

# KONCENTRATIONS- BESTEMMELSE

UNDERVISNINGSELEMENT

# # K5

—  
UNDERVISNING  
I MÅLETEKNIK



# KONCENTRATIONSBESTEMMELSE

Sune Veltzé & Mathias Geisler, DFM A/S

1. udgave – august 2020



Copyright © 2020 metrologi.dk – Materialet må ikke anvendes til kommercielt brug, uden tilladelse fra metrologi.dk.

Metrologi.dk er finansieret af Styrelsen for Forskning og Innovation i perioden 2016 – 2020. Materiale er udarbejdet i et samarbejde mellem GTS-institutterne DFM A/S, FORCE Technology og DELTA - a part of FORCE Technology.

Læs mere om projektet på [www.metrologi.dk](http://www.metrologi.dk).

Parterne i Metrologi.dk kan ikke gøres ansvarlig for fejl og mangler i indholdet af undervisnings materialet eller i indholdet på websitet, samt indholdet i de eksterne dokumenter og websites, der linkes til, medmindre andet følger af dansk rets almindelige regler.

Grafisk design af: Henriette Schäfer Høyrup og David Balslev-Harder.

## Indholdsfortegnelse

1 Indledning .....	1	4 Opsummering.....	18
2 Beskrivelse af måleteknikker.....	2	5 Ordliste .....	19
3 Anvendte teknikker til koncentrationsbestemmelse .....	8	6 Referencer.....	21
		7 Læringsudbytte .....	22

# 1 Indledning

Koncentrationsbestemmelse er en analysemetode hvor en ukendt koncentration bestemmes i et medie, eller sagt på en mere præcis måde: Bestemmelse af mængden af en konstituent i en enhed af flere konstituenten. En konstituent er en delkomponent i et større system, f.eks. maldsukkeret i øl, som er i en vandig opløsning sammen med humlen og gæren (se boks 1). Koncentrationsbestemmelse bruges mange sammenhænge både i hverdagen og i industrien. I takt med at medicinsk udstyr er blevet mere let-anvendeligt, er for eksempel bestemmelse af blodsukker (i.e. glukoseindholdet i blodet) hos sukkersyge blevet en 'almindelig' og rutineagtig øvelse. I blodsukkerbestemmelsen benyttes en enzymatisk bestemmelsesmetode, hvor glukosen omdannes til en strøm. Den elektriske spænding ( $U$ , måles i volt) og strømstyrke ( $I$ , måles i ampere) kan måles, hvorfra den elektriske ladning ( $Q$ , angives i coulomb) kan bestemmes. Ud fra den målte ladning og Avogadros konstant ( $N_A$ ) kan stofmængden (angives i mol) i den estimerede volumen af blod bestemmes. Blodsukkerkoncentrationen angives typisk i stofmængde per volumen i enheden mol per liter (mol/L eller evt. mmol/L). Denne information er vigtig for, at den sukkersyge kan indtage en tilpasset mængde af insulin til at nedbryde blodsukkeret, således at deres krop kan fungere, og de kan leve uden gener.

Den enzymatiske metode, samt flydevægten beskrevet i boks 1, er eksempler på koncentrationsbestemmelser, hvor man ud fra direkte målinger kan bestemme eller estimere en koncentration. For at kunne opnå et nøjagtigt resultat må metoden enten være selektiv som f.eks. den enzymatiske måling af blodsukkeret i blodsukkeranalysen eller prøven måler på må bestå af relativt få konstituenten der kan influere måleresultatet.

I dette kompendium vil vi gennemgå forskellige metoder til at bestemme koncentration ud fra målinger. Da der er et væld af forskellige teknikker til koncentrationsbestemmelse, beskrives i kapitel 2 nogle afgrænsede teknikker, som anvendes til hurtig og nøjagtig analyse. I de efterfølgende kapitler vil enkelte af disse

## Boks 1: Bestemmelse af sukkerindholdet ved ølbrygning

I forbindelse med hjemmebrygning af øl er vægtfylde-målinger (densitet) en vigtig informationskilde. Før man tilsætter gæren til sit bryg er man nødt til at bestemme hvor maldsukkerkoncentrationen man egentlig har opnået efter mæskningen. Til dette bruges en flydevægt (se figur 1). I væsker med en lav densitet stikker flydevægten dybere end i væsker med høj densitet. Således kan densiteten aflæses på skalaen ud for væskens overflade. For vandige opløsninger findes tabeller som lister sammenhængen mellem densitet og sukkerindhold. Således kan densiteten omregnes til en sukkerkoncentration.

Hvis der indgår flere konstituenten i væsken, f.eks. når gæringen er i gang og der tillige med sukker findes en ukendt mængde alkohol i opløsningen, kan koncentrationen af hver enkelt konstituent ikke bestemmes ved en enkelt måling. Derfor måles densiteten igen ved gæringens afslutning. Ud fra den oprindelige mængde sukker og den afsluttende densitet kan alkoholprocenten slås op i en tabel.

Læs evt. mere om flydevægte i "Måleteknik", bd. 2, s. 205 [5].



Figur 1: En flydevægt (kaldes også et hydrometer), der kan være lavet med én eller flere skalaer. Den tykke del sænkes ned i væsken. Måleværdien aflæses på skalaen ved væskeoverfladen.

teknikker blive nærmere beskrevet, og i nogle tilfælde suppleret med regneeksempler.

Derudover vil vi fremhæve teknikernes styrker og svagheder for at give en forståelse for hvilke faktorer, der kan have indflydelse på måleresultatet.

Der vil i dette kompendium blive brugt en del termer fra kemien, det antages derfor at begreberne introduceret i kompendiet "K3, Kemiske opløsninger" [1] er kendt.

Table 1: Her vises forskellige teknikker, der kan anvendes til at bestemme koncentration eller adskillelse af konstituent, hvorfra en koncentration kan bestemmes eller estimeres. I de to sidste kolonner angives hastigheden hvormed en prøve kan analyseres, samt om der kan udledes en koncentration direkte fra måleteknikken.

Måleteknik	Målemetode	Anvendelse	Tid pr. prøve	Måleform
<b>Kromatografi</b>	<i>Adskillelse af konstituent på en stationær fase</i>	Alsidig, bruges til adskillelse af konstituent	Min. - timer	Direkte
<b>Massespektrometri</b>	<i>Adskillelse af konstituent ud fra molekylvægt</i>	Præcis masse og forholdsbestemmelse	Min. - timer	Direkte
<b>pH</b>	<i>Bestemmelse af protonaktivitet (H<sup>+</sup>)-ionen</i>	Laboratorie og fødevarerindustrien	Sek.-min.	(Direkte)
<b>Ledningsevne</b>	<i>Samlet mængde af ioners ledningsevne</i>	Robust, bruges i industrien pga. hastighed og tilforlidelighed	Sekunder	Direkte
<b>UV-Vis</b>	<i>Absorption af en eller flere bestemte bølgelængder (Lambert-Beer)</i>	Robust metode, der anvendes i laboratorier på forskellig vis	Sek. - min.	Direkte
<b>Refraktometri</b>	<i>Ændring i lysets fysiske egenskab</i>	Laboratorieanalyser for fødevarerindustrien	Min.	Direkte
<b>Röntgen</b>	<i>Bestemmelse af densitetsforskelle for komponenter</i>	Anvendes i fødevarerindustrien (store emner) og lufthavne	Sek.-min.	Indirekte
<b>NIR (Nærinfrarød)</b>	<i>Sammenligning af spektrum med tidligere prøver</i>	Hurtig analysemetode, der især anvendes i fødevarerindustrien	< sek.	Indirekte
plus mange flere...	:	:	:	:

## 2 Beskrivelse af måleteknikker

I tabel 1 ses et udpluk af måleteknikker, der kan benyttes til at bestemme koncentrationen af en eller flere konstituent. Teknikkerne har forskellig anvendelse, som her kort vil blive beskrevet.

### 2.1 Kromatografi

Kromatografi er en generel term, som beskriver adskillelsen af konstituent ved at de påvirkes forskelligt af en stationær fase. Nærmere bestemt placeres det, man ønsker adskilt, på den stationære fase, og en mobil fase føres henover, hvorved forskellige stoffer trækkes med forskellig hastighed og der sker en adskillelse. De to mest anvendte former for kromatografi er væskechromatografi og gaskromatografi. Alt efter hvilken detektor der er monteret på systemet,

kan kromatografimetoderne anvendes analytisk (med henblik på identificering) eller kvantitativt (med henblik på oprensning og koncentrationsbestemmelse).

En nærmere beskrivelse af analysemetoden, der anvendes for kromatografi, er beskrevet i Analyseteknik, kap. 12. [2]

#### Boks 2: Ordet "Kromatografi"

Ordet kromatografi er sammensat af de græske ord kroma, som betyder farve og endelsen -grafi som betyder noget som er skrevet eller tegnet. Så betydningen er egentlig 'farvetegning'.

Anvendelsen af kromatografi blev første gang beskrevet omkring år 1900, og den russiske botaniker Michael Tsvet (1872-1919) tilskrives æren for opdagelsen. I 1903 og de følgende år beskrev han adskillelsen af en række plantefarvestoffer ved hjælp af væskechromatografi, men teknikken blev glemt, og først i 1930 blev den genoptaget. Det egentlige gennembrud kom i 1940 med A.J.P. Martins og R.L.M. Synges beskrivelse af væskechromatografi, for hvilken de i 1952 modtog nobelprisen i kemi. [10]

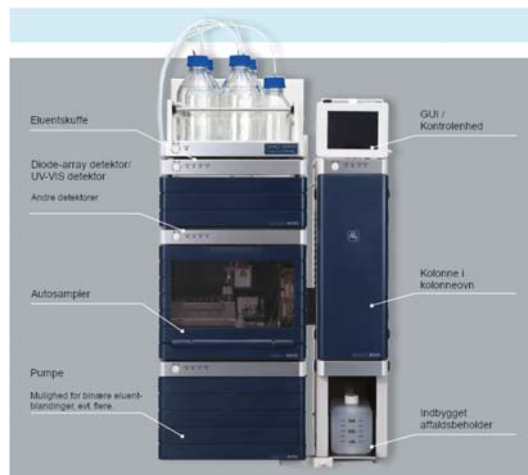
## Væskekromatografi

Væskekromatografi dækker over alle de kromatografiske metoder, hvor væske anvendes som den mobile fase. Væskekromatografi (på engelsk forkortet LC for "Liquid Chromatography") anvendes ofte i forbindelse med en anden teknik som detektor eller for at analysere konstituenten. Højtryksvæskekromatografi (benævnes ofte HPLC fra det engelske navn "High Pressure Liquid Chromatography") er en meget udbredt metode. I figur 2 kan man se et eksempel på en kommercielt solgt HPLC opstilling<sup>1</sup>, der ofte forhandles med en UV eller UV-Vis detektor.

