

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie

---

# **POKROČILÉ PRAKTIKUM Z ANALYTICKÉ CHEMIE**

## **MC230C04**



**NÁVODY K PRAKTICKÝM ÚLOHÁM**  
**pro studenty NANALD**

## *Organizace praktika*

**Praktikum probíhá 3x v týdnu, a to v pondělí, středu a pátek. Pracovní doba je od 8<sup>00</sup> do 16<sup>00</sup>.**

Studenti a studentky pracují na úlohách samostatně. Úlohy jsou přiděleny studentům na začátku praktika a každý/-á student/-ka musí absolvovat všechny úlohy dle časového rozpisu. V případě odůvodněné nepřítomnosti (nemoc apod.) na domluvené úloze je nutno se omluvit buď telefonicky na tel. č. 221 951 221 nebo e-mailem ([jana.sobotnikova@natur.cuni.cz](mailto:jana.sobotnikova@natur.cuni.cz)).

Všichni studenti se dostaví **v den začátku praktika v 9:00** na úvodní školení **do laboratoře 110**. Po úvodním slovu a školení o bezpečnosti práce a ochraně zdraví při práci, stvrdí studenti svou účast na školení podpisem. První den praktika probíhá přidělení jednotlivých úloh a seznámení s jejich náplní.

## ***Seznam úloh***

- 1. Anodická rozpouštěcí voltametrie:*** optimalizace podmínek pro stanovení  $\text{Cd}^{2+}$ , ověření linearity metody, určení meze stanovitelnosti, stanovení  $\text{Cd}^{2+}$  v neznámém vzorku metodou kalibrační přímky a standardního přídatku
- 2. Automatická potenciometrická titrace:*** optimalizace podmínek pro odměrné stanovení dvojmocného manganu manganistanem v přítomnosti difosforečnanu
- 3. Konduktometrická titrace:*** konduktometrická titrace různě silných kyselin, statistické zhodnocení výsledků, diskuze tvaru titračních křivek
- 4. Spektrofotometrie:*** určení disociační konstanty barevného indikátoru
- 5. Atomová absorpční spektrometrie:*** optimalizace podmínek měření při práci s AAS
- 6. Průtoková injekční analýza:*** disperze vzorku v proudu kapaliny
- 7. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie:*** separace a stanovení azobarviv metodou kalibrační přímky v systému RP-HPLC, určení meze detekce a meze stanovitelnosti, koeficientu linearity detektoru a lineárního dynamického rozsahu
- 8. Plynová chromatografie:*** stanovení methanolu ve vzorcích ovocných destilátů
- 9. Kapilární zónová elektroforéza:*** kvalitativní a kvantitativní analýza směsi aromatických nitrosloúčenin

## Hodnocení praktických úloh

Návody k úlohám si studenti stáhnou z webové stránky katedry analytické chemie PřF UK nebo ze SISu, případně v Moodle.

Studenti se musí na úlohu připravit – přečíst si důkladně návod, rozmyslet si správný pracovní postup, případně si oživit znalosti o principech, metodách a instrumentaci.

Před zahájením práce je **prověřena připravenost** studentů na úlohu zkoušením. Míra připravenosti je ohodnocena známkami 1 – 4. Nedostatečné znalosti teorie nebo provedení úlohy znamenají, že úlohu není možno zahájit. Úlohu lze zahájit až po doplnění znalostí a novém prověření připravenosti. V případě opětovných nedostatků znalostí bude úloha provedena v náhradním termínu po doplnění znalostí.

Při jakékoliv práci v laboratoři pokročilého praktika z analytické chemie je třeba striktně dodržovat bezpečnostní předpisy pro práci v chemických laboratořích.

Každý/-á student/-ka odevzdává z naměřené úlohy **protokol**, nejpozději **do 10 pracovních dnů** od absolvování úlohy. Součástí protokolu jsou originály záznamů z přístrojů (pokud jsou k dispozici) a grafy závislostí (jsou-li vyžadovány), samozřejmostí je statistické vyhodnocení naměřených výsledků. Všechny listy protokolu musí být pevně svázané.

Každá úloha bude na základě odevzdaného protokolu ohodnocena známkami 1 – 4. V případě, že protokol nebude kompletní, popř. bude obsahovat závažné nedostatky, bude ohodnocen známkou 4 a povinností studenta/-ky je jeho **přepracování a odevzdání nejpozději do jednoho týdne včetně originálu**. Opravený protokol bude znovu ohodnocen, přičemž do celkového hodnocení se započítávají obě známky.

### Tabulka parametrů hodnocení:

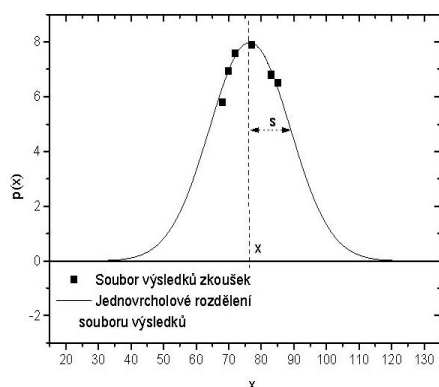
známka číselně	zkoušení	protokol
1	výborné znalosti, odpovědi s přehledem a bez chyby	úplný, dobře zpracovaný, bez připomínek a chyb
2	velmi dobré znalosti, drobné zaváhání	úplný, dobře zpracovaný bez závažných chyb
3	dobré znalosti, dostatečné pro zvládnutí úlohy	úplný, s připomínkami a drobnou opravou akceptovatelný
4	nedostatečné znalosti o teorii nebo provedení úlohy znamená vypracování úlohy v náhradním termínu	obsahuje hrubé chyby nebo není úplný, nutno přepracovat

## Statistické vyhodnocení analytických výsledků

Výsledky analytických zkoušek jsou vždy zatíženy náhodnými chybami, které ovlivňují přesnost výsledků. Analytické výsledky ale mohou být také zatíženy chybami hrubými a systematickými. Hrubé chyby se projeví jako odlehle výsledky daného souboru analytických dat a lze je vyloučit pomocí testů pro odlehle výsledky. Systematické chyby způsobují strannost výsledků a lze je prokázat či vyvrátit porovnáním s analytickými výsledky nezatíženými systematickou chybou, popřípadě porovnáním se známou pravou hodnotou, pomocí testů shodnosti.

Výsledky opakovaných analýz, které jsou zatíženy náhodnými chybami, mají určité *rozdělení* (distribuci). Rozdělením se zde rozumí závislost pravděpodobnosti výskytu daného výsledku na jeho hodnotě. Převážná část souborů analytických výsledků má jednovrcholové rozdělení, které se jen výjimečně blíží *normálnímu (Gaussovu) rozdělení*. Přesnost analytických výsledků je právě charakterizována tímto jednovrcholovým rozdělením.

Každé jednovrcholové rozdělení výsledků lze charakterizovat dvěma na sobě nezávislými parametry, parametrem centroidní tendence a parametrem variability. Pro jejich zjištění bychom potřebovali provést nekonečný počet měření, proto je lze pouze odhadovat. Parametr centroidní tendence charakterizuje správnost výsledků a jeho odhadem je střední hodnota souboru analytických výsledků,  $x$ . Parametr variability charakterizuje shodnost analytických výsledků a jeho odhadem je rozptyl,  $s^2$ , popřípadě směrodatná odchylka,  $s$  (druhá odmocnina rozptylu). Na obrázku Gaussova rozdělení je patrný význam veličin  $x$  a  $s$ .



Obecně platí, že paralelní analytické výsledky, které jsou zatíženy pouze malými náhodnými chybami, tedy **shodné**, a které nejsou zároveň zatíženy systematickou chybou, tedy **správné**, označujeme jako **přesné** výsledky.

**Statistické vyhodnocení analytických výsledků se provádí s konečnými výsledky koncentrací či procentuálního zastoupení analytů ve vzorku, nikoliv s mezivýsledky či dokonce vstupními daty jako jsou například spotřeby odměrných roztoků, plochy či výšky piků, absorbance anebo prošlé náboje.**

### VYLUČOVÁNÍ ODLEHLÝCH VÝSLEDKŮ

Ojedinelý výsledek v daném souboru analytických výsledků, který je zatížen hrubou chybou, se projeví jako odlehlejší výsledek a lze jej ze souboru vyloučit na základě Deanova a Dixonova testu (pro soubor s malým počtem paralelních výsledků) nebo Grubbsova testu (soubor s větším počtem paralelních výsledků).

#### Deanův a Dixonův test

Výsledky seřadíme podle velikosti od nejmenšího k největšímu  $x_1 < x_2 < \dots < x_{n-1} < x_n$  a vypočteme rozpětí  $R$  souboru výsledků jako rozdíl mezi největší a nejmenší hodnotou tohoto souboru

$$R = x_{max} - x_{min} = x_n - x_1.$$

Poté vypočteme kritérium  $Q_1$  jako rozdíl mezi nejmenším a následujícím výsledkem podělený rozpětím souboru výsledků

$$Q_1 = \frac{x_2 - x_1}{R}$$

a kritérium  $Q_n$  jako rozdíl mezi největším a předcházejícím výsledkem podělený rozpětím souboru výsledků

$$Q_n = \frac{x_n - x_{n-1}}{R}$$

Hodnoty kritérií  $Q_1$  a  $Q_n$  pak porovnáme s tabelovanou kritickou hodnotou  $Q_k$  z tabulky 1 pro daný počet výsledků  $n$  v souboru. Pokud je  $Q_1 > Q_k$ , pak nejmenší výsledek  $x_1$  je odlehlý podle Deanova a Dixonova testu, a proto jej ze souboru vyloučíme jako odlehlý výsledek. Pokud je  $Q_n > Q_k$ , pak největší výsledek daného souboru  $x_n$  je odlehlý a je nutné ho ze souboru vyloučit jako odlehlý výsledek.

### Grubbsův test

Výsledky seřadíme podle velikosti tak, že  $x_1 < x_2 < \dots < x_n$  a vypočteme kritérium  $T_1$  pro nejmenší a  $T_n$  pro největší hodnotu souboru výsledků

$$T_1 = \frac{\bar{x} - x_1}{s} \quad \text{a} \quad T_n = \frac{x_n - \bar{x}}{s}$$

kde  $\bar{x}$  je aritmetický průměr a  $s$  je odhad směrodatné odchylky vypočítaný z čtverců rozdílů (pro větší počet paralelních stanovení,  $n \geq 7$ ). Vypočtená kritéria  $T_1$  a  $T_n$  porovnáme s kritickou hodnotou  $T_k$  z tabulky 1 pro daný počet výsledků  $n$  v souboru. Je-li  $T_1 > T_k$ , je nejmenší výsledek  $x_1$  odlehlý a musíme ho ze souboru vyloučit. Je-li  $T_n > T_k$ , je největší výsledek  $x_n$  odlehlý a musíme ho ze souboru vyloučit.

## ODHADY STŘEDNÍ HODNOTY SOUBORU ANALYTICKÝCH VÝSLEDKŮ (CENTROIDNÍ TENDENCE ROZDĚLENÍ)

Odhadem střední hodnoty souboru výsledků mohou být v závislosti na počtu provedených měření medián (pro počet měření  $\leq 7$ ) nebo aritmetický průměr.

### Medián

Medián,  $\tilde{x}$ , souboru výsledků je hodnota ležící uprostřed intervalu hodnot výsledků seřazených podle velikosti. Pro lichý počet výsledků se medián rovná prostřednímu z výsledků a pro sudý počet se rovná aritmetickému průměru dvou prostředních výsledků.

$$\text{Aritmetický průměr} \quad \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

kde  $x_i$  je výsledek  $i$ -tého měření a  $n$  je počet opakovaných analýz. Pro malá  $n$  je však aritmetický průměr citlivý na okrajové hodnoty. Z tohoto důvodu pro  $n \leq 7$  jako odhad střední hodnoty souboru výsledků použijeme medián.

## ODHADY PARAMETRU VARIABILITY

Odhadem parametru variability je směrodatná odchylka,  $s$ , souboru výsledků, která charakterizuje šířku intervalu, v němž se mohou vyskytnout výsledky opakovaných měření. V závislosti na počtu provedených měření ji lze vypočítat buď z rozpětí nebo z čtverců rozdílů jednotlivých výsledků a střední hodnoty.

### **Směrodatná odchylka vypočtená z rozpětí**

Pro **malý počet  $n$  paralelních stanovení** ( $n \leq 7$ ) provedených na jednom vzorku se směrodatná odchylka,  $s$ , počítá podle vzorce:

$$s = k_n \cdot R$$

kde  $k_n$  je tabelovaný koeficient (tabulka 1) a  $R = x_{max} - x_{min}$  je rozpětí (rozdíl největší a nejmenší zjištěné hodnoty  $x$ ).

### **Směrodatná odchylka vypočtená z čtverců rozdílů**

Pro  $n$  paralelních stanovení ( $n \geq 7$ ) provedených na jednom vzorku se jako odhad variability souboru výsledků používá směrodatná odchylka,  $s$ , která je rovna:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

### **Variační koeficient** (relativní směrodatná odchylka RSD v %)

Variační koeficient vztahuje přesnost měření k velikosti střední hodnoty, tedy podle počtu měření v souboru buď k mediánu, nebo k aritmetickému průměru.

$$s_r(\%) = 100 \frac{s}{\bar{x}} \quad s_r(\%) = 100 \frac{s}{\bar{x}}$$

### **Mez opakovatelnosti/ interval spolehlivosti**

Na rozdíl od aritmetického průměru a mediánu, jež jsou představiteli bodových odhadů střední hodnoty souboru výsledků,  $x$ , je mez opakovatelnosti,  $r$  (interval spolehlivosti,  $L_{1,2}$ ) intervalovým odhadem. Tento interval představuje rozsah hodnot, ve kterém hledaný odhad střední hodnoty leží s udanou pravděpodobností. Tuto pravděpodobnost udává koeficient spolehlivosti, který zpravidla volíme 0,95 (95% pravděpodobnost), vyhodnocujeme tedy analytické výsledky na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Interval spolehlivosti čili mez opakovatelnosti vyjadřují míru shodnosti analytických výsledků, které získal jeden experimentátor za stejných experimentálních podmínek, a je tím užší, čím přesnější jsou získané výsledky. Mez opakovatelnosti  $r$  a zároveň interval spolehlivosti  $L_{1,2}$  počítáme dle vztahu:

$$r = K_n \cdot R \quad L_{1,2} = K_n \cdot R$$

kde  $K_n$  je tabelovaný koeficient tzv. Lordova rozdělení pro daný počet měření (tabulka 1) a  $R$  je rozpětí.

Pro počet stanovení  $n \geq 7$ , počítáme mez opakovatelnosti podle vztahu:  $L_{1,2} = \frac{t}{\sqrt{n}} \cdot s$

kde  $t$  je tabelovaný koeficient tzv. Studentova rozdělení (tabulka 1),  $n$  je počet měření v daném souboru a  $s$  je odhad směrodatné odchylky.

## VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKU

Výsledky zkoušek uvádíme v následujícím formátu s relevantním počtem desetinných míst.

$$(\tilde{x} \pm L_{1,2}) \cdot \text{exponent [jednotky] (počet stanovení, } s_r \text{ v \%)}$$

$$(\bar{x} \pm L_{1,2}) \cdot \text{exponent [jednotky] (počet stanovení, } s_r \text{ v \%)}$$

Přesnost měření  $L_{1,2}$  musí být uváděna se stejným počtem desetinných míst s jakým je vyjádřen výsledek  $\tilde{x}$ , případně  $\bar{x}$ . Případný exponent se uvádí společně pro oba členy za závorku. Výsledek musí být vždy doplněn údajem o počtu paralelních stanovení  $n$  a o relativní směrodatné odchylce  $s_r$  vyjádřené v procentech.

## SHODNOST VÝSLEDKŮ

Shodnost výsledků získaných dvěma různými analytickými metodami A a B, tj. statistickou významnost rozdílu ( $x_A - x_B$ ), kde  $x_A$  a  $x_B$  jsou mediány či aritmetické průměry výsledků metod A a B, testujeme buď za použití rozpětí  $R_A$  a  $R_B$  pomocí Lordova testu  $u$ , respektive Moorova testu  $U$ , nebo za použití směrodatných odchylek  $s_A$  a  $s_B$  průměrů pomocí Studentova testu  $t$ . Porovnáváme tedy mezi sebou 2 hodnoty zatížené náhodnými chybami. Testujeme tak, že hodnotu kritéria, vypočteného z výsledků analýz, porovnáme s kritickou hodnotou. Kritické hodnoty jsou tabelovány pro daný počet výsledků v souboru, získaných oběma analytickými metodami ( $n_A, n_B$ ) nebo pro počet stupňů volnosti, který souvisí s  $n_A$  a  $n_B$ , a pro hladinu významnosti  $\alpha$ . Testováním shodnosti výsledků ověřujeme nulovou hypotézu, že rozdíl  $|x_A - x_B|$  není statisticky významný na zvolené hladině významnosti  $\alpha$ . Testování je velmi jednoduché v případě, kdy počet stanovení provedený oběma metodami je stejný, tj.  $n_A = n_B = n$ . Proto se v praxi pro jednoduchost vždy snažíme, aby byla splněna podmínka  $n_A = n_B$ .

### **Lordův test $u$ pro $n_A = n_B$**

Hodnotu Lordova kritéria  $u$  vypočítáme podle vztahu: 
$$u = \frac{|x_A - x_B|}{R_A + R_B}$$

a porovnáme ji s kritickou hodnotou  $u_\alpha$  z tabulky 2 pro daný počet paralelních stanovení  $n = n_A = n_B$  a zvolenou hladinu významnosti  $\alpha$ . Je-li  $u \geq u_\alpha$ , je rozdíl výsledků statisticky významný na hladině významnosti  $\alpha$ . Je-li  $u < u_\alpha$ , není rozdíl výsledků statisticky významný a může být vysvětlen náhodnými chybami obou stanovení, přijímáme tedy rozhodnutí o shodnosti výsledků.

### **Studentův test $t$ pro $n_A = n_B$**

Hodnotu Studentova kritéria  $t$  vypočítáme podle vztahu: 
$$t = \frac{|x_A - x_B| \cdot \sqrt{(n-1)}}{\sqrt{(s_A^2 + s_B^2)}}$$

a porovnáme ji s kritickou hodnotou  $t_\alpha$  z tabulky 3 pro daný počet stupňů volnosti  $\nu = 2n - 2$ , kde  $n$  je počet paralelních stanovení provedených každou z obou metod na témže vzorku. Je-li  $t \geq t_\alpha$ , je rozdíl výsledků statisticky významný na hladině významnosti  $\alpha$ . Je-li  $t < t_\alpha$ , není rozdíl výsledků statisticky významný a může být vysvětlen náhodnými chybami obou stanovení, přijímáme tedy rozhodnutí o shodnosti výsledků.



### Moorův test $U$ pro $n_A \neq n_B$

Hodnotu Moorova kritéria  $U$  vypočítáme podle vztahu: 
$$U = \frac{|x_A - x_B|}{R_A + R_B}$$

a porovnáme ji s kritickou hodnotou  $U_\alpha$  z tabulky 4 pro daný počet stanovení  $n_A$  a  $n_B$  a zvolenou hladinu významnosti  $\alpha$ . Přitom označíme soubory tak, aby  $n_A \leq n_B$ . Je-li  $U \geq U_\alpha$ , je rozdíl výsledků statisticky významný na hladině významnosti  $\alpha$ . Je-li  $U < U_\alpha$ , není rozdíl výsledků statisticky významný a může být vysvětlen náhodnými chybami obou stanovení, přijímáme tedy rozhodnutí o shodnosti výsledků.

