

# Određivanje stehiometrije i konstante formiranja kompleksa Cu(I) i batokuproin disulfonske kiseline korištenjem slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor te klasične spektrofotometrije

---

**Anđelković, Nikolina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:376340>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-25**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Određivanje stehiometrije i konstante formiranja kompleksa  
Cu(I) i neokuproina korištenjem slijedne analize injektiranjem  
uz spektrofotometrijski detektor te klasične spektrofotometrije**

**ZAVRŠNI RAD**

**MARIJAN BOŽINOVIĆ KARAUZ**

**243**

**SPLIT, rujan 2017.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**Određivanje stehiometrije i konstante formiranja kompleksa  
Cu(I) i neokuproina korištenjem slijedne analize injektiranjem  
uz spektrofotometrijski detektor te klasične spektrofotometrije**

**ZAVRŠNI RAD**

**MARIJAN BOŽINOVIĆ KARAUZ**

**243**

**SPLIT, rujan 2017.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
UNDERGRADUATE STUDY PROGRAMME IN CHEMISTRY

**Determination of stoichiometry and formation constant of Cu(I)  
and neocuproine using Sequential Injection Analysis with  
spectrophotometric detector and classic spectrophotometric  
method**

**BACHELOR THESIS**

**MARIJAN BOŽINOVIĆ KARAUZ**

**243**

**SPLIT, September 2017.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

### ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu  
Studij preddiplomski studij kemije

**Znanstveno područje:** prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** kemija

**Tema rada** je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

**Mentor:** doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun

**Pomoć pri izradi:** Maja Biočić, mag. ing. cheming.

Određivanje stehiometrije i konstante formiranja kompleksa Cu(I) i neokuproina korištenjem slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor te klasične spektrofotometrije

Marijan Božinović Karauz, 243

#### Sažetak :

Cilj ovog završnog rada bio je određivanje stehiometrije kompleksnog spoja bakra(I) s neokuproinom primjenom klasične spektrofotometrije i slijedne analize injektiranjem. Određivanje se temelji na složenoj reakciji koja uključuje redoks reakciju i reakciju formiranja kompleksa. Prvi korak je redukcija bakra(II) u bakar(I) pomoću L-askorbinske kiseline, a u drugom koraku nastali bakar(I) s neokuproinom tvori žuto obojeni kompleks  $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$  čiji se apsorpcijski maksimum bilježi pri 458 nm. Stehiometrija kompleksa  $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$  je određena je klasičnom spektrofotometrijom, metodom molarnih omjera i metodom kontinuirane varijacije te iznosi  $\text{Cu}^+ : \text{Nc} = 1 : 2$ . Na temelju podataka dobivenih metodom molarnih omjera izračunata je konstanta formiranja kompleksa koja iznosi  $K_f = 3,01 \cdot 10^{10}$ . Određene su spektrofotometrijske karakteristike: molarna apsorptivnost ( $\epsilon = 7\,775 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) i Sandellova osjetljivost ( $8,17 \times 10^{-3} \text{ mg cm}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ). Konstruirana je krivulja umjeravanja na temelju eksperimentalnih mjerenja predložene reakcije formiranja kompleksa uz analit bakar(I) te je postignuta linearnost u području koncentracija od  $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  do  $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  uz jednadžbu pravca  $y = 15173x + 0,0081$  i korelacijski koeficijent  $R^2 = 0,9997$ . Izračunate su vrijednosti granice dokazivanja ( $3,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) i granice određivanja ( $1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). Stehiometrija nastalog kompleksa je određena i potvrđena slijednom analizom injektiranjem primjenom metode kontinuirane varijacije  $\text{Cu}^+ : \text{Nc} = 1 : 2$ . Dodatne prednosti slijedne analize injektiranjem naspram klasične spektrofotometrije su: ponovljivost, niska potrošnja reagensa, mala količina otpadnih tvari te brza i automatizirana analiza.

**Ključne riječi:** neokuproin (Nc), bakar (I), spektrofotometrija, slijedna analiza injektiranjem

**Rad sadrži:** 47 stranica, 24 slike, 8 tablica, 0 priloga, 23 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav povjerenstva za obranu:

1. doc. dr. sc. Franko Burčul	predsjednik
2. dr. sc. Ivana Škugor Rončević, znanstveni suradnik	član
3. doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun	mentor

**Datum obrane:** 29.09.2017. god.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Technology Split**  
**Study Undergraduate study programme in chemistry**

**Scientific area:** Nature Science

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 21.

**Mentor:** Lea Kukoč Modun, assistant prof. PhD

**Technical assistance:** Maja Biočić, mag. ing. chem. ing.

Determination of stoichiometry and formation constant of Cu(I) and neocuproine using Sequential Injection Analysis with spectrophotometric detector and classic spectrophotometric method

Marijan Božinović Karauz, 243

### Abstract:

The aim of this bachelor thesis has been to determine complex compound of copper(I) and neocuproine using classic spectrophotometry and sequential injection analysis. The determination is based on complex reaction that includes redox reaction and complex forming reaction. In the first step, the reduction of copper(II) to copper(I) occurred with the use of L-ascorbic acid just to serve in step two where the copper(I) formed a yellow coloured complex with the neocuproine  $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$  whose absorption maximum was measured at 458 nm. Stoichiometry of the complex is confirmed with classic spectrophotometry, by method of molar ratios and method of continued variation and is set at  $\text{Cu}^+ : \text{Nc} = 1 : 2$ . Based on information from method of molar ratios, the complex forming constant is calculated,  $K_f = 3,01 \cdot 10^{10}$ . Spectrophotometric characteristics determined include molar absorption ( $\epsilon = 7\,775 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) and Sandell's sensitivity ( $8,17 \times 10^{-3} \text{ mg cm}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ). A calibration line was constructed based on experimental data of forming reactions with the copper (I) as the analyte and a linear curve was established in the concentration area of  $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  to  $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  with the linear equation  $y = 15173 x + 0,0081$  and the correlation coefficient  $R^2 = 0,9997$ . Furthermore, limit of detection ( $3,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) and limit of quantification ( $1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) have been calculated. Stoichiometry of the formed complex was determined and checked with sequential injection analysis by application of continued variation method  $\text{Cu}^+ : \text{Nc} = 1 : 2$ . Unlike the classic spectrophotometry, additional advantages of sequential injection analysis are repeatability, low reagents consumption with low waste formation and fast automatic analysis.

**Keywords:** neocuproine (Nc), spectrophotometry, Sequential Injection Analysis

**Thesis contains:** 47 pages, 24 figures, 8 tables, 0 supplements, 23 references

**Original in:** Croatian

### Defence committee:

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Franko Burčul, PhD, assistant prof.            | chair person |
| 2. Ivana Škugor Rončević, PhD, research assistant | member       |
| 3. Lea Kukoč Modun, PhD, assistant prof.          | supervisor   |

Defence date: 29.09.2017.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.





*Završni rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Lee Kukoč Modun uz neposredno vodstvo Maje Biočić mag. ing. chem. ing., u razdoblju od veljače do rujna 2017. godine.*

*Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Lei Kukoč Modun što mi je omogućila izradu ovog rada i pomogla svojim iskustvom, znanjem i vodstvom. Posebno želim zahvaliti mag. ing. chem. ing. Maji Biočić na njenom velikom doprinosu, osobito u području rada u laboratoriju, predanosti u ispravljanju ovog rada te na ljudskoj i stručnoj potpori, strpljenju i brojnim korisnim raspravama bez kojih izrada ovog završnog rada ne bi bila moguća.*

*Zahvaljujem svojim roditeljima i djevojci koji su mi bili velika podrška i motivacija te prijateljima i kolegama, naročito Denisu Kriviću, koji su uvijek bili uz mene i nasmijavali me i bez kojih studiranje ne bi prošlo tako lako i zabavno. Hvala što ste vjerovali u mene i u moj uspjeh kad ni sam nisam!*

*Marijan Božinović Karauz*

## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak završnog rada je odrediti stehiometriju kompleksa bakar(I) i neokuproina te njegovu konstantu formiranja primjenom klasične spektrofotometrije i slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor. Nadalje, potrebno je odrediti spektralne karakteristike formiranog kompleksa, kao što su molarna apsorptivnost te Sandellova osjetljivost.

Određivanje sastava formiranog kompleksa obavlja se pomoću dvije metode:

1. Metode molarnih omjera;
2. Metode kontinuirane varijacije.

Nastali kompleks bakra(I) i neokuproina primjenjuje se za određivanje bakra(I) te je potrebno odrediti i analitičke karakteristike korištene metode:

- a) područje djelovanja Beerovog zakona (linearno dinamičko područje, LDP);
- b) jednadžbu regresijskog pravca;
- c) koeficijent linearne regresije,  $R^2$ ;
- d) granicu dokazivanja i granicu određivanja.

## SAŽETAK

Cilj ovog završnog rada bio je određivanje stehiometrije kompleksnog spoja bakra(I) s neokuproinom primjenom klasične spektrofotometrije i slijedne analize injektiranjem. Određivanje se temelji na složenoj reakciji koja uključuje redoks reakciju i reakciju formiranja kompleksa. Prvi korak je redukcija bakra(II) u bakar(I) pomoću L-askorbinske kiseline, a u drugom koraku nastali bakar(I) s neokuproinom tvori žuto obojeni kompleks  $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$  čiji se apsorpcijski maksimum bilježi pri 458 nm. Stehiometrija kompleksa  $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$  je određena je klasičnom spektrofotometrijom, metodom molarnih omjera i metodom kontinuirane varijacije te iznosi  $\text{Cu}^+ : \text{Nc} = 1 : 2$ . Na temelju podataka dobivenih metodom molarnih omjera izračunata je konstanta formiranja kompleksa koja iznosi  $K_f = 3,01 \cdot 10^{10}$ . Određene su spektrofotometrijske karakteristike: molarna apsorptivnost ( $\epsilon = 7\,775 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) i Sandellova osjetljivost ( $8,17 \times 10^{-3} \text{ mg cm}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ). Konstruirana je krivulja umjeravanja na temelju eksperimentalnih mjerenja predložene reakcije formiranja kompleksa uz analit bakar(I) te je postignuta linearnost u području koncentracija od  $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  do  $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  uz jednadžbu pravca  $y = 15173 x + 0,0081$  i korelacijski koeficijent  $R^2 = 0,9997$ . Izračunate su vrijednosti granice dokazivanja ( $3,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) i granice određivanja ( $1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). Stehiometrija nastalog kompleksa je određena i potvrđena slijednom analizom injektiranjem primjenom metode kontinuirane varijacije  $\text{Cu}^+ : \text{Nc} = 1 : 2$ . Dodatne prednosti slijedne analize injektiranjem naspram klasične spektrofotometrije su: ponovljivost, niska potrošnja reagensa, mala količina otpadnih tvari te brza i automatizirana analiza.

**Ključne riječi:** neokuproin (Nc), bakar(I), spektrofotometrija, slijedna analiza injektiranjem

## SUMMARY

The aim of this bachelor thesis has been to determine complex compound of copper(I) and neocuproine using classic spectrophotometry and sequential injection analysis. The determination is based on complex reaction that includes redox reaction and complex forming reaction. In the first step, the reduction of copper(II) to copper(I) occurred with the use of L-ascorbic acid just to serve in step two where the copper(I) formed a yellow coloured complex with the neocuproine  $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$  whose absorption maximum was measured at 458 nm. Stoichiometry of the complex is confirmed with classic spectrophotometry, by method of molar ratios and method of continued variation and is set at  $\text{Cu}^+ : \text{Nc} = 1 : 2$ . Based on information from method of molar ratios, the complex forming constant is calculated,  $K_f = 3,01 \cdot 10^{10}$ . Spectrophotometric characteristics determined include molar absorption ( $\epsilon = 7\,775 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) and Sandell's sensitivity ( $8,17 \times 10^{-3} \text{ mg cm}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ). A calibration line was constructed based on experimental data of forming reactions with the copper (I) as the analyte and a linear curve was established in the concentration area of  $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  to  $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  with the linear equation  $y = 15173 x + 0,0081$  and the correlation coefficient  $R^2 = 0,9997$ . Furthermore, limit of detection ( $3,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) and limit of quantification ( $1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) have been calculated. Stoichiometry of the formed complex was determined and checked with sequential injection analysis by application of continued variation method  $\text{Cu}^+ : \text{Nc} = 1 : 2$ . Unlike the classic spectrophotometry, additional advantages of sequential injection analysis are repeatability, low reagents consumption with low waste formation and fast automatic analysis.

**Key words:** neocuproine (Nc), copper(I), spectrophotometry, sequential injection analysis

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
2.1. Kompleksni spojevi.....	2
2.1.1. Reakcije nastajanja kompleksa .....	2
2.1.2. Mehanizam nastajanja kompleksa i konstanta nastajanja kompleksa ....	3
2.2. Spektroskopske analitičke tehnike .....	4
2.2.1. Elektromagnetsko zračenje .....	5
2.2.2. Apsorpcija zračenja.....	7
2.2.3. Beerov zakon .....	8
2.3. Određivanje sastava kompleksnog spoja bakar(II) neokuproin (Nc).....	10
2.3.1. Metoda molarnih omjera .....	10
2.3.2. Metoda kontinuirane varijacije.....	10
2.4. Analiza u protoku.....	11
2.4.1. Slijedna analiza injektiranjem .....	12
2.4.2. Formiranje zona .....	13
2.5. 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (neokuproin, Nc) .....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	18
3.1. Materijali .....	18
3.1.1. Priprava otopina .....	18
3.2. Instrumenti i uređaji .....	20
3.2.1. Spektrofotometar .....	20
3.2.2. Sustav za slijednu analizu injektiranjem .....	21
3.2.3. Ostali uređaji i oprema .....	23
3.3. Metode rada .....	24

4. REZULTATI I RASPRAVA .....	33
4.1. Metoda molarnih omjera .....	34
4.2. Metoda kontinuirane varijacije .....	37
4.3. Linearno dinamičko područje .....	39
4.4. Slijedna analiza injektiranjem .....	41
5. ZAKLJUČAK .....	44
6. LITERATURA.....	45

# 1. UVOD

Glavni cilj ovog rada bio je spektrometrijski odrediti stehiometriju kompleksa bakra(I) s neokuproinom te konstantu formiranja navedenog kompleksa, kao i njegove spektrofotometrijske karakteristike – Sandellovu osjetljivost i molarnu apsorptivnost. Spektrometrija ima široku primjenu u kvantitativnoj analizi zbog svoje jednostavnosti, ekonomske prihvatljivosti i dostupnosti.

Ono što omogućuje spektrofotometrijsku analizu bakra(I) jest nastajanje žutog kompleksa s neokuproinom  $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$  koji apsorbira pri  $\lambda = 458 \text{ nm}$ .

Neokuproin ima visoku selektivnost i osjetljivost prema bakru te se stoga koristi kao kelatirajući reagens u spektrometrijskom određivanju bakra.