I en væskekromatografisk opstilling er valget og sammensætningen af den benyttede væske/mobile fase (også kaldet eluent) vigtig. Valget af væsken og sammensætningen skal sammenholdes med den anvendte kolonne eller kolonnemateriale (den stationære fase), da de afgør hvordan adskillelsen af de stoffer der placeres på kolonnen forløber. Hvor lang tid et kemisk stof tager om at bevæge sig igennem kolonnen kaldes for retentionstiden. Retentionstiden er forskellig for kemiske stoffer, men kan påvirkes ved valg af kolonnemateriale og eluent væske/væskesammensætning.

## Gaskromatografi

Gaskromatografi er, som navnet antyder, en kromatografisk separeringsmetode, hvor den mobile fase er en gasart. Den anvendte gasart kan enten være kvælstof (N<sub>2</sub>), helium (He), argon (Ar), brint (H<sub>2</sub>) eller luft. Gaskromatografi forkortes ofte GC (fra det engelske navn "Gas Chromatography"). Valget af hvilken gasart der benyttes som eluent afhænger mest af hvilken detektorman ønsker at bruge. De to mest anvendte detektorer er flammeioniseringsdetektoren (FID) og den termiske ledningsevnedetektor (TCD). Af disse to er TCD detektoren den bredest anvendelige. FID detektoren er primært egnet til at detektere kulbrinter, da detektoren virker ved at måle antallet af ioner i en brintflamme. Gaskromatografi benyttes hovedsageligt til at separere og måle på kulbrinter af korte til



Figur 2: Eksempel på kommercielt HPLC opstilling, hvor komponenter (auto)sampler, kolonneovn, pumpe og detektor er integreret i én enhed. Billedet er tilpasset og benyttet med tilladelse fra VWR Avantor.

lange kulstofkæder, eller på større apolære molekyler.

Gaskromatografi er, ligesom væskekromatografi, en teknik, der ofte anvendes i forbindelse med en anden teknik som detektor og for videre analyse.

## 2.2 Massespektrometri

Massespektrometri er en analyseform, hvor ioniserede molekyler bliver accelereret inde i en maskine, hvor de derefter kan separeres alt efter deres masse (molar masse, g/mol) og ladning ( $Z^{+/-}$ ). Nogle massespektrometre kan videreanalysere på individuelle massetoppe, hvorfra man kan udlede strukturinformation ud fra et fragmenteringsmønster.

Massespektrometri er et meget stærkt analyseværktøj, især når det kobles med en anden teknik, som for eksempel de førnævnte kromatografiske separationsmetoder (disse benævnes således enten LC/MS eller GC/MS, hvis massespektrometri er kombineret med henholdsvis væskekromatografi eller gaskromatografi). Detektoren, der benyttes ved massespektrometri, tæller antallet af ioner med en specifik masse (eller mere præcist masse per ladning). Derfor kan

<sup>1</sup> Tilgået januar 2020 på URL-adressen: [https://dk.vwr.com/assetsvc/asset/da\\_DK/id/18714098/contents/ultra-high-performance-liquid-chromatograph.pdf](https://dk.vwr.com/assetsvc/asset/da_DK/id/18714098/contents/ultra-high-performance-liquid-chromatograph.pdf)

massespektroskopi i visse tilfælde give meget nøjagtige oplysninger om en prøves molekylære sammensætning.

Ved brugen af massespektrometri er ioniseringsmetoden meget vigtig. Små 'inerte' molekyler kan rammes af hårdere ioniseringsenergi uden at de går i stykker, hvorimod store molekyler eller proteiner er mere skrøbelige i forhold til høj ioniseringsenergi, hvorved bindinger brydes og fragmenter opstår. Som eksempler på anvendte ioniseringsmetoder kan nævnes



Figur 3: Eksempler på kommercielle ledningsevne sensorer, der fremstilles af firmaet Yokogawa. Øverst ses der to kontaktfrie ledningsevnesensorer i ISC40 familien, der virker ved hjælp af en spole (toroid). Nederst ses en SC42-34 ledningsevnesensor, der er opbygget som en koaksial (cylindrisk) føler. Billederne er givet med tilladelse fra Yokogawa Europe Solutions B.V.

elektronioniseringsmetoden (EI, Electron Ionization), matrixassisteret laser desorptions-ioniseringsmetoden (MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) og Elektrospray-ioniseringsmetoden (ESI, Electrospray Ionization), som er nævnt i rækkefølgen fra 'hård' til 'blød' ioniseringsmetode.

## 2.3 pH-elektroder

Kommercielle pH-elektroder, som typisk anvendes til bestemmelse af pH, er i virkeligheden kombinations-elektroder. Dette skyldes at den pH-følsomme overflade med føleelektroden (glaselektroden) kun danner en halvspænding. For at kunne måle et

spændingsfald er det derfor nødvendigt med en referenceelektrode, der er i kontakt med en referenceopløsning og i ionisk kontakt med overfladen af glaselektroden. pH-elektroden er den mest anvendte af de ionselektive elektroder, hvor ionselektiviteten ændres ved at ændre doteringen (tilførsel af en smule 'urenhedsatomer') af glaselektrodeoverfladen. Da pH-elektroden er afhængig af den ionfølsomme glaselektrodeoverflade til at kunne fungere, og derfor skrøbelig i forhold til slag, tryk, høje temperaturer og meget alkaliske (basiske) miljøer, er disse mest anvendt i laboratorieforhold, eller kontrollerede forhold, hvor risikoen for at beskadige dem er begrænset.

## 2.4 Ledningsevne

Ledningsevne målinger er en af de mest anvendte koncentrationsbestemmelsesmetoder i industrien. Ledningsevnen er evnen for et materiale til at lede en elektrisk strøm, og angives bedst i enheden Siemens per [centi]meter (S/[c]m).

Der findes forskellige sensorer, der kan benyttes for at bestemme ledningsevne i væsker. Disse kan inddeles i to grupper: de kontaktfrie (f.eks. toroid-design) og dem der er i kontakt med væsken der måles. I figur

### Boks 3: Enheden for ledningsevne

Siemens per centimeter (S/cm) er den mest anvendte enhed for ledningsevne. Dette skyldes historiske årsager, da forskerne der eksperimenterede med elektroder og elektrokemi alle normaliserede deres målinger i forhold til størrelsen på deres elektroder. Da disse ofte var i størrelsesordenen ca.  $1 \text{ cm} \cdot 1 \text{ cm} (= 1 \text{ cm}^2)$  blev længdeangivelsen 'cm' den mest anvendte og accepterede længdeenhed inden for elektrokemi. Som metrologisk enhed er 'm' basis for længdeangivelsen, og derfor anvendes prefixet 'centi' (= 0,01) oftest ikke på metrologiske institutter.

Derudover skelner man på engelsk mellem "conductance", der angives i Siemens (S) og "conductivity", der angives i Siemens per (centi)meter (S/[c]m). Desværre oversættes begge til dansk som 'ledningsevne', og der skelnes ikke om der er en længdeangivelse eller ej. Da ledningsevne uden længdeangivelse er specifik for det system man måler med, er det mest korrekt at angive ledningsevne med en længdeangivelse.

3 kan der ses nogle eksempler på kommercielle ledningsevnesensorer.

For at kunne udlede ledningsevnen i en væske er det nødvendigt at kende sensorens cellekonstant, samt at have en ledningsevnetransmitter, der viser selve resultatet fra målingen. Ledningsevnesensorens cellekonstant kan bestemmes enten ved geometrisk udmåling, eller ved kalibrering. Kalibreringen kan udføres enten mod en ledningsevnevæske som er blevet certificeret som referencemateriale (CRM, Certified Reference Material), eller mod en anden ledningsevnesensor (eller -celle), hvor den samme væske ledes igennem begge, og deres måleresultat sammenholdes. Ud fra kalibreringen kan man bestemme en cellekonstant, som er direkte afledt af S.I. enheden for afstand (meter), og angives i reciprok længde, f.eks.  $\text{m}^{-1}$  (det samme som  $1/\text{m}$ ). Ledningsevnesensorer fås med forskellige cellekonstanter, for at tilpasse dem til det ledningsevnesområde som man ønsker at måle i. Ledningsevne målingen giver den samlede værdi for væskens ledningsevne. Det vil sige at der ikke kan skelnes mellem ionerne som der måles på, og generelt er det bedst at måle på så simpelt et system som muligt, hvor der er tilsat så få forskellige ledende ioner som muligt. Ledningsevnen påvirkes af ionernes evne til at bevæge sig 'frit' (for at videreføre en elektrisk strøm), derfor påvirkes ledningsevnen af temperatur, det medie ionerne er i, ionernes størrelse, samt hvor høj koncentrationen er (hvor tæt ionerne befinder sig til hinanden).

## 2.5 UV-Vis

Spektrofotometre, der måler lysintensiteten i bølglængdeområdet fra ultraviolet til det synlige område, benyttes til identificering og koncentrationsbestemmelse af simple lysabsorberende molekyler.



Figur 4: Eksempel på et spektrofotometer med plads til flere kuvetter. Billedet er anvendt med tilladelse fra Ward's Science.

I figur 4 ses et spektrofotometer med plads til flere kuvetter. Spektrofotometeret virker ved at måle lysabsorbansen ved en eller forskellige bølglængder. Denne måling sammenholdes med en referencemåling, der afhængig af model kan ske samtidigt med eller før der måles på en prøve. Prøverne der måles i spektrofotometeret må ikke absorbere for meget lys ved bølglængderne som man ønsker at måle ved. Derfor kan det til tider være nødvendigt at fortynde ens prøver, samt at sørge for at det opløsningsmiddel man benytter ikke absorberer lys ved de samme bølglængder, som man ønsker at benytte. For at udføre målinger i spektrofotometeret, benyttes ofte kuvetter, der er lavet af specielt glas, der ikke absorberer lys ved de bølglængder som man ønsker at undersøge.

## 2.6 Refraktometri

Ved refraktometri benytter man sig af den egenskab at lys udbreder sig retlinet i et medie, indtil det møder et andet medie. I grænselaget mellem de to sker der en afbøjning af lyset, hvor man kan måle et forholdstal, som er kendt som brydningsindekset for den pågældende grænseflade (relativ). Ud fra det nødvendige kendskab til hvad det er man måler på og



kendskab til sit instrument, kan man bestemme det absolutte brydningsindex for sin prøve. Fra brydningsindexet kan man ved tabelopslag bestemme en koncentration. Brydningsindeksmålinger virker bedst på simple kulhydrater.

