

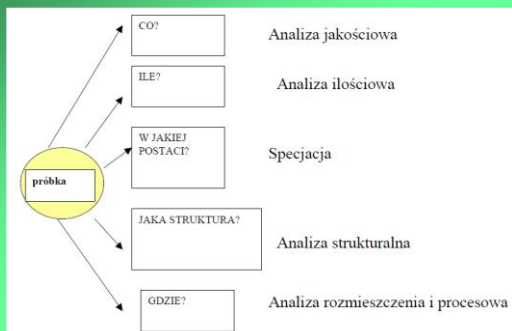
ANALIZA INSTRUMENTALNA MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

dr hab. Jacek Kęsy

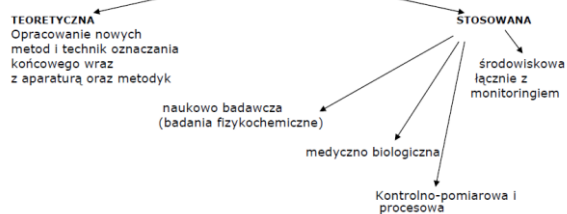
Cel wykładu

Poznanie teorii i przykładów praktycznego wykorzystania niektórych podstawowych metod analitycznych stosowanych we analityce chemicznej

Przedmiot i zadania analityki



ANALITYKA



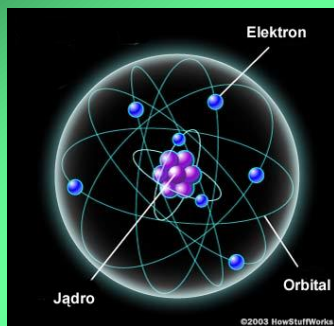
Schemat podziału analityki

Informacje uzyskiwane dzięki procesowi analitycznemu

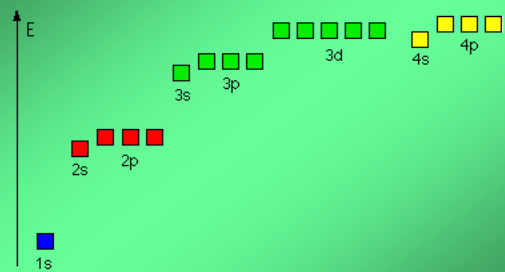
- Skład układów materialnych – analiza jakościowa i ilościowa
- Struktura cząsteczek – analiza strukturalna i konformacyjna
- Przemiany zachodzące w czasie i przestrzeni – analiza procesowa

Budowa materii

Elementarna budowa materii



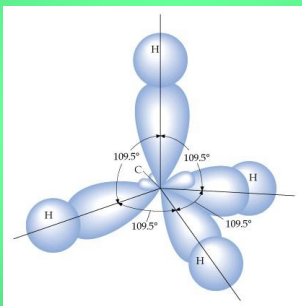
Kwantowy model budowy atomu



Kwantowy model budowy atomu – wiązania chemiczne

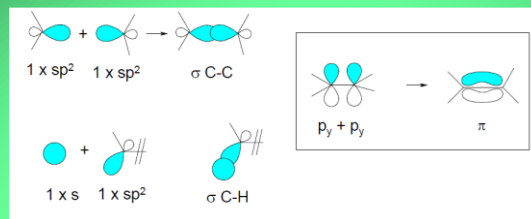
Szczególą rolę w „funkcjonowaniu” atomów odgrywają elektrony ostatniej powłoki, tzw. **powłoki walencyjnej** (elektrony walencyjne). To dzięki nim dochodzi do łączenia się atomów w związki chemiczne.

Wchodzące w reakcje chemiczne elektrony walencyjne rozlokowują się na tzw. **orbitalach zhybryzowanych**, których energia w obrębie powłoki jest taka sama. Przez to wszystkie wiązania w cząsteczce np. metanu są równocenne, pomimo że brały w nich udział różniące się przecieź energią orbitale typu **s** i **p** atomu węgla. Wiazania powstają przez nakładanie się orbitali i są podobnie jak orbitale skwantowane (posiadają ściśle określoną energię).