Analiza injektiranjem u protok analitička je tehnika s brojnim primjenama u kvantitativnoj kemijskoj analizi. Slijedna analiza injektiranjem (*Sequential Injection Analysis*, SIA), u odnosu na metodu analize injektiranjem u protok (*Flow Injection Analysis*, FIA), ima određena poboljšanja od kojih je najvažniji manji utrošak reagensa. Oboje spadaju u kinetičke analitičke metode, obzirom da se signal bilježi pod fizikalnim, kemijskim i fizikalno-kemijskim neravnotežnim uvjetima, drugim riječima u trenutku kada reakcija nije u stanje termodinamičke ravnoteže.<sup>[1]</sup>

Korištenjem slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor, primjenom metode molarnih omjera, određena je stehiometrija kompleksa  $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$  koja iznosi  $\text{Cu}^+ : \text{Nc} = 1 : 2$ .



## 2. TEORIJSKI DIO

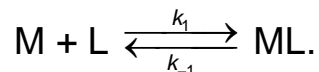
### 2.1. Kompleksni spojevi

Švicarski kemičar Alfred Werner, dobitnik nobelove nagrade za kemiju, smatra se utemeljiteljem koordinacijske kemije. Koordinacijska kemija, jedna od mnogobrojnih disciplina anorganske kemije, bavi se proučavanjem sinteze i strukture kompleksnih spojeva.<sup>[2]</sup>

Kompleksni ili složeni spojevi su kemijski spojevi u kojima molekule/ioni tvore više ili manje stabilne jedinice, u različitim agregacijskim stanjima, s atomima ili ionima metala. Građeni su od središnjeg iona (kationa) koji je okružen ligandima. Ligandi su Lewisove baze koje imaju najmanje jedan slobodni elektronski par koji dijele s ionom metala te time tvore posebnu kemijsku vezu koju nazivamo koordinacijska veza zbog pravilnog načina na koji se ligandi rasporede oko središnjeg atoma. Ovisno o tome koliko slobodnih elektronskih parova doniraju metalnom atomu, mogu biti monodentatni, koji doniraju jedan elektronski par, bidentatni, koji doniraju 2 elektronska para, te polidentatni, koji doniraju više od 2 elektronska para. (tridentatni, tetradentatni, pentadentatni i heksadentatni).<sup>[3]</sup>

#### 2.1.1. Reakcije nastajanja kompleksa

U otopini, u kojoj su stvoreni uvjeti za nastajanje kompleksa, uspostavlja se dinamička ravnoteža koja podrazumijeva trajan proces nastajanja i razgradnje kompleksa.



U ravnotežnom se stanju brzine nastajanja i razgradnje kompleksa izjednačavaju:

$$k_1 \cdot [M] \cdot [L] = k_{-1} \cdot [ML].$$

Iz navedenog izraza može se doći do konstante ravnoteže kompleksa:

$$\frac{[ML]}{[M] \cdot [L]} = \frac{k_1}{k_{-1}} = K_1$$

Konstanta ravnoteže ( $K_1$ ) određena je odnosom konstanti brzine reakcije nastajanja ( $k_1$ ) i razgradnje ( $k_{-1}$ ).<sup>[4]</sup>

### 2.1.2. Mehanizam nastajanja kompleksa i konstanta nastajanja kompleksa

Prije dodatka liganda, ioni metala su okruženi molekulama otapala te zbog toga ligandi ne zaposjedaju slobodna mjesta u koordinacijskoj sferi, nego se ugrađuju u strukturu kompleksa procesom istiskivanja molekula otapala.

Zamjena molekula otapala teče postupno, što znači da u reakciji s monodentatnim ligandom ioni metala gube najprije jednu molekulu vode, zatim drugu, te dalje u skladu s tim pravilom. Broj zamijenjenih molekula ovisit će o koncentraciji dodanog liganda.



Budući da oslobođena voda u reakcijama nastajanja kompleksa u vodenim otopinama ne utječe na stanje ravnoteže, za prikaz nastajanja kompleksa koriste se reakcije adicije i pripadajuće pojedinačne konstante formiranja (nastajanja) kompleksa,  $K_f$ .

Za gore navedenu jednadžbu, konstanta formiranja ima oblik:

$$K_f = \frac{[ML^{(n-v)+}]}{[M^{n+}] \cdot [L^{v-}]}$$

Konstante nastajanja pružaju informaciju o koncentraciji različitih kompleksa koje metal tvori u određenim ravnotežnim smjesama.

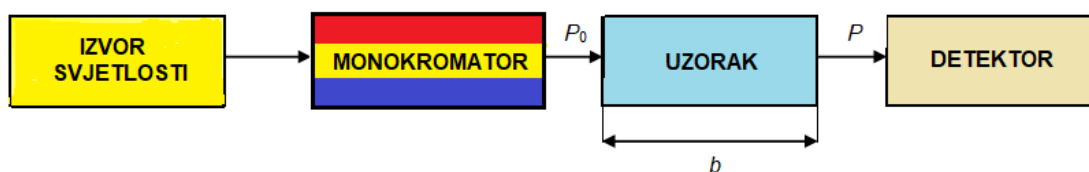
Kelatni efekt je sposobnost formiranja dviju ili više koordinacijskih veza između polidentatnog liganda i jednog središnjeg atoma metala uz nastanak stabilnijeg kompleksa od onih koje tvore monodentatni ligandi. Kelati su tvari koje tvore topive kompleksne molekule s pojedinim metalnim ionima inaktivirajući te ione tako da oni ne mogu normalno reagirati s drugim atomima ili ionima i proizvoditi talog.<sup>[3]</sup>

## 2.2. Spektroskopske analitičke tehnike

Spektroskopija je znanost koja proučava interakciju elektromagnetskog (EM) zračenja i tvari, a zasniva se na analizi apsorpcije i emisije EM zračenja. Koristi se u mnogim granama prirodnih znanosti budući da nam omogućuje uvid u građu i sastav neke tvari te njenu temperaturu i tlak.

Na kraju devetnaestog stoljeća spektroskopija je bila ograničena samo na vidljivi dio spektra, ultraljubičasto i infracrveno zračenje te elektromagnetsko zračenje. Razvitkom tehnologije spektroskopske analize u današnje vrijeme uključuju i druge vrste EM zračenja kao što su X zrake, mikrovalovi i radiovalovi.<sup>[5]</sup>

Za svako snimanje spektra, potrebno je imati: izvor zračenja, uzorak, monokromator i detektor.



Slika 2-1 Shematski dijagram jednosnopskog spektrometrijskog eksperimenta

Zračenje se iz izvora usmjerava na uzorak, koji može apsorbirati, raspršiti, ili reflektirati svjetlo. Ukoliko uzorak emitira zračenje, izvor zračenja je sam uzorak. Zračenje iz izvora putuje prema monokromatoru, koji propušta samo jednu valnu duljinu, prolazi kroz uzorak i nakon toga ide prema detektoru koji zatim primljeno zračenje pretvara u signal, koji se u konačnici zapisuje kao spektar.<sup>[6]</sup>

### 2.2.1. Elektromagnetsko zračenje

Elektromagnetsko ili ionizirajuće zračenje je vrsta energije koja velikom brzinom prolazi kroz prostor, a kombinacija je oscilirajućeg električnog i magnetskog polja, te se njegovo ponašanje može opisati svojstvima i valova i čestica. Neka svojstva elektromagnetskog zračenja, poput loma kad prelazi iz jednog medija u drugi, najbolje su objašnjena opisujući svjetlost kao val. Druga svojstva, kao što su apsorpcija i emisija, bolje su opisana tretirajući svjetlost kao česticu.

Elektromagnetsko zračenje se širi kroz prostor uz konstantnu brzinu. Kao što je već rečeno elektromagnetski val sastoji se od dva oscilirajuća polja te su njihovi vektori međusobno pod pravim kutom i oba su okomita na smjer kretanja elektromagnetskog vala. Elektromagnetski val je okarakteriziran s nekoliko osnovnih svojstava među kojima su brzina, valna duljina, amplituda, frekvencija, polarizacija, fazni kut i smjer širenja, a njegova energija je veća što je veća njegova frekvencija.<sup>[6]</sup>

Elektromagnetsko zračenje sastoji se od čestica fotona gdje svaki foton nosi određenu količinu energije. Foton je elementarna čestica, kvant elektromagnetskog zračenja te nema masu mirovanja, a sadrži energiju.

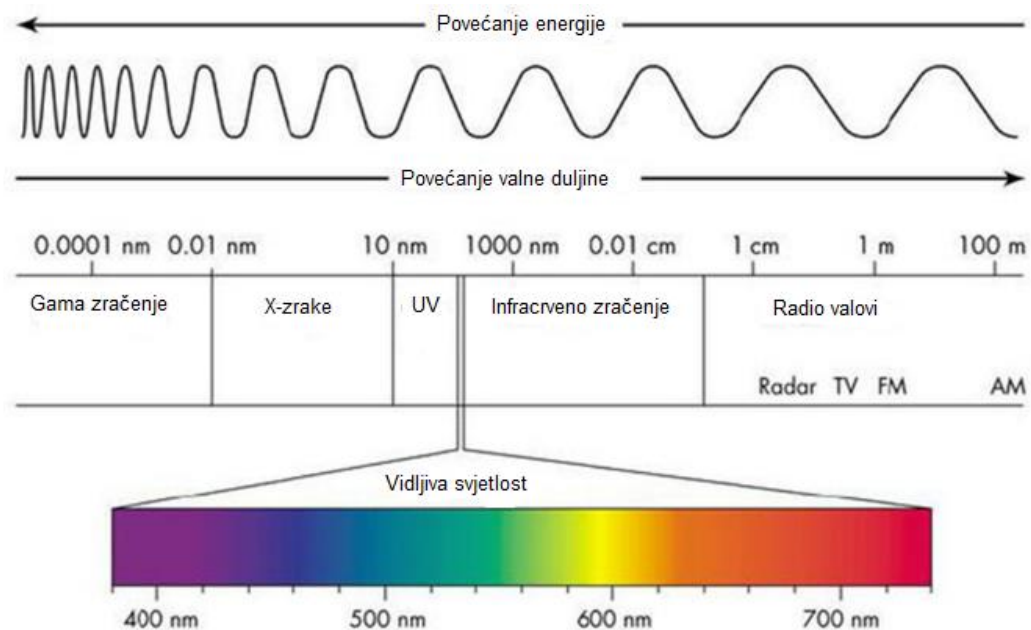
Kada tvar apsorbira elektromagnetsko zračenje, dolazi do energetske promjene. Energija fotona je vezana uz svoju frekvenciju, valnu duljinu i valni broj prema sljedećoj jednadžbi:

$$E = h \times \nu$$

gdje je  $h$  Planckova konstanta čija je vrijednost  $h = 6,626 \times 10^{-34}$  J s, te ona opisuje veličinu kvanta svjetlosti u kvantnoj mehanici, dok konstanta sama, zapravo,

predstavlja razmjer između energije fotona i frekvencije odgovarajućega elektromagnetskog zračenja.<sup>[5]</sup>

Frekvencija i valna duljina elektromagnetskog zračenja variraju unutar mnogo redova veličine. Praktičnosti radi, elektromagnetsko zračenje dijelimo na različita područja koja čine elektromagnetski spektar, a on se temelji na vrsti atomskog ili molekuskog prijelaza koji uzrokuje apsorpciju ili emisiju fotona. Granice između područja elektromagnetskog spektra nisu strogo definirane te je stoga moguće preklapanje spektralnih područja.<sup>[5]</sup>



Slika 2-2 Osnovna podjela elektromagnetskog spektra

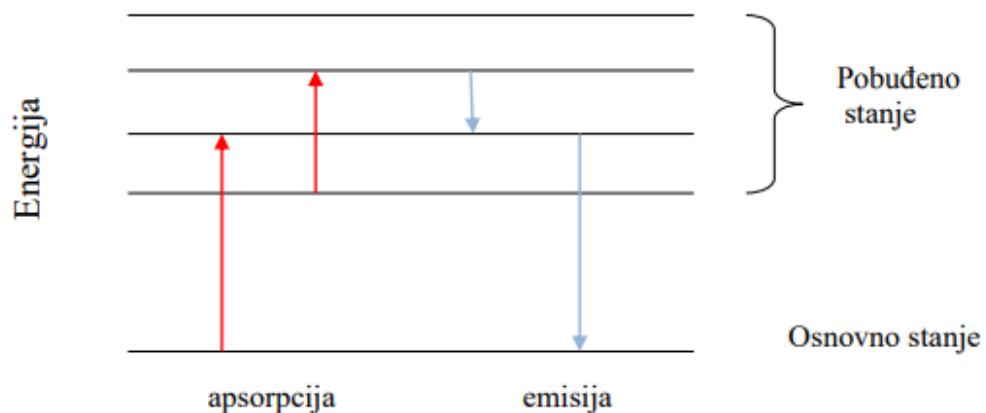
Općenita podjela elektromagnetskog zračenja je: gama zračenje, rendgensko zračenje, ultraljubičasto zračenje, vidljiva svjetlost, infracrveno zračenje, mikrovalno zračenje i radiovalovi. Dio elektromagnetskog spektra koji obuhvaća valne duljine od 190 do 1100 nm posjeduje energiju koja odgovara elektronskim prijelazima te se stoga može primjenjivati u analitičkoj spektroskopiji.<sup>[7]</sup>

## 2.2.2. Apsorpcija zračenja

Apsorpcija je proces kojim se energija zračenja apsorbira i pretvara u druge oblike energije. Da bi podrobnije objasnili proces apsorpcije zračenja potrebno je obratiti pozornost na klasičnu teoriju građe atoma sa pozitivnom atomskom jezgrom oko koje po orbitalama kruže elektroni. Kruženje elektrona oko atomske jezgre vrši se bez emitiranja ili apsorbiranja energije, a takvo stabilno stanje najniže energije naziva se osnovno stanje.

Dovođenjem energije jedan ili više elektrona u atomu može preći u energetski više, dozvoljeno, pobuđeno stanje. Važno je naglasiti da apsorpcija fotona može nastati samo ukoliko je energija fotona jednaka energetskej razlici između osnovnog stanja i nekog od pobuđenih stanja čestice. Apsorpcija zračenja nije kontinuirana već se ona vrši u kvantima energije, fotonima. Elektron koji primi odgovarajući foton preskače u pobuđeno odnosno ekscitirano stanje.<sup>[5]</sup>

U pobuđenom stanju, elektron ostaje kratkotrajno, te se pobuđena čestica vraća u stanje niže energije pritom prenoseći suvišak energije drugim atomima ili pak molekulama u okolini.<sup>[7]</sup>



Slika 2-3 Energijski prijelaz elektrona uslijed emisije odnosno apsorpcije

Količina topline koja se pri tome otpušta kao i koncentracija pobuđenih čestica u jednom trenutku su zanemarive, stoga ni u jednom trenutku ne možemo reći da je energija promatranog sustava na bilo koji način remećena.<sup>[7]</sup>

### 2.2.3. Beerov zakon

Beerov zakon je osnovni zakon u kolorimetriji i spektrofotometriji, te daje funkcijski odnos između veličine mjerene apsorpcijskom metodom ( $A$ ) i veličine koja se određuje, u ovom slučaju, koncentracije ( $c$ ).

$$A = \log \frac{P_0}{P} = a \cdot b \cdot c$$

gdje je  $a$  konstanta proporcionalnosti, apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent), dok je  $b$  duljina puta zračenja kroz uzorak. Apsorbancija je logaritam omjera intenziteta upadnog zračenja i propuštenog zračenja kroz uzorak. Obzirom da je apsorbancija veličina bez dimenzije možemo zaključiti da se jedinice za apsorptivnost određuju iz navedene jednadžbe.