## 2.7 Röntgen

Röntgenbilledeanalyse af fødevarerprodukter er en metode som firmaet Foss Analytical A/S producerer til at udføre fedtprocentanalyse af kødprodukter. Et billede af deres produkt "Meat Master II" kan ses ved figur 5.

Metoden er baseret på digital billedanalyse, idet at fedt, ben og kød har forskellig densitet, og derfor også fremstår med forskellig intensiteter i Röntgenbilledet. Metoden er et eksempel på en 'indirekte' måleform, da der ikke er en direkte relation mellem Röntgenbilledernes intensitet og kødproduktens fedtprocent.

Metoden er afhængig af en god analyseteknik, samt et godt og varieret datasæt som opslagsværk for billedanalysen.

## 2.8 Nærinfrarød

I de seneste år er der sket en stor udvikling indenfor nærinfrarødspektrometre. Især inden for fødevarerindustrien, men også andre produktionsområder har metoden fundet anvendelse. Nærinfrarød (benævnes 'NIR') spektrofotometre måler transmittans af lys med bølgelængde mellem ca. 800 nm til 2500 nm (bølgetal mellem ca. 4000  $\text{cm}^{-1}$  til 12500  $\text{cm}^{-1}$ ). Spektret man opnår fra nærinfrarødspektroskopi viser generelt de svage overtoner og kombinations vibrationelle bånd, som fremstår som brede og ofte som kombinationer af flere energiovergange. Da mange af disse vibrationelle kombinations og overtoner bånd er kvantemekaniske 'forbudte' overgange, er deres molære absorptions i nærinfrarødområdet svagt. Den svage molære absorptions er en fordel i industrien, da man kan måle direkte på prøver eller i produktionslinjen (inline/online), uden at skulle 'fortynde' prøverne. En anden fordel for nærinfrarødmålinger er at gennemtrængningsdybden er forholdsvis stor, derved opnås information omkring hovedbestanddelene af prøverne der måles på, og ikke blot grænselaget.

For at opnå et resultat fra nærinfrarød målingen er det nødvendigt at analysere spektret i forhold til andre optagede spektre. Da signalerne er kombinationsbånd, varierer intensiteten ikke direkte lineært med koncentration, som det ses ved andre frekvensområder (som f.eks. uv-vis). Til analysen af spektrene kan der derfor benyttes forskellige lineære og ikke-lineære analysemetoder såsom: multipel lineær regression (MLR), principal component analyse (PCA) / principal component regression (PCR), lineær partial least squares regression (PLS), polynomial partial least squares regression (Poly-PLS), spline partial least squares regression (Spline-PLS) og artificial neural networks (ANN).



Figur 5: Produktbillede af inline Röntgenanalysator "Meat Master II", som produceres af firmaet Foss Analytical A/S. URL: <https://www.fossanalytical.com/en/products/meatmaster-ii>, tilgået januar 2020.

## 2.9 Inline, Online og Off-line målinger

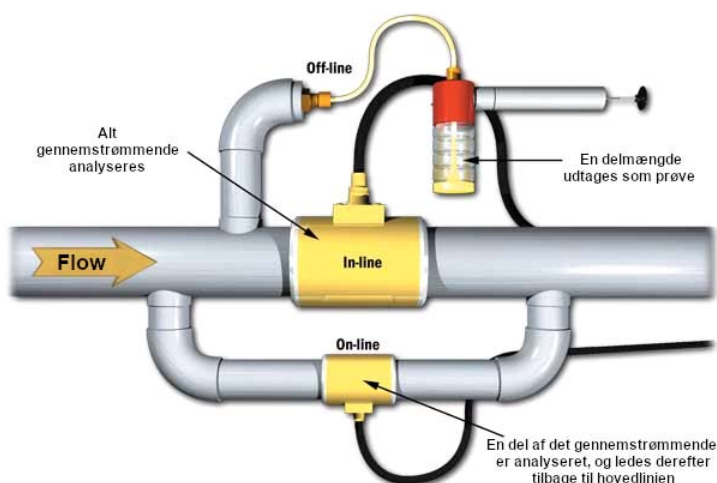
I en proceslinje er der forskellige placeringer der anvendes for at kunne måle på reaktanter og produkt(er), alt efter hvad der er mest favorabelt eller muligt. Generelt skelnes der mellem "Inline", "On-line" og "Off-line" målinger.

**Inline målinger** foretages på selve produktet/reaktanter som tilsættes, hvor måleproben er placeret direkte i hovedlinjen eller i hovedstrømmen der tilføres.

**Online målinger** foretages ved at måleproben sidder i en sidegren til hovedlinjen, eller hovedstrømmen, der tilføres. Sidegrenen kan være tilbage til hovedlinjen hvis den ikke er destruktiv (som f.eks. massespektrometri eller GC-kromatografi). Benævnelserne 'online målinger' benyttes ligeledes i forbindelse med målinger (f.eks. optiske) på et produktionsbånd, samt ved systemer der giver et samlet overblik over nuværende målinger.

**Offline målinger** (eller At-line) er målemetoden, hvor prøver udtages eller fjernes fra produktionslinjen, for at kunne lave analyse på dem.

Et overblik over måleplaceringerne er vist i figur 6.



Figur 6: Eksempler på forskellige prøvetagningsplaceringer, der kan anvendes. Ved in-line målinger, bliver det gennemstrømmende i hovedlinjen analyseret. Ved on-line målinger foretages der målinger på en sidegren, som ledes tilbage efter målingen. Ved off-line (At-line) målinger udtages en prøve, som analyseres. Tilpasset fra URL: <https://aavos.eu/glossary/online-inline-atline-bypass-analysers/>, tilgået januar 2020.

## 3 Anvendte teknikker til koncentrationsbestemmelse

I dette kapitel gives en nøjere beskrivelse af nogle udvalgte teknikker.

### 3.1 pH

Koncentrationsbestemmelse ved brug af pH-elektroder er tidligere blevet delvist behandlet i kompendiet "K1, pH-måling" [3]. pH er defineret ud fra brintionens aktivitet, der kan estimeres ud dens molære koncentration,  $[H^+]$ , og aktivitetskoefficient,  $\gamma_{H^+}$ , jf. ligning 1.

Ligning 1

$$pH \equiv -\log_{10}(a_{H^+}) \approx -\log_{10}([H^+] \cdot \gamma_{H^+})$$

Ved at om-arrangere ligning 1 kan man således få ligning 2, der beskriver den molære koncentration af brintionen ud fra pH værdien.

Ligning 2

$$[H^+] \approx \frac{10^{-pH}}{\gamma_{H^+}}$$

Det vil sige at for syrer (og baser<sup>2</sup>), der siges at dissociere (adskille sig) fuldstændigt, og er fortyndet (under 0,1 mol/kg<sub>H<sub>2</sub>O</sub>), og er indenfor de begrænsninger som er beskrevet af IUPAC (International Union on Pure and Applied Chemistry), er det muligt at benytte pH måling til estimering af koncentrationen. Begrænsningerne for pH definitionen fra IUPAC, er dels den førnævnte koncentrationsgrænse, at det der måles på kun må indeholde vand som opløsningsmiddel, temperaturen skal være omkring stuetemperatur, og at trykket er nær normalt atmosfærisk tryk.

En anden udfordring ved måling af pH, består i de kombinationselektroder man ofte benytter. Disse består af en samlet glas- og referenceelektrode, som beskrevet i undervisningsmaterialet "K2, pH metre" [4]. Da denne type af elektrode er lavet af en glaselektrode og med en ionisk permeabel forbindelse til referenceelektrodevæsken, er disse modtagelige over

<sup>2</sup> For baser kan hydroxy-ionens koncentration estimeres ud fra autoprotolysen af vand, som ligeledes er beskrevet i kompendiet "K1 – pH måling" [3].

for fysiske stød, tilsmudsning og tryk. Derudover vil det være nødvendigt kalibrere disse med mindst to kalibreringsbuffer, for at justere spændingsresponsen per pH enhed, samt spændingsforskydning (grundet diffusionspotentialet og modstand fra ledningsveje og samlinger).

### 3.2 Ledningsevne

En meget anvendt metode for koncentrationsbestemmelse i væsker består i at bestemme den elektrolytiske ledningsevne. Dette udføres i grove træk ved at måle den elektriske modstand i væsken ved hjælp af et målehoved eller sensor.

Ledningsevne (også kaldt konduktivitet) er en intensiv tilstandsstørrelse, som betyder at den ikke er afhængig af systemets (dimensionale) udstrækning. Ledningsevne kan dog ikke måles direkte, men må udregnes fra målinger af materialets eller væskens modstand (resistans). Modstanden/resistansen er en ekstensiv tilstandsstørrelse (se Boks 4), hvilket vil sige at den er afhængig af det målte systems størrelse, blandt andet dets volumen, masse og energi (dermed

#### Boks 4: Intensive & ekstensive tilstandsstørrelser

Intensive og ekstensive tilstandsstørrelser, beskriver et materiales eller systems afhængighed af den fysiske egenskab der undersøges eller beskrives. Hvis det hovedsystem, som man undersøger, opdeles i to lige store dele, så kan de fysiske egenskaber eller tilstandsstørrelser for delsystemerne enten være halverede eller uforandrede.

Hvis egenskaberne eller tilstandsstørrelser for delsystemerne er uforandrede, og derfor uafhængige af størrelsen der måles på, er disse intensive. Eksempler på intensive egenskaber og tilstandsstørrelser er farve, koncentration, densitet, temperatur, viskositet og specifik ledningsevne (og resistivitet).

Hvis egenskaberne eller tilstandsstørrelser for delsystemerne er forandrede er disse ekstensive. Eksempler for ekstensive størrelser er masse, volumen, længde, stofmængde og resistans.

også temperatur). Det betyder at elektrisk eller elektrolytisk ledningsevne bestemmes ud fra korresponderende målinger af modstand, der korrigeres ift. målelængde/cellekonstant og temperatur.

Elektrisk og elektrolytisk modstandsmålinger kan udføres ens, idet de begge er givet ved Ohms lov (se Ligning 3, hvor  $U$  er spændingen i Volt,  $R$  er modstanden i Ohm  $[\Omega]$ , og  $I$  er strømstyrken i ampere). Forholdet mellem strømstyrke, spænding og modstand, samt deres målemetoden for disse er beskrevet i bogen "Måleteknik", bind 2, s 160-166 [5].