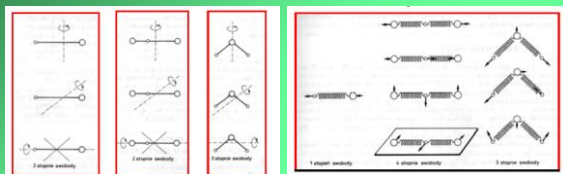


Kwantowy model budowy atomu – wiązania chemiczne

Wiazania w cząsteczce etylenu $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ (jedno wiązanie C-C (σ), 4 wiązania C-H (σ), 1 wiązanie π) powstają ze zhybryzowanych orbitali **sp²** węgla oraz orbitali **s** wodoru. Wiazanie π powstaje z orbitali **p_y** węgla.



Skwantowane są również drgania (oscylacje) i rotacje cząstek



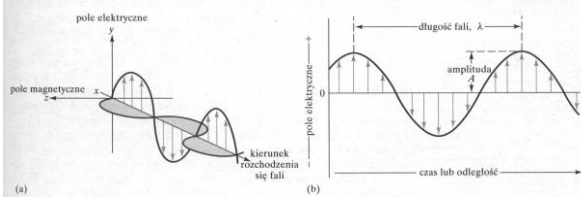
Całkowita energia cząsteczki wyraża się zatem jako suma trzech składników odpowiadających trzem rodzajom ruchu w cząsteczce

$$E = E_e + E_{os} + E_{rot}$$

gdzie: E_e - energia elektronowa (związana z ruchem elektronów),
 E_{os} - energia oscylacyjna (związana z ruchem oscylacyjnym),
 E_{rot} - energia rotacyjna (związana z ruchem rotacyjnym).

Promieniowanie elektromagnetyczne

Falowa natura promieniowania elektromagnetycznego



Drganie pola elektrycznego, któremu towarzyszy drganie pola magnetycznego

$$c = 3 \times 10^8 \text{ m/s}$$

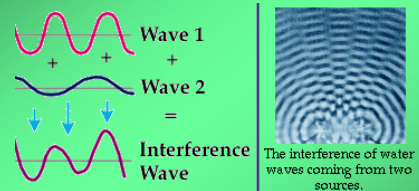
$$\text{Częstość drgań} \quad \nu = c/\lambda \quad [\text{s}^{-1}, \text{Hz}]$$

$$\text{Liczba falowa} \quad \bar{\nu} = \nu/c = 1/\lambda \quad [\text{cm}^{-1}]$$

Współczynnik załamania $n = c/u$ u - prędkość światła w ośr. materialnym

Falowa natura promieniowania elektromagnetycznego

Interferencja



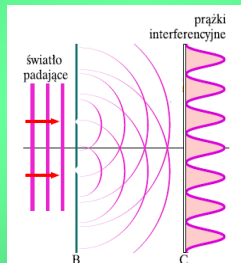
W efekcie nakładania się fal powstają
wzmocnienia i wygaszenia sygnału

Falowa natura promieniowania elektromagnetycznego

Dyfrakcja

- zjawisko zmiany kierunku rozchodzenia się fali na krawędziach przeszkód oraz w ich pobliżu.

Gdy wiązka światła przechodzi przez wąską szczelinę, każdy jej punkt staje się nowym źródłem fali. Między powstałymi falami zachodzi interferencja, co powoduje wzmocnianie i osłabianie światła rozchodzącego się w różnych kierunkach. Zastosowanie wielu równo od siebie oddalonych szczelin powoduje wzmocnienie powstających prążków interferencyjnych.



$$\sin \theta = \frac{n\lambda}{d} \quad \text{warunek wystąpienia maksimum}$$

Charakter korpuskularny promieniowania elektromagnetycznego

Hipoteza Einsteina (1905):

- światło składa się z kwantów (fotonów) o energii $E = h\nu$, gdzie h – stała Plancka
- fotony zachowują się jak cząstki materii
- podczas zderzenia z elektronem, fotony są pochłaniane przez elektrony i mogą oddawać im swoją energię

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

h – stała Plancka, uniwersalna stała fizyczna = $6.62 \times 10^{-34} \text{ Js}$