Ukoliko koncentraciju izrazimo jedinicom mol L<sup>-1</sup>, a duljinu puta  $b$  u cm konstanta proporcionalnosti je molarna apsorptivnost i izražava se u mol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. U tom slučaju jednadžba poprima sljedeći oblik:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c. \text{ [8]}$$

Ovisi o temperaturi, koncentraciji, valnoj duljini i naravno o tvari. Molarna apsorptivnost je broj litara u kojim je potrebno otopiti 1 mol neke tvari da bi vrijednost apsorbancije bila 1 uz duljinu optičkog puta 10,0 mm.

Također, Beerov zakon je moguće primjeniti i na otopine koje sadrže više različitih tvari koje apsorbiraju ukoliko ne postoji međudjelovanje različitih vrsta. U tom slučaju Beerov zakon poprima sljedeći oblik:

$$A_{\text{ukupno}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \varepsilon_1 bc_1 + \varepsilon_2 bc_2 + \dots + \varepsilon_n bc_n. \text{ [5]}$$

Sandellova osjetljivost (engl. *Sandell's sensitivity*) definirana je kao količina tvari izražena u miligramima koja je nužna za postizanje apsorbancije od 0,001. Sandellova osjetljivost izražava se u  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , a može se izračunati koristeći sljedeći izraz:

$$S = \frac{10^{-3}}{a} (\mu\text{g cm}^{-2})$$

gdje je  $a$  apsorptivnost izražena u jedinicama  $\text{L g}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . [9]

### Ograničenja Beerovog zakona

Kao što je već navedeno, prema Beerovom zakonu apsorbancija je logaritam omjera intenziteta upadnog zračenja i propuštenog zračenja kroz uzorak te je proporcionalna koncentraciji apsorbirajuće vrste. Odnos između apsorbancije i koncentracije linearno proporcionalan, a do odstupanja od te linearnosti dolazi ukoliko je koncentracija tvari veća od  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . Iz toga možemo zaključiti da je primjena spektrometrije, unutar vidljivog dijela elektromagnetskog zračenja, rezervirana samo za niže koncentracije. Razlog tomu je što se smanjuju udaljenosti među česticama vrste koja apsorbira do stupnja gdje svaka čestica utječe na raspodjelu naboja suprotne čestice. [6]

Kemijska odstupanja posljedica su asocijacije, disocijacije ili reagiranja vrste koja apsorbira s otapalom, pri čemu nastaju produkti čije se apsorpcijske značajke razlikuju od značajki analita. Ukoliko se analit pojavljuje u različitim oblicima potrebno je ostvariti takovo stanje u otopini gdje će usljed porasta analitičke koncentracije porasti koncentracija apsorbirajuće vrste. [6]



## **2.3. Određivanje sastava kompleksnog spoja bakar(II) neokuproin (Nc)**

Spektrofotometrija je prikladna metoda za određivanje sastava kompleksnih iona i za određivanje njihovih konstanti nastajanja. Prednost ove metode jest u činjenici da se kvantitativna apsorpcijska mjerenja izvode bez poremećaja promatranih ravnoteža. Postoje dvije metode određivanja sastava kompleksnog spoja: (a) metoda molarnih omjera i (b) metoda kontinuirane varijacije.<sup>[6]</sup>

### **2.3.1. Metoda molarnih omjera**

Pri primjeni ove metode, potrebno je pripremiti niz otopina u kojima je analitička koncentracija jednog od reaktanata konstantna, te je to najčešće koncentracija kationa, a koncentracija drugog je promjenjiva. Potom je potrebno napraviti grafički prikaz apsorbcije u ovisnosti o molarnom omjeru reaktanata, uz uvjet da je konstanta nastajanja kompleksa relativno prihvatljive veličine. Time se dobivaju dva pravca različitih nagiba koja se sijeku u točki koja predstavlja vrijednosti molarnog omjera i koji odgovara omjeru komponenata u kompleksu. Pomoću podataka grafičkog prikaza, dobivenog metodom molarnih omjera, možemo izračunati vrijednost konstante nastajanja kompleksa,  $K_f$ .<sup>[6]</sup>

### **2.3.2. Metoda kontinuirane varijacije**

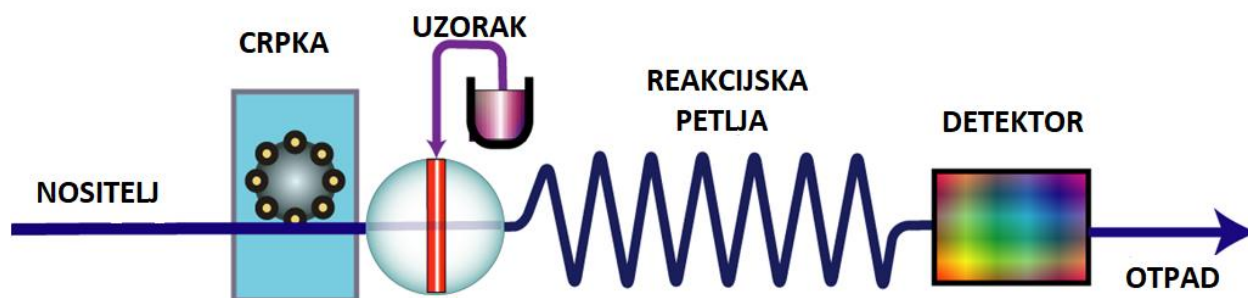
Da bismo uspješno primjenili metodu kontinuirane varijacije potrebno je otopine kationa i liganda, koje imaju identičnu analitičku koncentraciju, miješati na način da nam ukupan volumen i broj molova reaktanata budu nepromjenjivi, a da se pri tome molarni omjer reaktanata kategorički mijenja. U tom se slučaju mjeri apsorbcija svake otopine pri odgovarajućoj valnoj duljini, te se korigira za bilo koju vrijednost apsorbcije koju bi navedena smjesa mogla imati bez reakcije. Dobivenu korigiranu vrijednost zatim grafički prikazujemo u ovisnosti o volumnom udjelu

jednog od reaktanata, odnosno  $V_M/(V_M + V_L)$ , pri čemu je  $V_M$  volumen otopine kationa, a  $V_L$  volumen otopine liganda.<sup>[6]</sup>

## 2.4. Analiza u protoku

Analizu u protoku ubrajamo u kinetičke analitičke metode zbog toga što se signal uzorkuje pri kemijskim, fizikalnim i fizikalno-kemijskim neravnotežnim uvjetima.

Prva tehnika analize u protoku bila je protočna injekcijska analiza (engl. *Flow Injection Analysis*, FIA). Tijekom posljednjih 30 godina doprinijela je automatizaciji, učestalosti analiza te smanjenju volumena uzoraka i reagensa koji se analiziraju i posljedično je smanjila cijenu analiza uzoraka. Zbog tih ključnih karakteristika analize injektiranjem u protok, sama analiza bila je relativno brzo prihvaćena obzirom na njena razumljiva temeljna načela i jednostavnu provedbu. Kao što je navedeno, na jednostavan način je pružila mogućnost automatizacije mnogobrojnih analitičkih postupaka kao i ponovljivost injektiranja točnih volumena uzoraka.<sup>[5]</sup>



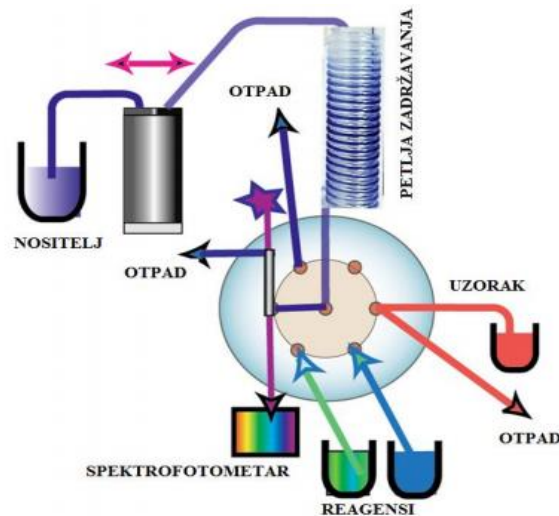
Slika 2-4 Shematski prikaz sustava za protočnu analizu injektiranjem<sup>[10]</sup>

Analiza u protoku razvila se kroz četiri kategorije: injektiranje u protok točno određenog volumena (engl. *Flow Injection*, FI), slijedno injektiranje (engl. *Sequential Injection*, SI), injektiranje u suspenziju čestica (engl. *Bead injection*, BI) i

kromatografija slijednim injektiranjem (engl. *Sequential Injection Chromatography*, SIC).<sup>[10]</sup>

#### **2.4.1. Slijedna analiza injektiranjem**

Slijedna analiza injektiranjem (engl. *Sequential Injection Analysis*, SIA) kinetička je analitička tehnika razvijena 1991. godine, te je druga generacija protočnih sustava. Omogućuje automatizaciju postupaka rukovanja uzorcima u analizama na brz, precizan i učinkovit način, te dijeli mnoge karakteristike s protočnom analizom injektiranjem. Jedna od glavnih razlika jest to što u FIA-i postoji neprekidni jednosmjerni protok, dok je u SIA-i protok programiran i prilagođen specifičnoj reakciji kako bi se omogućila optimizacija svake pojedine analize. Drugim riječima kod SIA analize protok je dvosmjernan i diskontinuiran, što za posljedicu ima uštedu reagensa u vremenu kada je sustav u praznom hodu i kada se priprema uzorak obzirom da se protok može zaustaviti. Ima i jednostavnije dijelove sustava, dvosmjerna crpka koja usisava osnovnu otopinu, koja je ujedno i nositelj, te višepozicioni selekcijski ventil koji omogućuje slijedno injektiranje nekoliko različitih otopina uzoraka ili reagensa zatim petlja zadržavanja i u konačnici detektor. Važno je naglasiti da se svi navedeni dijelovi sustava mogu upotrijebiti za veći raspon analitičkih metoda, bez mijenjanja fizičke konfiguracije sustava, jednostavno mijenjajući program.<sup>[11]</sup>



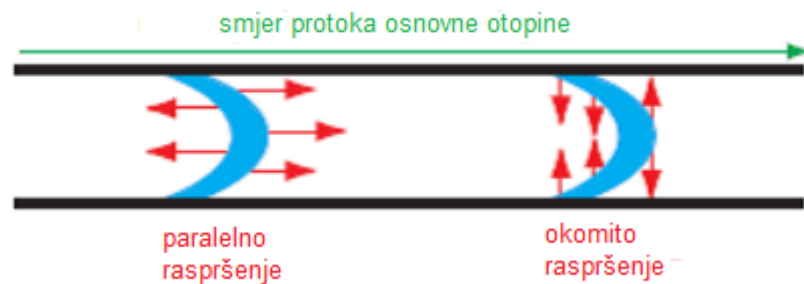
Slika 2-5 Shematski prikaz sustava za slijednu analizu injektiranjem<sup>[12]</sup>

Ovaj sustav temelji se na injektiranju slijeda određenog volumena analita i reagensa u struju otopine nositelja. Zone uzoraka i reagensa injektiraju se jedna pored druge u struju nositelja te se tijekom procesa raspršuju jedna u drugoj unutar petlje zadržavanja i na njihovom sučelju formira se produkt reakcije. Protokom kroz detektor bilježe se odgovarajuće fizikalne promjene odnosno analitički signal. Posebnost sustava SIA je poboljšana kontrolirana zona uzoraka i reagensa uzrokovana promjenom smjera protoka u petlji zadržavanja, kao i širok raspon područja koncentracija i visoka osjetljivost.

#### 2.4.2. Formiranje zona

Protok u SIA sustavu ima dvije svrhe. Prva je dovođenje zone uzorka do detektora, dok je druga miješanje uzorka s osnovnom otopinom i reagensom te formiranje mjerljivog produkta. U uvjetima protoka, zona se uzorka prenosi do detektora te se pri tome miješa sa zonom reagensa kao i s osnovnom otopinom. U tim uvjetima, miješanjem zona dolazi do kontinuiranog razrijeđenja te nastajanja produkata reakcije. Taj se proces naziva disperzija odnosno kontrolirana disperzija.

Disperzija, odnosno raspršenje je dinamičan proces pri kojem dolazi do miješanja zone uzorka sa zonom reagensa, odnosno nositelja što je uzrokovano dinamikom fluida unutar protoka kroz savijene cijevčice. Kad je uzorak tek injektiran u sustav kemijski učinak dominira te povećanje disperzije povećava i osjetljivost. Difuzija se događa u dva smjera, aksijalno, odnosno paralelno sa smjerom protoka osnovne otopine i radijalno, odnosno okomito na smjer protoka osnovne otopine. Važno je napomenuti da za protočne analize radijalna difuzija ima veći značaj iz razloga što radijalna difuzija bitno smanjuje linearnu brzinu uzorka u sredini cijevi uz povećanje linearne brzine prema stijenci cijevi.<sup>[12]</sup>

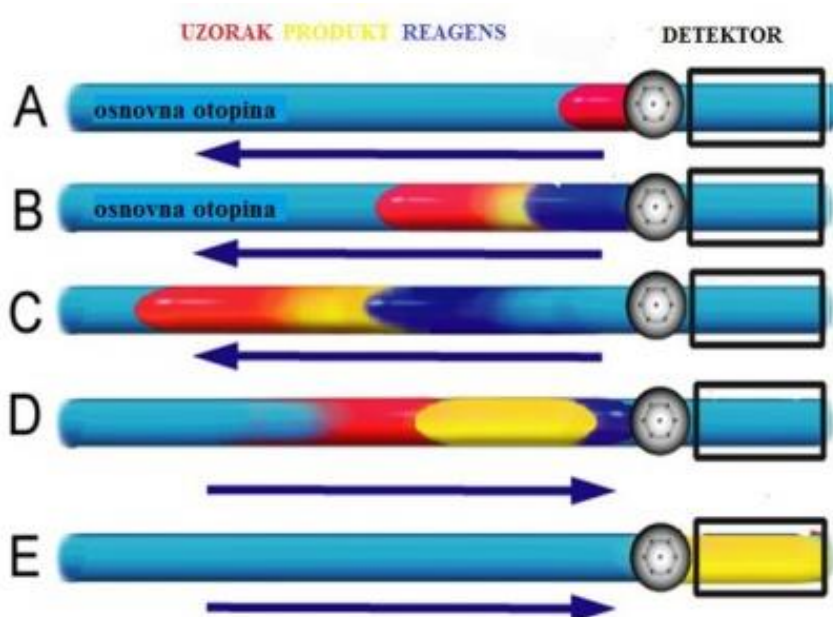


Slika 2-6 Okomito i paralelno raspršenje – utjecaj na koncentracijski gradijent<sup>[13]</sup>

U konačnici, nakon nekog vremena učinak razrjeđenja prevlada te osjetljivost opada iz razloga što učinak razrjeđenja sve više dominira.