### Ligning 3

$$U = R \cdot I$$

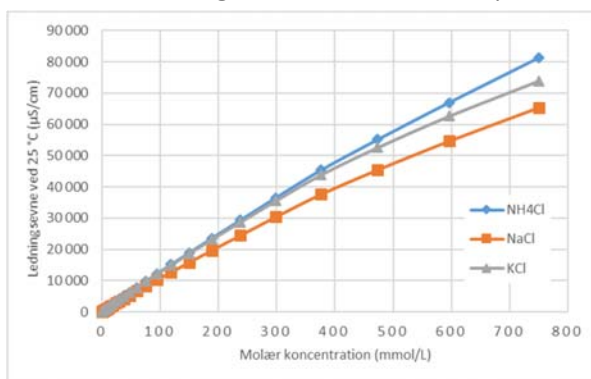
Ledningsevne angives i S/m (eller S/cm), hvor den som nævnt tidligere også kan benævnes konduktivitet  $[\kappa]$ , og er afledt af resistivitet  $[\rho]$  (enheden for  $\rho$  angives i  $\Omega \cdot m$ ). Ledningsevne og resistivitet er reciprokke værdier af hinanden, som nævnt i indledningens afsnit 2.4, og kan derfor beskrives ved forholdet i ligning 4.

### Ligning 4

$$\kappa = \frac{1}{\rho}$$

I væsker vil der ved tilstedeværelsen af ioner kunne måles en elektrolytisk modstand (vand og alkoholer danner naturligt ioner, selv når disse er 'rene').

Da man ved ledningsevne målinger ikke kan skelne mellem hvilke ioner man måler på (der er ingen selektivitet), er det ønskværdigt at måle på så simple systemer som muligt. Hvis målemetoden benyttes for at



Figur 7: Her er vist den teoretiske ledningsevne som funktion af molærkoncentration for kloridsaltene af natrium ( $NaCl$ ), kalium ( $KCl$ ) og ammonium ( $NH_4Cl$ ). Beregnet ved hjælp af Aqion 6.9.8 ([www.aqion.de](http://www.aqion.de))

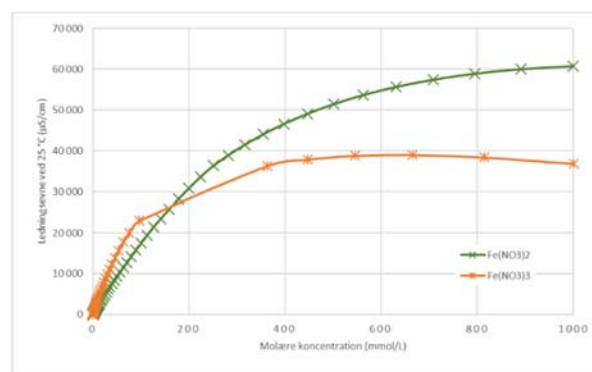
styre tilsætningen af reagens, at der kun er en bestemt komponent der justeres.

Ledningsevnen for forskellige opløsninger af salte er ionafhængig. Det vil sige at den samme koncentration af saltopløsninger vil have forskellig ledningsevne ved samme temperatur. Dette kan ses som eksempel ved de teoretiske ledningsevner for de tre almindelige kloridsalte, natrium-, kalium- og ammoniumklorid, der er vist i Figur 7. Udviklingen af ledningsevne i forhold til koncentrationen for de tre salte ligner hinanden ved lave koncentrationer, men afviger dog ved koncentrationer over 100-500 mmol/L.

Ved høje ionkoncentrationer begynder ionernes masstransport at begrænse ledningsevnen, og udviklingen ved tilsætning af salt er langt fra lineær. Endda kan ledningsevnen begynde at aftage ved tilsætningen af salt. Et eksempel kan ses i Figur 8 som viser den teoretiske ledningsevne for jern(II)- og jern(III)nitrat ved forskellige koncentrationer. For vandig jern(II)nitrat ( $Fe(NO_3)_2$ ) opløsning ses det at ledningsevnen forøges nærværd lineært ved koncentrationer under 250 mmol/L, hvorimod udviklingen af ledningsevnen 'flader' ud over denne koncentration. For jern(III)nitrat ( $Fe(NO_3)_3$ ) er ledningsevneudviklingen indtil ca. 100 mmol/L tilnærmelsesvis lineær, hvorefter den aftager kraftigt, og har en negativ udvikling ved koncentrationer over 600 mmol/L.

### 3.2.1 Cellekonstanten

For at kunne udføre ledningsevne målingen må man kende sit måleudstyr. I en måleopstilling kan man ved



Figur 8: Her er vist den teoretiske ledningsevne som funktion af molærkoncentration for jern(II)- og jern(III)nitrat. Beregnet ved hjælp af Aqion 6.9.8 ([www.aqion.de](http://www.aqion.de))

at kende størrelsen, samt afstanden imellem måleelektroderne beregne en cellekonstant. For et simpelt lineært system (med to elektroder) kan cellekonstanten beregnes ud fra de to ovennævnte størrelser ved forholdet i Ligning 5.

Ligning 5

$$K = \frac{l}{A}$$

Hvor  $K$  er cellekonstanten (også kaldt den geometriske faktor),  $l$  er længden imellem elektroderne og  $A$  er elektrodernes areal.

For andre typer af måleelektroder vil cellekonstanten skulle udregnes ved andre forhold, da ledningsvejen for måleudstyret er anderledes. Således er cellekonstanten generelt for koaksiale måleelektroder/celler givet ved Ligning 6 [6].

Ligning 6

$$K = \frac{\ln\left(\frac{b}{a}\right)}{2 \cdot \pi}$$

Hvor  $b$  er den ydre elektrodens indre radius, og  $a$  er den indre elektrodens ydre radius.

I tilfælde hvor man ikke kender elektrodens geometri, kan man benytte et (certificeret) referencemateriale, hvor man i en anden opstilling eller ved et andet laboratorium har bestemt ledningsevnen af en væske. Så er det muligt ud fra målinger på ens egen måleopstilling at beregne cellekonstanten ud fra det udmålte referencemateriale. Cellekonstanten udregnes ud fra beregningen af resistiviteten, og den elektrolytiske ledningsevne, ved forholdet i ligning 4.

Ligning 7

$$\kappa = \frac{1}{\rho} = \frac{K}{R}$$

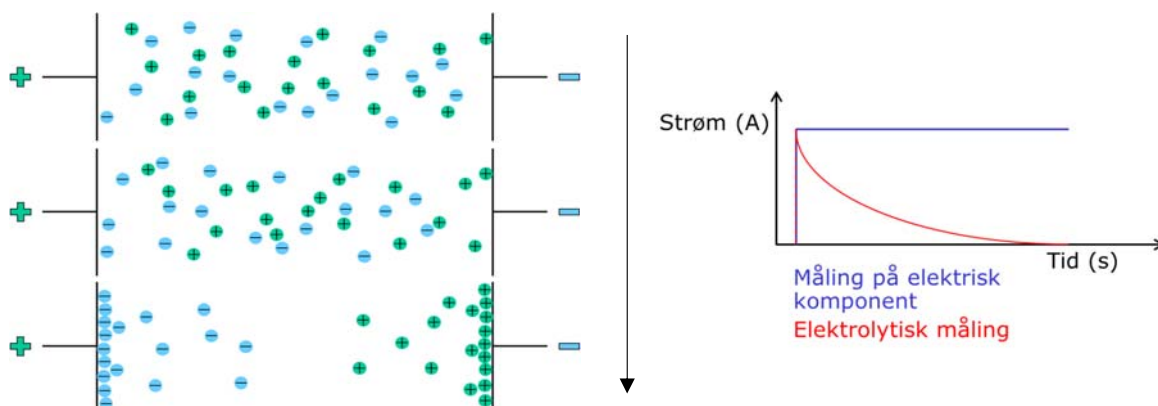
Hvor  $R$  er den modstand målt i ens måleopstilling.

### 3.2.2 Ledningsevнемåling

For modstandsmålinger på elektriske komponenter, er det som beskrevet i "Måleteknik", bd. 2, s. 160-161 [5], tilstrækkeligt at inducere en spændings- eller strømstyrkeændring, og måle den resulterende strømstyrke eller spændingsfald for at kunne udregne den resulterende modstand. Dette er en metode hvor man bruger en jævnstrøm (DC), hvor spændingen (engelsk: potential) eller strømstyrken ændres jævnt iført Ohms lov, og hvor den resulterende strømstyrke- eller spændingsændring forbliver ens.

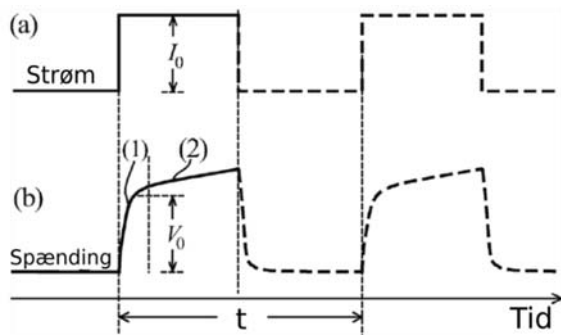
Målinger hvor spændingen holdes konstant og en strømstyrkeændring måles, kaldes målingen potentiostatisk. Hvorimod hvis strømstyrken holdes konstant og den resulterende spændingsændring måles kaldes den galvanostatisk.

Til forskel for en måling på en elektrisk komponent vil man ved en måling på en væske se at den resulterende strømstyrken eller spændingsfald ikke forbliver ens over tid. Dette skyldes at ionerne i væsken samler sig ved elektroderne når de polariseres af strømmen, og modstanden gradvist vil stige til det uendelige som følge af ionernes inhomogenitet. I Figur 9 ses til venstre hvorledes ionerne over tiden vil migrere til hver sin modsatpolariserede elektrode. Til højre i Figur 9 ses en repræsentation af strømstyrkeforløbet over tid



Figur 9 **Venstre:** Ved måling på en væske (elektrolyt) vil man se at ionerne efter hånden samler sig ved elektroderne. **Højre:** Dette fører til at den målte strømstyrke falder som vist ved den røde kurve.

ved en potentiostatisk måling henover elektroderne. Målingen vist med blå til højre i Figur 9 repræsenterer en modstandsmåling på en elektrisk komponent, hvorimod den røde repræsenterer den lignende modstandsmåling på en (elektrolytisk) væske.