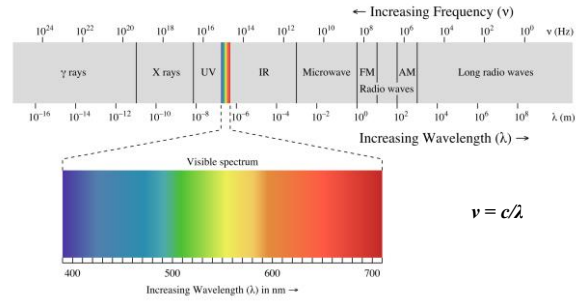
Charakter korpuskularny promieniowania elektromagnetycznego



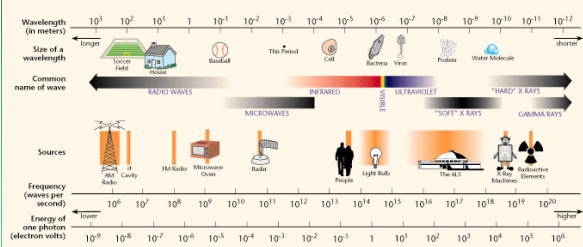
Zjawisko fotoelektryczne

- wybijanie elektronów z powierzchni materiałów

Widmo promieniowania elektromagnetycznego



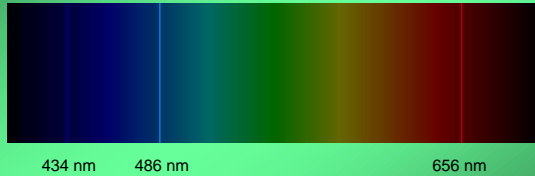
THE ELECTROMAGNETIC SPECTRUM



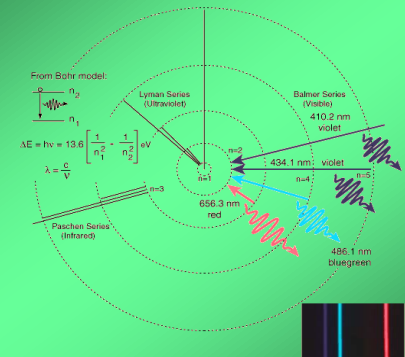
Pochodzenie (źródło) promieniowania elektromagnetycznego

Rodzaj zmiany stanu kwantowego:	zmiana spinu	zmiana orientacji	zmiana konfiguracji	zmiana rozkładu gęstości elektronowej	zmiana konfiguracji jąder
	10 ⁻²	1	100	10 ⁴	10 ⁸
	10 m	100 cm	1 cm	100 μm	1000 nm
	3 · 10 ⁶	3 · 10 ⁸	3 · 10 ¹⁰	3 · 10 ¹²	3 · 10 ¹⁴
	10 ⁻³	10 ⁻¹	10	10 ³	10 ⁷
rodzaj spektroskopii:	NMR	EPR	mikrofalowa	w podczerwieni	w zakresie widzialnym i nadfiolecie
					rentgenowska
					promieniowania γ

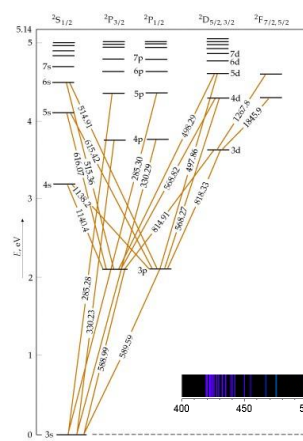
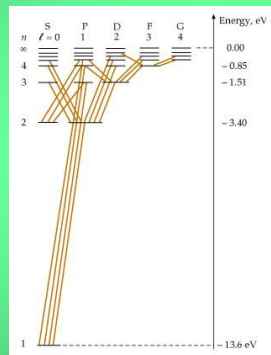
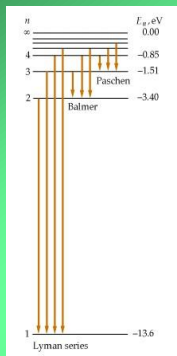
Linie emisyjne wodoru w zakresie widzialnym



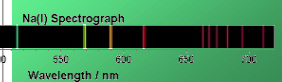
Atom wodoru – poziomy energetyczne



Poziomy energetyczne wodoru, inaczej!