### Tabulka 1

Hodnoty koeficientů  $Q_k$ ,  $T_k$ ,  $k_n$ ,  $K_n$  a  $t$  pro soubor analytických výsledků o počtu  $n$  a pro koeficient spolehlivosti 0,95 ( $\alpha = 0,05$ )

počet měření $n$	$Q_k$	$T_k$	$k_n$	$K_n$	$t$
2	-	-	0,8862	6,353	12,71
3	0,941	1,155	0,5908	1,304	4,303
4	0,765	1,481	0,4857	0,717	3,182
5	0,642	1,715	0,4299	0,507	2,776
6	0,560	1,887	0,3946	0,399	2,571
7	0,507	2,020	0,3698	0,333	2,447
8	0,468	2,126	0,3512	0,288	2,365
9	0,437	2,215	0,3367	0,255	2,306
10	0,412	2,290	0,3249	0,230	2,262

### Tabulka 2

Kritické hodnoty Lordova testu  $u_\alpha$  pro hladinu významnosti  $\alpha = 0,05$  a počet měření  $n$

$n$	$u_\alpha$	$n$	$u_\alpha$
2	1,714	7	0,213
3	0,636	8	0,186
4	0,406	9	0,167
5	0,306	10	0,152
6	0,250		

**Tabulka 3**

Kritické hodnoty Studentova rozdělení  $t_\alpha$  pro hladinu významnosti  $\alpha = 0,05$  a stupeň volnosti  $\nu$

$\nu$	$t_\alpha$	$\nu$	$t_\alpha$
1	12,706	11	2,201
2	4,303	12	2,179
3	3,182	13	2,160
4	2,776	14	2,145
5	2,571	15	2,131
6	2,447	16	2,120
7	2,365	17	2,110
8	2,306	18	2,101
9	2,262	19	2,093
10	2,228	20	2,086

**Tabulka 4**

Kritické hodnoty Moorova testu  $U_\alpha$  pro hladinu významnosti  $\alpha = 0,05$  a počet měření  $n_A$  a  $n_B$  ( $n_A \leq n_B$ )

$n_A$	$n_B$	$U_\alpha$	$n_A$	$n_B$	$U_\alpha$
2	2	1,714	4	4	0,407
	3	0,915		5	0,353
	4	0,732		6	0,319
	5	0,619		7	0,294
	6	0,549	5	5	0,307
	7	0,502		6	0,277
3	3	0,635	6	7	0,256
	4	0,511		6	0,250
	5	0,429		7	0,240
	6	0,391	7	7	0,213
	7	0,360			

# ***Určení koeficientu linearity a lineárního dynamického rozsahu měřícího zařízení, určení meze detekce a meze stanovitelnosti analytické metody z kalibračních závislost***

## **Určení koeficientu linearity měřícího zařízení**

Předpokládejme, že platí obecný vztah mezi signálem  $S$  měřícího zařízení a koncentrací  $c_a$  analytu v měřeném vzorku:

$$S = K \cdot c_a^l + b \quad (1)$$

kde  $K$  je konstanta charakteristická pro použitý měřící systém (viz dále),  $l$  je koeficient linearity měřícího systému (detektoru) a  $b$  je hodnota signálu za nepřítomnosti analytu (hodnota nulové linie, pozadí, šum). Signálem může být v tomto kontextu míněna plocha či výška píku (v chromatografii), absorbance (optické metody) či proud (elektrochemické metody). Koeficient linearity může obecně nabývat hodnot mezi  $-1$  a  $1$ . Pokud leží koeficient linearity  $l$  v intervalu přibližně mezi  $0,95$  a  $1,05$ , lze tvrdit, že odezvy měřícího zařízení jsou lineární a vztah (1) přejde na tvar

$$S = K \cdot c_a + b \quad (2).$$

Tato rovnice je formálně shodná s lineární regresní rovnicí popisující lineární kalibrační závislost mezi signálem a koncentrací použitého standardu. Abychom mohli pro kalibraci použít tuto jednoduchou lineární regresní rovnici, je třeba se přesvědčit, že koeficient linearity použitého zařízení je blízký  $1$ . Hodnotu koeficientu linearity lze zjistit ze zlogaritmované formy rovnice (1):

$$\log(S - b) = \log K + l \cdot \log c_a \quad (3)$$

tj. vynesení  $\log(S-b)$  oproti  $\log c_a$  dostaneme v ideálním případě přímku, jejíž směrnice je rovna koeficientu linearity použitého měřícího zařízení a současně lze určit i konstantu  $K$ .

## **Určení meze detekce a meze stanovitelnosti metody z kalibračních závislostí**

Mez detekce (LOD) daného analytického postupu je dána nejmenším množstvím analytu ve vzorku, které může být detekováno. Mez detekce je nejmenší koncentrace analytu, která ještě vyvolá odezvu měřícího systému rozpoznatelnou (s přijatelnou statistickou jistotou) od ostatních vlivů. LOD je taková koncentrace látky, která vyvolá odezvu ( $S$ ) měřícího přístroje větší než je trojnásobek úrovně šumu ( $N$ ) pozadí,  $S/N = 3$ . Mez detekce, stejně jako mez stanovitelnosti, tedy závisí na poměru signál/šum. LOD je stanovována opakovanou analýzou slepého pokusu a je to taková koncentrace analytu, jehož odezva odpovídá průměrné odezvě slepého pokusu plus trojnásobek odhadu směrodatné odchylky:

$$\text{LOD} = \overline{x_{sl}} + 3 \cdot s_{sl} \quad (4)$$

kde  $\overline{x_{sl}}$  je průměrná hodnota slepého pokusu a  $s_{sl}$  je směrodatná odchylka pro slepý pokus.

Mez stanovitelnosti (LOQ) metody je nejnižší koncentrace analytu, kterou lze s definovaným stupněm přesnosti a správnosti kvantitativně vyhodnotit. LOQ je koncentrace látky, která vyvolá odezvu ( $S$ ) měřícího přístroje větší než je desetinásobek úrovně šumu ( $N$ ) pozadí,  $S/N = 10$ . Pro určení LOQ ze slepého pokusu slouží vztah (5):

$$\text{LOQ} = \overline{x_{sl}} + 10 \cdot s_{sl} \quad (5).$$

LOQ by měla být zjištěna za použití vhodného standardu či vzorku a obvykle je to nejnižší bod kalibrační křivky, při vyloučení slepého pokusu. LOQ by neměla být stanovována extrapolací.

V separačních metodách se používá k výpočtu meze detekce a meze stanovitelnosti velikost hodnoty slepého pokusu a směrnice kalibrační závislosti. Z chromatogramu slepého pokusu, který je třeba mít k dispozici, se určí maximální kolísání základní linie  $h_n$ , tzv. šum základní linie. Mez detekce LOD pak počítáme ze vztahu

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot h_n}{m} \quad (6),$$

kde  $h_n$  je šum základní linie a  $m$  je směrnice kalibrační křivky (pro výšku píku!). Hodnota šumu a výšky píku v kalibračních křivkách musí být ve stejných jednotkách. Mez stanovitelnosti LOQ počítáme ze vztahu

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot h_n}{m} \quad (7),$$

kde  $h_n$  je šum základní linie a  $m$  je směrnice kalibrační křivky.

LOD a LOQ se doporučuje vyjadřovat jako koncentraci analytu v původním vzorku, zejména pokud na daných koncentračních hladinách existují rušivé vlivy matrice. Mez detekce a mez stanovitelnosti metody lze také určit analýzou rozptylu experimentálních dat kolem kalibrační přímky pro studované analyty.

#### Určení meze detekce a meze stanovitelnosti analýzou rozptylu dat kalibračních závislostí

Podrobnou statistickou analýzou kalibrační závislosti (např. s pomocí programu Excel, Nástroje-Analýza dat-Regrese) lze získat nejen koeficienty lineární regrese (směrnici a úsek) a korelační koeficient, ale také jejich směrodatné odchylky a hlavně směrodatnou odchylku  $s_{y,x}$  (v Excelu nazvané jako "Chyba střední hodnoty"), která charakterizuje rozptýlení bodů okolo regresní přímky pro případ, že  $x$  je nezávisle a  $y$  je závisle proměnná.

$$s_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - Y_i)^2}{n-2}} \quad (8)$$

kde  $y_i$  jsou naměřené hodnoty závislé veličiny regresní rovnice, tj. signálu, a  $Y_i$  jsou hodnoty závislé veličiny (signálu) vypočtené z regresní rovnice pro dané  $x_i$ . S pomocí  $s_{y,x}$  lze určit jak mez detekce, LOD (limit of detection), tak i mez stanovitelnosti, LOQ (limit of quantification).

Předpokládejme, že platí zjednodušená rovnice (2) ( $S = K \cdot c_a + b$ ) a že jsme metodou lineární regrese na kalibračních datech získali regresní rovnici přímky ve tvaru:

$$y = A \cdot x + B \quad (9)$$

kde  $y$  je náš signál a  $x$  je koncentrace analytu v použitém roztoku jeho standardu. Nyní chceme zjistit LOD jako koncentraci, kdy ještě můžeme s definovanou pravděpodobností tvrdit, že je analyt přítomen, ovšem nemůžeme určit jeho koncentraci. Položíme tedy LOD rovno  $x$  (resp.  $c_a$ ) a hodnota signálu  $y$  (resp.  $S$ ), která bude odpovídat této koncentraci, je v případě LOD rovna trojnásobku  $s_{y,x}$ . Dosazením do regresní rovnice (9), resp. (2), dostaneme:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot s_{y,x} - B}{A} \quad (\text{resp. } \text{LOD} = \frac{3 \cdot s_{y,x} - b}{K}) \quad (10).$$

Obdobně pro LOQ bereme za hodnotu signálu desetinásobek  $s_{y,x}$  a dostáváme:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot s_{y,x} - B}{A} \quad (\text{resp. } \text{LOQ} = \frac{10 \cdot s_{y,x} - b}{K}) \quad (11).$$

Složitější situace nastává v případě platnosti obecnější rovnice (1), tj. když se koeficient linearity  $l$  výrazně liší od 1. S využitím podobnosti rovnic (3) a (9) lze odvodit rovnice pro LOD a LOQ:

$$\text{LOD} = 10^{\frac{3 \cdot s_{y,x} - B}{A}} \quad (\text{resp. } \text{LOD} = \sqrt[l]{\frac{10^3 \cdot s_{y,x}}{K}}) \quad (12)$$

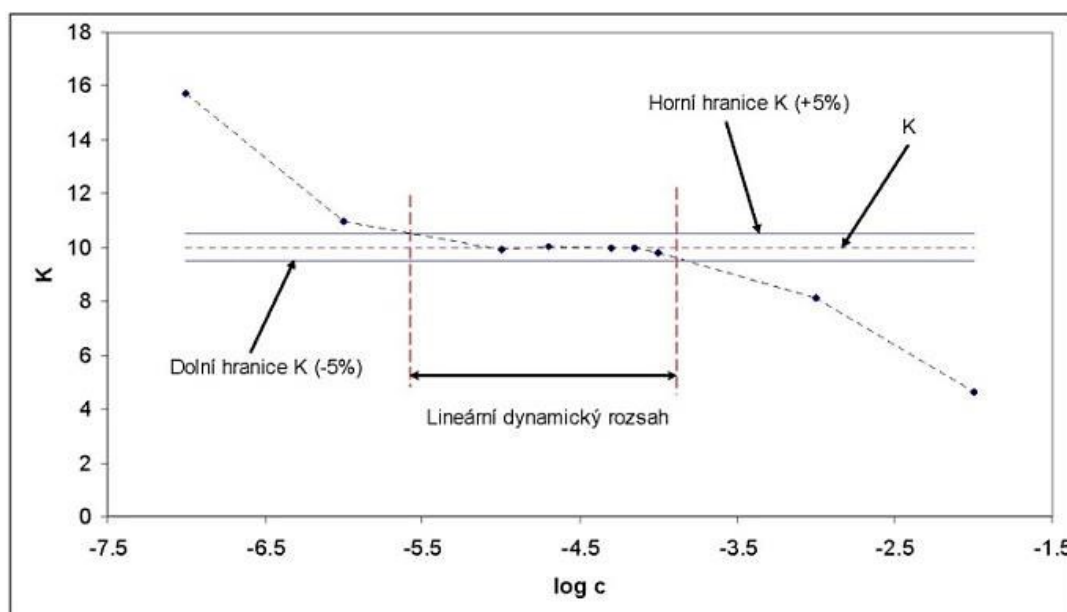
$$\text{LOQ} = 10^{\frac{10 \cdot s_{y,x} - B}{A}} \quad (\text{resp. } \text{LOQ} = \sqrt[l]{\frac{10^{10} \cdot s_{y,x}}{K}}) \quad (13).$$

### Určení lineárního dynamického rozsahu měřicího zařízení

Předpokladem použitelnosti měřicího zařízení pro kvantitativní analýzu je podmínka jeho konstantní citlivosti v použitém rozsahu koncentrací. Pokud by totiž signál neodpovídal lineárně koncentraci, nešlo by provést určení odpovídající koncentrace. **Citlivost detektoru** je definována jako jeho signál odpovídající jednotkovému látkovému či jinak definovanému množství. Pohledem na rovnici (1) lze citlivost odvodit jako:

$$K = \frac{S-b}{c_a^l} \quad (14).$$

Vynesení podílu  $\frac{S-b}{c_a^l}$  oproti  $c_a$  do grafu musíme v případě konstantní citlivosti obdržet body ležící na přímce rovnoběžné s osou  $x$  grafu ve vzdálenosti odpovídající citlivosti  $K$ . Nad a pod touto přímkou lze v určité vzdálenosti nastavit hraniční přímky, které udávají toleranci, s jakou jsme ochotni akceptovat rozptyl bodů kolem centrální přímky. Překročení těchto hranic vymezuje interval, ve kterém považujeme citlivost měření za konstantní, tj. lineární dynamický rozsah měřicího systému. Příklad 5% tolerance pro hodnotu  $K$  je znázorněn na obr. č. 1. Z důvodu velkého koncentračního rozsahu bylo pro koncentraci zvoleno logaritmické měřítko.



Obr. č. 1: Určení lineárního dynamického rozsahu měřicího zařízení

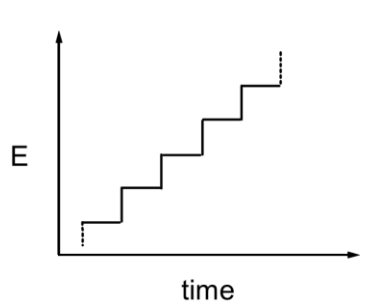
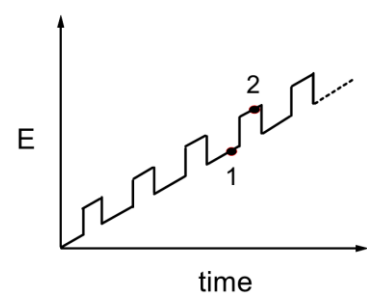
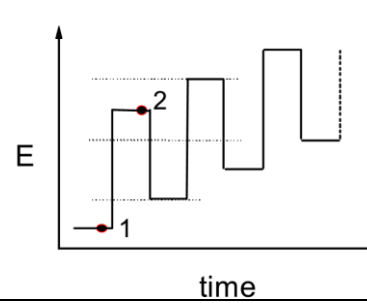
# Anodická rozpouštěcí voltametrie

## Teorie

Klasická voltametrie je založena na sledování proudu procházejícího elektrodami v závislosti na vkládaném potenciálu; signál závisí na koncentraci reagující látky v difuzní vrstvě a odezvou je, zejména v případě polarografie na kapající rtuťové elektrodě, polarografická vlna. Citlivost této techniky je možné zvýšit modifikací potenciálového programu nebo zařazením akumulčního kroku, který zvýší koncentraci analytu na elektrodě.

Jako modifikace potenciálového programu jsou typicky využívány různé druhy pulsních programů, které umožní zlepšit poměr proudu píku (faradaický) a proudu pozadí (kapacitní). Kromě toho transformuje pulsní program tvar odezvy z vlny na pík a tím zjednoduší vyhodnocení dat. Pulsní potenciálové programy se vzájemně liší tvarem pulsu a průběhem základní linie potenciálového programu; tvar nejběžnějších z nich je ukázán v tabulce 1.

Tabulka 1: Nejběžněji používané pulsní potenciálové programy

Technika	Potenciálový program
Schodovitá (staircase) voltametrie, SCV	
Diferenční pulsní voltametrie, DPV	
Voltametrie čtvercových vln (square wave voltammetry), SWV	

Akumulční krok může využívat různé fyzikální či chemické děje, nejběžnější je zřejmě elektrochemické vyloučení kovových iontů či sorpce na elektrodovém povrchu. Za pozornost v tomto případě stojí též fakt, že pokud příslušnému ději podléhá pouze část látek ve vzorku, je akumulací možné zvýšit selektivitu stanovení.

## Úkoly

Najděte optimální podmínky pro stanovení  $\text{Cd}^{2+}$  pomocí anodické rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie (AS-DPV) z hlediska depozičního potenciálu a času.

Ověřte, že je koncentrační závislost metody lineární v rozsahu  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  až  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a zjistěte mez stanovitelnosti metody.

Stanovte  $\text{Cd}^{2+}$  v neznámém vzorku metodou kalibrační přímky a standardního přídatku, porovnejte získané výsledky.

## Pracovní postup

Sestavte aparaturu: do měřicí cely napipetujte 10 ml 0,2M roztoku chloridu draselného, k přístroji Eco-Tribo Polarograph připojte referentní argentchloridovou elektrodu, pomocnou platinovou elektrodu, míchadlo a dusíkové bubláni. Spusťte program Polar Pro a připravte ho k měření podle pokynů dozoru.

Připravte k práci meniskem modifikovanou amalgámovou elektrodu: obnovte meniskus ponořením do rtuti, elektrodu připojte k přístroji a aktivujte ji vložением potenciálu  $-2,2 \text{ V}$  po dobu 5 minut v míchaném roztoku 0,2M chloridu draselného (metoda „Aktivace“).

Připravte základní elektrolyt – octanový pufr o pH 4 – smícháním 0,2M kyseliny octové a 0,2M hydroxidu sodného. Do měřicí cely napipetujte 10 ml octanového pufru a odstraňte kyslík z roztoku pětiminutovým probubláním dusíkem. Změřte AS-DP voltamogram tohoto základního elektrolytu (metoda „AS-DPV“, základní nastavení parametrů: akumulací potenciál  $-800 \text{ mV}$ ; akumulací čas 60 s; výška pulsu 50 mV; šířka pulsu 80 ms; rozsah měřených potenciálů od  $-800 \text{ mV}$  do  $-100 \text{ mV}$ ; rychlost skenu  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Stejně jako u všech následujících měření proveďte měření čtyřikrát a první získanou křivku nevyhodnocujte.