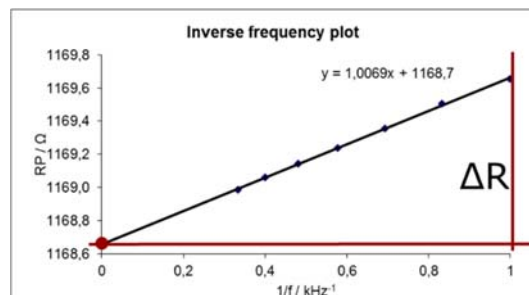
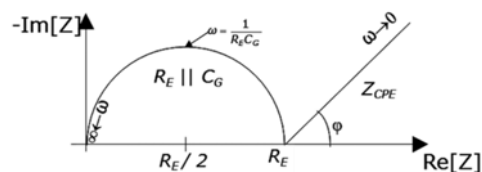
Figur 10: Her er der vist en strømpulsmåling, hvor strømpulsen vist i a induceres i en målecelle. Dette giver spændingsresponsen, der kan ses i b, hvor den fuldt optrukne linje viser den inducerede strømstyrke og spændingsforløbet i tiden t. Strømpulsmålingen udføres kontinuert i forlængelse af hinanden (vist ved fuldt optrukne og stiplede linjer).

For at overkomme denne udfordring, udfører de fleste kommercielle transmittere målingen ved hjælp af andre metoder. Som for eksempel en tidsafhængig galvanostatisk (strømstyrke) måling eller målinger med vekselstrøm (AC) ved forskellige frekvenser (kaldes også impedansmåling).

Den tidsafhængige galvanostatiske måling kan udføres som strømpulsmålinger (som vist i Figur 10), hvor der induceres en strømstyrke ( $I_0$ ), samtidig med at spændingsforløbet måles. Henover en måling i tiden t, vil der fremkomme to tidsreaktioner på spændingsforløbet, (1) en hurtig reaktion, og (2) en langsommere reaktion på spændingen. Ved at ekstrapolere disse to spændingsreaktioner, vil man kunne bestemme et estimeret spændingsrespons ( $V_0$ ) der med en vis unøjagtighed kan benyttes til at bestemme en modstand. Ud fra cellekonstanten, man indgiver i transmitteren, vil denne angive en ledningsevne måling. Da den elektrolytiske ledningsevne som standard er angivet ved 25 °C, indeholder de fleste ledningsevnefølere ligeledes en temperaturføler, der anvendes til at temperaturkompensere ledningsevne målingen. Temperaturkompenseringen bygger dog ofte på den teoretiske ledningsevneændring (ca. 2% ændring per grad), hvilket dog ikke passer for alle opløsninger og væsker.

Ved at benytte vekselstrøm til at udføre en måling på den elektrolytiske ledningsevne celle, undgår man det fænomen, som er vist i Figur 9, hvor ionerne samler sig ved hver sin målelektrode. Dette skyldes at til forskel for jævnstrømsmålingen, så skifter vekselstrømsmålingen kontinuerligt polarisering. Derved har ionerne ofte ikke mulighed for at migrere til hver sin elektrode. Analysen er dog en del besværligere, samtidig med at der skal benyttes udstyr der kan ændre strømstyrken ved forskellige frekvenser og optage frekvensforskydningen gennem målecellen.

### Boks 5: Modstandsmåling ved hjælp af impedansspektroskopi



Med impedansspektroskopi kan man bestemme modstande ved forskellige frekvenser. Til forskel for jævnspændingsmålinger, indeholder modstandsmålingerne dog en real ( $\text{Re}[Z]$ ) og en imaginær ( $\text{Im}[Z]$ ) komponent. Faktisk taler man ikke om modstand, men om impedans ( $Z$ ). De reelle og imaginære Impedanskomponenter kan repræsenteres på forskellige måder, ved at plote dem mod hinanden (vist som repræsentation øverst i denne boks) får man et Nyquistplot.

De målinger man er interesserede i er dem, som er optaget ved det minimum som benævnes  $R_E$  i Nyquistplottet. Ved at plote  $\text{Re}[Z]$  komponenten mod den inverse frekvens får man en lineær afhængighed (som vist under Nyquistplottet), som kan benyttes til at estimere  $R_E$ , og dermed opløsningens 'bulk'-modstand. Denne metode har vist sig at være mere nøjagtig end den typisk anvendte DC strømpulsmetode [13].

## Boks 6: Eksempel – pH overvågning ved hjælp af en ledningsevnesensor

En renseproces i en industriel produktionslinje indebærer at der tilsættes en vandig saltsyreopløsning (ved en koncentration af ca. 0,5 mol/L HCl<sub>aq.</sub>) til linjen, som skal virke i mindst en time ved en pH < 1. For at kontrollere pH-værdien placeres en ledningsevnesensor i/ved afløbsvæsken for linjen.

Vi ønsker at bestemme hvilken HCl-koncentration og ledningsevne af opløsningen som svarer til pH 1. Ledningsevnen stiger ved lavere pH. Vi ønsker at estimere usikkerheden ved bestemmelsen af ledningsevnen, således at vi kan afgøre, hvilken værdi vi skal holde os over for med sikkerhed at kunne fastslå at pH er under 1.

De teoretiske værdier for vandige HCl koncentrationers ledningsevne og pH ved 25 °C er vist til venstre i Figur 11. Ud fra forløbet for pH ses det at pH 1 svarer til en molærkoncentration på ca. 100 mmol/L (eller 0,1 mol/L). Af kurven for ledningsevne ses det at en molærkoncentration på 100 mmol svarer til en ledningsevne på ca. 40000 µS/cm (eller 40 mS/cm).

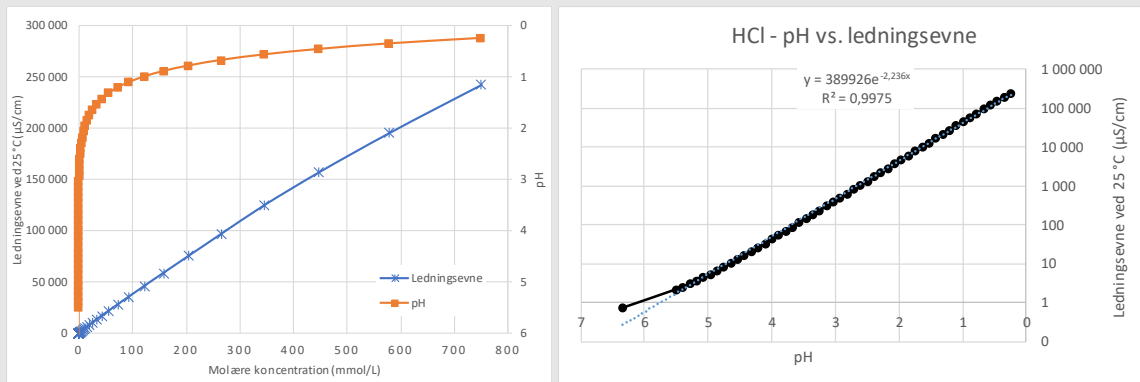
En lidt mere nøjagtig bestemmelse af ledningsevnen kan opnås ved at plote værdierne for pH og ledningsevne direkte mod hinanden. Dette er gjort til højre i Figur 11. Ud fra denne graf kan det ses at ledningsevnen falder eksponentielt med pH-værdien (sagt på en anden måde, den stiger eksponentielt med lavere pH). Ud fra tendenslinjen, der er vist på grafen er ledningsevnen

$$y = 389926e^{-2,236 \cdot x}$$

For pH = 1 :

$$\kappa = 389926e^{-2,236 \cdot 1} \cong 41700 \text{ } \mu\text{S/cm}$$

Ledningsevnen skal altså være over 41,7 mS/cm (= 4,17 S/m) ved 25 °C.



Figur 11: Til venstre ses de teoretisk beregnede pH og ledningsevne ved 25 °C for HCL ved molære koncentrationer op til 0,750 mol/L. Til højre er pH og ledningsevnen plottet mod hinanden, og ledningsevneaksen er ændret til log(10) skala.

På grund af den høje ledningsevne og brug af en syre som renevæsken benyttes en toroid Yokogawa ISC40S celle med en FLXA202 ledningsevnetransmitter. Ledningsevnecellen har en nominel cellekonstant på 10 cm<sup>-1</sup>. Vi ønsker at kalibrere den benyttede ledningsevnesensor, for at bestemme den reelle cellekonstant og den omtrentlige måleusikkerhed. Til dette formål benyttes et certificeret referencemateriel (CRM), der kan være en vandig KCl opløsning der er nøje udmålt. Referencematerialet har en certificeret ledningsevne på  $\kappa_{\text{ref}} = 9,993 \text{ S/m}$ , og ekspanderet måleusikkerhed ( $k = 2$ ) på  $U(\kappa_{\text{ref}}) = 0,012 \text{ S/m}$ .

### Boks 6: Eksempel – pH overvågning ved hjælp af en ledningsevnesensor (fortsat)

Under målingen med referencematerialet er væsken og ledningsevnesensoren termostateret til 25 °C. Der opnås 10 modstandsmålinger med cellen på transmitteren. Middelværdien er  $\bar{R} = 100,7 \Omega$ . Standardafvigelsen på de 10 målinger er på  $0,5 \Omega$ , så standardusikkerheden på middelværdien er  $u(\bar{R}) = 0,5 \Omega / \sqrt{10} = 0,16 \Omega$ . Den relative usikkerhed er  $u(\bar{R})/\bar{R} = 0,16\%$ .

Ud fra modstandsmålingen, og den certificerede ledningsevne fra referencevæsken, kan vi ved hjælp af Ligning 7 bestemme en cellekonstant for ledningsevnecellen.

$$K = \kappa_{\text{ref}} \cdot \bar{R} = 9,993 \text{ S/m} \cdot 100,7 \Omega \approx 1006 \text{ m}^{-1} = 10,06 \text{ cm}^{-1}$$

Da cellekonstanten er proportional med  $\bar{R}$ , som er bestemt med en usikkerhed på 0,16%, er den relative usikkerhed på cellekonstanten,  $u(K)/K$  også ca. 0,16%. (Usikkerheden på referencens ledningsevne er meget lav).