Poziomy energii atomu sodu



Proces analityczny

Podstawowe pojęcia z zakresu analityki

Metoda analityczna	Sposób wykrywania lub oznaczania składników próbki
Analit	Analizowany składnik próbki
Próbka	Podzbiór populacji podlegający badaniu
Próbka reprezentatywna	Próbka nie różniąca się istotnie pod względem badanej cechy od populacji generalnej
Próbka laboratoryjna	Część próbki reprezentatywnej przeznaczona do prowadzenia analiz
Próbka analityczna	Część próbki laboratoryjnej wykorzystana do pojedynczego oznaczenia
Próba ślepa (zerowa)	Próbka porównawcza, posiadająca cechy próbki analitycznej nie zawierająca analitu

Podstawowe pojęcia z zakresu analityki

Oznaczanie	Ilościowe określenie zawartości analitu w badanej próbce
Wykrywanie	Określenie obecności lub nieobecności analitu w badanej próbce
Wykrywalność (granica detekcji)	Najmniejsza ilość (stężenie) analitu wykrywalna daną metodą z określonym prawdopodobieństwem
Oznaczalność (granica oznaczalności)	Najmniejsza ilość (stężenie) analitu oznaczalna daną metodą z określonym prawdopodobieństwem
Czułość metody analitycznej	Zdolność metody do rozróżnienia zbliżonych zawartości (stężeń) analitu – stosunek przyrostu sygnału analitycznego towarzyszący przyrostowi stężenia
Selektywność metody	Cecha, umożliwiająca zastosowanie metody do analizy pewnej niewielkiej liczby analitów
Specyficzność metody	Cecha, umożliwiająca zastosowanie metody do analizy tylko jednego analitu

Sposoby wyrażania stężeń

Stężenie	Równanie definicyjne	Jednostka
Procent masowy	$\frac{m_x}{m_x + m_y} \cdot 100$	% mas
Część na milion	$\frac{m_x}{m_x + m_y} \cdot 1000000$	ppm
Część na miliard	$\frac{m_x}{m_x + m_y} \cdot 1000000000$	ppb
Stężenie molowe	$\frac{n_x}{V_{x+y}}$	M, mol/dm ³
Stężenie normalne	$\frac{n_x}{z \cdot V_{x+y}}$	wal/dm ³
Stężenie masowo-objętościowe	$\frac{m_x}{V_{x+y}}$	g/dm ³ , g/ml mg/ml
Ułamek molowy	$\frac{n_x}{n_x + n_y}$	mol/mol

Mol i liczba Avogadro

Mol (gramocząsteczka) to taka ilość cząstek, których masa wyrażona w gramach jest liczbowo równa ich względnej masie atomowej. Na przykład mol ^{12}C ma masę 12 g; mol wody (H_2O) ma masę 18 g. Liczba cząsteczek wchodzących w skład mola wynosi 6.02214×10^{23} i nazywa się liczbą Avogadro (AN).

$$\text{AN} = 6.02214 \times 10^{23}$$

Czy można sobie wyobrazić wielkość liczby Avogadro? Spróbujmy!

Wyobraźmy sobie, że jeden litr roztworu zawierającego AN cząstek barwnika wlewamy do morza i dobrze mieszamy ☺, tak aby barwnik równomiernie rozpuścił się w oceanach Ziemi. Nabieramy następnie do takiego samego naczynia 1 litr wody morskiej i wtedy okazuje się, że znajduje się w niej około 400 cząstek barwnika. Można to sobie wyobrazić?

*Masa wody w oceanach Ziemi wynosi ok. 1.4×10^{21} kg



Wielokrotności i podwielokrotności

100	10^2	hekto	h
10	10^1	deka	da
1	10^0		
0.1	10^{-1}	decy	d
0.01	10^{-2}	centy	c
0.001	10^{-3}	mili	m
0.0001			
0.00001			
0.000001	10^{-6}	mikro	μ
0.0000001			
0.00000001			
0.000000001	10^{-9}	nano	n
0.0000000001			
0.00000000001	10^{-12}	piko	p
0.000000000001			
0.0000000000001	10^{-15}	femto	f
0.00000000000001			
0.000000000000001	10^{-18}	atto	a
0.0000000000000001			