Ze základního elektrolytu připravte přidáním standardního roztoku  $\text{Cd}^{2+}$  roztok o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Změřte závislost výšky píku na akumulací potenciálu v rozsahu  $-600 \text{ mV}$  až  $-1000 \text{ mV}$ . Z výsledků vyberte optimální hodnotu, kterou budete používat při dalších měřeních. V dalším kroku podobným způsobem najděte optimální hodnotu akumulací času z rozsahu 0 s až 60 s.

Za nalezených optimálních podmínek změřte koncentrační závislost  $\text{Cd}^{2+}$  iontů v rozsahu  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  až  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Ověřte, jestli je změřená koncentrační závislost lineární. Roztok o nejnižší koncentraci změřte desetkrát a na základě směrodatné odchylky těchto měření spočítejte mez detekce a stanovitelnosti.

Vzorek  $\text{Cd}^{2+}$  o objemu 5 ml smíchejte s 5 ml octanového pufru a změřte jeho AS-DP voltamogram bez přídatku a s jedním a dvěma přídatky standardu  $\text{Cd}^{2+}$ ; objem přídatku volte tak, abyste jím koncentraci kadmiových iontů ve vzorku přibližně zdvojnásobili. Získaná data vyhodnoťte metodou standardního přídatku a metodou kalibrační přímky, získané výsledky porovnejte.

## Literatura

Barek, J., Opekar, F., Štulík, K.: Elektroanalytická chemie, Praha 2005

Opekar, F., Jelínek, I., Rychlovský, P., Plzák, Z.: Základy analytické chemie, Praha 2002

# Automatická potenciometrická titrace

## Teorie

K vypracování metody odměrného stanovení je třeba si nejen ověřit základní předpoklady o průběhu chemické reakce, které se má stát podkladem odměrného určení a navrhnout indikační metodu, ale z proměřených závislostí veličiny použité k indikaci na reakčních podmínkách stanovit takový soubor podmínek, kdy bude studovaná reakce probíhat stechiometricky, kvantitativně a dostatečně rychle.

Z literatury <sup>(1)</sup> je známo použití reakce manganatých iontů s manganistanovými v kyselém prostředí v přítomnosti difosforečnanu k vysoce selektivnímu stanovení manganu v metalurgii, při kterém ruší vanad.

Dvojmocný mangan se oxiduje na trojmocný a sedmimocný se redukuje rovněž na trojmocný, který je pevně vázán do komplexu  $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7)_3]^{3-}$  při  $\text{pH} = 2$  až  $5$ .

Stechiometrie předpokládané reakce, její kvantitativnost a rychlost bude tedy ovlivněna nejen koncentrací  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{MnO}_4^-$ , ale i aciditou a koncentrací  $(\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7)^{2-}$ . Pro ostatní faktory ovlivňující rychlost chemické reakce (iontová síla, teplota) budeme aplikovat obecně známé vztahy, tzn. v našem případě bude rychlost reakce zpomalována s rostoucí iontovou silou a samozřejmě urychlována s rostoucí teplotou.

Kyselina difosforečná je slabou čtyřsytnou kyselinou a její disociace je ovlivněna aciditou roztoku. Acidita roztoku tedy určuje i množství  $(\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7)^{2-}$ , resp.  $(\text{HP}_2\text{O}_7)^{3-}$ , v roztoku, které je vyjádřeno v procentech z celkového množství všech forem obsahujících pyrofosforečnan jako:

$$\% (\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7)^{2-} = \frac{\frac{K_1 \cdot K_2}{[\text{H}^+]^2} \cdot 100}{1 + \frac{K_1}{[\text{H}^+]} + \frac{K_1 \cdot K_2}{[\text{H}^+]^2} + \frac{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3}{[\text{H}^+]^3} + \frac{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot K_4}{[\text{H}^+]^4}}$$

kde  $K_1$  až  $K_4$  jsou konsektivní disociační konstanty. Je tedy zřejmé, že hlavním faktorem, uplatňujícím se při studiu uvedené reakce  $\text{Mn}^{2+}$ , bude vliv acidity.

Po proměření závislostí měřené veličiny na reakčních podmínkách (elektroodový potenciál  $E = f(\text{Mn}^{2+}, \text{MnO}_4^-, [\text{Mn}(\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7)_3]^{3-}, \text{H}^+)$ ) vybereme pro přímé stanovení optimální oblast reakčních podmínek a stanovíme její hranice. Samotná měření budeme provádět automatickým titračním zařízením s potenciometrickou indikací.

## Úkoly

Najděte optimální podmínky pro odměrné stanovení dvojmocného manganu manganistanem draselným a na jejich základě vypracujte pracovní návod pro toto stanovení. Navrženým postupem stanovte koncentraci manganatých iontů ve vzorku.

## Chemikálie

0,02 M  $\text{KMnO}_4$

0,025 M  $\text{MnSO}_4$ , slabě okyseleno  $\text{H}_2\text{SO}_4$

1,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$

čerstvý nasycený roztok  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$



## Pracovní postup

### a) Proměření vlivu acidity na reakci dvojmocného manganu s manganistanem draselným v prostředí difosforečnanu

Do titrační baňky odměřte 1 ml roztoku 0,025 M síranu manganatého, přidejte 20 ml nasyceného roztoku difosforečnanu sodného a pomocí automatického titrátoru upravte pH v rozmezí 2 – 9 (po jednotkách pH). Zaznamenejte spotřebu kyseliny sírové a doplňte vodou vždy na celkový objem 30 ml. Následně proveďte titraci roztokem 0,02 M  $\text{KMnO}_4$  s registrací titrační křivky.

### b) Proměření ostatních závislostí elektrodového potenciálu na reakčních podmínkách

Proměření vlivu množství manganaté soli a difosforečnanu sodného na sledovanou reakci proveďte ve zdůvodněných hranicích (tedy v takových koncentracích, ve kterých jsou ještě splněny teoretické požadavky, vyplývající ze stechiometrie reakce), při optimální aciditě, která bude konstantní pro všechna měření, stejně jako objem 30 ml.

Všechna tato měření budete provádět se zařízením pro automatické potenciometrické titrace s registrací potenciometrické křivky. V našem případě potřebujete znát nejen schematický průběh reakce, ale i absolutní měřené hodnoty, a je tedy nutné si popsat potenciálovou osu.

Po vymezení optimálních reakčních podmínek (reakce probíhá podle jedné stechiometrie kvantitativně a dostatečně rychle) si vypracujte vlastní návod pro stanovení manganaté soli a proveďte podle něho sérii titrací pomocí automatické potenciometrické titrace k potenciálu inflexe, který určíte z předchozích měření. Sérii výsledků zhodnoťte statisticky.

**Poznámka: Je nebezpečí, že se indikační elektroda zpasivuje vyloučením  $\text{Mn}^{(IV)}$ , zvláště v alkalických roztocích. Pak je nutné elektrodu reaktivovat podle pokynů dozoru úlohy.**

## Vyhodnocení výsledků

1. Ověřte platnost stechiometrie pro napsanou rovnici sledované reakce.
2. Graficky vyhodnoťte závislost formálních rovnovážných potenciálu na pH pro:  
 $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7)_3]^{3-} / \text{Mn}^{2+}$   
 $[\text{MnO}_4^- / \text{Mn}(\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7)_3]^{3-}$   
komplex s  $(\text{HP}_2\text{O}_7)^{3-}$ .
3. Vypočítejte a graficky vyhodnoťte závislost hodnoty rovnovážné konstanty reakce na pH.
4. Vypočítejte distribuční diagram pro  $(\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7)^{2-}$  a  $(\text{HP}_2\text{O}_7)^{3-}$ .
5. Najděte hranice oblastí hodnot reakčních podmínek, ve kterých lze provést stanovení, a vysvětlete, proč je stanovení neproveditelné za těmito hranicemi.
6. Napište návod pro odměrné stanovení manganaté soli manganistanem draselným v kyselém prostředí za přítomnosti difosforečnanu.
7. Statisticky zhodnoťte výsledky série stanovení obsahu manganatých iontů ve vzorku.

## Literatura

1. Lingane, J. J., Karplus, R.: Anal. Chem. 18, 191, 1946
2. Berka, A., Feltl, L., Němec, I.: Cvičení z kvantitativní analytické chemie. SPN, Praha 1967
3. Opekar, F., Jelínek, I., Rychlovský, P., Plzák, Z.: Základy analytické chemie, Praha 2002

## Konduktometrická titrace

### Teorie

Schopnost vodiče vést elektrický proud je charakterizována veličinou zvanou elektrická vodivost  $G$ . V elektrotechnické práci se místo ní častěji užívá její převrácené hodnoty – odporu  $R$ . Vodivost závisí na geometrickém tvaru vodiče, lineárně klesá s jeho délkou a stoupá s průřezem. Abychom tento vliv eliminovali, zavádíme takzvanou měrnou vodivost  $\kappa$ , pro niž platí:

$$\kappa = G \cdot L / A$$

kde  $A$  je průřez vodiče a  $L$  jeho délka.

V roztocích elektrolytů je vedení elektrického proudu uskutečňováno pohybem iontů přítomných v daném roztoku. Každý ion je charakteristický takzvanou iontovou vodivostí  $\lambda$  – mírou schopnosti vést elektrický proud. Příspěvky různých iontů k celkové vodivosti roztoku se sčítají, v případě vodivosti jednoho molu iontů jedné sloučeniny mluvíme o molární vodivosti  $\Lambda$ . Kromě druhu iontu a jeho náboje je vodivost závislá rovněž na jeho koncentraci v roztoku. V oblasti nižších koncentrací je závislost lineární, při vyšších koncentracích se od této jednoduché závislosti v důsledku interakce mezi ionty odchyluje. V určitém rozsahu koncentrací se pak řídí empirickým vztahem  $\Lambda = \Lambda_0 - k\sqrt{c}$ , kde  $\Lambda_0$  je takzvaná molární vodivost při nekonečném zředění a  $k$  je empirická konstanta.

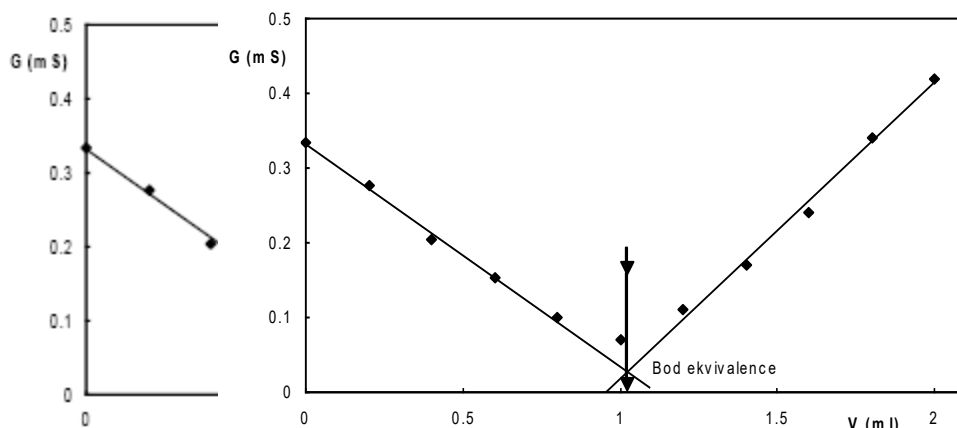
Většina iontů přispívá k vodivosti roztoku přibližně stejnou měrou, výjimkou jsou ionty hydroxidové a oxoniové, které mají ve vodných roztocích v důsledku přítomnosti vodíkových můstků měrnou vodivost řádově vyšší. Skutečnost, že vodivost zajišťují pouze ionty, má některé důležité důsledky. Sloučeniny, které se rozpouštějí bez tvorby iontů, jako například sacharidy ve vodě, vodivost roztoků neovlivňují. U sloučenin málo disociovaných, například slabých kyselin a zásad, přenáší elektrický proud jen disociovaná část látky, vodivost roztoku tedy není úměrná přímo celkové analytické koncentraci, ale závisí na stupni disociace látky.

Klasické uspořádání k měření vodivosti roztoků je dvojice platinových elektrod ve tvaru paralelně umístěných plíšků; nežádoucí polarizace elektrod je omezena použitím střídavého proudu. Modernější variantou je zapojení čtyřelektrodové, které možné interference dále zmenšuje tím, že proud prochází pouze vnější dvojicí elektrod, zatímco potenciál je měřen na vnitřní, bezproudově zapojené dvojici elektrod. Toto zapojení je vesměs realizované jako čtveřice prstencových elektrod. Vodivost změřená v elektrodové cele je ovlivněná jejími geometrickými parametry, takzvanou konstantou vodivostní nádoby  $\Theta = \kappa / G$  – není-li cela zkonstruována tak, aby měla tuto konstantu jednotkovou, je nutná její kalibrace roztokem o známé měrné vodivosti.

Konduktometrii lze použít pro rychlá stanovení v průmyslových roztocích obsahujících pouze jednu vodivou látku nebo pro určení celkového množství iontů v roztocích. Zajímavé možnosti přináší jako detekční technika v průtokových analytických metodách, například iontově výměnné chromatografii nebo kapilární elektroforéze. Jiné možné využití je konduktometrické sledování průběhu titrací. Vhodné je zejména u reakcí, při nichž dochází k výrazné změně vodivosti. Mezi ty patří zejména srážecí titrace, při nichž se mění celková koncentrace přítomných iontů, a acidobazické titrace, při nichž se mění koncentrace silně vodivých iontů.

V průběhu titrace silných kyselin silnou zásadou klesá před dosažením bodu ekvivalence vodivost roztoku v důsledku výměny vodivějších iontů  $H^+$  (vznikem molekul vody) za méně vodivé ionty z titračního činidla. Po dosažení bodu ekvivalence vodivost opět stoupá, tentokrát v důsledku přidavku vodivých  $OH^-$  iontů. V případě titrace slabých kyselin silnou zásadou počáteční část křivky mírně klesá, je konstantní nebo mírně stoupá, v závislosti na stupni disociace kyseliny a tím i na koncentraci  $H^+$  iontů. Bod ekvivalence je

určován jako průsečík přímek proložených body v oblasti před změnou sklonu závislosti a za ní. V oblasti této změny je závislost zakřivená, protože vodivost je určovaná ionty vznikající soli, a tyto hodnoty nejsou při vyhodnocování brány v úvahu (obr. č. 1).



Obr. č. 1: Titrační křivka acidobazické titrace silné kyseliny silnou zásadou, průběh reakce sledován konduktometricky. Naznačen způsob hledání bodu ekvivalence.

## Konduktometrické acidobazické titrace

### Úkoly

1. Proveďte titraci různě silných kyselin silnou bází jako titračním činidlem a porovnejte průběh jejich titračních křivek
2. Proveďte 10 opakovaných stanovení kyseliny borité za stejných podmínek a stanovte opakovatelnost výsledků.

### Chemikálie a přístroje

konduktometr AD8000 (Adwa Instruments) s elektrodovou celou CDC5070R (Radiometer Analytical)

magnetická míchačka včetně míchadélka

pipety, kádinky

titrační činidlo 2 M KOH

0,02 M roztoky kyselin:  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , HCl,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{ClCOOH}$ ,  $\text{CHCl}_2\text{COOH}$ ,  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ , HCOOH

### Pracovní postup

Odpipetujte 5 ml kyseliny a titrujte konduktometricky roztokem 2 M KOH. Znázorněte titrační křivky graficky a vysvětlete jejich průběh na základě hodnot disociačních konstant kyselin. Při statistickém vyhodnocení deseti opakovaných stanovení kyseliny borité vypočítejte odhad směrodatné odchylky, interval spolehlivosti pro 95% hladinu pravděpodobnosti, případně vylučte odlehlé výsledky.

### Literatura

Barek, J., Opekar, F., Štulík, K.: Elektroanalytická chemie, Praha 2005

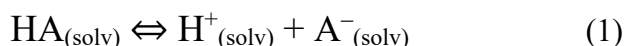
Opekar, F., Jelínek, I., Rychlovský, P., Plzák, Z.: Základy analytické chemie, Praha 2002

# Spektrofotometrie

## Stanovení disociační konstanty acidobazického indikátoru

### Teorie

Slabé kyseliny nebo báze disociují ve vodných roztocích jen omezeně; acidobazické indikátory se chovají buď jako slabé kyseliny nebo slabé báze. Kvantitativní mírou disociace je hodnota disociační konstanty. Pro slabou jednosytnou kyselinu platí:



$$K = \frac{a_{\text{H}^+_{(\text{solv})}} \cdot a_{\text{A}^-_{(\text{solv})}}}{a_{\text{HA}_{(\text{solv})}}} \quad (2)$$

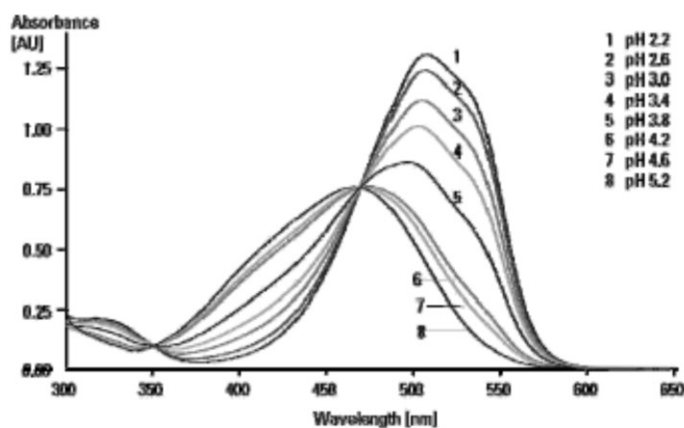
$$\text{pH} = \text{p}K + \log \frac{a_{\text{A}^-_{(\text{solv})}}}{a_{\text{HA}_{(\text{solv})}}} \quad (3)$$

Hodnotu disociační konstanty lze tedy vypočítat změřením aktivit solvatovaného protonu, aniontu kyseliny a nedisociované formy kyseliny.

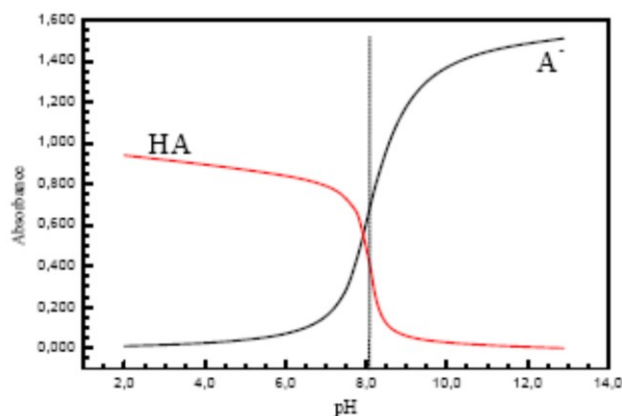
Absorbuje-li solvatovaná forma aniontu, či nedisociované kyseliny elektromagnetické záření ve vhodné oblasti vlnových délek, je možno k měření jejich aktivit použít spektrofotometrickou metodu.

Se změnou pH se bude rovnováha popsaná rovnicí (1) posouvat doleva nebo doprava. V silně kyselém prostředí tedy bude aktivita  $a_{\text{A}^-_{(\text{solv})}}$  velmi malá, zatímco v zásaditém prostředí bude zanedbatelná aktivita  $a_{\text{HA}_{(\text{solv})}}$ .