Sam proces započinje injektiranjem uzorka pri čemu se usisava točna količina analita preko ventila u petlju zadržavanja (A), te uzastopno usisava odabrani volumen reagensa (B). Pošto se navedene dvije zone kreću uzvodno zbog paralelnog raspršenja, tako se međusobno počinju raspršivati jedna u drugoj, te se kao rezultat formira proizvod reakcije naznačen u koloni C. Nakon obrata toka, zona uzorka i reagensa nastavljaju se miješati i reagirati, te dolazi do turbulentnog strujanja uzrokovano ubrzanjem okomitog i paralelnog raspršenja (D). Potom reakcijska smjesa dostigne reakcijsku petlju u kojoj se kontinuirano stvara produkt

reakcije. U trenutku kada reakcijska smjesa dođe do detektora (E) okomito raspršenje je završeno. (Slika 2-7) <sup>[12]</sup>



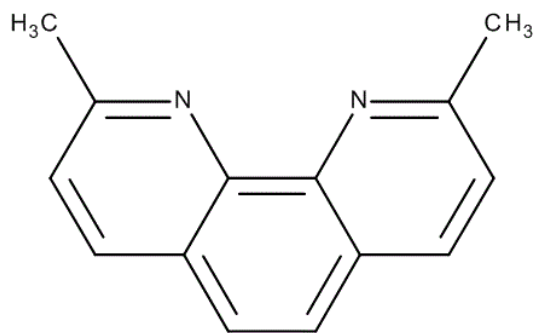
Slika 2-7 Formiranje zone koja se prenosi do detektora (zona uzorka miješa se s osnovnom otopinom i zonom reagensa pri čemu nastaje produkt reakcije)<sup>[14]</sup>

Produkt reakcije se kontinuirano mjeri i bilježi pomoću detektora što za rezultat ima mogućnost analize i obrade svih rezultata na isti način, drugim riječima usporedbu standarda s nepoznatim uzorcima. Po završetku ciklusa sustav ispiremo brzim protokom osnovne otopine koja potom odlazi u otpad.<sup>[12]</sup>

## 2.5. 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (neokuproin, Nc)

2,9-dimetil-1,10-fenantrolin, poznatiji kao neokuproin, heterociklički je organski spoj i kelatirajuće sredstvo.<sup>[15]</sup>

Neokuproin je spoj molekulske formule  $C_{14}H_{12}N_2$  čija je molekulska masa  $208,264 \text{ g mol}^{-1}$ . Pri sobnoj temperaturi je svijetlo-žuti prah s točkom taljenja između  $162$  i  $164 \text{ }^\circ\text{C}$ , slabo topljiv u vodi, a dobro topljiv u organskim otapalima, kao što su aceton, etanol, eter i benzen.<sup>[16]</sup>



Slika 2-8 Strukturna formula 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina<sup>[17]</sup>

U ranim 1930.-ima, derivati fenantrolina postali su poznati u analitičkoj kemiji kao kolorimetrijski indikatori brojnih prijelaznih metala, među kojima se neokuproin, derivat 1,10-fenantrolina, pokazao kao visokoselektivan za bakar(I). Dobiveni kompleks,  $\text{Cu}(\text{neokuproin})^{2+}$ , žute je boje.

Nekoliko poželjnih svojstava pridonijeli su tome da je neokuproin prikladan za određivanje metala u tragovima. Konstante stabilnosti metalnih kelata su dovoljno visoke da se mogu kvantitativno kompleksirati i u najrazrjeđenijim otopinama s odgovarajućom pH vrijednosti i suviškom reagensa. Razvijene metode uključuju redukciju bakra(II) u bakar(I) koji reagirajući s neokuproinom tvori žuto obojenu otopinu.<sup>[18]</sup>

Nadalje, bakrov(II) neokuproin se u nekim radovima koristi kao obojeni reagens za određivanje koncentracije klasičnom spektrofotometrijom nekih biološki važnih tiola, kao što su cistein, penicilamin, glutation i 6-merkaptopurin te se ta metoda temelji na reakciji bakrovog(II) neokuproina u bakrov(I) neokuproin koji se mjeri pri valnoj duljini  $\lambda = 458$  nm. Ta se metoda pokazala uspješnom pri analizi navedenih tiola koristeći bakar(II) neokuproin budući da standardna devijacija nije prelazila 0,6%.<sup>[19]</sup>

U literaturi je dostupan rad u kojem je opisano određivanje *N*-acetil-L-cistein (NAC) redukcijom bakrova(II) neokuproina u bakrov(I) neokuproin čija je apsorbancija kontinuirano bilježena kao funkcija vremena pri valnoj duljini  $\lambda = 458$  nm.<sup>[20]</sup>

Određivanje askorbinske kiseline u voćnim sokovima i farmaceutskim proizvodima spektrofotometrijskim metodama temelji se na oksidaciji askorbinske kiseline s bakrovim(II) neokuproinom, a kao produkti nastanu dehidroaskorbinska kiselina i bakar(I) neokuproin. Analiza se može obavljati i klasičnom spektrofotometrijom i metodama analize u protoku, s tim da je analiza u protoku povoljnija jer je kod klasične spektrofotometrije potrebno ukloniti učinke matriksa u kojem i drugi sastojci apsorbiraju UV zračenje. Apsorbancija bakar(I) neokuproina mjeri se pri valnoj duljini  $\lambda = 450$  nm. Bakar(II) neokuproin je slabiji, a time i selektivniji oksidans nego uobičajeniji Fe(III)-1,10-fenantrolin. Rezultati dobiveni primjenom bakrova(II) neokuproina statistički su uspoređeni s rezultatima dobivenim analizom HPLC-om te se ustanovilo da je ovo pouzdana nova metoda za analizu voćnih sokova i farmaceutskih proizvoda.<sup>[21]</sup>



## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Priprava otopina

Sve otopine koje su korištene pripravljene su od kemikalija čistoće stupnja analitičkog reagensa. Za dobivanje krivulje umjeravanja sve standardne otopine bile su svježije pripravljane.

#### Otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera (pH = 2,0)

Otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera  $\{c = 4,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}\}$  pripravljena je otapanjem 4,946 g borne kiseline ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska) u malo deionizirane vode koja je prenesena u odmjernu tikvicu pomoću glatkog lijevka uz dodatak 4,57 mL ledene octene kiseline ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska) i 3,19 mL fosforne kiseline ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska) nakon čega se nadopuni deioniziranom vodom do ukupnog volumena od 1000 mL. pH vrijednost tako pripravljene otopine iznosila je približno 2. Otopina acetatno-boratno-fosfatnog pufera pH vrijednosti 3,00 pripravljena je dodatkom otopine natrijeva hidroksida  $\{c(\text{NaOH}) = 2,0 \text{ mol L}^{-1}\}$  osnovnoj otopini pufera. Podešavanje pH vrijednosti kontrolirano je korištenjem mV-metra opremljenog kombiniranom staklenom elektrodom za pH mjerenja (SevenMulti, Mettler Toledo, Swerznbach, Švicarska).

#### Otopina neokuproina (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin)

Temeljna standardna otopina neokuproina ( $\{c(\text{Nc}) = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}\}$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) pripravljena je otapanjem 0,0208 g u deioniziranoj vodi do ukupnog volumena 100 mL. Otapanje je potpomognuto uporabom ultrazvučne kupelji. Pripravljena standardna otopina čuvana je na 4 °C te su radne

otopine nižih koncentracija pripravljane neposredno prije mjerenja odgovarajućim razrjeđenjem acetatno-boratno-fosfatnim puferom (pH= 3,0).

### **Otopina bakrovih (II) iona**

Otopina bakrovih (II) iona  $\{c(\text{Cu}^{2+}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}\}$  pripravljena je otapanjem 0,025 g bakrova (II) sulfata pentahidrata ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska) u deioniziranoj vodi do ukupnog volumena 100 mL. Radne otopine nižih koncentracija pripravljane su dnevno odgovarajućim razrjeđenjem acetatno-boratno-fosfatnim puferom (pH= 3,0).

### **Otopina askorbinske kiseline**

Otopina askorbinske kiseline  $\{c(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}\}$  pripravljena je otapanjem 0,0088 g L-(+)-askorbinske kiseline ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska) u deioniziranoj vodi do ukupnog volumena 50 mL. Otopina je pripravljena na dnevnoj bazi kao i potrebne otopine nižih koncentracija razrjeđenjem acetatno-boratno-fosfatnim puferom (pH= 3,0).

### **Otopina NaOH**

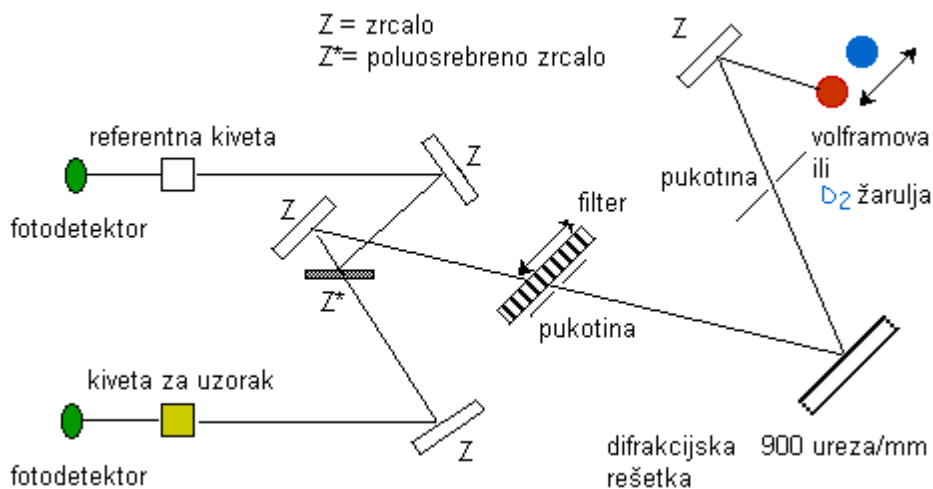
Otopina natrijevog hidroksida ( $\{c(\text{NaOH}) = 2,0 \text{ mol L}^{-1}\}$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska) pripravljena je otapanjem 8 g natrijevog hidroksida u 100 mL deionizirane vode.

## 3.2. Instrumenti i uređaji

### 3.2.1. Spektrofotometar

Za mjerenja je korišten sustav koji se sastoji od spektrofotometra i osobnog računala s programom za očitavanje i interpretaciju signala. Korišteni spektrofotometar, Shimadzu UV-1601 (Shimadzu, Kyoto, Japan), sadrži optičku kvarcnu kivetu te je spojen na računalo s programskom podrškom Hyper UV-VIS software (Shimadzu, Kyoto, Japan) u svrhu prikupljanja i obrade podataka.

Spektrofotometar je dvosnopni uređaj, odnosno ima dva snopa koja nastaju pomoću sklopa zrcala – djelitelja snopa. Jedan snop prolazi prema fotodetektoru kroz referentnu otopinu, a drugi istodobno prema drugom fotodetektoru kroz uzorak. Sva mjerenja su izvedena pri valnoj duljini od 458 nm.



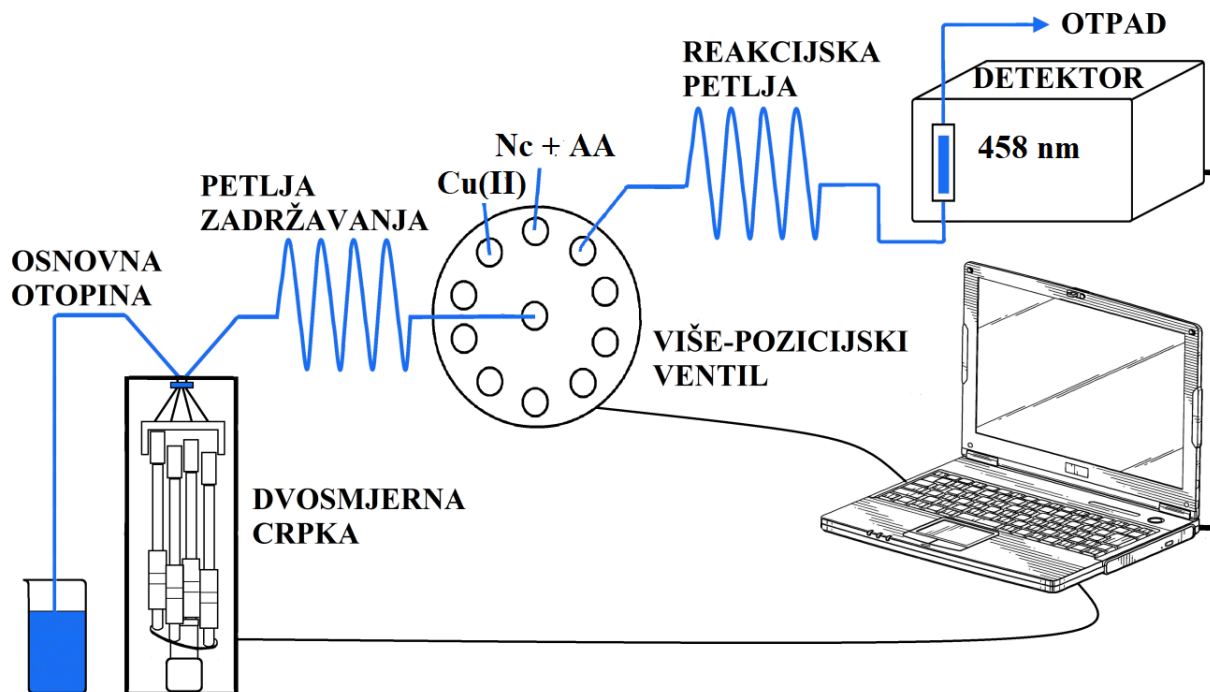
Slika 3-1 Shematski prikaz spektrofotometra Shimadzu UV – 1601<sup>[8]</sup>

### 3.2.2. Sustav za slijednu analizu injektiranjem

Sustav za slijednu analizu injektiranjem sastoji se od više-pozicijskog selekcijskog ventila i dvosmjerne crpke međusobno povezanih petljom zadržavanja. Osnovna otopina biva usisana u sustav pomoću crpke te se zatim u petlju zadržavanja slijedno injektiraju određeni volumeni otopina reagensa i uzorka kroz odabrane otvore više-pozicijskog ventila. U zadnjem koraku, protok osnovne otopine tjera zonu uzorka i reagensa kroz otvor selekcijskog ventila koji je reakcijskom petljom povezan s detektorom.