<http://encyklopedia.pwn.pl/haslo.php?id=2337732>

Precyzja i dokładność – błędy pomiarowe

Precyzja

- opisuje powtarzalność i odtwarzalność wyników
- wewnątrz serii pomiarowej – powtarzalność (repeatability)
- między seriami pomiarowymi – odtwarzalność (reproducibility)

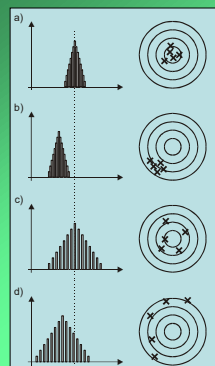
Dokładność

- opisuje zgodność wielkości mierzonej z wartością rzeczywistą

Błąd pomiarowy

- brak precyzji, brak dokładności

Precyzja i dokładność – błędy pomiarowe



Metoda:

- dokładna i precyzyjna
- precyzyjna, ale mało dokładna
- mało precyzyjna, ale dokładna
- mało dokładna i mało precyzyjna

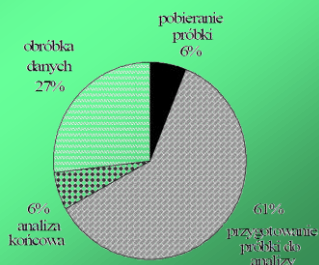
Błędy:

- bezbłędnie (niewielki błąd)
- błąd systematyczny
- błąd przypadkowy
- b) + a)

Co może być przyczyną błędów systematycznych (b), a co przypadkowych (c) w strzelaniu do tarczy?

Etapy procesu analitycznego

- czynności wstępne (przygotowanie literaturowe, wybór techniki, metody i liczby oznaczeń, sprzęt, odczynniki...)
- pobieranie próbki
- przygotowanie próbki do analizy
- pomiar
- obróbka wyników
- wnioski i informacja analityczna



Etapy procesu analitycznego

Pobieranie próbek do analizy – próbka reprezentatywna (pobór, opakowanie, transport, przechowywanie)

Czynniki określające wiarygodność próbki:

- zanieczyszczenia na etapie pobierania
- utrata lotnych składników próbki
- reakcje ze składnikami powietrza (tlen, para wodna, dwutlenek węgla)
- rozkład próbki – promieniowanie UV
- degradacja termiczna
- reakcje katalityczne

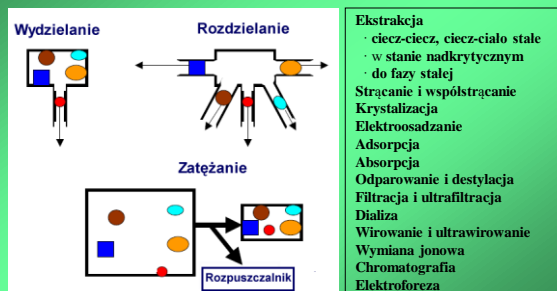
Etapy procesu analitycznego

Przygotowanie próbek do analizy

- przeprowadzenie do roztworu
- wydzielanie, rozdzielanie i zateżanie analitu
- maskowanie
- derywatywacja analitu

Etapy procesu analitycznego - przygotowanie próbek

Wydzielanie, rozdzielanie, zateżanie



Ekstrakcja do fazy stałej

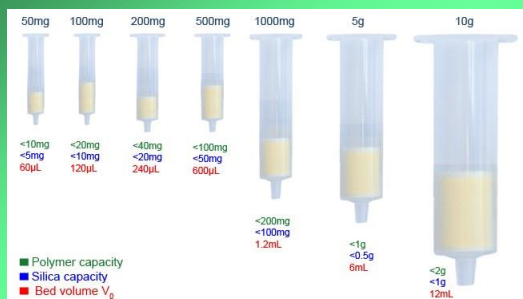
Ekstrakcja do fazy stałej (z ang. Solid Phase Extraction – SPE) polega na zaadsorbowaniu na sorbencie stałym składników próbki i następnie elucji (wymywaniu) ich z jego powierzchni wybranym rozpuszczalnikiem. Ekstrakcja ta daje dobre rezultaty, gdy oddziaływanie między sorbentem i analitem będzie większe niż między matrycą i analitem.