Vlnovou délku odpovídající jednoduché rovnováze  $\text{A}^-/\text{HA}$  označujeme jako isobestický bod a v tomto bodě se budou protínat všechny křivky závislosti absorbance na vlnové délce  $\lambda$  (obr. č. 1). Intenzita zabarvení při vlnové délce odpovídající absorpci  $\text{A}^-_{(\text{solv})}$  se bude zvětšovat se zvyšujícím se pH, zatímco pro  $\text{HA}_{(\text{solv})}$  se bude snižovat se zvyšujícím se pH.



Obr. č. 1: Absorpční spektra roztoků methylové oranže při různých hodnotách pH roztoku



Obr. č. 2: Závislost absorbance disociované formy ( $A^-$ ) a nedisociované formy (HA) acidobazického indikátoru na hodnotě pH roztoku (měřeno při vlnových délkách maxim disociované formy ( $A^-$ ) a nedisociované formy (HA))

Závislost absorbance kterékoliv formy ( $A^-_{(solv)}$ ,  $HA_{(solv)}$ ) na pH bude sigmoidní křivka symetrická podle bodu inflexe (obr. č. 2), ve kterém je  $pK = pH$ , neboť  $\log(a_{A^-_{(solv)}}/a_{HA_{(solv)}}) = 0$ , viz rovnice (3). Z uvedeného vyplývá, že je několik možných metod zjištění  $pK$ .

Pro analytickou koncentraci indikátoru platí:

$$c_{HA} = [HA] + [A^-]$$

a měřená hodnota absorbance při určité vlnové délce je:

$$A = \varepsilon_{HA} \cdot [HA] + \varepsilon_{A^-} \cdot [A^-]$$

Výraz pro disociační konstantu můžeme přepsat do tvaru:

$$K = c_{H^+} \cdot \frac{A_\lambda - \varepsilon_{A^-} \cdot c_{HA}}{\varepsilon_{A^-} \cdot c_{HA} - A_\lambda}$$

### Úkol

Zjistěte hodnotu kyselé disociační konstanty vzorku acidobazického indikátoru. Použijte spektrofotometrickou metodu.

### Přístroje a chemikálie

Spektrofotometr Pye-Unicam PU 8800 (Philips-Unicam, Cambridge, Anglie) připojený k řídicímu počítači a ovládaný vytvořeným software (Labview, National Instruments, USA); skleněné kyvety s tloušťkou absorpční vrstvy 10,00 mm

Laboratorní pH metr AD 1020 (ADWA, Rumunsko) s kombinovanou skleněnou elektrodou, nakalibrovaný standardními kalibračními roztoky o pH 7,00 a 4,00; magnetická míchačka

50 ml odměrné baňky, automatická byreta, kádinky, automatické pipety

Standardní Brittonův – Robinsonův pufr daných hodnot pH, který připravíte smícháním složky **A** a **B** ve vhodném poměru. Roztok **A** obsahuje  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaOH a roztok **B**  $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{CH}_3\text{COOH}$  a  $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Pro požadované pH smíchejte 50 ml roztoku **B** s  $x$  ml roztoku **A**, podle následující tabulky:

<i>pH</i>	<i>x ml A</i>	<i>pH</i>	<i>x ml A</i>	<i>pH</i>	<i>x ml A</i>	<i>pH</i>	<i>x ml A</i>
1,81	0	4,35	13,75	7,00	26,25	9,91	38,75
1,89	1,25	4,56	15	7,24	27,5	10,38	40
1,98	2,5	4,78	16,25	7,54	28,75	10,88	41,25
2,09	3,75	5,02	17,5	7,96	30	11,20	42,5
2,21	5	5,33	18,75	8,36	31,25	11,40	43,75
2,36	6,25	5,72	20	8,69	32,5	11,58	45
2,56	7,5	6,09	21,25	8,95	33,75	11,70	46,25
2,87	8,75	6,37	22,5	9,15	35	11,82	47,5
3,29	10	6,59	23,75	9,37	36,25	11,92	48,75
3,78	11,25	6,80	25	9,62	37,5	11,98	50
4,10	12,5						

**Dosaženou hodnotu pH pufru vždy kontrolujte pH metrem! Při práci s pH metrem dejte pozor, aby nedošlo k rozbití baničky měrné elektrody – je z tenkého skla.**

### Pracovní postup

1. Proved'te orientační měření, při kterém nejdříve zjistíte zabarvení disociované a nedisociované formy indikátoru: v kádinkách v malém množství kyselé složky **B** Brittonova–Robinsonova pufru i alkalické složky **A** rozpust'te trochu vzorku indikátoru a zapíšte si zabarvení jak disociované (alkalické) tak nedisociované (kyselé) formy indikátoru. Dále pak zjistíte alespoň přibližnou hodnotu pH pro barevný přechod indikátoru. Přitom vycházejte z rovnice (3). Přibližné určení  $pK$  proved'te takto: do menší kádinky, která se vejde pod hlavici pH–metru, odměřte odměrným válcem 50 ml kyselé složky **B** Brittonova–Robinsonova pufru a přidejte 1 ml vzorku indikátoru. K takto připravenému roztoku přidávejte z automatické byrety alkalickou složku **A** pufru a sledujte změny zabarvení vzorku indikátoru; změní-li indikátor zabarvení tak, že tato barva bude odpovídat přibližnému zastoupení disociované a nedisociované formy v poměru 1 : 1, odeč'tete hodnotu pH. Tato hodnota odpovídá přibližně hodnotě  $pK$ . Během tohoto experimentu sledujte, zda váš vzorek indikátoru nejeví dva barevné přechody. Pokud ano, zajímá nás vždy až ten přechod při vyšší hodnotě pH.
2. Znáte-li přibližnou hodnotu pH barevného přechodu, připravte do 50 ml odměrných baněk zásobní roztoky proměřovaného vzorku (celkem 12 roztoků); výsledná koncentrace je vždy uvedena na lahvičce se vzorkem indikátoru. Odměrky s indikátorem doplňte po rysku připraveným pufrům o určité hodnotě pH. pH pufrů volíme tak, abyste obsáhli barevný přechod indikátoru ( $\pm 1,5$  jednotky pH od orientačně určené hodnoty pH) a dále pH samotné disociované  $A^-(\text{solv})$  a nedisociované  $HA(\text{solv})$  formy.
3. Pečlivě proměřte spektra ve viditelné oblasti všech dvanácti roztoků a odeč'tete z nich polohu maxim absorpce pro disociovanou a nedisociovanou formu a polohu isosbestického bodu. Ovládání spektrofotometru a řídicího software je popsáno níže.
4. Při vlnových délkách absorpčních maxim a pro hodnoty pH, při kterých předpokládáte jen disociovanou a jen nedisociovanou formu indikátoru, proměřte koncentrační závislost. V alkalické oblasti volte koncentrační rozsah tak, aby nejvyšší bod kalibrace odpovídal vyznačené koncentraci na lahvičce se

vzorkem indikátoru. V kyselé oblasti pak volte koncentrační rozsah tak, aby nejvyšší bod kalibrace odpovídal dvojnásobku uvedené koncentrace (nižší hodnota molárního absorpčního koeficientu pro vlnovou délku nedisociované formy).

### Ovládání spektrofotometru a řídicího software

Registrační spektrofotometr PU 8800, na kterém proměřujete spektra a kalibrační závislosti, může pracovat samostatně bez nutnosti připojení řídicího počítače; v tomto případě však není možné provést elektronické vyhodnocení změřených spekter ani kalibračních závislostí. Pro komunikaci s počítačem je spektrofotometr vybaven sériovým rozhraním RS-232C, přes které je možné ho řídit, nastavovat podmínky měření, spouštět měření a také sbírat naměřená data. Pro oboustrannou komunikaci se spektrofotometrem je možné použít řídicí program vytvořený v grafickém programovacím prostředí LabView pro Windows firmy National Instruments.

Postup je následující: nejdříve zapněte spektrofotometr hlavním vypínačem a počkejte na proběhnutí testovacího programu; zapněte řídicí počítač a přihlaste se do profilu „Praktika“.

Proveďte inicializaci spojení spektrofotometru s počítačem – na panelu spektrofotometru postupně zmáčkněte následující tlačítka: „\*“, „MODIFY“, „ENTER“, „ENTER“ a otočte klíčkem do polohy „LOCK/REMOTE“. Tímto je spektrofotometr přepnut do modu řízení počítačem. Do kyvetového prostoru vložte obě kyvety naplněné destilovanou vodou.

Na počítači spusťte program „LabView“ a po jeho inicializaci otevřete vytvořený program „Měření spekter.vi“ uložený v adresáři „Praktika“.

Na čelním panelu tohoto programu navolte přímo parametry měření: „Počáteční vlnová délka: 700 nm“, „Konečná vlnová délka: 400 nm“, „Rychlost snímání spektra: 2 (5) nm/s“, „Šířka spektrálního intervalu: 1 nm“, „Krok digitalizace spektra: 1 nm“ a odešlete je do spektrofotometru tlačítkem „Parametry měření“ nebo vyberte z nabídky přednastavený soubor parametrů „Praktika 1“ a přímo jej odešlete do spektrofotometru. Tlačítkem „Base line“ vynulujte základní linii v měřeném rozsahu vlnových délek. Vložte kyvetu s prvním měřeným roztokem a tlačítkem „Měření“ odstartujte měření spektra. V dialogovém okně musíte vyplnit název ukládaného souboru. Po skončení měření se výsledné spektrum objeví na obrazovce počítače a zároveň je uloženo na harddisk počítače. Postupně proměřte všechny vzorky.

### Vyhodnocení výsledků

Z digitalizovaných spekter odečtěte příslušné hodnoty absorbancí při vlnových délkách obou absorpčních maxim a vynesete je proti pH. Podobně vyhodnoťte spektra z kalibračních závislostí. Všechny změřené závislosti zpracujte graficky. Ze všech změřených závislostí vyhodnoťte:

- $\lambda_{\max}$  pro  $A^-(\text{solv})$  a  $HA(\text{solv})$
- isosbestický bod
- molární absorpční koeficient ( $\epsilon_\lambda$ ) pro  $A^-(\text{solv})$  a  $HA(\text{solv})$  při obou maximem absorpce
- hodnotu  $pK$  graficky i výpočtem z hodnot  $\epsilon_\lambda$ .

Pro výpočet disociační konstanty použijte hodnoty změřené jen při pH roztoků pufrů v okolí inflexního bodu dané závislosti  $A_\lambda$  na pH.

# Atomová absorpční spektrometrie

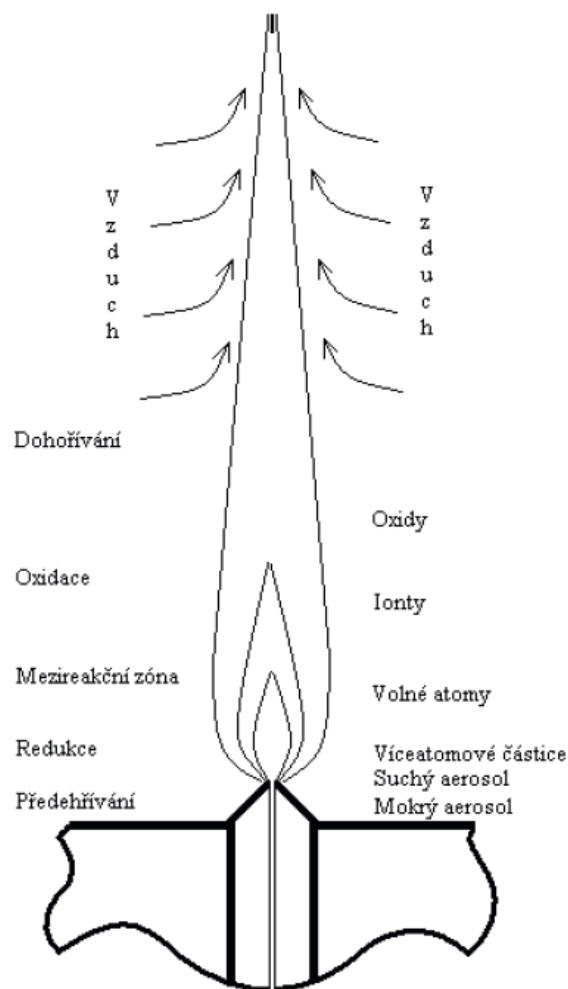
## Optimalizace podmínek měření při práci s AAS

### Teorie

#### 1. Optimalizace pracovních podmínek

Jedním z prvních úkolů při práci s atomovým absorpčním spektrometrem (AAS) je vždy nalezení (později již jen nastavení a ověření) optimálních přístrojových parametrů pro stanovení zadaného prvku. Snahou je nastavením těchto podmínek dosáhnout co nejvyšší citlivosti stanovení a zároveň minimalizovat interference rušivých složek matrice, pokud je to změnou přístrojových parametrů možné. Jde o tyto parametry:

- **vlnová délka ( $\lambda$ )** (při které měříme; je uvedena v přístrojovém manuálu; u řady prvků lze volit z několika čar; zpravidla se volí nejcitlivější čára)
- **šířka spektrálního intervalu ( $\Delta\lambda$ )** (je uvedena pro příslušnou vlnovou délku daného prvku v manuálu; selektivita vs. citlivost stanovení)
- **žhavicí proud výbojky s dutou katodou (HCL)** (opět doporučen výrobcem; kompromisem mezi životností výbojky a citlivostí měření)
- **vycentrování výbojek** v optické ose pomocí otočných šroubů na patici výbojek a **přesné nastavení vlnové délky** pro zajištění maximální intenzity záření
- **plamenový profil** (hledá se optimální výška plamene od ústí hořáku, ve které prochází měřicí paprsek atomizačním prostředím; viz ilustrační obrázek)
- **účinnost zmlžování** (poloha tříštící kuličky před ústím nasávací kapiláry)
- **složení plamene** (poměr oxidantu – vzduchu a paliva – acetylenu)



#### 2. Určení koncentrace vzorku

Po nastavení optimálních parametrů pro stanovení daného prvku je možné začít vlastní stanovení. Měřit lze jednak metodou kalibračního grafu a jednak metodou standardního přídávku. Metoda standardního přídávku se používá v případě sady menšího počtu vzorků, u kterých není dostatečně známo složení matrice nebo je matrice variabilní. Metoda kalibračního grafu se používá pro sadu velkého počtu vzorků, u které je složení matrice alespoň přibližně známo, a složení této matrice je zohledněno při přípravě odpovídajících standardních (kalibračních) roztoků.



### 3. Fyzikální interference

Výsledek analýzy mohou ovlivnit také mnohé fyzikální vlastnosti vzorku. Mezi takové fyzikální vlastnosti vzorku patří hustota, viskozita a povrchové napětí kapalin, které mají vliv především na transport vzorku ke zmlžovači a účinnost nebulizace (tvorby jemného aerosolu).

### 4. Závislost mezi šířkou spektrálního intervalu a linearitou a citlivostí kalibrace

Šířka spektrálního intervalu má vliv na hodnotu lineárního dynamického rozsahu a směrnici kalibrační křivky (citlivost).

### 5. Ionizační a chemické interference

#### a) Ionizační interference

Některé prvky, jako např. vápník a hliník, potřebují pro svoji atomizaci dodat více energie, než dodává plamen acetylen – vzduch. Je proto nutné pracovat v plameni acetylen – oxid dusný. Zároveň ovšem např. u vápníku a barya dochází v plameni acetylen - oxid dusný k částečné ionizaci, která negativně zkresluje naměřené hodnoty. K roztokům těchto prvků je třeba přidat tzv. ionizační pufr, tedy sloučeninu prvku s menším ionizačním potenciálem, jako je např. draslík nebo cesium. Přítomnost ionizačního pufru vede k potlačení ionizace stanovovaného prvku v plameni acetylen – oxid dusný.

#### b) Chemické interference

V případě stanovení např. Ca v přítomnosti Al nebo Cr v přítomnosti Fe je třeba pracovat v plameni acetylen – oxid dusný. Tyto prvky spolu tvoří tzv. termostabilní sloučeniny a pro jejich disociaci je třeba větší množství energie než je schopen dodat plamen acetylen – vzduch. Energie dodávaná plamenem acetylen – oxid dusný je ale až příliš velká, dochází tak zároveň k nežádoucí ionizaci vápníku. Pro stanovení vápníku je proto nutné do zmlžovaného roztoku přidat tzv. ionizační pufr.

### Úkol

Proměřte vliv vybraných přístrojových parametrů na stanovení vybraných prvků metodou atomové absorpční spektrometrie.

### Přístroje a pomůcky

AA-spektrometr 933AA (GBC, Austrálie), odměrné nádoby

*S obsluhou přístroje GBC vás seznámí dozor úlohy.*

### Chemikálie

standardní roztoky  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  o koncentraci  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , standardní roztok  $\text{Al}^{3+}$  o koncentraci  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a standardní roztok obsahující  $100\,000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \text{K}^+$

### Příprava roztoků

*Nejprve si připravte všechny potřebné roztoky pro celou úlohu, měření všech bodů postupu bude probíhat v jednom bloku.*

Všechny roztoky připravujte ve 100ml odměrných baňkách. Před doplněním deionizovanou vodou po rysku přidejte vždy 1 ml koncentrované  $\text{HNO}_3$ .

**Sada roztoků A1 - A6** Roztoky  $Zn^{2+}$  iontů o výsledných koncentracích 0,0 (blank); 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

**Sada roztoků B1 - B4** Čtyři baňky obsahující 10,0 ml vzorku na stanovení Zn (nejdříve doplňte odměrku po rysku deionizovanou vodou!). Do baněk č. 2, 3 a 4 postupně přidejte 0,1; 0,2 a 0,3 ml zásobního roztoku o koncentraci 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   $Zn^{2+}$  iontů.

**Sada roztoků C1 - C3** Tři roztoky  $Zn^{2+}$  iontů o výsledné koncentraci 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  s rostoucí koncentrací methanolu: 0; 20 a 50 % (v/v).

**Sada roztoků D1 - D5** Roztoky  $Ni^{2+}$  iontů o výsledné koncentraci 2; 5; 10; 15 a 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

**Sada roztoků E1 - E6** Roztoky o výsledné koncentraci  $Ca^{2+}$  iontů 2,0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , s postupně vzrůstající koncentrací  $K^+$  iontů: 0; 100; 500; 1 000; 2 000 a 5 000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   $K^+$  iontů.