Pod utjecajem raspršenja, miješaju se zone uzorka i reagensa pri čemu nastaje produkt, čijim je prolaskom kroz protočnu kivetu odziv detektora zabilježen kao koncentracijski gradijent (zbrojni vremenski signal, pik). Kao detektor korišten je dvosnopni spektrofotometar Shimadzu UV-1601 (Shimadzu, Kyoto, Japan) s protočnom kvarcnom kivetom.

Rad SIA sustava (brzina protoka, redosljed injektiranja i volumeni injektiranja) u potpunosti je programski kontroliran jer su pojedini koraci protočne metode planirani i uneseni u programski slijed koji će biti detaljnije objašnjen u poglavlju '*Programiranje protoka*' i prikazan na slici 3-9.



Slika 3-2 Shematski prikaz SIA sustava



Slika 3-3 Instrumentacija za izvođenje slijedne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor

### 3.2.3. Ostali uređaji i oprema

Za mjerenje pH-vrijednosti otopina korišten je milivoltmetar Mettler Toledo SevenMulti (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska) opremljen kombiniranom staklenom elektrodom, Mettler Toledo InLab® (slika 3-4).



Slika 3-4 Milivoltmetar Mettler Toledo SevenMulti opremljen kombiniranom staklenom elektrodom.<sup>[22]</sup>

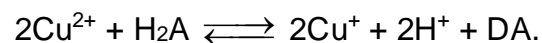
Za precizno dodavanje različitih mikrolitarskih volumena otopina, korištene su mikropipete po Eppendorfu s ručnim držačem, Nichiryo (Nichiryo, Tokyo, Japan), za raspone volumena od 10 do 100  $\mu\text{L}$  te od 100 do 1000  $\mu\text{L}$  (slika 3-5).



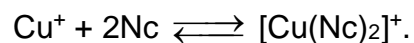
Slika 3-5 Mikropipeta s ručnim držačem<sup>[23]</sup>

### 3.3. Metode rada

Da bismo odredili stehiometrijski odnos bakra i neokuproina i konstantu formiranja kompleksa Cu(I)-Nc, potrebno je reducirati bakrove(II) ione u bakrove(I) ione pomoću L-askorbinske kiseline koja djeluje kao reducens.



U sljedećem stupnju bakrovi(I) ioni s neokuproinom formiraju žuto obojeni kompleks,  $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$ , prema sljedećoj reakciji:



Nastali kompleks apsorbira elektromagnetsko zračenje pri 458 nm.

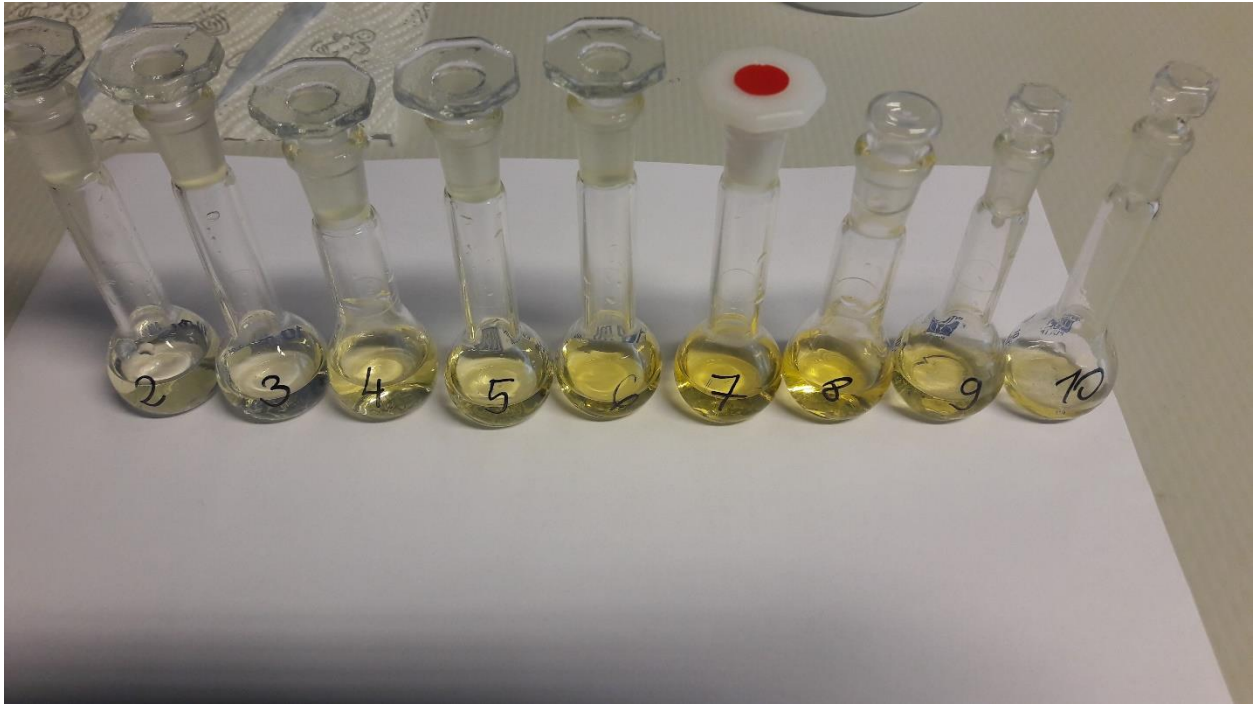
## Metoda molarnih omjera

Ion Cu(I) reagira s neokuproinom tvoreći žuto-narančasto obojeni kompleks čiju je stehiometriju potrebno odrediti. Prvo je potrebno Cu<sup>2+</sup> reducirati u oblik Cu<sup>+</sup>, u kojem se i određuje, a kao reducens se koristi L-askorbinska kiselina koja se dodaje u suvišku kako bi se Cu<sup>2+</sup> ion u potpunosti reducirao, dok je koncentracija Cu<sup>2+</sup> konstantna, a mijenja se koncentracija neokuproina. Mjerenja se provode pri pH = 3 (acetatno-boratno-fosfatni pufer), a apsorbancija svih pripremljenih otopina mjeri se pri maksimalnoj valnoj duljini ( $\lambda_{\max} = 458 \text{ nm}$ ). Nakon obavljenih mjerenja, iz konstruiranog grafičkog prikaza ovisnosti apsorbancije pri  $\lambda_{\max}$  o molarnom omjeru reaktanata, možemo odrediti stehiometriju analiziranog kompleksnog spoja.

Tablica 3-1 Priprava otopina za određivanje stehiometrije kompleksa metodom molarnih omjera

V(pufer) mL	V(H <sub>2</sub> O) mL	V(Cu <sup>2+</sup> ) mL	c(Cu <sup>2+</sup> ) mol L <sup>-1</sup>	V(Nc) mL	c(Nc) mol L <sup>-1</sup>	c <sub>L</sub> /c <sub>M</sub>	V(H <sub>2</sub> A) mL	c(H <sub>2</sub> A) mol L <sup>-1</sup>
4	4,40	0,40	$4 \times 10^{-5}$	0,20	$2 \times 10^{-5}$	0,5	1	$1 \times 10^{-4}$
4	4,20	0,40	$4 \times 10^{-5}$	0,40	$4 \times 10^{-5}$	1	1	$1 \times 10^{-4}$
4	4,00	0,40	$4 \times 10^{-5}$	0,60	$6 \times 10^{-5}$	1,50	1	$1 \times 10^{-4}$
4	3,80	0,40	$4 \times 10^{-5}$	0,80	$8 \times 10^{-5}$	2,00	1	$1 \times 10^{-4}$
4	3,60	0,40	$4 \times 10^{-5}$	1,00	$1 \times 10^{-4}$	2,50	1	$1 \times 10^{-4}$
4	3,40	0,40	$4 \times 10^{-5}$	1,20	$1,2 \times 10^{-4}$	3,00	1	$1 \times 10^{-4}$
4	3,20	0,40	$4 \times 10^{-5}$	1,40	$1,4 \times 10^{-4}$	3,50	1	$1 \times 10^{-4}$
4	3,00	0,40	$4 \times 10^{-5}$	1,60	$1,6 \times 10^{-4}$	4,00	1	$1 \times 10^{-4}$
4	2,60	0,40	$4 \times 10^{-5}$	2,00	$2 \times 10^{-4}$	5,00	1	$1 \times 10^{-4}$
4	2,20	0,40	$4 \times 10^{-5}$	2,40	$2,4 \times 10^{-4}$	6,00	1	$1 \times 10^{-4}$





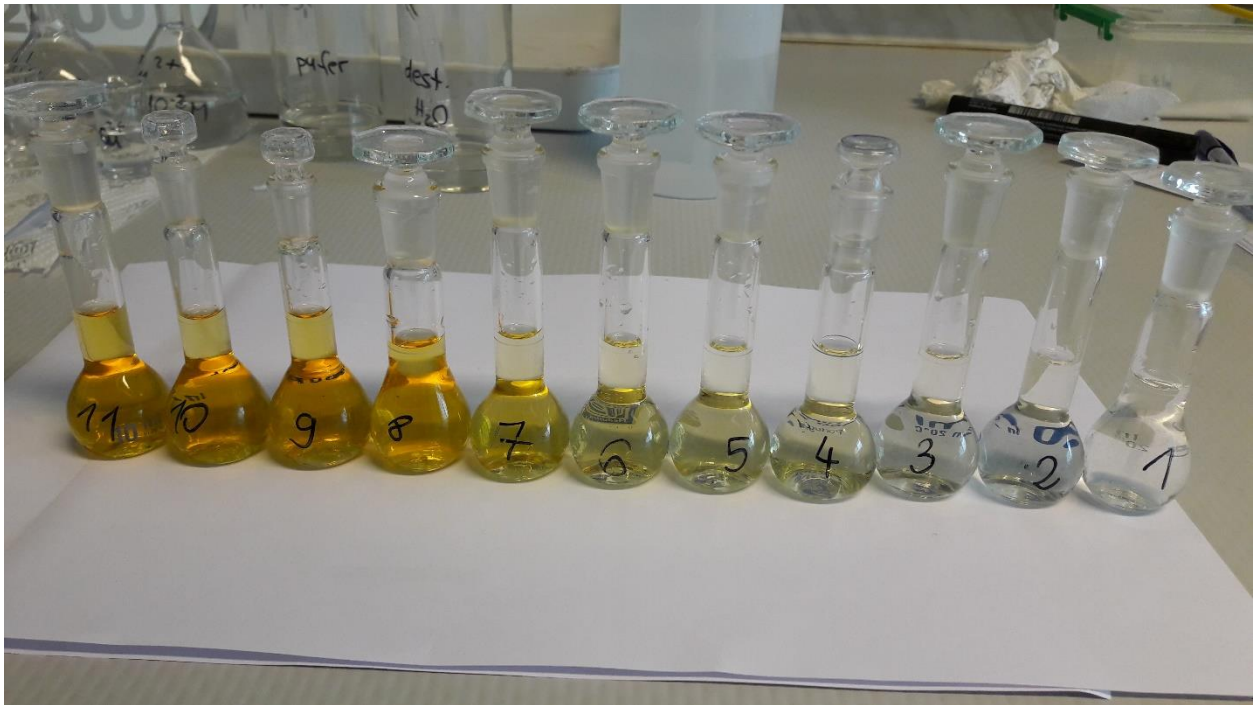
Slika 3-6 Pripravljene otopine za metodu molarnih omjera

### **Metoda kontinuirane varijacije**

Korištenjem metode kontinuirane varijacije miješaju se otopine  $\text{Cu}^+$  (posredno nastao redukcijom  $\text{Cu}^{2+}$ ) i neokuprina identičnih analitičkih koncentracija uz sustavno mijenjanje omjera reaktanata, s tim da su ukupan broj molova i ukupan volumen reaktanata u svakoj pripremljenoj otopini konstantni. Nakon pripreve željenih otopina, slijedi mjerenje apsorbancije svake otopine pri  $\lambda_{\text{max}}$  sustava. Vrijednost apsorbancije se grafički prikazuje u ovisnosti o volumnom udjelu jednog od reaktanata. Grafički je potrebno odrediti vrijednost udjela metala  $c_M/(c_M+c_L)$ .

Tablica 3-2 Priprava otopina za određivanje korigirane vrijednosti apsorbancije metodom kontinuirane varijacije

<b>V(Cu<sup>2+</sup>)</b> <b>mL</b>	<b>c(Cu<sup>2+</sup>)</b> <b>mol L<sup>-1</sup></b>	<b>V(Nc)</b> <b>mL</b>	<b>c(Nc)</b> <b>mol L<sup>-1</sup></b>	<b>c<sub>M</sub>/(c<sub>M</sub>+c<sub>L</sub>)</b>	<b>V(H<sub>2</sub>A)</b> <b>mL</b>	<b>c(H<sub>2</sub>A)</b> <b>mol L<sup>-1</sup></b>
0,10	$1,00 \times 10^{-5}$	0,90	$9,00 \times 10^{-5}$	0,10	1	$1 \times 10^{-4}$
0,20	$2,00 \times 10^{-5}$	0,80	$8,00 \times 10^{-5}$	0,20	1	$1 \times 10^{-4}$
0,25	$2,50 \times 10^{-5}$	0,75	$7,50 \times 10^{-5}$	0,25	1	$1 \times 10^{-4}$
0,29	$2,86 \times 10^{-5}$	0,71	$7,10 \times 10^{-5}$	0,33	1	$1 \times 10^{-4}$
0,33	$3,30 \times 10^{-5}$	0,67	$6,67 \times 10^{-5}$	0,40	1	$1 \times 10^{-4}$
0,40	$4,00 \times 10^{-5}$	0,60	$6,00 \times 10^{-5}$	0,50	1	$1 \times 10^{-4}$
0,50	$5,00 \times 10^{-5}$	0,50	$5,00 \times 10^{-5}$	0,60	1	$1 \times 10^{-4}$
0,60	$6,00 \times 10^{-5}$	0,40	$4,00 \times 10^{-5}$	0,67	1	$1 \times 10^{-4}$
0,67	$6,70 \times 10^{-5}$	0,33	$3,30 \times 10^{-5}$	0,71	1	$1 \times 10^{-4}$
0,75	$7,50 \times 10^{-5}$	0,25	$2,50 \times 10^{-5}$	0,75	1	$1 \times 10^{-4}$
0,80	$8,00 \times 10^{-5}$	0,20	$2,00 \times 10^{-5}$	0,80	1	$1 \times 10^{-4}$
0,90	$9,00 \times 10^{-5}$	0,10	$1,00 \times 10^{-5}$	0,90	1	$1 \times 10^{-4}$



Slika 3-7 Pripravljene otopine za metodu kontinuirane varijacije

### Krivulja umjeravanja i linearno dinamičko područje

Linearno dinamičko područje (LDP) je ono područje koncentracija u kojem signal linearno raste s porastom koncentracije, odnosno koncentracijsko područje analita u kojem postoji linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji. Linearno dinamičko područje je omeđeno granicom određivanja i gornjom granicom LDP-a.