Cellekonstanten kan indsættes i ledningsevnetransmitteren, hvor modstandsmålinger omsættes til ledningsevne. Usikkerheden,  $u(R)$ , på **en enkelt modstandsmåling**,  $R$ , antages at være lig med standardafvigelsen på  $0,5 \Omega$  ved  $100,7 \Omega$ . Dette giver en relativ usikkerhed  $u(R)/R$  på ca. 0,5%. Når vi skal udregne usikkerheden på ledningsevnen benytter vi at de relative bidrag i en kvotient kan lægges sammen i kvadratur:

$$\kappa = \frac{K}{R} \Rightarrow \frac{u(\kappa)}{\kappa} = \sqrt{\left(\frac{u(K)}{K}\right)^2 + \left(\frac{u(R)}{R}\right)^2} = \sqrt{(0,16\%)^2 + (0,5\%)^2} = 0,53\%$$

Usikkerheden på en måling omkring  $41,7 \text{ mS/cm}$  er altså  $u(\kappa) = 41,7 \text{ mS/cm} \cdot 0,53\% = 0,22 \text{ mS/cm}$ .

For at opnå 95% konfidens skal der ganges med en dækningsfaktor på  $k = 2$ , dvs.  $U(\kappa) = 0,44 \text{ mS/cm}$ .

Når der på ledningsevne måleren aflæses en værdi højere end  $41,7 \text{ mS/cm} + U(\kappa) = 42,3 \text{ mS/cm}$ , kan vi altså med 95% sikkerhed sige at HCl-koncentrationen i afløbsvæsken er højere end  $100 \text{ mmol/L}$  og at pH-værdien er mindre end 1.

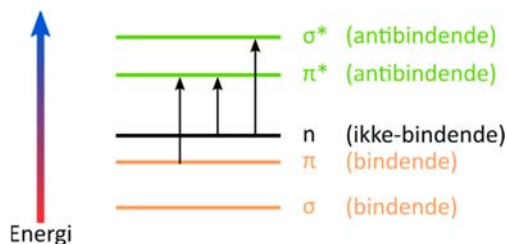
(Man bør nok også overveje om der skal medtages et bidrag som skyldes at temperaturen ikke er eksakt 25 °C, hverken under bestemmelsen af cellekonstanten eller ved den egentlige måling ved linjen.)

### 3.3 Uv/vis-spektroskopi

Uv/vis-spektroskopi kan bruges til at bestemme koncentrationen af et stof ud fra dets absorption af lys med bølglængder på 200-800 nm, dvs. fra det ultraviolette område gennem det synlige spektrum. I det følgende gennemgås noget grundlæggende teori for brugen af uv/vis-spektroskopi efterfulgt af et regneeksempel af koncentrationsbestemmelse af farvestoffet 'Brilliant Blue' med og uden brug af standardkurve (kalibreringskurve).

I figur 12 ses de typisk forekomne orbitaler i organiske molekyler arrangeret efter deres relative energi. Absorptionen af lys skyldes elektronovergange mellem disse orbitaler, hvor de mest almindelige er indikeret med de sorte pile. De andre ( $\sigma\text{-}\pi^*$ ,  $\pi\text{-}\sigma^*$  og  $\sigma\text{-}\sigma^*$ ) har som oftest energier, der ligger dybere i uv-området,

dvs. har bølglængder kortere end 200 nm. Absorptionsprofilen for, og dermed farven af, et givent molekyle afhænger af den præcise konfiguration af orbitalerne samt hvor nemt, de enkelte overgange kan finde sted.



Figur 12: Energien af de forskellige typiske orbitaler i organiske molekyler med deres relative energier. Bemærk, at energiaksen ikke er på den rigtige skala.



For at bestemme koncentrationen benyttes en opstilling som vist i Figur 13. Lyskilden med intensitet  $I_0$  sendes gennem prøven med længden  $l$ , og den efterfølgende intensitet  $I$  registreres i detektoren. Med disse målte værdier kan koncentration  $c$  findes ved at bruge en omskrevet version af Lambert-Beers lov

Ligning 8

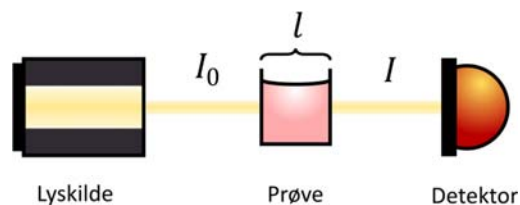
$$\log(I/I_0) = A = \varepsilon l c,$$

hvor  $A$  er absorbansen, og  $\varepsilon$  er den molare absorptionskoefficient, som beskriver, hvor stærkt et molekyle absorberer lys ved en given bølgelængde. Intensiteten måles typisk for en enkelt bølgelængde ad gangen ved at bruge en monokromator foran lyskilden, og sammenlagt giver alle disse intensiteter et absorptionsspektrum for prøven.

Der findes grundlæggende to måder at bestemme koncentrationen på i uv-vis-spektroskopi. Man kan enten direkte udregne koncentrationen fra Ligning 8, hvilket dog kræver en kendt værdi for  $\varepsilon$ , som typisk skal findes i opslagsværker. Man skal også sikre sig at Lambert-Beers lov gælder i det givne koncentrationsområde, hvilket ikke altid er tilfældet.

Den anden måde omgår dette problem. Her laver man på forhånd en kalibreringskurve for det stof, man ønsker at teste for. Dette gøres ved at måle på en række opløsninger med nøjagtigt kendt koncentration, således at man får punkter på begge sider af den forventede koncentration. Med kalibreringskurven ved hånden kan man blot foretage sin måling og derefter sammenligne med kurven for at finde koncentrationen i prøven. Herved undgår man at skulle bruge Ligning 8 (og  $\varepsilon$ ), da punkterne til kurven udelukkende kommer fra målinger på kendte koncentrationer.

Som det kan ses fra Ligning 8, er kalibreringskurven lineær, hvis Lambert-Beers lov gælder, og det vil den gøre for de fleste, tynde opløsninger. En afvigelse fra denne linearitet er imidlertid ikke noget problem med denne metode, da man netop kortlægger kurvens form på forhånd og senere udnytter denne til koncentrationsbestemmelsen. Da kalibreringskurven ydermere tager højde for forskellige fejl og afvigelser forårsaget af udstyret, kan den til en vis grad også kompensere for disse, fordi koncentrationerne til kurven kommer fra en ekstern måling. Det er dog som altid stadig bedst at benytte udstyr, som man gennem nøje kalibrering har sikret sig fungerer.



Figur 13: Skitse af et uv/vis-spektrometer, hvor lyset sendes gennem en prøve for derefter at blive opsamlet af en detektor.

## Boks 7: Eksempel – Koncentrationsbestemmelse med og uden kalibreringskurve

Vi ønsker at bestemme en ukendt koncentration af farvestoffet Brilliant Blue (E133). Som beskrevet i afsnit 3.3 kan vi gøre dette på to forskellige måder. Vi vil først gøre det ved brug af Lambert-Beers lov, og derefter ved brug af kalibreringskurven i Figur 14. Vi husker, at absorbansen  $A$  i Lambert-Beers lov var givet ved

$$A = \epsilon l c \Leftrightarrow c = A/l \epsilon.$$

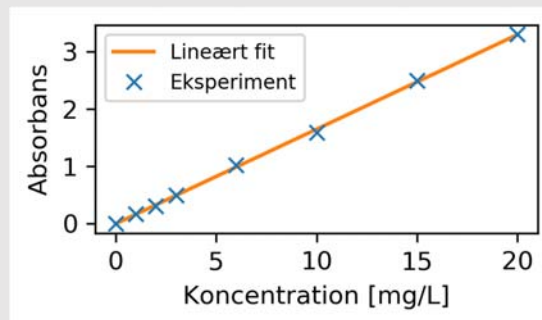
På denne måde kan vi finde koncentrationen  $c$  ud fra en måling af absorbansen og de kendte værdier  $\epsilon$  og  $l$ . For en standardkuvette er  $l = 1,00$  cm, og vi bruger derfor denne værdi her. Absorptionskoefficienten  $\epsilon$  kan findes i opslagsværker og er  $130\,000$  L/(cm mol) ved en bølgelængde på  $\lambda = 629$  nm [11]. Vi skal her huske at holde godt styr på enhederne. Koncentrationer angives undertiden også i g/L, da dette nemt relaterer til stoffer, man afvejer. Til omregningen mellem disse to skal vi bruge molarmassen af Brilliant Blue, som er på  $792,85$  g/mol.

Lad os antage, vi har målt en absorbans på  $0,900$  i vores eksperiment. Ved brug af formlen ovenfor får vi da

$$c = \frac{0,900}{1,00 \text{ cm} \cdot 130\,000 \text{ L}/(\text{cm} \cdot \text{mol})} = 6,92 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}} = 0,006\,92 \text{ mmol/L}$$

Ønsker vi i stedet koncentrationen i g/L kan vi omregne med molarmassen:

$$c = 6,92 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \cdot 792,85 \text{ g/mol} = 5,48 \times 10^{-3} \text{ g/L} = 5,48 \text{ mg/L}$$



Figur 14: Kalibreringskurve for farvestoffet Brilliant Blue (E133) målt ved en bølgelængde på  $\lambda = 629$  nm.

Den anden måde at gøre dette på er ved at bruge kalibreringskurven i Figur 14. Den er lavet ved at måle absorbansen af syv opløsninger af Brilliant Blue med koncentrationer på hhv. 0, 1, 2, 3, 6, 10, 15 og 20 mg/L i standardkuvetter, igen ved en bølgelængde på  $\lambda = 629$  nm. Vi antager, vi er i et regime, hvor Lambert-Beers lov gælder, og vi kan derfor foretage et lineært fit til punkterne, som giver os forskriften

$$A = 165 \text{ L/g} \times c - 6,99 \times 10^{-3}$$

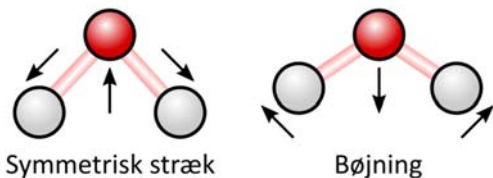
Ideelt set skulle kurven skære y-aksen i 0, men grundet måleusikkerheder kan den afvige, og vi kan også se, at afvigelsen er rimelig lille. Omregnes hældningen får vi  $130\,810$  L/mol, som ligeledes er ret tæt på tabelværdien for  $\epsilon$ . Med forskriften kan vi finde koncentrationen for målingen af absorbansen på  $0,900$  til

$$c = \frac{0,900 + 6,99 \times 10^{-3}}{165 \text{ L/g}} = 5,50 \times 10^{-3} \frac{\text{g}}{\text{L}} = 5,50 \frac{\text{mg}}{\text{L}},$$

som næsten er det samme som før. Fordelen her er dog, at vi slip for at bruge tabelværdien for  $\epsilon$ , hvilket gør forsøget mere repræsentativt for forholdene under netop vores eksperiment. Værdien for  $\epsilon$  kan afhænge af eksterne faktorer som f.eks. pH-værdien og temperaturen, og kalibreringskurven tager implicit højde for dette.