**Sada roztoků F1 - F4** Roztoky s výslednou koncentrací  $Ca^{2+}$  iontů 5,0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a  $K^+$  iontů 2 000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , se vzrůstající koncentrací  $Al^{3+}$  iontů: 0; 10; 50 a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

## Pracovní postup

*S atomovým absorpčním spektrometrem pracujte pouze za dohledu pedagogického dozoru. Nikdy přístroj nezapínejte sami, hrozí nebezpečí výbuchu. Při práci s plamenovou technikou mějte vždy zapnutý laboratorní plášť a nasazené ochranné brýle!*

## Před měřením:

- zapněte odtah zplodin (vypínač z boku digestoře), **hlavní odtah musí být vždy otevřen!**
- otevřete tlakové lahve s plyny (vzduch, acetylen, oxid dusný)
- zapněte spektrometr a počítač
- po inicializaci spektrometru zapněte program ovládání spektrometru ikonou **GBC RUN**, umístěnou na ploše počítače – dojde k inicializaci spojení počítače se spektrometrem a současně se objeví **hlavní okno** (Main Control) ovládacího programu
- k patici **č. 1** připojte výbojku s dutou katodou (HCL) pro stanovení zinku a vložte ji do karuselu spektrometru (umístěný v levé části přístroje)
- ověřte, že máte nastavený správný typ hořáku pro základní směs acetylen : vzduch (AIR-ACET). **Výměna hořáku se provádí v přítomnosti pedagogického dozoru!**

## Ovládání spektrometru:

### HLAVNÍ OKNO

- překontrolujte nastavení **System Type**; v průběhu celého praktika musí být nastaven mód **Flame**
- kliknutím na **Load Application** vyberte příslušnou metodu:
- pro stanovení zinku zvolte uloženou metodu **ZINEK Zn Praktika ZS** (ZS = zimní semestr)

- mezeríkem potvrďte, že máte vloženou správnou výbojku s dutou katodou, tedy tu pro stanovení zinku (červenobíle blikající hláška ve spodní části obrazovky: *Move turret to correct lamp, space when ready*)
- v části **Application parameters** si prohlédněte nastavené hodnoty a zkontrolujte správnost nastavené vlnové délky, napájecího proudu a šířky spektrálního intervalu, pokud hodnoty nesouhlasí s tabulkou. č. 1 (na konci návodu), opravte je (symbolem desetinných míst je tečka!)
- případné změny potvrďte na konci tabulky příkazem **Save Application Parameters** a stisknutím klávesy **Y** (YES). Klávesou **ESC** se vraťte do hlavního okna.
- kliknutím na **Run Parameters** otevřete stejnojmenné okno a kliknutím na **Report Control** vyberte u položky **Sample Labels File Name** soubor **PRAKTIKA**, klávesou **ESC** se vraťte do hlavního okna
- pomocí příkazu **Alignment** proveďte vycentrování výbojky: to se provádí pomocí dvojice šroubů umístěných v karuselu výbojky s dutou katodou; cílem je dosáhnout co nejvyšší intenzity záření dopadajícího z výbojky na detektor (sledujte levou část obrazovky označenou **Sample HC signal**) a otáčejte šrouby pro dosažení maximální kladné výchylky; recalibrace se provádí klávesou **mezerík**). Poznamenejte si do protokolu hodnotu EHT uvedenou ve voltech. Po vycentrování výbojky se vraťte klávesou **ESC** do hlavního okna.

## OKNO MĚŘENÍ

- klávesou **F2** přejděte do okna měření (klávesou **ESC** se můžete vrátit zpět)
- stisknutím klávesy **F7** otevřete okno **Results Menu**, ve kterém klikněte na **Clear Results File** a potvrďte klávesou **Y** (YES), čímž si připravíte nový prostor pro záznam vašich měření, klávesou **ESC** se vraťte do okna měření
- za přítomnosti pedagogického dozoru zapalte plamen krátkým stisknutím tlačítka **AIR ACET** na levé přední části spektrometru a ihned dalším krátkým stiskem tlačítka **IGNITION** (*Vypnutí plamene se provádí krátkým stisknutím tlačítka **AIR ACET***)
- nasávejte deionizovanou vodu a stiskněte tlačítko **F10**, čímž spustíte automatický režim měření (dojde k automatickému vynulování spektrometru). V tomto režimu budete využívat pouze dvě tlačítka:
  - F4** – nulování na aktuální experimentální podmínky
  - Mezerík** – měření signálu (dle nastavených parametrů)
- do vašich laboratorních deníků si zapisujte průměr (Mean) ze tří měření a hodnotu relativní směrodatné odchylky (%RSD); oba údaje se objeví krátce po stisknutí tlačítka **mezerík** na monitoru počítače

## 1. Optimalizace pracovních podmínek (Zn<sup>2+</sup>)

### a) plamenový profil

Zmlžujte připravený roztok A6 (0,5 µg·ml<sup>-1</sup> Zn<sup>2+</sup>) při různé výšce paprsku nad horní hranou hořáku. Vzájemná poloha paprsku a hrany hořáku je vyjádřena v relativních stupních 0 – 10, stupnice je v pravé části od hořáku. Proměřte závislost absorbance na relativní výšce pro hodnoty 9, 8, 7, 6, 5 a 4 nastavitelné posuvným šroubem ve **vertikálním směru** (pod hořákem). **Po každé změně výšky hořáku je nutné vynulovat přístroj na deionizovanou vodu!** Po skončení vraťte hořák do polohy, ve které jste dosáhli maximální absorbance a přístroj znovu vynulujte na deionizovanou vodu.

## b) poměr palivo : oxidant

Regulátorem průtoku oxidantu upravte průtok vzduchu (modrá) na hodnotu 7,5 dílku stupnice (*tento průtok zůstane po celou dobu měření konstantní*), regulátorem průtoku paliva (červená) upravte průtok acetyleny na hodnotu 2,0 dílku stupnice a přístroj opět vynulujte na deionizovanou vodu. Postupným zmlžováním téhož roztoku zinku (A6) při různém průtoku acetyleny změřte závislost absorbance na poměru palivo : oxidant. Průtok acetyleny (červená) měňte v rozmezí 2,0 - 4,0 dílku s krokem po 0,5 dílku stupnice. **Po každé změně průtoku acetyleny je nutné vynulovat přístroj na deionizovanou vodu!** Po skončení této části optimalizace vraťte průtok acetyleny na hodnotu, při které jste dosáhli maximální absorbance a přístroj vynulujte na deionizovanou vodu.

## 2. Kalibrační závislost, určení charakteristické koncentrace ( $Zn^{2+}$ )

### a) normální kalibrace

Vynulujte přístroj na deionizovanou vodu a změřte postupně absorbanci sady roztoků A1- A6 s rostoucí koncentrací  $Zn^{2+}$  ionů a následně váš vzorek. Zvolte vhodné nařazení tak, aby signál vašeho vzorku spadl do lineární části kalibrační závislosti.

### b) metoda standardního přídatku

Vynulujte přístroj na deionizovanou vodu a změřte postupně všechny roztoky sady B1 - B4 s rostoucí koncentrací přídatku  $Zn^{2+}$  iontů.

## 3. Fyzikální interference, viskozita rozpouštědla ( $Zn^{2+}$ )

Nastavte přístrojovou nulu na deionizovanou vodu a proměřte roztoky sady C1 - C3 s různým obsahem methanolu. Do odměrného válce o objemu 10 ml odměřte postupně všechny tři roztoky a zjistěte nasátý objem jednotlivých roztoků vstupní kapilárou za minutu.

Po změření všech vzorků obsahující zinečnaté ionty ukončete měřicí program klávesou **F10** a klávesou **ESC** přejděte do hlavního okna.

Vypněte plamen krátkým stisknutím tlačítka **AIR ACET** na levé přední straně spektrometru.

## 4. Závislost mezi šířkou spektrálního intervalu a linearitou a citlivostí kalibrace ( $Ni^{2+}$ )

Od patice č. 1 odpojte HCL pro stanovení zinku a připojte HCL pro stanovení niklu a vložte ji do karuselu.

Výšku paprsku nad hranou hořáku a průtoky paliva a oxidantu nechte na stejných hodnotách jako pro stanovení Zn.

### HLAVNÍ OKNO

- vyberte metodu: **NIKL Ni Praktika ZS**
- mezerníkem potvrďte správnost vložené výbojky
- prohlédněte si nastavené hodnoty a zkontrolujte správnost nastavené vlnové délky, napájecího proudu a šířky spektrálního intervalu – pokud hodnoty nesouhlasí s tabulkou č. 1, opravte je.
- případné změny potvrďte

## OKNO MĚŘENÍ

- přejděte do okna měření
- připravte si nový prostor pro záznam vašich měření
- za pedagogického dozoru zapalte plamen
- nasávejte deionizovanou vodu a spusťte automatický režim měření
- postupně proměřte připravené roztoky sady D1 – D5, mezi jednotlivými měřeními vždy zmlžujte deionizovanou vodu.

Po proměření celé sady roztoků změňte hodnotu velikosti spektrálního intervalu na 0,3 nm a vynulujte přístroj na deionizovanou vodu. Opět proměřte všechny roztoky téže sady a stejným způsobem postupujte i v případě šířky spektrálního intervalu 0,5 nm. Pro změnu šířky spektrálního intervalu je nutné klávesou **F10** vždy vypnout a po nastavení opět zapnout měřicí režim.

Po změření všech vzorků obsahujících nikelnaté ionty ukončete měřicí program a přejděte do hlavního okna.

Vypněte plamen krátkým stisknutím tlačítka **AIR ACET**.

## 5. Ionizační a chemické interference při stanovení $\text{Ca}^{2+}$

Připojte HCL pro stanovení vápníku (patice č. 1)

## HLAVNÍ OKNO

- vyberte metodu: **VAPNIK Ca Praktika ZS**
- mezerníkem potvrďte správnost vložené výbojky
- prohlédněte si nastavené hodnoty a zkontrolujte správnost nastavené vlnové délky, napájecího proudu a šířky spektrálního intervalu – pokud hodnoty nesouhlasí s tabulkou č. 1, opravte je.
- případné změny potvrďte

## OKNO MĚŘENÍ

- přejděte do okna měření
- připravte si nový prostor pro záznam vašich měření
- za pedagogického dozoru zapalte plamen
- nastavte průtok acetylenu na hodnotu 2,5 dílku, průtok vzduchu ponechte na hodnotě 7,5 dílku
- nasávejte deionizovanou vodu a spusťte automatický režim měření
- postupně proměřte všech šest připravených roztoků sady E1 - E6 a všechny čtyři roztoky sady F1 - F4, mezi jednotlivými měřeními vždy zmlžujte deionizovanou vodu.

Po změření všech vzorků vypněte plamen krátkým stisknutím tlačítka **AIR ACET**.

## VÝMĚNA HOŘÁKU - *Výměna hořáku se provádí v přítomnosti pedagogického dozoru!*

Vyjměte hořák pro základní směs acetylen : vzduch (AIR-ACET) a vložte hořák pro směs acetylen : oxid dusný ( $\text{N}_2\text{O}$ -ACET).

- za pedagogického dozoru zapalte plamen krátkým stisknutím tlačítka  **$\text{N}_2\text{O}$  ACET** na levé přední části spektrometru a ihned dalším krátkým stiskem tlačítka **IGNITION**
- nasávejte deionizovanou vodu a přístroj vynulujte

- postupně opět proměřte všech šest připravených roztoků sady E1 - E6 a všechny čtyři roztoky sady F1 - F4

Po změření všech vzorků vypněte plamen krátkým stisknutím tlačítka **N2O ACET**, ukončete měřicí program klávesou **F10** a klávesou **ESC** přejděte do hlavního okna.

Opětovným stiskem klávesy **ESC** a tlačítka **y** (YES) zavřete ovládací program, **vypněte spektrometr, tlakové lahve a na závěr i odtah.**

### Vyhodnocení výsledků

1. Vyneste do grafu závislost absorbance na výšce paprsku nad hranou hořáku, do dalšího grafu vyneste závislost absorbance na průtoku paliva.
2. Zjistěte obsah  $Zn^{2+}$  ve vzorku jak metodou kalibračního grafu, tak metodou standardního přídatku. Zjistěte charakteristickou koncentraci pro toto stanovení Zn za daných podmínek měření.
3. Vyneste do grafu závislost absorbance Zn na koncentraci methanolu a zároveň závislost mezi hodnotou absorbance a množstvím nasátého roztoku.
4. Vyneste do grafu kalibrační křivky pro Ni při různé šířce spektrálního intervalu. Neprokládejte celou kalibrační závislost lineárně!!! Zhodnoťte vliv šířky štěrbinu na linearitu a citlivost stanovení.
5. a) Vyneste do grafu závislost absorbance Ca na koncentraci ionizačního pufru po oba druhy plamene a porovnejte dosaženou citlivost. Určete minimální koncentraci  $K^+$  potřebnou pro potlačení ionizace Ca.  
b) Vyneste do grafu závislost mezi absorbancí Ca a koncentrací  $Al^{3+}$  pro oba druhy plamene a diskutujte získané výsledky.

Tabulka č. 1: Výňatek z tabulky doporučení výrobce výbojek s dutou katodou (HCL)

ELEMENT		FILL GAS / WINDOW	CURRENT (mA)		WAVELENGTH (nm)	RECOM. SLIT (nm)	RELATIVE SENSITIVITY	RELATIVE INTENSITY
			MAX.	RECOM.				
Ca	Calcium	N / Q	10	10	422,7	0,5	1	100
					239,9	0,2	200	10
Ni	Nickel	N / Q	10	4	232,0	0,2	1	5
					352,5	0,2	5	100
					351,5	0,2	10	30
					362,5	0,2	500	10
Zn	Zinc	N / Q	10	5	213,9	0,5	1	100
					307,6	1,0	8000	60
Co / Ni	Cobalt / Nickel	N / Q	15	10	240,7 / 232,0	0,2	N/A	N/A
								multielement lamp

### Literatura

*základní:* Opekar, F. a kol.: Základní analytická chemie, Karolinum, Praha 2002

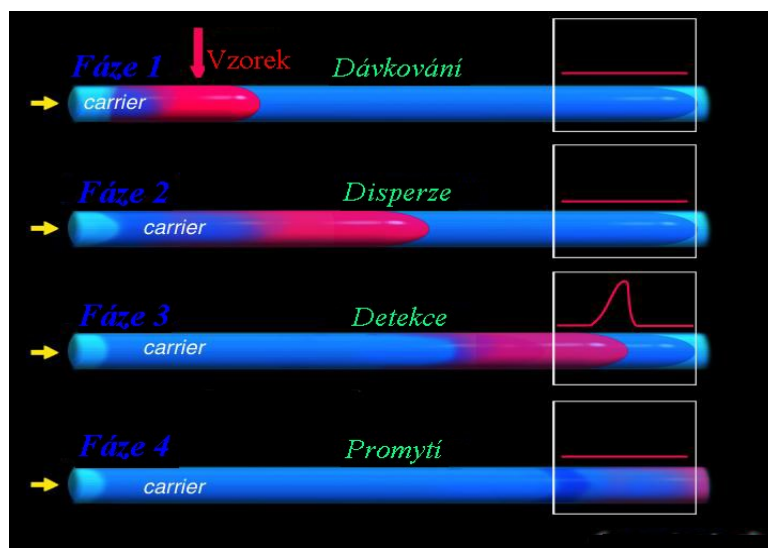
*doporučená:* Němcová, I. a kol.: Spektrometrické analytické metody I, Karolinum, Praha 2004

*rozšiřující:* Komárek, J.: Atomová absorpční spektrometrie, MU, Brno 2000

## Průtoková injekční analýza se spektrofotometrickou detekcí: disperze vzorku v proudu kapaliny

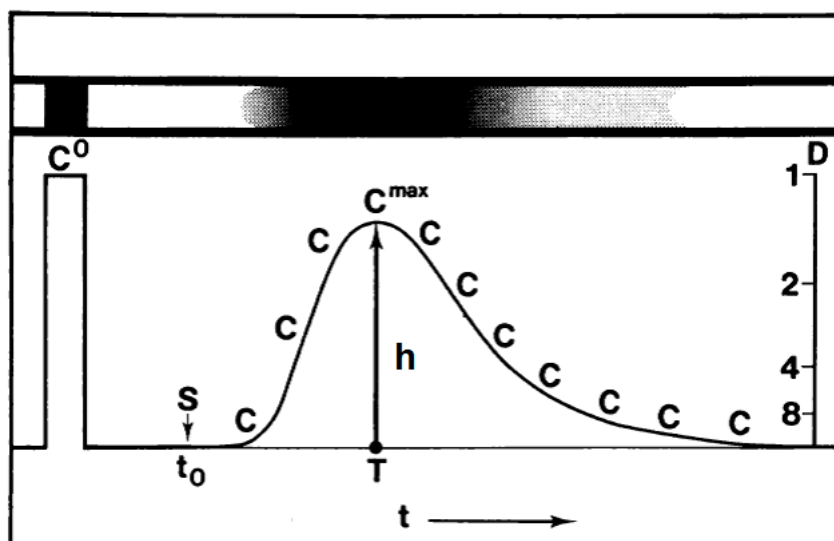
### Teorie

Průtoková injekční analýza (FIA – Flow Injection Analysis) je analytická metoda v průtokovém uspořádání, založená na vstřikování vzorku do plynulého toku reagentů (obr. č. 1). Zóna vzorku je v nosném toku dispergována vlivem pohybu a rozdílu koncentrací. **Kontrolovaná disperze** je základní charakteristikou metody FIA.



Obr. č. 1: Princip průtokové injekční analýzy (FIA)

Vzorek je při průchodu systémem rozmýván v nosném proudu činidel a vytváří se koncentrační gradient (obr. č. 2). Výsledkem analýzy jsou za sebou jdoucí píky závislosti signálu (např. absorbance) na čase, jejich výška  $h$  resp. plocha  $A$  je mírou analytické koncentrace.



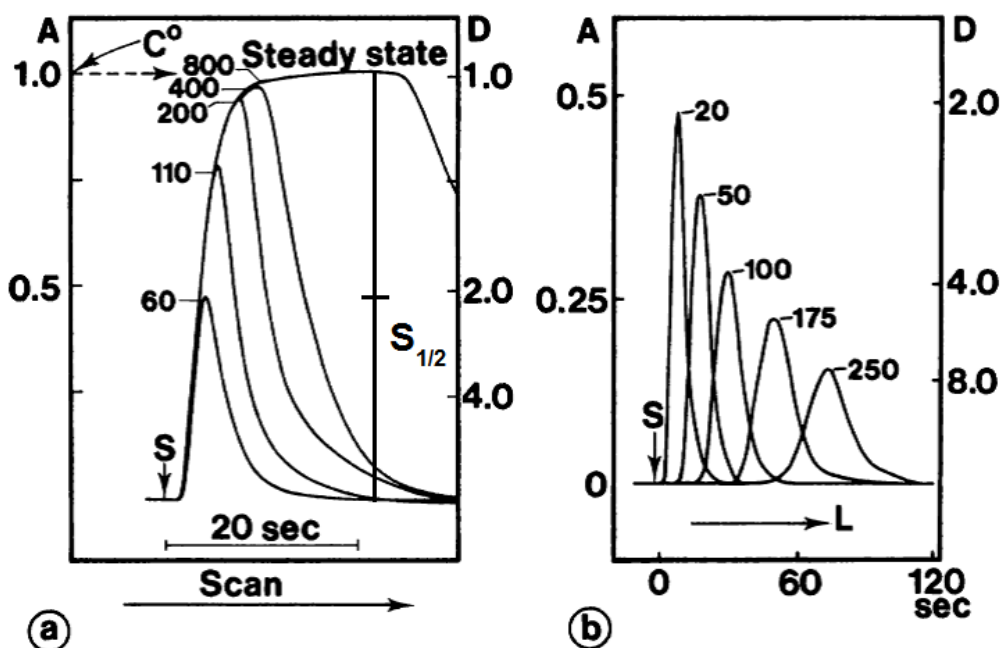
Obr. č. 2: Záznam FIA píky a důležité charakteristiky

K popisu koncentračního gradientu se užívá disperzní koeficient  $D$ , který je dán poměrem počáteční koncentrace  $c_0$  a aktuální koncentrace  $c$  v daném okamžiku:

$$D = \frac{c_0}{c} \quad (1)$$

Hodnota  $D$  je vždy větší než jedna a nejčastěji se odečítá v bodě maximální koncentrace ( $c_{max}$ ), kterému pak odpovídá hodnota  $D_{max}$ . Podle velikosti disperzního koeficientu rozlišujeme tři druhy disperze: omezená ( $D = 1 - 3$ ), střední ( $D = 3 - 10$ ) a velká ( $D \geq 10$ ).