**Granica određivanja** (engl. *Limit of quantification, LOQ*) je najniža koncentracija analita koja se može odrediti primjenom odgovarajuće tehnike ili metode, uz odgovarajuću preciznost i točnost. Određuju je brzina kemijske reakcije i metoda mjerenja. Može se izračunati pomoću izraza:

$$Q_L = \frac{10 \cdot s_b}{m}$$

gdje je  $s_b$  standardna devijacija slijepe probe, a  $m$  nagib krivulje umjeravanja.

**Granica dokazivanja** (engl. *Limit of detection, LOD*) je najniža koncentracija analita čije se prisustvo može dokazati primijenjenom metodom ili tehnikom, tj kvalitativno odrediti. Izraz za izračunavanje granice dokazivanja glasi:

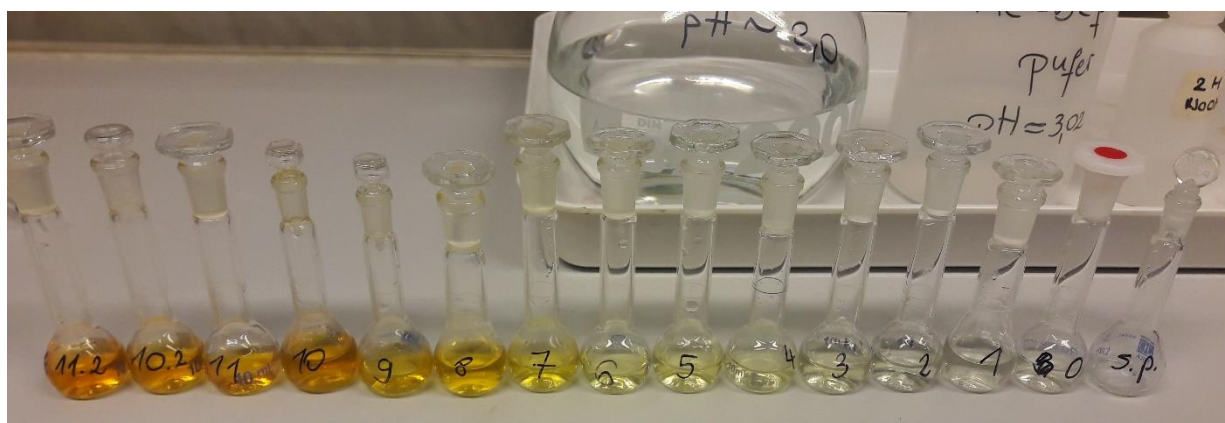
$$D_L = \frac{3 \cdot s_b}{m}$$

gdje je  $s_b$  standardna devijacija slijepe probe, a  $m$  je nagib krivulje umjeravanja.<sup>[9]</sup>

Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji naziva se krivulja umjeravanja, a u ovom istraživanju radi se o krivulji umjeravanja bakrovih(I) iona. Da bismo konstruirali krivulju umjeravanja potrebno je pripremiti otopine u kojima su koncentracije askorbinske kiseline i neokuproina iste u svakoj otopini, s tim da je neokuproin u suvišku kako bi se sav metal vezao u kompleks, dok se koncentracija i volumen  $\text{Cu}^{2+}$  iona mijenja. Askorbinska kiselina je također u suvišku kako bi se sav  $\text{Cu}^{2+}$  reducirao u  $\text{Cu}^+$ . Zatim se mjeri apsorbancija tako pripremljenih otopina te se, nakon mjerenja, na temelju rezultata konstruira krivulja umjeravanja.

Tablica 3-3 Priprava otopina za konstruiranje krivulje umjeravanja bakrovih (I) iona

V(pufer) mL	V(Cu <sup>2+</sup> ) mL	c(Cu <sup>2+</sup> ) mol L <sup>-1</sup>	V(Nc) mL	c(Nc) mol L <sup>-1</sup>	V(H <sub>2</sub> A) mL	c(H <sub>2</sub> A) mol L <sup>-1</sup>
2,90	0,10	1 × 10 <sup>-4</sup>	6,00	6 × 10 <sup>-4</sup>	1,00	1 × 10 <sup>-4</sup>
2,80	0,20	1 × 10 <sup>-4</sup>	6,00	6 × 10 <sup>-4</sup>	1,00	1 × 10 <sup>-4</sup>
2,60	0,40	1 × 10 <sup>-4</sup>	6,00	6 × 10 <sup>-4</sup>	1,00	1 × 10 <sup>-4</sup>
2,40	0,60	1 × 10 <sup>-4</sup>	6,00	6 × 10 <sup>-4</sup>	1,00	1 × 10 <sup>-4</sup>
2,20	0,80	1 × 10 <sup>-4</sup>	6,00	6 × 10 <sup>-4</sup>	1,00	1 × 10 <sup>-4</sup>
2,00	0,10	1 × 10 <sup>-3</sup>	6,00	6 × 10 <sup>-4</sup>	1,00	1 × 10 <sup>-4</sup>
2,80	0,20	1 × 10 <sup>-3</sup>	6,00	6 × 10 <sup>-4</sup>	1,00	1 × 10 <sup>-4</sup>
2,60	0,40	1 × 10 <sup>-3</sup>	6,00	6 × 10 <sup>-4</sup>	1,00	1 × 10 <sup>-4</sup>
2,40	0,60	1 × 10 <sup>-3</sup>	6,00	6 × 10 <sup>-4</sup>	1,00	1 × 10 <sup>-4</sup>



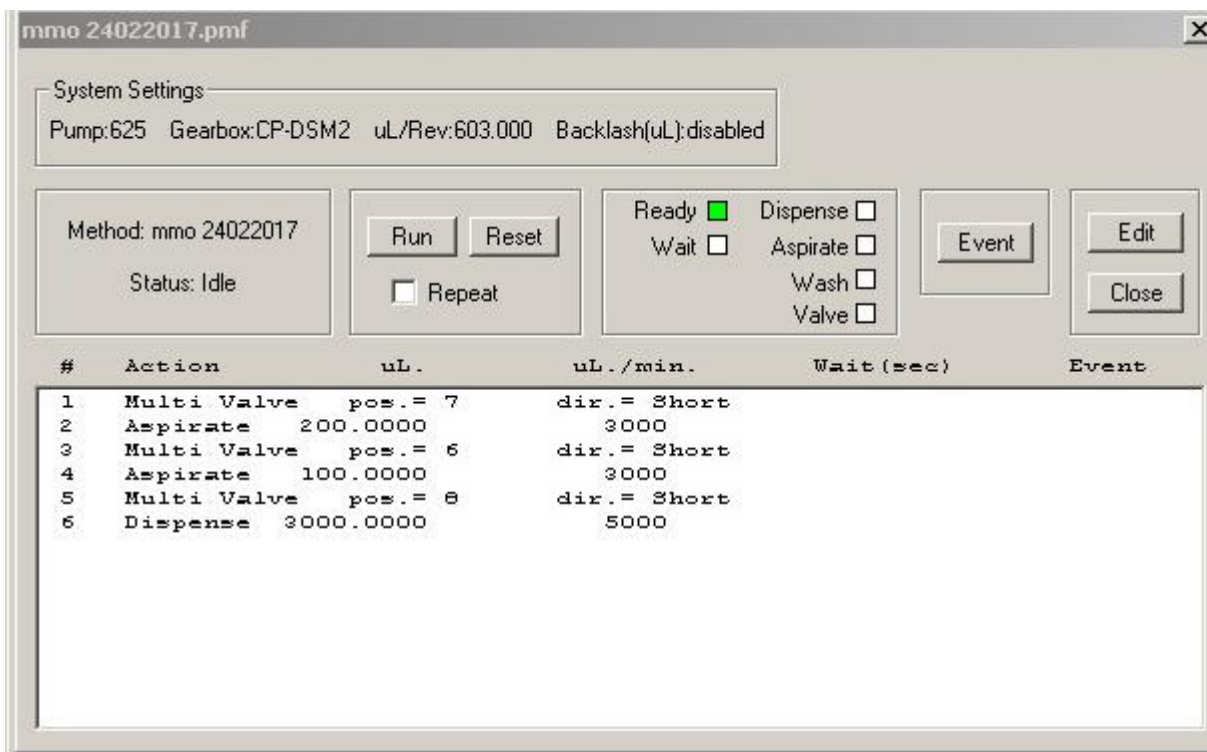
Slika 3-8 Pripravljene otopine za mjerenje LDP-a

## Slijedna analiza injektiranjem (SIA)

Slijedna analiza injektiranjem izvedena je korištenjem ranije razvijenog i optimiziranog sustava, koji je opisan u poglavlju 2.4.1. i prikazan na slici 2-6, uz spektrofotometrijski detektor. Stehiometrija bakar(I) neokuproin kompleksa dobivena klasičnim stehiometrijskim metodama provjerena je i dokazana slijednom analizom injektiranjem metodom molarnih omjera što ujedno pokazuje da se ova tehnika može koristiti za automatizirano određivanje stehiometrije kompleksa.

## Programiranje protoka

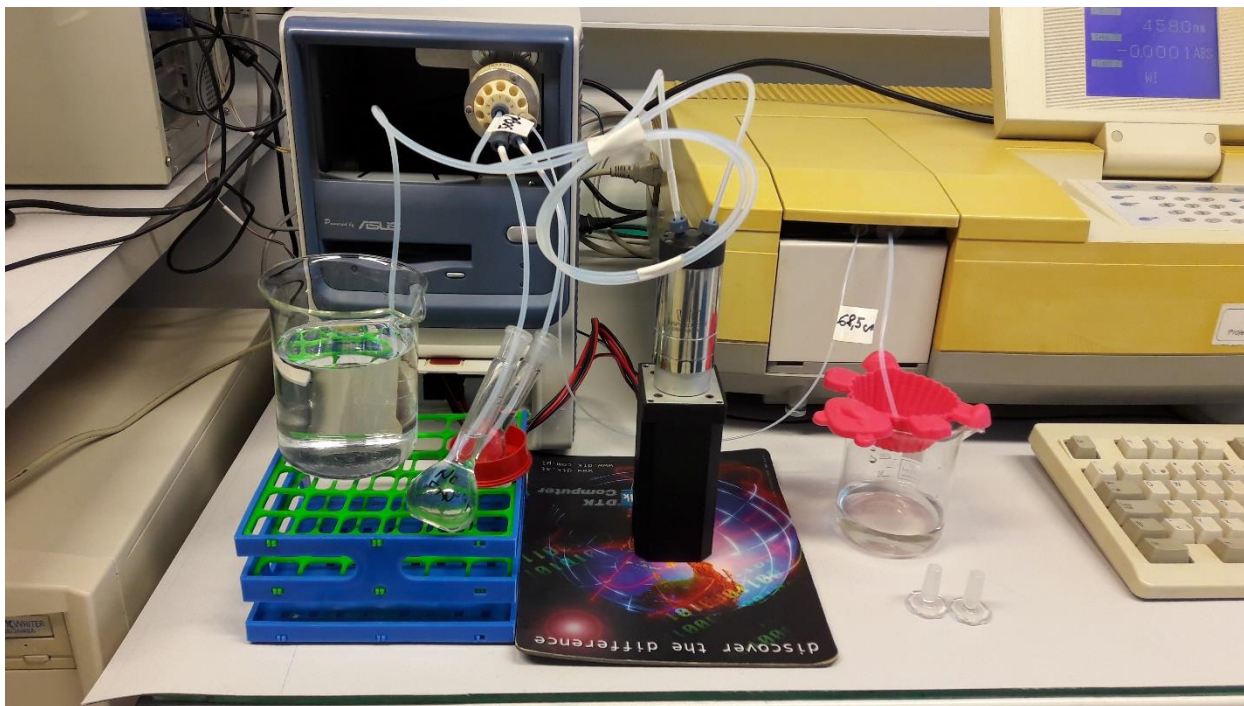
Prije početka mjerenja potrebno je napuniti cijeli sustav s otopinama kako bi se uklonio sav zrak u cjevčicama. Korišteni program prikazan je na slici 3-9.



Slika 3-9 Programski slijed punjenja cjevčica

Prvo je potrebno odabrati poziciju selekcijskog ventila (1-10) te smjer protoka otopina, odnosno protok usmjeren od otvora na selekcijskom ventilu prema crpki (engl. *aspirate*-usisavanje) ili protok usmjeren od crpke prema selekcijskom ventilu (engl. *dispense*-isisavanje). Cjevčice sustava se napune otopinama protokom od otvora 7 (otopina liganda neokuproina i L-askorbinske kiseline) i 6 (otopina  $\text{Cu}^{2+}$ ) prema crpki te se zatim u suprotnom smjeru protoka guraju osnovnom otopinom (nositelj) prema otvoru 8 koji je povezan s protočnom kivetom u optičkom putu spektrofotometra.

Mjerenje se provodi tako da se podešavanjem toka određeni volumeni analita i reagensa usisaju u petlju zadržavanja te se zatim kao zajednička zona, uz pomoć osnovne otopine suprotnog toka, šalju prema detektoru. Korištena osnovna otopina (nositelj) je deionizirana voda.

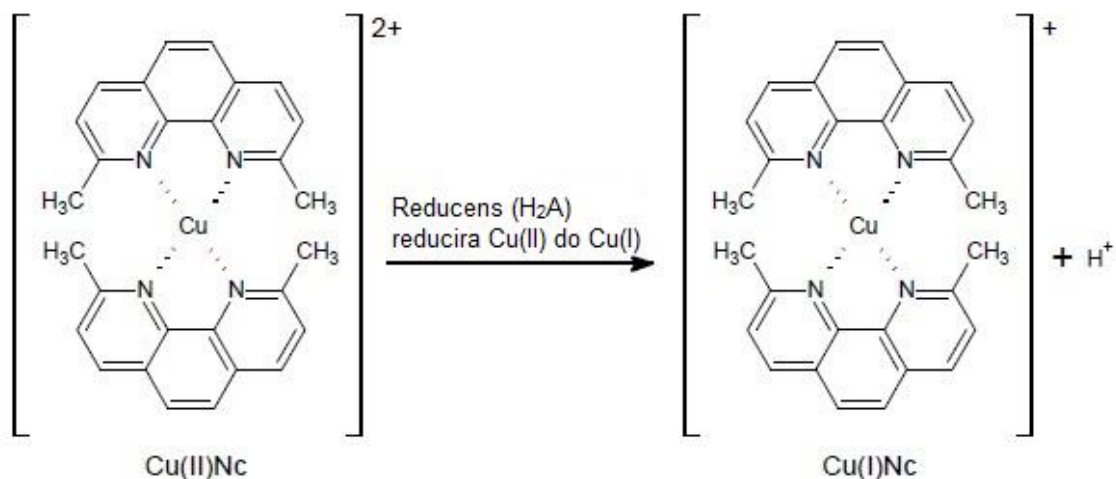
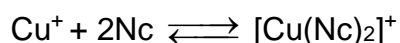
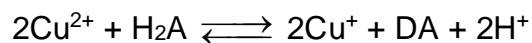


Slika 3-10 Izvedba sustava za slijednu analizu injektiranjem

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Reakcije na kojima se temelji određivanje stehiometrije kompleksa spektrometrijskom tehnikom su redoks reakcija između Cu(II) iona i L-askorbinske kiseline te kompleksometrijska reakcija u kojoj nastaje Cu(I) neokuproin kompleks.