Ekstrakcja do fazy stałej (ekstrakcja w układzie ciecz-ciało stałe)

Wyróżniamy następujące typy sorbentów:

- sorbenty niepolarne, na których adsorbowane są niepolarne i średnio polarne anality z polarnych roztworów
- sorbenty polarne, na których adsorbowane są średnio polarne, do polarnych anality z niepolarnych roztworów
- sorbenty o przeciwnym ładunku, na którym adsorbowane są jonowe anality z roztworów.

Kolumnienki do SPE



Ekstrakcja do fazy stałej

Tabela 2 Sorbenty niepolarne.

Symbol	Nazwa	Zastosowanie
C - 18	Oktadecyl endcapped*	Faza stosowana do rozdzielenia od niepolarnych do średniopolarnych związków, takich jak antybiotyki, barbiturany, benzodiazepiny, kofeina, narkotyki, barwniki, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, herbicydy, pestycydy, węglowodory, fenole, steroidy, witaminy rozpuszczalne w wodzie.
ENVI - 18	Oktadecyl endcapped	Dokładniejsze pokrycie i większa zawartość węgla niż C-18, większa odporność na skrajne wartości pH i nieco większa pojemność na związki niepolarne. Używana jak C-18.
C - 8	Octyl endcapped	Faza stosowana do rozdzielenia od niepolarnych do średniopolarnych związków, takich jak antybiotyki, barbiturany, benzodiazepiny, kofeina, narkotyki, barwniki, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, pestycydy, węglowodory, fenole, steroidy, witaminy rozpuszczalne w wodzie.
ENVI - 8	Octyl endcapped	Dokładniejsze pokrycie i większa zawartość węgla niż C-8, większa odporność na skrajne wartości pH i nieco większa pojemność na związki niepolarne. Używana jak C-8.
C - Ph	Fenyl	Nieco mniejsze zatrzymywanie niż C-8 i C-18. Używana z niepolarnymi do średniopolarnych związków, szczególnie do związków aromatycznych.
Hsep		Do eliminacji białek w próbkach biologicznych; wiąże małe cząsteczki takie jak narkotyki.

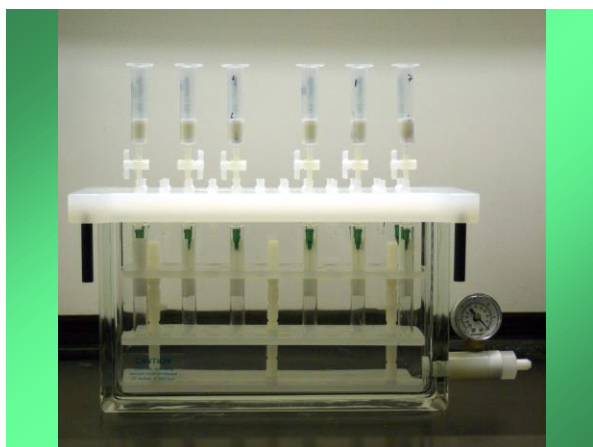
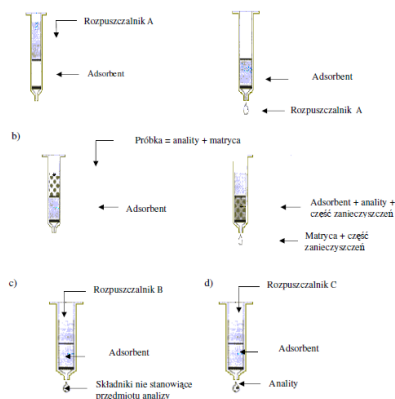
*Endcapped – pokrycie końcowe; reakcja wiązania z trimetylochlorosilanem wolnych, dostępnych silanoli, pozostałych na powierzchni żelu krzemionkowego po związaniu z nim fazy stacjonarnej (wytworzenia fazy wiążącej). Jest stosowane w celu dezaktywowania sorbentu w stosunku do związków zasadowych.