Velikost disperze zóny, a tedy i tvar a výška zaznamenaného signálu, závisí, mimo jiné, na dávkovaném objemu vzorku (obr. 3a), délce reakčních cívek (obr. 3b), průtokové rychlosti vzorku, rozměrech průtokového vedení a na parametrech průtokového detektoru.

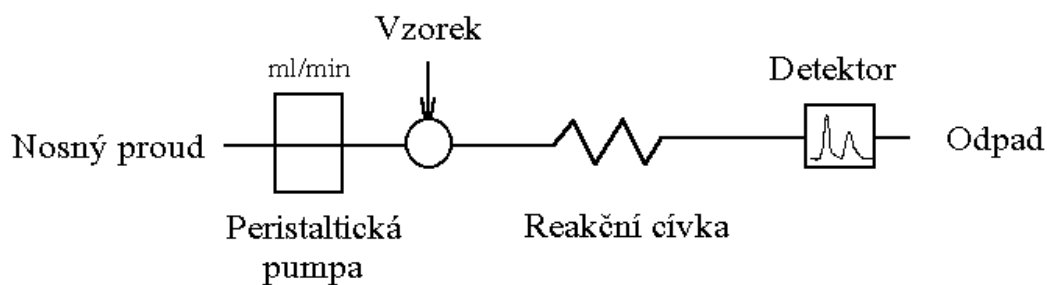


Obr. č 3: a) Vliv dávkovaného objemu ( $\mu\text{l}$ ), b) vliv délky reakční cívky (cm)

Průtoková injekční analýza může být prováděna v různých experimentálních uspořádáních. Nejjednodušší (jednakanálové) uspořádání je uvedeno na obr. č. 4 a skládá se ze čtyř částí: zdroje toku kapaliny, injekčního systému, reakční cívky a detektoru. Jednakanálové uspořádání je vhodné pro studium disperze vzorku v nosném toku.

Pro stanovení obsahu analytu ve vzorku je vhodnější použít vícekanálové uspořádání, při kterém je vzorek dávkován do inertního rozpouštědla (nejčastěji voda), ke kterému je kontinuálně přimícháváno reakční činidlo. V takovémto systému dochází k lepšímu promíchání vzorku a reakčního činidla včetně středu zóny vzorku.

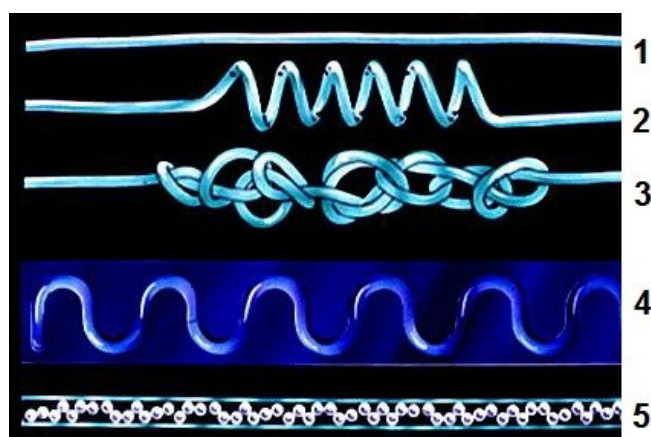




Obr. č. 4: Schéma základního zapojení průtokové injekční analýzy

Ve FIA metodě je obecně nutné zajistit bezpulsní tok všech chemikálií a přísně reprodukovatelný vnesený objem vzorku. Pro kvalitní záznam signálu v metodě FIA musí být na jedné straně dosaženo malé disperze vzorku a zároveň musí být poskytnut dostatečný čas  $T$  pro proběhnutí reakce. Oba tyto požadavky jsou však protichůdné, proto je velmi důležité nalézt optimální podmínky pro provedení dané analýzy. Optimální objem vzorku pro dosažení malé disperze při dostatečné citlivosti stanovení odpovídá polovině odezvy ustáleného stavu ( $S_{1/2}$ , viz obr. 3a).

Velikost disperze a symetrie signálu je také ovlivněna uspořádáním reaktoru, ve kterém dochází k míchání vzorku s činidly. Při volbě reaktoru je důležité, aby došlo k co nejrychlejšímu smísení a aby byla zvýšena intenzita radiálního mísení (vzorek při průchodu reaktorem naráží na stěny trubice, mění směr toku, ale stále platí předpoklad laminárního proudění). Naopak rychlost v axiálním směru by měla být co nejnižší. Vhodný je takový reaktor, který má konstantní průměr reakční cívky a dochází v něm k prudkým změnám toku. Reaktor může být realizován různými způsoby (obr. č. 5).



Obr. č 5: Realizace reakční cívky: 1) přímá trubice, 2) stáčená reakční cívka, 3) tzv. uzlový reaktor, 4) mísící komůrka, 5) reaktor s pevnými částicemi

Pro sériové analýzy je důležitou informací maximální frekvence dávkování vzorku  $S_{max}$ , která je dána vztahem, v kterém  $t_b$  je šířka píku při základně (s, min):

$$S_{max} = \frac{60}{t_b} \quad (2)$$

Pro detekci ve FIA systému je možné použít jakýkoliv detektor vhodný pro daný reakční produkt v kombinaci s průtokovou kvyetou (vnitřní objem několik desítek  $\mu\text{l}$ ). Mezi detektory využívající optické vlastnosti látek patří: fotometrické, citlivější fluorimetrické, detektory využívající chemiluminiscenci, detektory refraktometrické, AAS, plamenová fotometrie. Z elektrochemických detektorů lze použít např. iontově selektivní elektrody a vodivostní detektory.

#### Použitá literatura:

1. Růžička J., Hansen E.H.: Flow-injection analysis, 2<sup>nd</sup> Ed. Wiley, New York (1988)
2. Valcárcel M., Luque de Castro M.D.: Flow injection analysis, Ellis Horwood Chichester (1987)

#### Příprava na úlohu

Odhadněte vlnovou délku absorpčního pásu methylenové modři.

Vypočítejte navážku methylenové modři pro přípravu zásobního roztoku.

Doneste si s sebou USB disk pro stažení naměřených dat.

#### Úkol

Zjistěte vliv následujících parametrů na disperzi vzorku v metodě průtokové injekční analýzy: objemová průtoková rychlost nosného proudu, délka reaktoru, dávkovaný objem.

#### Chemikálie a přístroje

Methylenová modř (MB,  $M = 374 \text{ g mol}^{-1}$ ), destilovaná voda, odměrné baňky 100 ml, odměrný válec 10 ml, dělená pipeta 10 ml, kádinky 3 ks. UV-Vis spektrometr SPECORD 210 PLUS; průtoková kyveta vnitřního objemu 80  $\mu\text{l}$  s tloušťkou absorpční vrstvy 10,00 ml (Hellma), peristaltická pumpa, nízkotlaký dávkovací ventil s různými objemy dávkovacích smyček (100  $\mu\text{l}$ , 250  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$ , 1200  $\mu\text{l}$ ) (Rheodyne, U.S.A.), čerpací hadičky (Cole-Parmer), reakční cívky různých délek (200, 400, 600, 800, 1000 mm), spojovací teflonové hadičky (vnitřní průměr 0,8 mm).

#### Pracovní postup

1. Připravte roztok methylenové modři o koncentraci  $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v objemu 100 ml a nařeďte ho dle zadání doзору. Při všech měřeních bude nosným tokem destilovaná/deionizovaná voda.
2. Zkalibrujte peristaltické čerpadlo dle pokynů doзору.
3. Proměřte absorpční spektrum pracovního roztoku methylenové modři v rozmezí 400 – 800 nm v kyvetě s tloušťkou absorpční vrstvy 10,00 mm. Ze získaného spektra určete vlnovou délku absorpčního maxima roztoku methylenové modři a hodnotu maximální absorbance. Tuto hodnotu použijete pro výpočet příslušných disperzních koeficientů  $D_{max}$ . Ovládání spektrometru je uvedeno níže.
4. Proměřte vliv objemové průtokové rychlosti ( $Q$ ,  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ) na disperzi vzorku. Proměřte rozmezí průtokových rychlostí: 0,8; 1,2; 1,6; 2,2; 2,6; 2,8  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$  (délka reakční cívky je 600 mm, dávkovaný objem 500  $\mu\text{l}$ ). Každou závislost změřte jednou.
5. Proměřte vliv dávkovaného objemu vzorku ( $V$ ,  $\mu\text{l}$ ) na signál. Dávkujte vzorek v těchto objemech: 30  $\mu\text{l}$  (spojení nakrátko), 100  $\mu\text{l}$ , 250  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$ , 1200  $\mu\text{l}$  (průtoková rychlost 2,0  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , délka reakční cívky 600 mm).
6. Proměřte vliv délky reaktoru ( $L$ , mm) na disperzi vzorku. Proměřte délky reakční cívky: 0; 200; 400; 600; 800; 1000 mm (průtoková rychlost 2,0  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , dávkovaný objem 250  $\mu\text{l}$ ).
7. Změřte 3x FIAGram pro následující podmínky:  $Q = 2,0 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $V = 250 \mu\text{l}$ ,  $L = 200 \text{ mm}$ . Z průměrné šířky píku při základně vypočítejte maximální frekvenci analýz pro výše uvedené podmínky.

## Vyhodnocení výsledků

Diskutujte vliv studovaných parametrů na disperzi vzorku a uveďte Vámi nalezené optimální hodnoty pro stanovení methylenové modři.

1. Ze získaných závislostí absorbance na čase pro jednotlivá měření odečtěte  $A_{\max}$  a vynesete do grafu průběhy  $A_{\max}$  v závislosti na sledovaném parametru (celkem 3 grafy). Diskutujte průběhy závislostí. Vypočítejte jednotlivé hodnoty  $D_{\max}$  a vynesete závislosti  $D_{\max}$  na zkoumaném parametru (dávkovaný objem, objemová průtoková rychlost, délka reakční cívky, 3 grafy). Opět diskutujte průběhy závislostí.
2. Z výsledných závislostí parametr– $D_{\max}$  navrhnete optimální hodnoty, které byste použili pro stanovení methylenové modři a zdůvodněte volbu.
3. Určete maximální frekvenci analýz  $S_{\max}$ .

**Přílohou protokolu je 6 grafů.**

## Ovládání spektrometru SPECORD 210 PLUS a nastavení měření

Zapněte počítač a spektrometr, po inicializaci přístroje spusťte ovládací software Aspect UV. K nastavení měření absorpčního spektra vzorku slouží modul „Spectrum“, k měření časových závislostí modul „Kinetics“; oba jsou umístěny na postranní liště vlevo.

### Absorpční spektrum methylenové modři ve VIS oblasti

V modulu **Spectrum** nastavte následující hodnoty:

- Záložka General: Measure mode: Absorbance, Range: 400-800 nm, Measuring points: 1 nm, Speed 20 nm/s, Slit 1 nm
- Záložka Evaluation: zatrhněte volbu Determine peaks a zvolte variantu maxima, threshold nastavte na hodnotu 0,05.
- Záložka Sample sequence: Sample 1 – reference, Sample 2 – sample (změnu typu vzorku proveďte stiskem pravého tlačítka myši)

### Měření závislosti změny signálu na čase v modulu Kinetics

Pro změření vlivu objemové průtokové rychlosti vzorku a dávkovaného objemu vzorku vytvořte metodu pro měření, nastavte následující hodnoty:

- Záložka General: Measure mode: Absorbance, Wavelength – vlnová délka absorpčního maxima roztoku MB, measurement time 5 min, integration time 0,1 s, interval time 0,1 s
- Záložka Sample sequence: Sample 1 – reference, přidejte potřebný počet vzorků pro změření vlivu daného parametru (sample)
- Po doměření celé sekvence nezapomeňte výsledky uložit a také vyexportovat jako .csv soubor.

Pro změření vlivu délky reakční cívky a pro určení maximální frekvence dávkování nastavte:

- Záložka General: Measure mode: Absorbance, Wavelength – vlnová délka absorpčního maxima roztoku MB, measurement time 3 min, integration time 0,1 s, interval time 0,1 s
- Záložka Sample sequence: Sample 1 – reference, přidejte potřebný počet vzorků pro změření vlivu daného parametru (sample).

# Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

## Stanovení azobarviv ve směsi metodou RP– HPLC se spektrofotometrickou detekcí

### Teorie

Netěkavé a polární látky, jejichž analýza plynovou chromatografií je velmi obtížná, lze s výhodou analyzovat metodou HPLC. Principiálně rozlišujeme dva druhy HPLC:

- kapalinovou chromatografií na normálních fázích (NP–HPLC), kdy stacionárními fázemi jsou polární oxid křemičitý (silikagel) nebo oxid hlinitý (alumina) a mobilní fází je nepolární kapalina, nejčastěji uhlovodík
- HPLC na obrácených (reverzních) fázích (RP–HPLC), kde separace probíhá na nepolární stacionární fázi, nejčastěji na silikagelu chemicky modifikovaném nepolárními skupinami, jako jsou C<sub>8</sub> (oktyl) nebo C<sub>18</sub> (oktadecyl), přičemž jako mobilní fáze se používá polárnějších kapalin (methanol, acetonitril) a jejich směsí s vodou či vodnými pufrů.

K separaci studovaných azobarviv vyhovuje ve spojení s C<sub>18</sub> stacionární fází směs methanolu s vodou (9:1). Studovaná barviva lze detegovat fotometrickým detektorem při vlnové délce 290 nm, kde všechna vykazují dostatečně silnou absorpci záření. Identifikace se provádí na základě shody retenčních časů,  $t_R$ , případně retenčních faktorů,  $k$ , měřených látek a standardů. Kvantitativní složení vzorku se zjistí metodou absolutní kalibrace na základě proměření kalibračních křivek pro jednotlivé standardní roztoky čistých azobarviv.

### Úkol

Separovat a metodou kalibrační křivky stanovit azobarviva (methyloranž – MO, dimethylová žlut' – DMŽ) ve směsi metodou RP–HPLC se spektrofotometrickou detekcí, určit meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ), koeficienty linearitu detektoru a ověřit jeho lineární dynamický rozsah pro obě barviva.

### Pracovní postup

#### 1. Příprava mobilní fáze

Pokud není k dispozici dostatek mobilní fáze (MF), připravte asi 500 ml mobilní fáze o složení methanol:voda (9:1). Smíchejte 450 ml methanolu a 50 ml destilované vody odměřené příslušnými odměrnými válci; **nedoplňujte** - při míšení methanolu a vody není v důsledku vysoké polarizace obou kapalin plně zachována aditivita objemů. Připravenou mobilní fází přefiltrujte a odplyňte v ultrazvukové lázni asi 10 min.

#### 2. Příprava měřicího zařízení

Ke chromatografické analýze budete používat kapalinový chromatograf od firmy Shimadzu, složený z vysokotlakého kvartérního čerpadla LC-20AD, degaseru, dávkovacího ventilu Rheodyne s dávkovací smyčkou o objemu 20  $\mu$ l a UV-VIS spektrofotometrického detektoru SPD-20AV. K separaci budete používat chromatografickou kolonu Tessek C18 (150×4,6 mm; 3,0  $\mu$ m).

Zapněte pumpu a detektor alespoň 20 min před první analýzou. Zapněte řídicí počítač a přihlašte se jako uživatel STUDENT, heslo hplc. Na ploše spusťte program **LCsolution**, otevřete **Instrument 1** (ikona

počítače) a připravte ho pro sběr dat pod vaším jménem do adresáře C:/praktika/ZS2018. Odstraňte vzduchové bubliny ze všech propojovacích trubiček a z pumpy (příkaz PURGE při **otevřeném promývacím ventilu**). Po promytí zapněte průtok MF a postupně ho zvyšujte na hodnotu **0,5 ml/min**.

### 3. Příprava kalibračních roztoků

Zásobní roztoky standardů azobarviv mají koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vhodným ředěním připravte do **10 ml odměrných baněk** roztoky jednotlivých azobarviv o koncentracích **(1; 3; 5; 7 a 9) · 10<sup>-5</sup> mol · l<sup>-1</sup>**. Pozor, ředíme mobilní fází, nikoliv vodou!

### 4. Dávkování

Dávkování se provádí dávkovacími ventily s dávkovacími smyčkami o velikosti 20  $\mu\text{l}$ . Dávkovací smyčky plňte stříkačkami o vhodném objemu, když je dávkovací ventil v poloze pro plnění smyčky (**LOAD**); smyčku proplachujte alepoň 10ti násobným objemem smyčky. Po naplnění smyčky vzorkem přepněte rychlým a plynulým pohybem páky dávkovací ventil do dávkovací polohy (**INJECT**) a spusťte okamžitě sběr dat počítačem. Po ukončení analýzy zastavte sběr dat a zapište si **retenční čas, plochu a výšku píků**. Nezapomeňte dávkovací ventil vrátit do polohy LOAD.

### 5. Identifikace azobarviv

Analýzou roztoku standardů azobarviv o nejnižší koncentraci zjistíte jejich retenční časy, určete eluční pořadí.

### 6. Kalibrace

Proměřte připravené kalibrační roztoky azobarviv a zaznamenejte plochy a výšky píků; každý kalibrační roztok změřte **3x**. Ze získaných dat sestrojte pro obě barviva grafy kalibračních závislostí, jednu pro plochy píků a jednu pro výšky píků.

Sestrojte příslušné grafy a určete z nich koeficienty linearit detektoru a lineární dynamický rozsah, jak pro výšky, tak i pro plochy píků (návod viz obecný úvod těchto skript).

### 7. Analýza vzorků

Pokud jsou vzorky v odměrných baňkách, je třeba je doplnit mobilní fází po rysku. Vzorky jsou směsné a obsahují obě barviva, methyloranž a dimethylovou žluť.

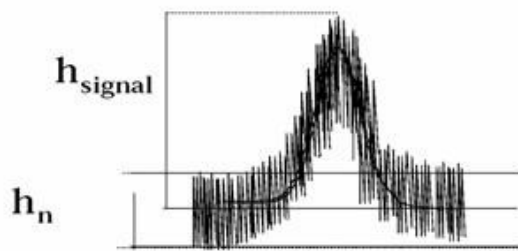
Stejným způsobem jako kalibrační roztoky proměřte vaše vzorky azobarviv a zaznamenejte příslušné  $t_R$ , výšky a plochy píků; měření roztoku vzorku opakujte 3 x. **Při měření vzorku vždy zkontrolujte, zda Vámi naměřené plochy, případně výšky, leží v rozsahu naměřených kalibračních křivek**. Pokud ne, vyvoďte z toho patřičné závěry a neznámý vzorek nařeďte.