Redukcija Cu<sup>2+</sup> iona odvija se pomoću reducensa L-askorbinske kiseline (H<sub>2</sub>A), a zatim reducirani Cu<sup>+</sup> ioni u prisutnosti liganda neokuproina formiraju žuto obojeni [Cu(Nc)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> kompleks koji apsorbira elektromagnetsko zračenje pri valnoj duljini λ = 458 nm, gdje ima apsorpcijski maksimum.



Slika 4-1 Strukturnim formulama prikazana reakcija redukcije bakar(II) neokuproin kompleksa u bakar(I) neokuproin kompleks

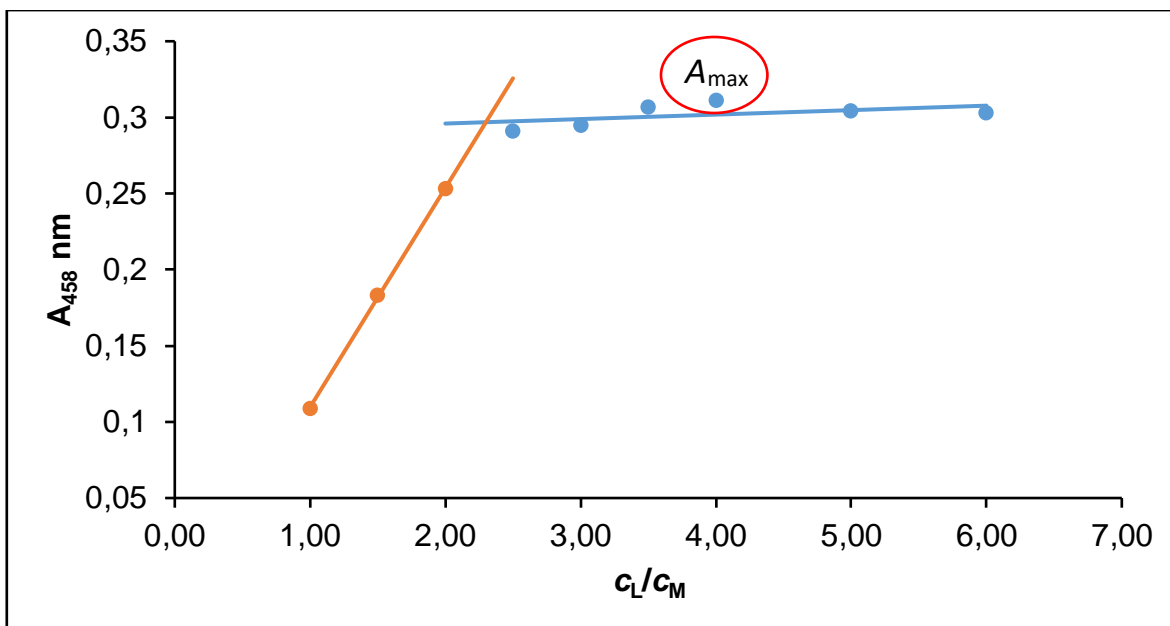


#### 4.1. Metoda molarnih omjera

Metodom molarnih omjera izmjerena je apsorbancija nastalog kompleksa pri  $\lambda_{\max}$  te je grafički prikazana. Iz grafičkog prikaza ovisnosti apsorbancije o molarnom omjerneru određena je stehiometrija dobivenog kompleksnog spoja.

Tablica 4-1 Izmjerene vrijednosti apsorbancija metodom molarnih omjera

<b>cL/cm</b>	<b>A<sub>458 nm</sub></b>
1,00	0,109
1,50	0,183
2,00	0,253
2,50	0,291
3,00	0,295
3,50	0,307
4,00	0,311
5,00	0,304
6,00	0,303



Slika 4-2 Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o molarnom omjeru Nc

Odredivši sjecište dvaju pravaca, iz grafičkog je prikaza vidljivo da se dobivena stehiometrija bakra i liganda neokuproina može opisati sljedećim omjerom:



Pomoću Beerovog zakona može se izračunati molarna apsorptivnost žuto obojenog  $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$  kompleksa gdje je duljina puta zračenja,  $b$ , jednaka 1 cm, koncentracija kompleksa jednaka  $3,41 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , a apsorbancija  $A_{\text{max}} = 0,311$  u trenutku kad je sav Nc vezao bakar(I) u kompleks.

$$\varepsilon = \frac{A_{\text{max}}}{b \cdot c(\text{M}^{2+})}$$

Uvrštavanjem podataka u ovu jednadžbu izračunata je molarna apsorptivnost,  $\varepsilon = 775 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Nakon izračuna molarne apsorptivnosti, možemo izračunati i uvjetnu konstantu formiranja kompleksa  $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$ , i to na sljedeći način:

$$[[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+] = \frac{A}{b \cdot \varepsilon} = \frac{0,253}{7775} = 3,25 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$$

$$[\text{Cu}^+] = c(\text{Cu}^+) - [[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+] = 0,75 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$$

$$[\text{Nc}] = 2c(\text{Cu}^+) - 2[[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+] = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$$

$$K_f' = \frac{[[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+]}{[\text{Cu}^+] \cdot [\text{Nc}]^2} = \frac{3,25 \cdot 10^{-5}}{0,75 \cdot 10^{-5} \cdot (1,2 \cdot 10^{-5})^2} = 3,01 \cdot 10^{10}$$

Poznavajući molarnu apsorptivnost, također možemo izračunati i Sandellovu osjetljivost:

$$M_r(\text{Cu}) = 63,55 \text{ g mol}^{-1}$$

$$a = \frac{\varepsilon}{M_r(\text{Cu})} = 122,35 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$S = \frac{10^{-3}}{a} = 8,17 \cdot 10^{-6} \text{ g cm L}^{-1} = 8,17 \cdot 10^{-3} \text{ mg cm L}^{-1}$$

Tablica 4-2 Spektrofotometrijske karakteristike  $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$  kompleksa

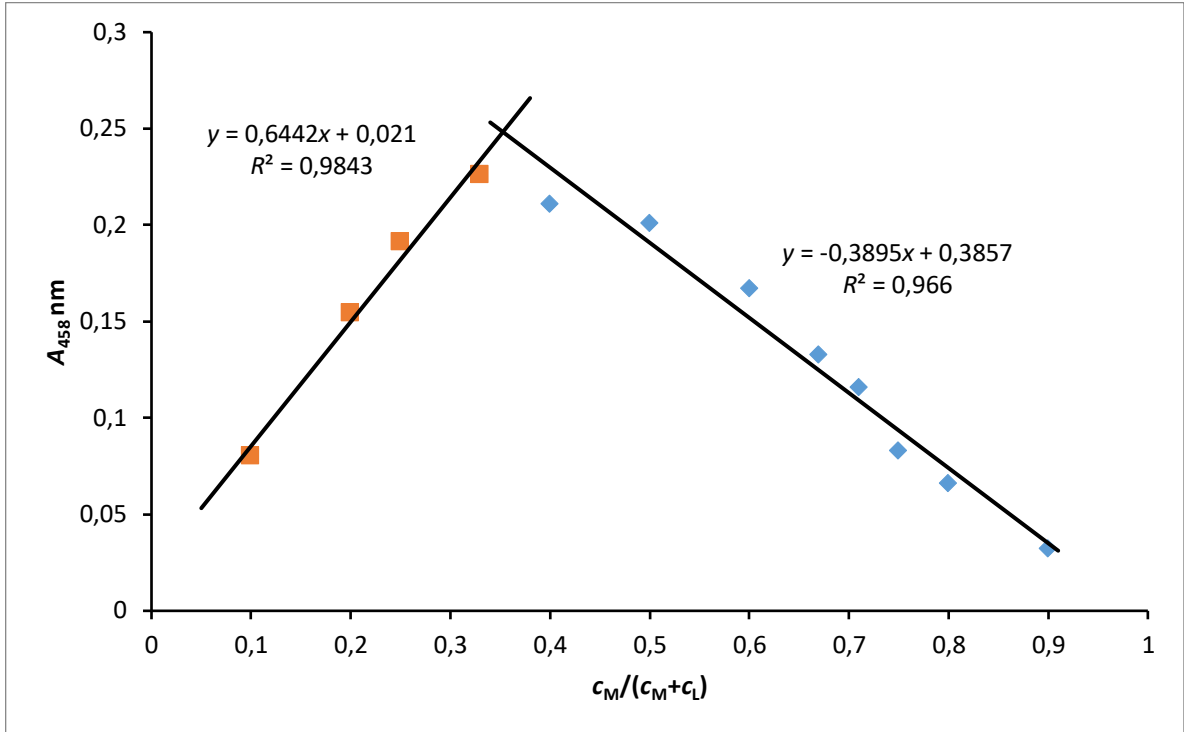
<b><math>c(\text{Cu}^+) : c(\text{Nc})</math></b>	1 : 2
<b>molarna apsorptivnost, <math>\epsilon</math></b>	7 775 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
<b>Sandellova osjetljivost, S</b>	8,17 × 10 <sup>-3</sup> mg cm <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>

## 4.2. Metoda kontinuirane varijacije

Korištenjem metode kontinuirane varijacije miješaju se otopine  $\text{Cu}^+$  (posredno dobivenog redukcijom  $\text{Cu}^{2+}$ ) neokuprina identičnih analitičkih koncentracija uz sustavno mijenjanje omjera reaktanata, s tim da su ukupan broj molova i ukupan volumen reaktanata u svakoj pripremljenoj otopini konstantni.

Tablica 4-3 Izmjerene vrijednosti apsorbancija metodom kontinuirane varijacije

<b><math>c_M/(c_M+c_L)</math></b>	<b><math>A_{458 \text{ nm}}</math></b>
0,10	0,08
0,20	0,154
0,25	0,191
0,33	0,226
0,40	0,211
0,50	0,201
0,60	0,167
0,67	0,133
0,71	0,116
0,75	0,083
0,80	0,066
0,90	0,032



Slika 4-3 Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o volumnom udjelu metala

Presjek dvaju pravaca na grafičkom prikazu predstavlja volumni udio metala ( $\text{Cu}^+$ ) u odnosu na cijeli kompleks, što se može prikazati izrazom:

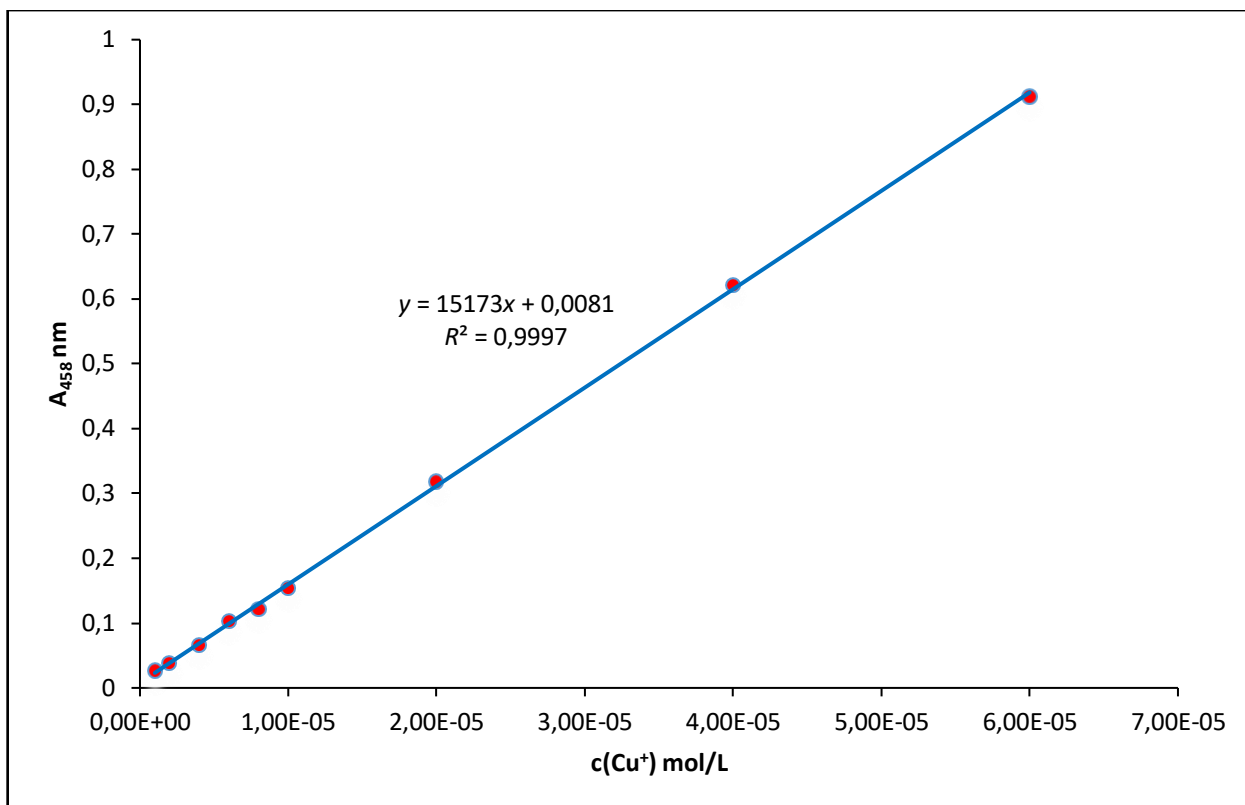
$$x = \frac{c_M}{c_M + c_L},$$

a računa se pomoću jednadžbi pravaca prikazanih na grafu te iznosi  $x = 0,35$ . Na temelju ove vrijednosti možemo izračunati da je omjer bakra(I) i neokuproina:  $\text{Cu(I)} : \text{Nc} = 1 : 2$ .

