10.pdf
10. SRPS EN 26777:2009: Water quality - Determination of nitrite - Molecular absorption spectrometric method (ISO 6777:1984).
11. SRPS EN ISO 6878: Kvalitet vode - Određivanje fosfora - Spektrometrijska metoda sa amonijum-molibdatom.
12. SRPS H.Z1.184:1974. Water testing - Determination of ammonia.
13. SRPS ISO 8245:2007. Water quality — Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).
14. Thomas, R. (2013) *Practical Guide to ICP-MS (Practical Spectroscopy)*. CRC Press; 3rd edition ISBN-10: 1466555432
15. Uredbom o graničnim vrednostima zagađujućih materija u površinskim i podzemnim vodama i sedimentu i rokovima za njihovo dostizanje (Sl. Glasnik RS br. 50/2012)

16. Uredbom o graničnim vrednostima emisije zagađujućih materija u vode i rokovima za njihovo dostizanje (Sl. glasnik RS br. 67/2011-13, 48/2012-7, 1/2016-3
17. Uredba o uslovima za monitoring i zahtevima kvaliteta vazduha (Sl. glasnik RS, br. 11/2010-20, 75/2010-5 i 63/2013-20
18. Zhang, C.C. (2007) Fundamentals of Environmental Sampling and Analysis. A John Wiley & Sons, Inc., Publication.