Dosazením naměřených ploch/výšek do regresních rovnic či odečtem z kalibračních závislostí pro plochu a pro výšku píku **určete koncentraci azobarviv ve vašem vzorku v jednotkách  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$** . **Výsledek uveďte v následujícím formátu:  $(\text{výsledek} \pm L_{1,2}) \cdot \text{společný exponent } \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (počet měření  $n$ , RSD %).**

Pro obě barviva srovnajte na hladině  $\alpha = 0,05$ , zda jsou výsledky získané z kalibračních závislostí pro plochu a pro výšku statisticky rozdílné.

### 8. Určení meze detekce a meze stanovitelnosti ze slepého pokusu

Pro určení meze detekce/stanovitelnosti v separačních metodách je třeba určit hodnotu signálu slepého pokusu. Zaznamenejte chromatogram slepého pokusu (bez dávkování) v délce odpovídající elučnímu času DMŽ (5–6 minut) a vyhodnoťte šum základní linie  $h_n$  podle postupu uvedeného na obr. č. 1 níže.



Obr. č. 1: Vyhodnocení šumu základní linie při chromatografické analýze

Mez detekce je koncentrace, jejíž signál je statisticky významně odlišný od šumu, počítáme ji ze vztahu  $LOD = \frac{3 \cdot h_n}{m}$ , kde  $h_n$  je šum základní linie a  $m$  je směrnice kalibrační křivky (pro výšku píku!). Hodnota šumu a výšky píku v kalibračních křivkách musí být ve stejných jednotkách. Mez stanovitelnosti je koncentrace, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení, a počítáme ji ze vztahu  $LOQ = \frac{10 \cdot h_n}{m}$ , kde  $h_n$  je šum základní linie a  $m$  je směrnice kalibrační křivky. Mez detekce a mez stanovitelnosti metody lze také určit analýzou rozptylu experimentálních dat kolem kalibrační přímky pro jednotlivá studovaná barviva (postup uveden v obecném úvodu na začátku skript).

Dejte pozor, zda vaše naměřené koncentrace vzorků neleží pod mezemi detekce či stanovitelnosti - pokud ano, vyvoďte z toho příčné závěry a důsledky.

**K protokolu se odevzdává 6 grafů: 2 x kalibrace, 2 x linearita, 2x lineární dynamický rozsah (pro plochu a výšku píku, každý graf se oběma barvivy).**

# Vysokoučinná kapalinová chromatografie

(pro studenty, kteří přicházejí z BKATA)

## Stanovení aromatických barviv pomocí gradientové RP-HPLC se spektrofotometrickou detekcí

### Teorie

Studovaná aromatická barviva jsou polární látky sloužící jako indikátory změny pH při titračních analýzách. Tyto látky lze analyzovat pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní stacionární fázi. V tomto uspořádání probíhá separace na nepolární stacionární fázi, nejčastěji na silikagelu chemicky modifikovaném nepolárními skupinami, jako jsou C8 (oktyl) nebo C18 (oktadecyl), zatímco mobilní fáze je tvořena směsí vody či pufru s polární, s vodou mísitelnou, organickou kapalinou (methanol, acetonitril). K separaci studovaných azobarviv lze ve spojení s C18 stacionární fází použít mobilní fázi tvořenou směsí methanolu (MeOH) a vody. Na průběh separace v HPLC má velký vliv složení mobilní fáze, v tomto případě poměr mezi vodnou a organickou složkou. Tento poměr je zapotřebí optimalizovat tak, aby píky všech studovaných látek byly dostatečně rozlišené, tzn. aby rozlišení sousedních píků dosahovalo hodnoty  $R_{1,2} \geq 1,5$ , a aby byla analýza realizována v přiměřeném čase. V případě, že je velký rozdíl mezi retencí jednotlivých analytů, dochází k nepřiměřenému prodloužení analýzy, což je nevýhodné i z hlediska ekonomického (zvýšená spotřeba rozpouštědel). Proto se v takové situaci používá **gradientová eluce**, kdy se poměr složek mobilní fáze mění podle vhodného schématu v průběhu analýzy.

Studované analyty lze detegovat spektrofotometrickým detektorem při vlnové délce 290 nm, při které studovaná barviva vykazují dostatečnou absorpci záření. Identifikace se provádí na základě shody retenčních časů,  $t_R$ , případně retenčních faktorů,  $k$ , měřených látek a standardů.

### Úkol

Optimalizujte složení mobilní fáze pro separaci methylové oranže, thymolové modři a dimethylové žluti pomocí RP-HPLC s UV detekcí.

### Pracovní postup

Ke chromatografické analýze budete používat kapalinový chromatograf od firmy Shimadzu, složený z vysokotlakého kvartérního čerpadla, degaseru, dávkovacího ventilu Rheodyne s dávkovací smyčkou o objemu 20  $\mu\text{l}$  a UV-VIS spektrofotometrického detektoru. Separace bude prováděna na chromatografické koloně Tessek C18 (150  $\times$  4,6 mm, 3,0  $\mu\text{m}$ ). Průtokovou rychlost mobilní fáze nastavte na **0,5 ml min<sup>-1</sup>**. Promytí dávkovací smyčky proveďte alespoň desetinásobkem jejího objemu. Vlnovou délku detektoru nastavte na **290 nm**.

Pro optimalizační měření si připravte roztoky jednotlivých analytů, které připravte naředěním ze zásobních roztoků standardů barviv o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  do 10 ml odměrných baněk a doplňte mobilní fází MeOH : voda – 90 : 10 (v/v) po rysku tak, aby výsledná **koncentrace methylové oranže a dimethylové žluti** byla  $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a **thymolové modři**  $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

**Proměřte orientačně (1x) retenční chování studovaných analytů (dávkujte v pořadí oranž, modř, žlut) s použitím následujících mobilních fází a gradientových programů:**

a) isokratická eluce, MeOH : voda v poměru 90 : 10 (v/v);

b) isokratická eluce, MeOH : voda v poměru 60 : 40 (v/v);

**Po ukončení isokratické eluce promyjte kolonu alespoň 10 minut mobilní fází MeOH : voda v poměru 90 : 10 (v/v).**

c) gradientová eluce s následujícím programem:

krok 1: 0,0 min – 1,7 min: 40: 60 (v/v) MeOH : voda

krok 2: 1,8 min – 8,5 min: MeOH

krok 3: 8,6 min – 12,5 min: 40 : 60 (v/v) MeOH : voda

krok 4: 13,0 min: ukončení sběru dat

V případě gradientové eluce proveďte nejdříve 1-2 analýzy bez nástřiku vzorku, tzv. blank run, a teprve poté postupně nadávkujte připravené roztoky jednotlivých barviv. Získané chromatogramy porovnejte a vyberte nejvhodnější složení mobilní fáze na základě vizuálního zhodnocení tvaru píků (rozmytý či symetrický), rozlišení píků jednotlivých analytů a doby analýzy.

Za optimalizovaných podmínek nadávkujte směsný vzorek všech třech analytů, který připravíte odpipetováním alikvotních objemů (např. 1 ml) z roztoků jednotlivých analytů připravených pro optimalizační měření.

Za optimalizovaných podmínek proměřte odezvy analytů také při vlnové délce 254 nm a 210 nm a porovnáním s již změřenou vlnovou délkou 290 nm vyberte vhodnou detekční vlnovou délku pro případná další kvantifikační měření (porovnejte plochy a výšky píků, zhodnoťte velikost systémových píků a šumu základní linie).

Při nejvhodnějších separačních podmínkách si zaznamenejte retenční čas, plochu píku, výšku píku a šířku píku pro všechny studované analyty a spočítejte pro methylovou oranž, thymolovou modř a dimethylovou žlut retenční faktory  $k$ , počet teoretických pater  $n$ , výškový ekvivalent teoretického patra  $H$  a rozlišení mezi methylovou oranží a thymolovou modří a mezi thymolovou modří a dimethylovou žlutí. Jako hodnotu mrtvého času použijte retenční čas systémového píku.



# *Plynová chromatografie*

## **Analýza ovocných destilátů, určení obsahu methanolu a ethanolu**

### **Chemikálie a materiál**

Methanol, ethanol, isobutanol, vzorky ovocných destilátů – hruškovice, slivovice, ovocný destilát, rumunská pálenka.

Presvědčte se, že máte k dispozici všechny nezbytné látky a materiál: GC injekční stříkačku o objemu 5 nebo 10  $\mu\text{l}$ , automatickou pipetu 10–100  $\mu\text{l}$  a 100–1000  $\mu\text{l}$  se špičkami, suché vialky o objemu 1,5 ml s víčky a septy pro přípravu vzorků a pro přípravu kalibračních roztoků k určení obsahu ethanolu.

Separací kolonou je kapilární kolona Supelco WAX 10 (polyethylenglykol), délka 60 m, I.D. 0,32 mm, tloušťka filmu 0,25  $\mu\text{m}$ ; nosný plyn je dusík; detektor FID.

### **Pracovní postup**

1) Pokud je potřeba, vyměňte použité septum v nástřikové hlavě za nové. Zapněte plynový chromatograf a počítač a nastavte optimální pracovní podmínky podle pokynů pedagogického dozoru: teplota kolony **40 °C**, teplota dávkovače **200 °C (INJ A TEMP)**, teplota detektoru **250 °C (DET A TEMP)**. Zkontrolujte **nastavení teplotního programu**: počáteční teplota kolony **40 °C (INIT TEMP)** po dobu **2 minut (INIT TIME)**, nárůst teploty kolony rychlostí **30 °C/min (RATE)**, konečná teplota kolony **160 °C (FINAL TEMP)**, temperace po dobu **5 minut (FINAL TIME)**

2) **Změřte retenční čas  $t_R$  kapalných standardů methanolu, ethanolu a isobutanolu**, dávkovaný objem 0,2  $\mu\text{l}$  chromatografickou stříkačkou Rheodyne; měření  $t_R$  proveďte 1× pro každý standard, **začněte isobutanolem**.

3) **Zjistěte retenční profil ovocných destilátů**: vyberte si 1 vzorek z destilátů, které jsou k dispozici, a vybraný vzorek 1x nadávkujte do chromatografického systému; dávkovaný objem je 1  $\mu\text{l}$ , doba analýzy 10 minut. Na základě shody retenčních časů s proměřenými standardy identifikujte píky methanolu, ethanolu a isobutanolu ve vzorku destilátu.

4) **Přídavek vnitřního standardu**: z vialek s ovocnými destiláty odpipetujte do suchých vialek **1 ml** Vámi vybraného **destilátu** a přidejte isobutanol jako vnitřní standard v množství **15  $\mu\text{l}$  isobutanolu na 1 ml destilátu**. Takto vzniklý vzorek 2x nadávkujte (dávkovaný objem 1  $\mu\text{l}$ ) a zaznamenejte si plochy píků methanolu a isobutanolu.

5) **Kvantifikace methanolu v ovocném destilátu**: následně do vzorku destilátu s přidaným vnitřním standardem (bod 4) **provedte 2 standardní přídavky methanolu**, každý o objemu **10  $\mu\text{l}$** , a **každý standardní přídavek změřte 2x**, dávkovaný objem je 1  $\mu\text{l}$ . Zaznamenejte si plochy píků methanolu a isobutanolu. Graficky vyhodnoťte obsah methanolu (v objemových procentech) ve vybraném destilátu.

**6) Kvantifikace ethanolu v ovocném destilátu:** připravte do suchých vialek (max. objem 1,5 ml) kalibrační roztoky ethanolu obsahující 30, 40, 50 a 60 obj. % ethanolu. Při přípravě kalibračních roztoků smíchejte vypočítané množství vody a ethanolu, **nedoplňujte na celkový objem!** Do kalibračních roztoků přidejte také vnitřní standard v množství **50  $\mu$ l isobutanolu na 1 ml roztoku**. Každý kalibrační roztok **změřte 2x**, dávkovaný objem je 1  $\mu$ l. Zaznamenejte si plochy píků ethanolu a isobutanolu.

Nyní si připravte **nový vzorek vybraného destilátu** s přidavkem vnitřního standardu, a to s 50  $\mu$ l isobutanolu na 1 ml roztoku, a tento **vzorek 2x změřte**, dávkovaný objem je 1  $\mu$ l.

Při vyhodnocení kalibrační závislosti nezapomeňte, že standard ethanolu je 96% (obj.) vodným roztokem!

Pro vyhodnocení obsahu ethanolu a methanolu používejte **poměr ploch příslušného analytu a vnitřního standardu**, nedochází tak ke změnám ploch sledovaných analytů vlivem ředění vzorku a nepřesnostmi v nadávkovaném objemu vzorku na kolonu.

Porovnáním poměru ploch ethanolu a isobutanolu, získaných pro vybraný destilát, se změřenou kalibrační závislostí vyhodnoťte obsah ethanolu (v obj. %) ve vzorku destilátu. Grafy obou kalibračních závislostí (pro ethanol i methanol) odevzdejte s protokolem.

#### **7) Výpočet obsahu methanolu ve vzorcích ovocných destilátů**

Obsah methanolu ve vzorcích ovocných destilátů nejdříve vyjádřete v objemových procentech, které pak následně přepočítejte na množství gramů methanolu na 1 litr 100% ethanolu. Pro tento způsob vyjádření obsahu methanolu v destilátu je tedy nezbytné vědět, kolik % ethanolu příslušný destilát obsahuje (bod 6), aby byl možný přepočet na 100% ethanol (tzv. absolutní líh). Maximální přípustné množství methanolu v pravých ovocných destilátech je uvedeno v prováděcí vyhlášce k zákonu o lihu č. 141/1997 Sb., příloha 3, a to *15 g methanolu v 1 litru ethanolu o koncentraci 100 obj. %*. Vyhodnoťte, zda Vámi analyzované ovocné destiláty vyhovují výše uvedené normě.

#### ***Volitelná část úlohy***

*8) Změřte chromatogramy Vámi doneseného destilátu (s přidavkem vnitřního standardu v množství 50  $\mu$ l isobutanolu na 1 ml roztoku pro kvantifikaci ethanolu) a určete objemová procenta ethanolu s využitím výše naměřené kalibrační závislosti. K určení objemového procenta methanolu využijte metodu 1 bodového standardního přidavku methanolu (přídavek 15  $\mu$ l isobutanolu 2x změřit, + 10  $\mu$ l methanolu 2x změřit).*

Hustota methanolu je 0,79 g/cm<sup>3</sup> a molární hmotnost 32,04 g/mol.

## Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

### Domácí příprava

1. Prostudujte si výpočet elektroosmotické mobility a efektivních elektroforetických mobilit z elektroferogramu.
2. Prostudujte si vliv pH na efektivní elektroforetickou mobilitu v CZE a výpočet iontových mobilit.
3. Prostudujte si vztahy, které používáme k výpočtu počtu teoretických pater, výškového ekvivalentu teoretického patra a rozlišení v chromatografii.
4. Prostudujte si příloženou "Teorii k metodě standardního přídatku".

### Literatura

1. Štulík, K. a kolektiv, Analytické separační metody, Nakladatelství Karolinum, Praha 2004, ISBN 80-246-0852-9
2. učební text na internetové adrese [www.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html](http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html)

### Materiál a chemikálie

- Zásobní roztoky: 2–nitrofenol, 3–nitrofenol, tyramin, kyselina benzoová, thiomočovina – všechny o koncentraci 1 mg/ml v destilované vodě
- 10 mmol/l tetraboritanový pufr, pH 9,1 (**pokud není k dispozici, nařed'te ho z 20 mmol/l zásobního roztoku**)
- Roztok neznámého vzorku k analýze v 5 ml odměrné baňce
- 4 ml vialky, pipety

### Experimentální podmínky

**Upozornění:** pracujete s vysokým napětím (VN), které je životu nebezpečné! Proto pracujte opatrně, pozorně a pečlivě. Přístroj je vybaven bezpečnostními obvody, takže VN je zapnuto pouze v případě, kdy jsou **úplně** uzavřena oboje dvířka VN–komory. V případě otevření VN–komory během analýzy dojde rovněž k okamžitému vypnutí VN.

### Separační kapilára

průměr: 75  $\mu\text{m}$

délka vstup-detektor : uvedeno u přístroje (50 cm)

celková délka : uvedeno u přístroje (70 cm)

**Dávkování** hydrodynamické - 10 cm výškové převýšení po dobu 5 – 10 s

**Separační napětí** 15 až 30 kV – nastavte tak, aby proud nepřesahoval 100  $\mu\text{A}$  (vstupní elektroda anoda, výstupní katoda)

**Separační pufr** 10 mM tetraboritan sodný (pH = 9,1)

**Detekce** fotometrická (UV absorpční při 220 nm)

**Značkováč EOF** thiomočovina

**Separované látky** 2–nitrofenol ( $\text{pK}_a = 7,17$ )

3–nitrofenol ( $\text{pK}_a = 8,28$ )

kyselina benzoová ( $\text{pK}_a = 4,19$ )

tyramin = 4–(2–aminoetyl)fenol ( $\text{pK}_a(\text{OH}) = 10,4$ ;  $\text{pK}_a(\text{NH}_2) = 9,3$ )

## Pracovní postup

### 1. Všechna měření se provádějí 3 x.

2. Naplníte dvě 4 ml vialky pracovním pufrům (optimum jsou 3 ml), vložte je opatrně do cel CE přístroje, za pomoci přetlaku v dávkovací cele naplníte kapiláru pufrům a spusťte VN, aby došlo ke stabilizaci pracovních podmínek v separační kapiláře. Stabilizaci základní linie detektoru sledujte na monitoru PC. Pracovní VN nastavte na takovou hodnotu, aby proud separační kapilárou nebyl vyšší než 100  $\mu\text{A}$  (*doporučené VN19 kV, proud  $\sim 22 \mu\text{A}$* ). Hodnotu VN si zaznamenejte.

3. Připravte si pracovní roztok standardů tak, že do odměrné baňky o objemu 5 ml napipetujete 1 ml pracovního pufru, vypočtené objemy zásobních roztoků jednotlivých standardů a doplňte destilovanou vodou po rysku. Výsledné koncentrace standardů mají být:

**2-nitrofenol: 25  $\mu\text{g/ml}$**

**3-nitrofenol: 25  $\mu\text{g/ml}$**

**kyselina benzoová: 25  $\mu\text{g/ml}$**

**thiomočovina: 125  $\mu\text{g/ml}$**

**tyramin: 50  $\mu\text{g/ml}$**

4. Odpipetujte 3 ml pracovního roztoku standardů do 4 ml vialky, nadávkujte ho a zaznamenejte jeho elektroferogram. Měření zopakujte celkem 3x.

5. Přiřaďte jednotlivé píky příslušným sloučeninám obsaženým v pracovním roztoku standardů, když víte, že vzorek obsahuje následující sloučeniny, které migrují v tomto pořadí: 1. tyramin, 2. thiomočovina, 3. 3–nitrofenol, 4. kyselina benzoová a 5. 2–nitrofenol. Vytiskněte jeden vzorový elektroferogram pracovního roztoku a přiložte ho k protokolu.