### 3.4 Nærinfrarød (NIR)

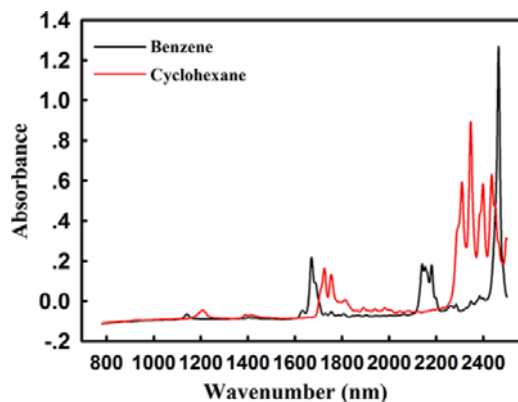
Nærinfrarød spektroskopi omhandler, som navnet antyder, undersøgelser af stoffers egenskaber i det nærinfrarøde område, dvs. fra ca. 780 nm til 2500 nm. Dette gøres ved at måle absorbansen (eller transmittansen, afhængigt af instrumentet) af det materiale, man ønsker at undersøge. Forskellige materialer absorberer det indkomne lys ved forskellige bølgelængder, og de gør det ligeledes med forskellig styrke. Disse forskelle skyldes den molekulære sammensætning af materialet, og man kan derfor bruge NIR-spektroskopi til at identificere, hvilke stoffer en prøve indeholder. Og med nøje kalibrering af det brugte instrument kan man ligeledes bestemme koncentrationen af stofferne.



Figur 15: Eksempler på vibrationelle tilstande i et vandmolekyle. Mere udtømmende lister kan findes på nettet med animationer af atomernes bevægelser, f.eks. [her](#).

Den fysiske årsag til absorptionen skal findes i de enkelte molekyler. Et af de enkleste molekyler, vi kan kigge på, er et vandmolekyle. I en simpel model kan vi betragte de to hydrogenatomer som værende forbundne til oxygenatomet med hver sin fjeder. I dette billede er det nemt at forestille sig, at molekylet kan bevæge sig på mange forskellige måder, hvis man ryster det. Om end en given bevægelse kan være kompleks, kan den beskrives ved en kombination af grundlæggende vibrationelle tilstande i molekylet; to eksempler herpå er givet i Figur 15, hvor vi ser den grundlæggende bevægelse for et symmetrisk stræk og en bøjning.

Alle disse grundlæggende bevægelser har forskellige energier og vil derfor give anledning til absorption ved forskellige bølgelængder. Hver enkelt bevægelse har ud over den fundamentale energi også overtoner ved andre energier, ligesom en guitarstreng har overtoner, når man anslår den. Disse overtoner vil derfor også være synlige i NIR-spektret. Derudover kan de



Figur 16: Nærinfrarødt spektrum af benzen og cyclohexan. X-aksen angiver bølgelængden i nm, mens y-aksen angiver absorbansen. Figuren er hentet uændret fra (<https://www.nature.com/articles/s41598-019-45945-y>) distribueret under [Creative Commons-lisensen](#).

enkelte bevægelser kombinere deres energi og give anledning til absorption ved andre energier. Læg derfor, at de fleste interessante molekyler hurtigt bliver komplekse (f.eks. glukose med formelen  $C_6H_{12}O_6$ ), og man ender hurtigt med et meget kompliceret spektrum bestående af mange overlappende toppe, som kan være svært at analysere. Dette gjorde også, at NIR-spektroskopi i mange år blev anset for at være en teknik med ringe potentiale.

Det er dog ikke alle atomare forbindelser, der giver anledning til absorption. Men især hydrogenbindinger med andre molekyler (såsom oxygen eller nitrogen) er aktive i det nærinfrarøde energiområde. Man ser derfor ofte fingeraftryk fra denne slags forbindelser i de fleste prøver, idet hydrogenbindinger er en fast bestanddel af mange (især organiske) forbindelser. Forholdet mellem absorptionstoppe i spektret giver derfor et fingerpeg om, hvor mange af de enkelte forbindelser en prøve indeholder, og dette fingeraftryk kan derfor bruges til at identificere prøven. Et eksempel på to spektre kan ses i Figur 16 for hhv. benzen (sort,  $C_6H_6$ ) og cyclohexan (rød,  $C_6H_{12}$ ). På trods af sin relativt simple form indeholder benzen stadig mange toppe, der kan bruges til identifikation. Bemærk især, hvor mange ekstra toppe der optræder i spektret for cyclohexan, hvilket netop skyldes de seks ekstra hydrogenbindinger i dette molekyle. Flere eksempler med endnu mere komplicerede spektre kan eksempelvis ses [her](#) [7].

Udviklingen i instrumentering og matematiske analyseværktøjer gennem årene har ligeledes gjort, at NIR-spektroskopi i dag er en meget udbredt teknik, især fordi mange prøver kan analyseres uden den store forberedelse. Dette betyder også, at analysetiden i mange tilfælde er langt kortere end med andre teknikker, idet selve målingen kan klares på sekunder.

Til trods for disse fordele er spektrene i alle andre end de simpleste tilfælde meget komplekse, især hvis mange stoffer er til stede i prøven, og det kan derfor være en stor udfordring at foretage kvantitative analyser. NIR egner sig dog vældig godt til kvalitative analyser, idet det er muligt at kigge på udviklingen af spektrene forskellige prøver imellem.

Hvis man ønsker at foretage en pålidelig kvantitativ analyse, kræver det en nøje forudgående kalibrering med mange forskellige stoffer i kendte koncentrationer. Gøres dette korrekt, kan koncentrationer ned til omkring 0,1 % detekteres i de fleste tilfælde. For at opnå denne præcision er det, ud over det omfattende referencemateriale, også nødvendigt at anvende avancerede analyseteknikker baseret på multivariate metoder (mere i næste afsnit).

Der er dog et stort potentiale i NIR-spektroskopi, hvis man kan overvinde de nævnte udfordringer. Da NIR-spektre kan genereres på få sekunder, og da de indeholder fingeraftryk fra mange organiske forbindelser, er NIR-spektroskopi meget populært i bl.a. fødevarerindustrien, hvor f.eks. FOSS med stor succes bruger

metoden til at bestemme kvaliteten af en lang række fødevarer.

### 3.4.1 Multivariat dataanalyse

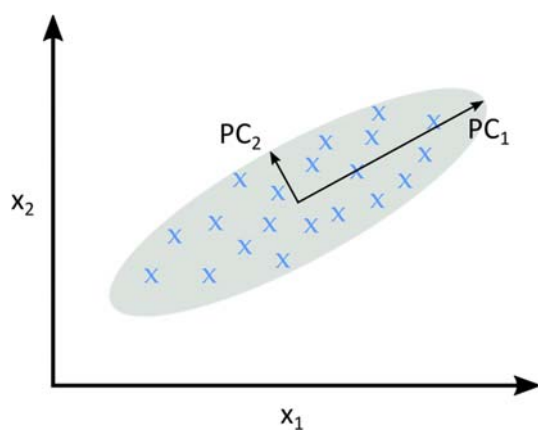
Multivariat dataanalyse vil sige, at man holder variationen af flere variable for øje på én gang. Hvis man f.eks. undersøger en række fødevarer for deres indhold af protein, kulhydrat, fedt og samlet energi, vil en univariat analyse kun kigge på, hvordan fødevarernes indhold af én parameter ændrer sig af gangen. I nogle tilfælde går det godt, men mange gange ændrer parametrene sig med hinanden, f.eks. vil indholdet af enten protein, kulhydrat eller fedt gå op, hvis energiindholdet gør det. Dette kaldes, at parametrene kovarierer, og denne kovarians fanges ikke af en univariat analyse. Multivariat dataanalyse er derfor den anbefalede metode i f.eks. den farmaceutiske industri i USA [8].

Principal component analysis (PCA) er en udbredt metode i multivariat dataanalyse. Der er meget at sige om PCA og dens anvendelser, men vi vil kun give en kort introduktion til emnet og ellers henvise til andre kilder for mere uddybende information.

PCA går i sin essens ud på at beskrive sine data ud fra nogle principale komponenter (principal components, PC), der tager højde for så meget af variansen i datasættet som muligt. Disse komponenter udregnes med en statistisk metode baseret på kovariansen af hele datasættet. Antallet af PC'er, man skal bruge til at beskrive et datasæt, vurderes fra gang til gang ud fra, hvornår man har beskrevet nok af variansen. Der findes statistiske metoder til at bestemme dette.

Et grafisk eksempel kan ses i Figur 17, hvor der er foretaget en række målinger af to variable  $x_1$  og  $x_2$ . Plottet mod hinanden kan vi se, at der tilsyneladende er en korrelation mellem de to variable: Når  $x_1$  bliver større, gør  $x_2$  det også og vice versa. Der er altså kovarians mellem  $x_1$  og  $x_2$ . Hvis man nøjedes med at kigge på de to variable hver for sig, ville denne sammenhæng gå ubemærket hen. Men med PCA kan man finde de PC'er, der bedst beskriver variansen i datasættet – i figuren er de illustreret med de to pile i ellipsen. I to dimensioner svarer dette til en simpel rotation af koordinataksene.

Man kunne spørge sig selv, hvad vi så har vundet ved analysen? I dette tilfælde har vi fundet kovariansen



Figur 17: Eksempel på en undersøgelse med to variable,  $x_1$  og  $x_2$ , plottet mod hinanden. De to principale komponenter,  $PC_1$  og  $PC_2$ , kan ses som de akser, der bedst beskriver variansen i datasættet.

mellem  $x_1$  og  $x_2$ , men vi skulle stadig bruge to PC'er til at beskrive datasættet med to variable.

Den virkelige styrke ved PCA bliver synlig, når man har mange variable, langt flere end de to her. Man kunne forestille sig, vi havde fire som i eksemplet tidligere med fødevarerne, eller vi kunne have målt det fulde næringsindhold med vitaminer og mineraler for hver fødevarer, hvilket ville have givet os mange flere; lad os sige 29 for eksemplets skyld. Men det er højst usandsynligt, at vi skal bruge 29 PC'er til at beskrive variansen i datasættet. Nogle gange kan man nøjes med en 2-3 stykker. Vi har dermed reduceret dimensionaliteten af datasættet fra 29 variable til f.eks. 3, hvilket kan øge overskueligheden betragteligt.