### 4.3. Linearno dinamičko područje

Tablica 4-4 Izmjerene vrijednosti za krivulju umjeravanja

<b><math>c(\text{Cu}^+)</math> mol/L</b>	<b><math>A_{458 \text{ nm}}</math></b>
$1 \times 10^{-6}$	0,026
$2 \times 10^{-6}$	0,038
$4 \times 10^{-6}$	0,067
$6 \times 10^{-6}$	0,103
$8 \times 10^{-6}$	0,122
$1 \times 10^{-5}$	0,154
$2 \times 10^{-5}$	0,319
$4 \times 10^{-5}$	0,622
$6 \times 10^{-5}$	0,913



Slika 4-3 Krivulja umjeravanja za određivanje bakra(I) (Cu<sup>+</sup>)

Na temelju izmjerenih apsorbancija bakra(I) konstruirana je krivulja umjeravanja za područje koncentracija od  $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  do  $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . U ovom koncentracijskom području postignuta je linearnost s pripadajućom jednačinom pravca  $y = 15173x + 0,0081$ , gdje je  $y$  visina vrha apsorbancije, a  $x$  je koncentracija bakra(I) izražena u  $\text{mol L}^{-1}$ , s korelacijskim koeficijentom  $R^2 = 0,9997$ . Bitno je napomenuti da je mijenjana koncentracija Cu(II), a koncentracija L-askorbinske kiseline je u suvišku jer ga ona reducira od Cu(II) do Cu(I). Izračunate su granice dokazivanja i određivanja pomoću jednačbi prikazanih u poglavlju 3.3 Metode rada, Krivulja umjeravanja i linearno dinamičko područje, te iznose: granica dokazivanja =  $3,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , granica određivanja =  $1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

#### 4.4. Slijedna analiza injektiranjem

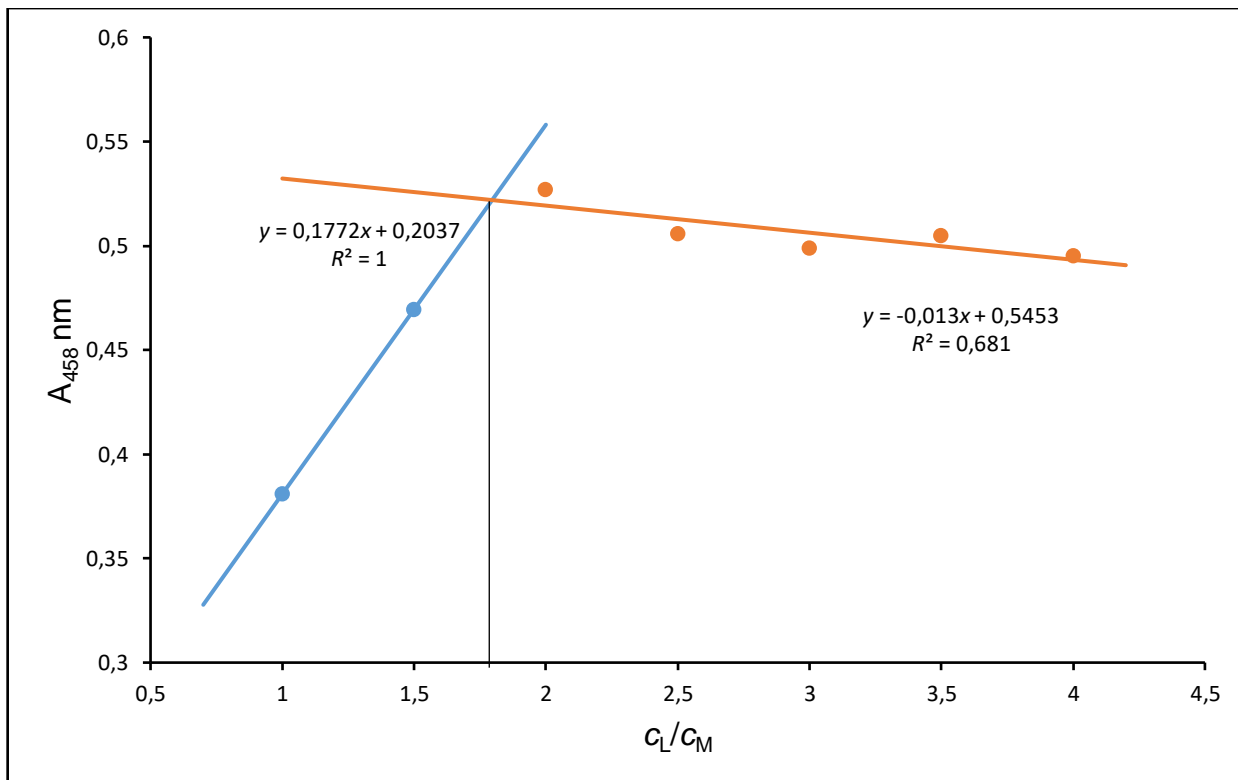
Osnovna otopina (deionizirana voda) biva usisana u sustav pomoću crpke te se zatim u petlju zadržavanja slijedno injektiraju određeni volumeni otopina reagensa (neokuproin i L-askorbinska kiselina) i uzorka (bakar(II)) kroz odabrane otvore više-pozicijskog ventila. U zadnjem koraku, protok osnovne otopine gura zonu uzorka i reagensa kroz otvor selekcijskog ventila koji je reakcijskom petljom povezan s detektorom.

Pod utjecajem disperzije, miješaju se zone uzorka i reagensa pri čemu nastaje produkt, čijim je prolaskom kroz protočnu kivetu odziv detektora zabilježen kao koncentracijski gradijent.

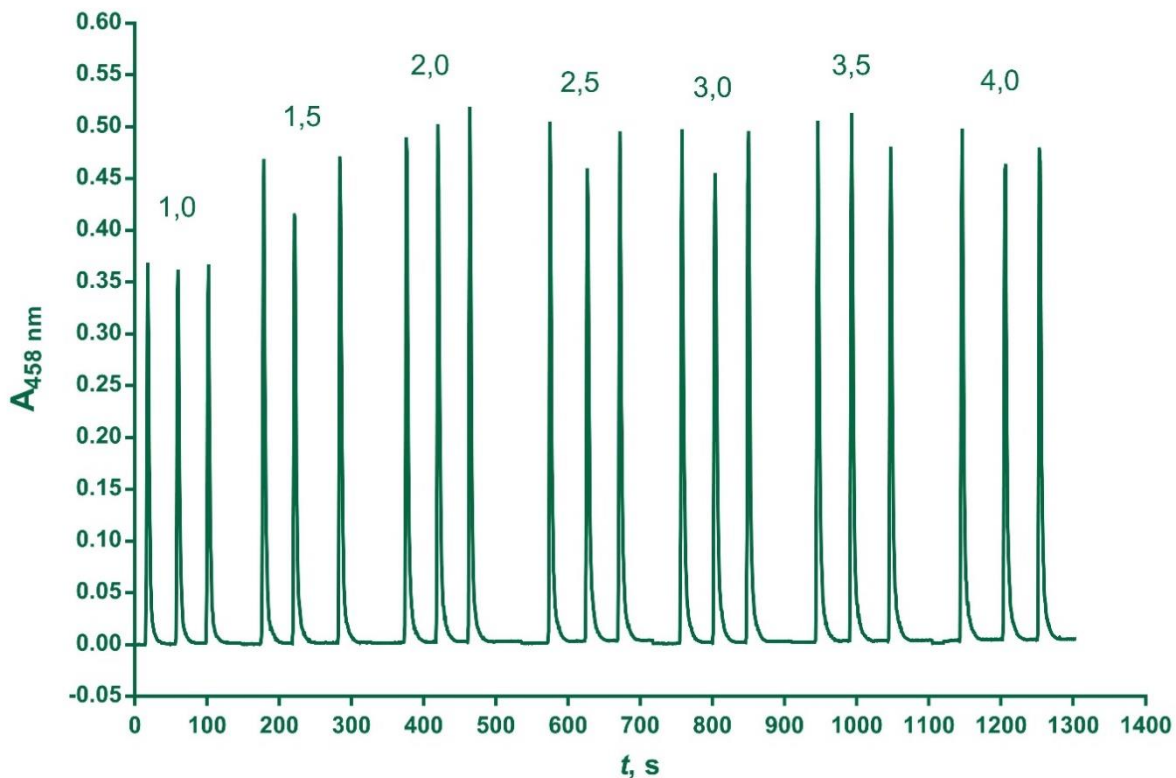
Tablica 4-5 Izmjerene apsorbancije slijednom analizom injektiranjem metodom molarnih omjera

$c/cm$	$A_{sred}$
1,0	0,3809
1,5	0,4695
2,0	0,5271
2,5	0,5057
3,0	0,4987
3,5	0,5049
4,0	0,495





Slika 4-5 Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o molarnom omjeru  $c_L/c_M$  konstruiran mjerenjem slijednom analizom injektiranjem metodom molarnih omjera



Slika 4-5 Instrumentalni zapis slijedne analize injektiranjem, metoda molarnih omjera

Slijednom analizom injektiranjem potvrđen je stehiometrijski odnos bakra(I) i neokuproina ( $\text{Cu}^+$ ) : (Nc) = 1 : 2 u kompleksu  $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$ , te je pokazano da se radi o učinkovitoj tehnici za određivanje stehiometrije kompleksa koja je brza i ponovljiva, a to se vidi iz siagrama koji je prikazan na slici 4-5.

## 5. ZAKLJUČAK

Za određivanje stehiometrije kompleksa  $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$  korištene su klasična spektrofotometrija i slijedna analiza injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor. Određivanje se temelji na redoks reakciji u kojoj L-askorbinska kiselina reducira bakrove(II) ione u bakrove(I) ione koji s ligandom neokuproinom formiraju žuto obojeni kompleks čiji je apsorpcijski maksimum pri  $\lambda = 458 \text{ nm}$ .

Klasičnom spektrofotometrijom određena je stehiometrija kompleksnog spoja  $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$  dvjema metodama: metodom molarnih omjera te metodom kontinuirane varijacije klasičnom spektrofotometrijom te slijednom analizom injektiranjem. Metodom molarnih omjera određena je stehiometrija kompleksa  $\text{Cu}^+ : \text{Nc} = 1 : 2$  te je izračunata konstanta formiranja kompleksa,  $K_f = 3,01 \times 10^{10}$ . Ovom metodom određene su spektrometrijske karakteristike  $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$  kompleksa: molarna apsorptivnost, koja iznosi  $\varepsilon = 7\,775 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  i Sandellova osjetljivost,  $8,17 \times 10^{-3} \text{ mg cm}^{-1} \text{ L}^{-1}$ . Metodom kontinuirane varijacije određena je vrijednost volumnog udjela bakra(I) u kompleksu koja iznosi  $x = 0,35$ . Navedena vrijednost potvrđuje stehiometriju kompleksa  $\text{Cu}^+ : \text{Nc} = 1 : 2$ .

Linearno dinamičko područje određivanja bakra(I) reakcijom s neokuproinom definirano je jednadžbom:  $y = 15173x + 0,0081$ , uz koeficijent linearne regresije  $R^2 = 0,9997$ . Postignuta je linearnost u području koncentracija od  $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  do  $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  te je određena granica dokazivanja, koja iznosi  $3,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  te granica određivanja, koja iznosi  $1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

Primjenom sustava za slijednu analizu injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor određen je omjer reaktanata u kompleksu  $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$  koji iznosi  $\text{Cu}^+ : \text{Nc} = 1 : 2$ . Dokazano je da se ovom vrstom analize brže može odrediti stehiometrija kompleksa uz velike prednosti u odnosu na klasične spektrofotometrijske metode, a to su niska potrošnja analita i reagensa te mala količina otpada.

## 6. LITERATURA

- [1] D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, Principles of Instrumental Analysis, Thomson, Saunders, 2007
- [2] URL:<https://www.thefamouspeople.com/profiles/alfred-werner-7238.php> (20.08.2017.)
- [3] Ivan Filipović, Stjepan Lipanović, Opća i anorganska kemija, Školska knjiga, Zagreb, 1973.
- [4] Nj. Radić, L. Kukoč Modun, Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, Zagreb, 2016.
- [5] D. Harvey, Modern Analytical Chemistry, McGraw-Hill Companies Inc., Boston, 2000.
- [6] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, Osnovne analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
- [7] D. C. Harris, Quantitative Chemical Analysis, W. H. Freeman and Company, New York, 2003.
- [8] L. Kukoč Modun, Molekulska apsorpcijska spektroskopija, Interna skripta, Split, 2003.
- [9] L. Kukoč Modun, Razvoj metoda spektrometrijskog i potenciometrijskog određivanja tiopronina u farmaceutskim pripravcima, Disertacija, Zagreb, 2009.
- [10] URL:<http://www.flowinjectiontutorial.com/Theory%200.0.html> (20.08.2017.)
- [11] URL:<http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.1.1.A.%20Sequential%20Injection%20or%20Flow%20Injection.html> (20.08.2017.)
- [12] URL:<http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.2.4.%20Concentration%20Gradient.html> (20.08.2017.)
- [13] URL:[https://chem.libretexts.org/LibreTexts/Northeastern/13%3A\\_Kinetic\\_Methods/13.4%3A\\_Flow\\_Injection\\_Analysis](https://chem.libretexts.org/LibreTexts/Northeastern/13%3A_Kinetic_Methods/13.4%3A_Flow_Injection_Analysis) (20.08.2017.)
- [14] URL:<http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.1.2.%20Flow%20Programming.html> (20.08.2017.)
- [15] URL:<http://www.publish.csiro.au/ch/CH9600145> (20.08.2017.)

- [16] URL:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65237#section=Top>  
(20.08.2017.)
- [17] URL:  
[http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Neocuproine,MDA\\_CHEM-102968?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.hr%2F&bd=1](http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Neocuproine,MDA_CHEM-102968?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.hr%2F&bd=1) (20.08.2017.)
- [18] Akheel Ahmed Syed, Ayesha Syeda, Neocuproine and bathocuproine as new reagents for the spectrophotometric determination of certain proton pump inhibitors, Bull. Chem. Soc. Ethiop. 2007, 21(3), 315-321
- [19] Besada, Tadros, Gawargious, Copper(II)-Neocuproine as Colour Reagent for Some Biologically Active Thiols: Spectrophotometric Determination of Cysteine, Penicillamine, Glutathione and 6-Mercaptopurine, Mikrochimica Acta, Wien, 1989, III, 143-146
- [20] Nj. Radić, L. Kukoč Modun, M. Biočić, Kinetic Spectrophotometric Determination of N-acetyl-L-cysteine Based on the Reduction of Copper(II)-neocuproine Reagent, Croatica Chemica Acta, 86 (2013) 65-71, Split
- [21] K. Güçlü, K. Sözgen, E. Tütem, M. Ozyürek, R. Apak, Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceuticals, Talanta, 65 (2005) 1226-1232, Istanbul
- [22] URL:<https://scientificservices.eu/item/mettler-toledo-sevenmulti-ph-meter-with-electrode-inlabR-413/1191> (20.08.2017.)
- [23] URL:<http://www.nichiryo.co.jp/en/product/pipette/ex/index.html> (20.08.2017.)