6. Metodou standardního přídávku stanovte 3–nitrofenol v neznámém vzorku. K neznámému vzorku v odměrné baňce přidejte 1 ml pufru a doplňte destilovanou vodou po rysku. Odpipetujte 3 ml neznámého vzorku do 4 ml vialky a 3x ho nadávkujte. Poté ke vzorku ve vialce přidejte standard 3–nitrofenolu a opět 3x nadávkujte. Vzorek může obsahovat nejvýše 5 výše uvedených látek

7. Vytiskněte si jeden elektroferogram vzorku a jeden vzorku s přídávkem a přiložte je k protokolu.

## Vyhodnocovací úkoly

1. Z elektroferogramů **pracovního roztoku standardů** vypočítejte mobilitu ( $m_{\text{eof}}$ ) elektroosmotického toku a zdánlivé a efektivní elektroforetické mobility  $m_{\text{eff}}$  všech složek za daných experimentálních podmínek.

2. Z elektroferogramů **pracovního roztoku standardů** vypočítejte elektroforetické (iontové) mobility 2–nitrofenolátového ( $m_2$ ), 3–nitrofenolátového ( $m_3$ ) a benzoátového ( $m_b$ ) aniontu za daných experimentálních podmínek.

3. Z elektroferogramů **pracovního roztoku standardů** vypočítejte počet teoretických pater ( $n$ ) a výškový ekvivalent teoretického patra ( $H$ ) pro danou kapiláru vzhledem k 3–nitrofenolu a rozlišení mezi píky kyseliny benzoové a 2–nitrofenolu.

4. **Pro pracovní roztok standardů** vypočítejte: objem kapiláry, délku dávkované zóny, objem pracovního roztoku standardů nadávkovaného do kapiláry a množství 3–nitrofenolu v pmol a ng, které bylo nadávkováno. Kolikrát lze teoreticky nadávkovat z použitého objemu pracovního roztoku standardů? Vypočítejte, jakým hydrostatickým tlakem v Pa jste dávkovali vzorky do kapiláry.

5. Vypočítejte koncentraci 3–nitrofenolu v neznámém vzorku z ploch píků 3–nitrofenolu a **kyseliny benzoové jako interního standardu** změřených před standardním přídávkem a po standardním přídávku (jednobodová metoda standardního přídávku).

## Ovládání a práce s CE

Ovládání přístroje a sběr dat probíhá v prostředí softwaru LabView (ver.8) firmy National Instruments.

1. Spustíte ovládací software ikonou „**CZE.vi**“ umístěnou na ploše. Po jeho otevření aktivujete ovládání kliknutím na tlačítko s bílou šipkou (**run**) vlevo nahoře (případně na horní liště: OPERATE → RUN).
2. Do vstupní a výstupní vialky připravte čistý separační pufir a zavřete posuvná dvířka i horní poklop přístroje (v opačném případě je blokováno vložení vysokého napětí na elektrody).
3. Kliknutím na tlačítko „Start/Stop“ spustíte registraci signálu detektoru na monitoru a kliknutím na tlačítko „HV“ (high voltage) vložte na separační kapiláru napětí a upravte jeho hodnotu tak, aby proud procházející kapilárou byl maximálně 100  $\mu\text{A}$ . Vyčkejte, dokud se neustálí signál detektoru. Poté napětí tlačítkem „HV“ vypněte.
4. Do rámečku „Path“ zadejte adresu souboru, který má být vytvořen pro ukládání dat a klikněte na tlačítko „Save“. Pro každou jednotlivou analýzu je potřeba vytvořit nový soubor. Pokud tak neučiníte, připsí se data z poslední provedené analýzy k té předchozí. **Soubor musí mít příponu „TXT“.**
5. Nahrďte vstupní vialku s pufrem (vlevo) vialkou se vzorkem tak, že nejdříve spustíte levý držák vialky asi o 0,5 cm dolů (aby hydrodynamickým prouděním nevnikal do kapiláry vzduch), vyjmete vialku se separačním pufrem a nahradíte ji vialkou s dávkovaným vzorkem. Proveďte nadávkování vzorku vyzdvižením držáku vialky o 10 cm na dobu 5 s. Po hydrodynamickém nadávkování vyměňte vialku se vzorkem za vialku se separačním pufrem stejným způsobem. Celu s vialkou vraťte do původní výšky a zkontrolujte, zda jsou hladiny pufiru v obou celách ve stejné výšce. Pokud ne, upravte výšku levé cely, s celou na straně detektoru se nesmí hýbat. Zavřete VN komoru.
6. Kliknutím na tlačítko „HV“ vložte napětí na separační kapiláru. Ihned poté klikněte na tlačítko „Start/Stop“, čímž spustíte zobrazování elektroferogramu na monitoru a vynulování detektoru. Současně tím spustíte ukládání dat do zadaného souboru (rozsvítí se kontrolka vedle tlačítka „Save“).
7. Po skončení analýzy vypněte tlačítkem „Start/Stop“ záznam analýzy a tlačítkem „HV“ vysoké napětí.  
Poznámka: pokud během analýzy výrazně klesne proud, může být v kapiláře bublina bránící průchodu proudu a elektroosmotickému toku elektrolytu – je nutno analýzu přerušit, bublinu z kapiláry vymýt, znovu stabilizovat pracovní podmínky a zopakovat nadávkování vzorku a jeho následnou analýzu.

### Popis elementů softwaru

**Graf:** Slouží k zobrazování dat přijímaných z detektoru. U pravého dolního okraje grafu jsou tlačítka, jimiž lze graf posunovat, zvětšovat, zmenšovat. Po spuštění analýzy je na ose x záznamu čas uveden v sekundách od referenčního data stanoveného výrobcem softwaru, takže vypadá nesmyslně, ovšem v ukládaném souboru je časová osa v pořádku.

**Signal (V):** Zobrazuje aktuální signál detektoru.

**Time (s):** Zobrazuje čas uplynulý od začátku záznamu elektroferogramu.

**Sampling (ms):** Umožňuje nastavit frekvenci sběru dat z detektoru.

**Path:** Slouží k zadání adresy souboru pro ukládání dat. Je nutno zadat název neexistujícího souboru, který bude před ukládáním automaticky vytvořen. Po zadání názvu existujícího souboru bude tento přepsán.

**Save:** Svítí-li tlačítko, je připraven záznam dat do zadaného souboru. Záznam začíná/končí kliknutím na tlačítko Start/Stop.

**Start/Stop:** Spustí/ukončí registraci signálu detektoru do grafu. Je-li aktivní tlačítko Save, spustí/ukončí se tlačítkem Start/Stop rovněž zápis dat do určeného souboru.

**HV:** Aktivováním tohoto tlačítka se uzavře bezpečnostní okruh a, je-li uzavřen pracovní prostor přístroje, je na elektrody vloženo vysoké napětí. Pokud nedojde ke vložení vysokého napětí na elektrody, zkontrolujte zda jsou oboje dvířka řádně uzavřena!

**Autozero:** Kliknutím se vynuluje detektor, provádí se automaticky vždy při stisku tlačítka Start/Stop.

## Teorie k metodě standardního přídatku

V HPLC, GC a CZE se běžně používá několik kvantitativních vyhodnocovacích metod: metoda vnitřní normalizace, metoda absolutní kalibrace, metoda vnitřního standardu a metoda standardního přídatku. Tato poslední kvantitativní vyhodnocovací metoda, tj. metoda standardního přídatku, umožňuje odstranit rušivý vliv matrice při kvantitativní analýze. Při této metodě změříme nejprve analytickou odezvu (tj. plochu píku) stanovované látky v původním vzorku, který je určen k analýze (první experiment). Ve druhém kroku přidáme k původnímu vzorku standardní přídatek vlastní stanovované látky o známém množství a opět změříme analytickou odezvu (tj. plochu píku) stanovované látky v takto získaném vzorku se standardním přídatkem (druhý experiment). Ze získaných ploch píků stanovované látky v původním vzorku a ve vzorku se standardním přídatkem o známém množství stanovované látky jsme potom schopni vypočítat koncentraci (popř. množství) stanovované látky v původním vzorku.

Koncentrace stanovované látky v původním vzorku :  $c_x$  [ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]

Objem původního vzorku :  $V_1$  [ $\mu\text{l}$ ]

Plocha píku stanovované látky v původním vzorku :  $A_1$  [ $\text{V}\cdot\text{s}$ ]

Koncentrace stanovované látky ve standardním přídatku :  $c_{sp}$  [ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]

Objem standardního přídatku :  $V_{sp}$  [ $\mu\text{l}$ ]

Plocha píku stanovované látky ve vzorku se standardním přídatkem :  $A_2$  [ $\text{V}\cdot\text{s}$ ]

Neznámou veličinou je  $c_x$  a výchozími známými veličinami jsou  $V_1$ ,  $A_1$ ,  $V_{sp}$ ,  $c_{sp}$  a  $A_2$ .

Původní vzorek obsahuje látkové množství stanovované látky  $n_1 = c_x \cdot V_1$  [ $\mu\text{mol}$ ] a standardní přídatek obsahuje látkové množství stanovované látky  $n_{sp} = c_{sp} \cdot V_{sp}$  [ $\mu\text{mol}$ ]. Vzorek se standardním přídatkem obsahuje tedy celkové látkové množství stanovované látky  $n_1 + n_{sp}$ , jeho celkový objem je  $V_1 + V_{sp}$  a tudíž koncentrace stanovované látky v tomto vzorku je rovna

$$c_2 = \frac{n_1 + n_{sp}}{V_1 + V_{sp}} = \frac{c_x \cdot V_1 + c_{sp} \cdot V_{sp}}{V_1 + V_{sp}} \quad [\mu\text{mol}\cdot\mu\text{l}^{-1} \text{ nebo } \text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}].$$

Při analýze je do přístroje v prvním experimentu dávkována část původního vzorku o objemu  $V_d$  [ $\mu\text{l}$ ] (tzv. dávkovaný objem) a stejný objem vzorku se standardním přídatkem je do přístroje dávkován ve druhém experimentu. Látkové množství stanovované látky dávkované do přístroje v prvním experimentu je tedy  $n_{d,1} = c_x \cdot V_d$  [ $\mu\text{mol}$ ] a látkové množství stanovované látky dávkované do přístroje ve druhém experimentu je rovno

$$n_{d,2} = c_2 \cdot V_d = \frac{n_1 + n_{sp}}{V_1 + V_{sp}} \cdot V_d = \frac{c_x \cdot V_1 + c_{sp} \cdot V_{sp}}{V_1 + V_{sp}} \cdot V_d \quad [\mu\text{mol}].$$

Analytická odezva přístroje (tj. plocha píku) pozorovaná v prvním experimentu je přímo úměrná látkovému množství stanovované látky dávkovanému do přístroje v prvním experimentu  $A_1 = \text{RF} \cdot n_{d,1} = \text{RF} \cdot c_x \cdot V_d$ , kde RF je tzv. faktor odezvy (response faktor) příslušného detektoru pro stanovovanou látku a říká, jak velkou analytickou odezvu (v našem případě plochu píku) poskytuje jednotkové látkové množství příslušné stanovované látky. Analytická odezva přístroje (plocha píku) pozorovaná ve druhém experimentu je také přímo úměrná látkovému množství stanovované látky dávkovaného do přístroje ve druhém experimentu a konstantou úměrnosti je stejný faktor odezvy, neboť se jedná o stejnou látku (tj. stanovovanou látku)

$$A_2 = \text{RF} \cdot n_{d,2} = \text{RF} \cdot c_2 \cdot V_d = \text{RF} \cdot \frac{n_1 + n_{sp}}{V_1 + V_{sp}} \cdot V_d = \text{RF} \cdot \frac{c_x \cdot V_1 + c_{sp} \cdot V_{sp}}{V_1 + V_{sp}} \cdot V_d.$$

Dáme-li obě změřené plochy píků stanovované látky do poměru, vykrátí se nám parametry, které nabývají v obou dvou experimentech týchž hodnot (tj. RF a  $V_d$ )

$$\frac{A_2}{A_1} = \frac{RF \cdot \frac{c_x \cdot V_1 + c_{sp} \cdot V_{sp}}{V_1 + V_{sp}} \cdot V_d}{RF \cdot c_x \cdot V_d} = \frac{c_x \cdot V_1 + c_{sp} \cdot V_{sp}}{c_x \cdot (V_1 + V_{sp})}$$

Osamostatněním koncentrace  $c_x$  z předcházející rovnice získáme vztah pro výpočet koncentrace stanovované látky v původním vzorku z výchozích známých veličin metody standardního přídávku

$$c_x = c_{sp} \cdot \frac{A_1 \cdot V_{sp}}{A_2 \cdot (V_1 + V_{sp}) - A_1 \cdot V_1}$$

Pokud vyjádříme koncentraci stanovované látky ve standardním přídávku (tj.  $c_{sp}$ ) v jiných jednotkách (např. v  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), lze použít stejný vztah pro výpočet koncentrace stanovované látky v původním vzorku (tj.  $c_x$ ), avšak tato koncentrace vyjde ve stejných jednotkách, v jakých byla vyjádřena koncentrace stanovované látky ve standardním přídávku (tedy např. v  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

## Dodatek

### a.

Na rozdíl od GC a HPLC, kde detekce analytů probíhá za separační částí systému, tj. za separační kolonou, v CZE probíhá detekce, zde spektrofotometrická, přímo na separační kapiláře. Důsledkem toho je, že zatímco u GC a HPLC se všechny analyty pohybují detektorem stejnou rychlostí, u CZE se analyty během detekce pohybují rozdílnými rychlostmi odpovídajícími jejich zdánlivé pohyblivosti za daných experimentálních podmínek. Tudiž dvě stejná látková množství dvou analytů se stejným odezvoým faktorem, ale s rozdílnou pohyblivostí, poskytnou v detektoru dvě rozdílné plochy. Analyt pohybující se pomaleji poskytne větší plochu, neboť stráví v efektivním prostoru detektoru více času. Z tohoto důvodu se při kvantitativním vyhodnocování ploch v CZE nepracuje přímo s naměřenými plochami  $A$ , ale s plochami korigovanými migračními časy analytů  $A_c$  (z angl. corrected). Platí:

$$A_c = \frac{A}{t_{migr}}$$

### b.

Jelikož je použitá metoda manuálního dávkování zatížena relativně velkou chybou, využívá se při vyhodnocování ploch jeden z přítomných analytů jako pomocná referentní látka. Místo absolutní plochy stanovovaného analytu,  $A$ , se do výpočtů bere relativní hodnota plochy jeho píku,  $A_r$ , což je hodnota  $A$  vydělená plochou píku pomocné látky,  $A_p$ .

$$A_r = \frac{A}{A_p}$$

Dávujeme-li tedy proměnlivé množství vzorku, měly by relativní plochy píků analytu zůstat konstantní, na rozdíl od absolutních ploch píků. Jako pomocnou látku je třeba zvolit takovou, jejíž migrace či retence a plocha píku jsou blízké hodnotám analytu.

### a.+b.

Kombinací postupů uvedených v poznámkách a) a b) dostáváme výsledný **vzorec pro výpočet koncentrace analytu metodou standardního přídávku v CZE:**

$$c_x = c_{sp} \cdot \frac{\frac{(A_1/t_1)}{(A_{p1}/t_{p1})} \cdot V_{sp}}{\frac{(A_2/t_2)}{(A_{p2}/t_{p2})} \cdot (V_1 + V_{sp}) - \frac{(A_1/t_1)}{(A_{p1}/t_{p1})} \cdot V_1}$$

kde  $t_1$  a  $t_{p1}$  jsou migrační časy analytu a pomocné látky v původním vzorku, zatímco  $t_2$  a  $t_{p2}$  jsou migrační časy analytu a pomocné látky ve vzorku s přídávkem.  $A_1$  a  $A_2$  jsou plochy stanovované látky ve vzorku a ve vzorku s přídávkem,  $A_{p1}$  a  $A_{p2}$  jsou plochy pomocné látky v původním vzorku a ve vzorku s přídávkem.

## Vzorce pro výpočty

**Elektroosmotický tok** 
$$\mu_{EOF} = \frac{l_t \cdot l_d}{U \cdot t_{EOF}} \quad (\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \text{s}^{-1})$$

$l_t$  ... celková délka kapiláry v cm;  $l_d$  ... délka kapiláry k detektoru v cm;  $U$  ... separační napětí ve V;  $t_{EOF}$  ... migrační čas markeru EOF v s

**Zdánlivá (pozorovaná) mobilita** 
$$\mu_{poz} = \mu_{eof} + \mu_{ef} = \frac{l_t \cdot l_d}{t_m \cdot U} \quad (\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \text{s}^{-1})$$

$l_t$  ... celková délka kapiláry v cm;  $l_d$  ... délka kapiláry k detektoru v cm;  $U$  ... separační napětí ve V;  $t_m$  ... migrační čas analytu v s

**Efektivní (elektroforetická) mobilita** 
$$\mu_{ef} = \left( \frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \cdot \frac{l_t \cdot l_d}{U} \quad (\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \text{s}^{-1})$$

$l_t$  ... celková délka kapiláry v cm;  $l_d$  ... délka kapiláry k detektoru v cm;  $U$  ... separační napětí ve V;  $t_m$  ... migrační čas analytu v s;  $t_{EOF}$  ... migrační čas markeru EOF v s

## Iontová mobilita

a) Slabá kyselina 
$$\mu_{A^-} = \mu_{ef,HA} \left( 1 + 10^{(pK_a - pH)} \right)$$

b) Slabá zásada 
$$\mu_{BH^+} = \mu_{ef,B} \left( 1 + 10^{(pH - pK_a)} \right)$$

**Počet teoretických pater** 
$$n = 16 \left( \frac{t_r}{w} \right)^2 = 5,545 \left( \frac{t_r}{w_{0,5}} \right)^2$$

$t_r$  ... retenční čas analytu min nebo s;  $w$  ... šířka píku analytu při základně píku v min nebo s;  $(w_{0,5})$  ... šířka píku analytu v polovině výšky píku v min nebo s

**Výškový ekvivalent teoretického patra** 
$$H = \frac{L}{n}$$

$L$  ... délka kolony v m, cm nebo mm;  $n$  ... počet teoretických pater

**Rozlišení dvou sousedních píků** 
$$R_{1,2} = \frac{2(t_{r,2} - t_{r,1})}{w_1 + w_2} \quad R_{1,2} = \frac{1,18(t_{r,2} - t_{r,1})}{(w_{0,5})_1 + (w_{0,5})_2}$$

$t_{r,1}$  a  $t_{r,2}$  ... retenční čas analytu 1 a analytu 2 v min nebo s;  $w_1$  a  $w_2$  ... šířka píku analytu 1 a analytu 2 při základně píku v min nebo s;  $(w_{0,5})_1$  a  $(w_{0,5})_2$  ... šířka píku analytu 1 a analytu 2 v polovině výšky píku v min nebo s

**Průtok nestlačitelné kapaliny trubicí (Poisseuillova rovnice)** 
$$v_v = \frac{dV}{dt} = \frac{\pi R^4 (p_1 - p_2)}{8 \eta l} \quad (\text{ml} \cdot \text{s}^{-1})$$

$v_v$  ... objemová průtoková rychlost v  $\text{ml} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $R$  ... poloměr trubice v cm,  $p_1$  a  $p_2$  ... tlaky kapaliny na vstupu a výstupu trubice v Pa,  $l$  ... délka trubice v cm,  $\eta$  ... viskozita kapaliny v Pa·s (pro vodu, resp. zředěné vodné roztoky, je rovna  $0,8904 \cdot 10^{-3}$  Pa·s pro  $24^\circ\text{C}$ )