I tilfældet med NIR-spektroskopi er princippet det samme. Vi har blot mange flere variable, idet hver enkelt målt bølgelængde kan ses som en separat variabel, hvor absorbansen så er målingen af denne variabel. Og da en måling kan klares på sekunder, ender vi hurtigt med et meget stort parameterum. Kombineret med den komplekse natur af NIR-spektrene, er det næsten umuligt at få et meningsfyldt resultat uden multivariat analyse.

En interessant konsekvens ved dette er, at PC'erne i sig selv bliver en slags spektre, som indeholder de toppe og dale, hvor de målte NIR-spektre varierer mest hinanden imellem; se f.eks. [9] for et meget illustrativt eksempel herpå.

Denne måde at reducere dimensionaliteten af sit datasæt er også en essentiel del af mere avancerede dataalgoritmer som f.eks. machine learning. Med de enorme mængder data, der bliver brugt, er det nødvendigt at reducere sættet til en række parametre, som gerne skulle fortælle mest muligt om datamængden, og her er PCA en blandt mange muligheder. Så kan man f.eks. nøjes med at kigge på 3 parametre i stedet for 29.

Moderne kvantitativ NIR-spektroskopi bygger også på bl.a. PCA samt andre, mere avancerede algoritmer. Det er ganske enkelt nødvendigt for effektivt at kunne beskrive prøverne i relation til det store bibliotek af referencemålinger og dermed få en pålidelig kvantitativ måling.

## 4 Opsummering

I dette kompendium gennemgås en del forskellige teknikker, der på forskellig vis kan benyttes til at lave koncentrationsbestemmelser. Metoderne har fordele og ulemper, som kort er blevet beskrevet. Det er især nøjagtigheden og målehastigheden, der adskiller de forskellige metoder.

Desuden gives regneeksempler for at kunne udføre kalibrering af henholdsvis en ledningsevneopstilling og en absorbanskurve for et farvestof ved hjælp af et spektrofotometrisk udstyr.

Til sidst gives en kort introduktion til Principal Component Analyse (PCA) og multivariat dateanalyse for at anskueliggøre kompleksiteten af dataanalysemetoden ved at analysere nærinfrarød spektre.

## 5 Ordliste

Begreb	Forklaring	Afsnit
<b>Cellekonstant</b>	Også kaldt den geometriske faktor, der beskriver en ledningsevne-celles geometriske størrelse	Afsnit 3.2.1
<b>Ekstensive tilstandsstørrelser</b>	Beskriver et materiales eller systems afhængighed af den fysiske egenskab der undersøges eller beskrives. Hvis egenskaberne eller tilstandsstørrelser for delsystemerne er forandrede er disse ekstensive.  Eksempler for ekstensive størrelser er masse, volumen, længde, stofmængde og resistans.	Afsnit 3.2
<b>Galvanostatisk</b>	En elektrisk måleform, hvor strømstyrken ændres, og ændringen i spændingsfald måles.	Afsnit 3.2.2
<b>hydrometer</b>	Også kaldt en Oechslevægt, er en flydevægt. Se også Oechslevægt	Afsnit 2
<b>Impedansspektroskopi</b>	En målemetode, hvor man benytter vekselstrøm ved forskellige frekvenser til at bestemme et faseskift i polariseringen. Målemetoden resulterer i frekvensafhængige impedanser, der har både reelle og imaginære komponenter.	Afsnit 3.2.2
<b>Intensive tilstandsstørrelser</b>	Beskriver et materiales eller systems afhængighed af den fysiske egenskab der undersøges eller beskrives. Hvis egenskaberne eller tilstandsstørrelser for delsystemerne er uforandrede, og derfor uafhængige af størrelsen der måles på, er disse intensive.  Eksempler på intensive egenskaber og tilstandsstørrelser er farve, koncentration, densitet temperatur, viskositet og specifik lednings-evne (og resistivitet).	Afsnit 3.2
<b>Kromatografi</b>	Kromatografi er en generel teknik, som beskriver adskillelsen af konstituenten ved at de påvirkes forskelligt af en stationær fase.	Afsnit 2.1

<b>Lambert-Beers lov</b>	Lov, der beskriver den spektrofotometriske absorbans ud fra forskellige fysiske parametre, som absorptionskoefficient, vejlængde og koncentration.	Afsnit 3.3
<b>Ledningsevne</b>	er evnen for et materiale at lede en elektrisk strøm. Angives i Siemens per meter [S/m]	Afsnit 2.4, Afsnit 3.2
<b>Massespektrometri</b>	Massespektrometri er en analyseform, hvor molekyler kan massediskriminere ved at ionisere dem.	Afsnit 2.2
<b>Multivariat dataanalyse</b>	En dataanalyse hvor man analyserer sin data, mens man holder variationen af flere variable for øje på én gang.	Afsnit 3.4.1
<b>Oechslevægt</b>	Også kaldt hydromter, er en flydevægt, der kan benyttes til at bestemme densiteten, og dermed koncentrationen af forskellige væsker.	Afsnit 1
<b>Potentiostatisk</b>	Elektrisk måleform, hvor spændingsfaldet ændres, og ændringen i strømstyrke måles.	Afsnit 3.2.2
<b>Refraktometri</b>	Målingen af den afbøjning der sker når lys, der bevæger sig i et medie møder et andet medie.	Afsnit 2.6
<b>Spektrofotometer</b>	er et udstyr, der måler lysintensiteten i bølgelængdeområdet fra ultraviolet til det synlige område.	Afsnit 2.5

## 6 Referencer

- [1] C. Thirstrup, »K3 - Kemiske opløsninger,« Metrologi.dk, 11 2017. [Online]. Available: <https://metrologi.dk/wp-content/uploads/Laeremidler/Kemi/K3-Kemiske-oploesninger.pdf>. [Senest hentet eller vist den 27 12 2019].
- [2] H. Jeppesen, M. N. Bergsøe og F. Simonsen, Analyseteknik, København: Nyt Teknisk Forlag, 2013.
- [3] C. Thirstrup, »K1 - pH måling,« Metrologi.dk, 5 2017. [Online]. Available: <https://metrologi.dk/wp-content/uploads/Laeremidler/Kemi/K1-pH-maaling.pdf>. [Senest hentet eller vist den 27 12 2019].
- [4] C. Thirstrup og S. R. Johannsen, »K2 - pH metre,« Metrologi.dk, 05 2017. [Online]. Available: <https://metrologi.dk/wp-content/uploads/Laeremidler/Kemi/K2-pH-metre.pdf>. [Senest hentet eller vist den 10 01 2020].
- [5] J. Meinertz og V. Loll, Måleteknik, Bind 2, Odense: Praxis - Nyt Teknisk Forlag, 2018.
- [6] K. Rhoads og D. R. Sadoway, »A high-accuracy, calibration-free technique for measuring the electrical,« *Review of Scientific Instruments*, årg. 69, nr. 9, pp. 3308-3313, 1998.
- [7] A. Davies, »An introduction to near infrared (NIR) spectroscopy,« IMPublications Open, [Online]. Available: <https://www.impopen.com/introduction-near-infrared-nir-spectroscopy>. [Senest hentet eller vist den 02 06 2020].
- [8] U.S. Department of Health and Human Services, »Guidance for Industry,« September 2004. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/media/71012/download>. [Senest hentet eller vist den December 2019].
- [9] L. Nørgaard, B. S. Engelsen og R. Bro, »Principal Component Analysis af nærinfrarøde spektroskopiske data,« *Dansk Kemi*, årg. 2, pp. 30-32, 2008.
- [10] S. H. Hansen, »Kromatografi i Den Store Danske,« 20 04 2015. [Online]. Available: [http://denstoredanske.dk/lt\\_teknik\\_og\\_naturvidenskab/Kemi/Analytisk\\_kemi/kromatografi](http://denstoredanske.dk/lt_teknik_og_naturvidenskab/Kemi/Analytisk_kemi/kromatografi). [Senest hentet eller vist den 19 12 2019].
- [11] S. B. Sigmann og D. E. Wheeler, »The Quantitative Determination of Food Dyes in Powdered Drink Mixes. A High School or General Science Experiment,« *Journal of Chemical Education*, årg. 81, nr. 10, p. 1475, 2004.
- [12] Perkin Elmer, »NIR Introduction,« [Online]. Available: <https://www.perten.com/Publications/Articles/NIR-Introduction1/>. [Senest hentet eller vist den 10 December 2019].
- [13] C. Thirstrup, A. Snedden og C. L. Deleebeeck, »Addressing the challenges of traceable electrolytic conductivity measurements in water,« *Measurement Science and Technology*, årg. 28, pp. 124001-124010, 2017.



## 7 Læringsudbytte

### Læringsudbytte:

Læseren skal opnå forståelse for forskellige metoder, der anvendes for koncentrationsbestemmelse, deres anvendelser og begrænsninger.

### Læringsmål:

Læseren bliver i stand til:

1) Kort forklare metoderne hvorved de beskrevne analysemetoder bygger på. Herunder at

a. Beskrive fordele og anvendelsesområder for de forskellige beskrevne teknikker.

b. Forklare eller kunne give et tidsestimater i forhold til hvor lang tid at en analysemetode tager at udføre, samt om disse er 'direkte' eller 'indirekte' målinger.

c. Kunne forklare hvad begreberne 'kolonne' retentions-tid, samt 'mobil' og 'stationær' fase dækker over inden for kromatografi.

d. Kunne forklare fordelene for brugen af ledningsevnesensorer i industrien, i forhold til pH-kombinations-elektroder.

e. Kunne angive enheden for ledningsevne, og forklare enhederne der beskriver dem.

f. Forklare hvad der skyldes de signaler der benyttes ved analysen af nærinfrarødspektre og kunne nævne mindst én analysemetode.

g. Kunne beskrive forskellene i placeringen ved en 'in-line', 'at-line' og 'offline' måling.

2) Kunne beregne eller estimere koncentrationer fra

a. pH målinger, hvor koncentrationen ( $<0,1$  mol/kg( $H_2O$ )) beregnes af simple vandige og fuldstændigt dissocierede syrer.

b. Forklare hvordan en ledningsevnekalibrering kan udføres, og udregne en cellekonstant ud fra målinger udført ved  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

c. Benytte Lambert-Beers lov til at bestemme en koncentration ud fra spektrofotometriske data, samt opstille en kalibreringskurve, som kan benyttes til at estimere en koncentration ud fra et stofs absorbans ved en bestemt bølgelængde.