Ekstrakcja do fazy stałej

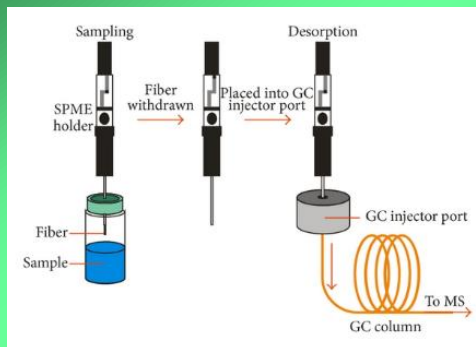
Tabela 3 Sorbenty polarne

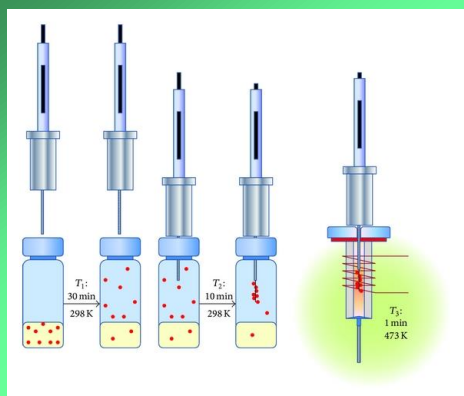
Symbol	Nazwa	Zastosowanie
C - CN	Cyjano Endcapped	Faza stosowana do średnio polarnych związków w układzie fazy odwróconej, w układzie fazy normalnej do związków polarnych takich jak: mykotosyny, antybiotyki, barwniki, herbicydy, pestycydy, fenole, steroidy. Słaby wymiennicz kationów.
C - Diol	Diol	Faza stosowana do ekstrakcji związków polarnych.
C - NH ₂	Amino	Faza stosowana do ekstrakcji związków polarnych, słaby wymiennicz anionów oraz kwasów organicznych.
C - Alumina-A	Kwasowa pH-5	Wymiennicz anionów i adsorbent związków polarnych, takich jak witaminy.
C - Alumina-B	Zasadowa pH-8,5	Adsorpcja związków polarnych i wymiana kationów.
C - Alumina-C	Obojętna pH-6,5	Adsorpcja związków polarnych. Możliwość wymiany anionów i kationów – zależne od pH. Używany do ekstrakcji witamin, antybiotyków, enzymów, hormonów, glikozydów.
C - Florisil		Faza stosowana do adsorpcji związków polarnych, takich jak: alkohole, aldehydy, aminy, narkotyki/leki, barwniki, pestycydy, PCB, ketony, związki azotowe, kwasy organiczne, fenole i steroidy.

a) Schemat ekstrakcji w układzie ciecz-ciało stałe



Solid Phase Microextraction (SPME) (mikroekstrakcja do fazy stałej)





Podział metod (nie technik) analitycznych

Metody bezwzględne (absolutne) nie wymagają wzorcowania

Metody porównawcze (względne) wymagają kalibracji względem znanych wzorców – większość metod należy do tej grupy

Rodzaje metod porównawczych

- metoda krzywej kalibracyjnej
- metoda dodawania wzorca
- metoda wzorca wewnętrznego

Etapy procesu analitycznego – pomiar

Instrumenty analityczne – przyrządy, urządzenia służące do celów pomiarowych w procesie analitycznym

Grupy analitycznych przyrządów pomiarowych:

- spektrometry – oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego z molekulami, atomami, jądrami atomowymi, elektronami
- aparatura elektrochemiczna – pomiar wielkości elektrycznych (opór elektryczny, napięcie i natężenie prądu) towarzyszących reakcjom elektrodowym w roztworach i procesom zachodzącym między elektrodami
- chromatografy
- aparatura do pomiarów termometrycznych

Rodzaje metod porównawczych

Metoda krzywej kalibracyjnej

$$Y = mc + b$$

Y – wielkość mierzona (sygnał analityczny)
m – współczynnik kierunkowy prostej
c – stężenie analitu
b – rzędna początkowa (c = 0) – wartość ślepej próby

Procedura pomiaru:

- Przygotować serię roztworów wzorcowych (znane stężenie analitu, c_i)
- Zmierzyć wartość sygnału analitycznego dla każdego roztworu wzorcowego
- Zmierzyć wartość sygnału dla analizowanej próbki
- Wykreślić krzywą kalibracyjną ($Y = f(c_i)$)
- Wyznaczyć stężenie analizowanej próbki (c_x)

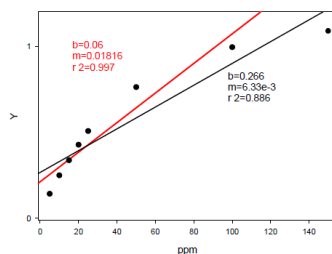
Ograniczenia:

- Wąski zakres liniowości
- Wpływ matrycy próbki (wartości m i b są różne dla wzorców i dla próbki)

Liniowość krzywej wzorcowej

$$Y = mc + b$$

c /ppm	Y
5.0	0.142
10.0	0.249
15.0	0.337
20.0	0.427
25.0	0.507
50.0	0.762
100.0	0.994
150.0	1.089



Metoda dodawania wzorca

Procedura pomiaru

- Mierzmy wartość sygnału analitycznego (Y) dla badanej próbki
- Do próbki dodajemy znaną ilość wzorca i powtórnie przeprowadzamy pomiar wartości Y. Sygnał analityczny się zmienia a wielkość zmiany jest proporcjonalna do ilości dodanego wzorca

Metoda wzorca wewnętrznego

Wzorec wewnętrzny – substancja nie będąca analitem. Do próbki dodaje się wzorca i mierzy się równocześnie dwa sygnały analityczne: dla analitu (Y_1) i dla wzorca (Y_2). Otrzymuje się wówczas: $Y_1 = m_1 c_1$, $Y_2 = m_2 c_2$

Podstawowe równanie metody wzorca wewnętrznego

Po podzieleniu stronami: $Y_1 / Y_2 = R \cdot c_1 / c_2$

gdzie: $R = m_1 / m_2$ nazywany jest współczynnikiem odpowiedzi

Techniki analityczne

Podział technik analitycznych

Techniki elektrochemiczne: pehametria, selektywne elektrody membranowe, polarografia i metody pokrewne (woltamperometria, chronowoltamperometria inwersyjna z rozwarzaniem anodowym, oscylpolarografia, polarografia krzywych pochodnych), konduktometria

Techniki optyczne (spektroskopowe): spektrofotometria w świetle widzialnym (VIS), nadfiolecie (UV) i podczerwieni (IR), emisyjna spektrofotometria płomieniowa, absorpcyjna spektrofotometria atomowa (AAS), jądrowy rezonans magnetyczny NMR, elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR), spektroskopia fotoakustyczna

Techniki chromatograficzne (rozdzielcze): chromatografia cienkowarstwowa (TLC), gazowa (GC), cieczowa (LC, HPLC), jonowa

Spektrometria masowa i techniki łączone: chromatografia gazowa – spektrometria masowa (GCMS)

Techniki radiometryczne

Techniki immunochemiczne

Techniki termoanalityczne

Metody spektroskopowe

Spektroskopia to dziedzina analityki, obejmująca metody badania materii przy użyciu promieniowania, które może być w danym układzie wytworzone (emisja) lub może z tym układem oddziaływać (absorpcja).

(Nauka o powstawaniu i interpretacji widm powstających w wyniku oddziaływań wszelkich rodzajów promieniowania z materią)

Spektrometria zajmuje się rejestracją i pomiarami efektów wytwarzania bądź oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z badaną materią.

Podział i kryteria podziału spektroskopii

- ☐ Z uwagi na zmiany energii między promieniowaniem i materią
 - spektroskopia absorpcyjna - zwiększenie energii układu w wyniku pochłaniania promieniowania
 - spektroskopia emisyjna - oddanie części energii przez układ drogą emisji promieniowania
- ☐ Z uwagi na składniki materii, których dotyczą badane przemiany
 - spektroskopia jądrowa
 - spektroskopia atomowa
 - spektroskopia cząsteczkowa
- ☐ Z uwagi na wielkość fotonu, który jest pochłaniany lub emitowany (wg. zakresu promieniowania)
 - spektroskopia rentgenowska
 - spektroskopia optyczna
 - radiospektroskopia: mikro, krótko i długofalowa

SPEKTROSKOPIA

radiospektroskopia	mikrofalowa	w podczerwieni (IR)	w obszarze widzialnym i nadfiolecie (UV-vis)
jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR)	rotacyjna – elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR)	oscylacyjna (Ramana)	elektronowa (Ramana)
5 – 800 MHz	9,4 – 35 GHz	200 – 5000 cm ⁻¹	400 – 800 nm 100 – 400 nm