

Emil Havránek a kolektív

**LABORATÓRNE CVIČENIA
Z ANALYTICKEJ CHÉMIE
III**

Fyzikálno-chemické metódy



UNIVERZITA KOMENSKÉHO BRATISLAVA

Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského

Emil Havránek a kolektív

**LABORATÓRNE CVIČENIA
Z ANALYTICKEJ CHÉMIE
III**

Fyzikálno-chemické metódy

1998

UNIVERZITA KOMENSKÉHO BRATISLAVA

UNIVERZITA KOMENSKÉHO
ÚSTREDNÁ KNIŽNICA
FARMACEUTICKEJ FAKULTY
Kalinčiakova 8
832 32 BRATISLAVA
- 6 -

V5004
Fa 99 212/04 R10

© prof. RNDr. Emil Havránek, CSc., RNDr. Ivan Benedikovič, CSc., RNDr. Iva Valášková, CSc.,
RNDr. Mária Svičková, CSc., RNDr. Magdaléna Hollá, 1998

Recenzentky: doc. RNDr. Vlasta Madajová, CSc.
doc. RNDr. Eva Sedlářová, CSc.

Za odbornú stránku tejto publikácie zodpovedajú autori.

ISBN 80-223-1323-8

Úvod

Skriptá z fyzikálno-chemických metód sú určené študentom druhého ročníka Farmaceutickej fakulty UK. Budú sa využívať v experimentálnych laboratórnych cvičeniach inštrumentálnych metód predmetu analytická chémia i ako základná literatúra pre študentov tretieho ročníka povinno-výberového predmetu nové smery v analytickej chémii.

Pri spracúvaní skript sa kládol dôraz na zrozumiteľnosť, na znalosť teoretických základov analytických metód, na experimentálnu techniku, pričom sa nadväzuje na znalosti získané pri predchádzajúcom štúdiu chemickej kvalitatívnej a kvantitatívnej analýzy, ako aj ďalších prípravných disciplín.

Cieľom autorov bolo vybrať moderné inštrumentálne analytické metódy v súlade s trendom ich súčasného vývoja so zreteľom na ich využitie najmä vo farmaceutickej praxi a pri kontrole podmienok životného prostredia. Výber metód bol zostavený tak, aby rozvíjal tvorivé schopnosti študentov a viedol ich k analytickému mysleniu. Výber metód demonštruje technické možnosti, ciele a prostriedky súčasnej analytickej chémie.

Realizácia úloh v súlade s technickými podmienkami (slovenskou technickou normou – STN) prispieva k adaptácii študenta na riešenie problémov širokého spektra analytickej praxe.

Skriptá zahŕňujú iba základné teoretické poznatky, ktoré sú bezpodmienečne nutné na zvládnutie experimentálnych úloh, pričom sa predpokladá sústavné štúdium odporúčanej študijnej literatúry i absolvovania prednášok z analytickej chémie. Ďalším predpokladom je presné dodržiavanie pracovných postupov a zásad správnej laboratórnej praxe, poriadku a čistoty. Rovnako dôležité je viesť si pracovný zošit, do ktorého sa zapisujú všetky čiastkové výsledky potrebné na celkové vyhodnotenie analýzy a vypracovanie záverečného protokolu.

Uvedené úlohy z oblasti separačných, spektrálnych, elektrochemických a nukleárných analytických metód sú orientované na kvalitatívnu analýzu (dôkaz, identifikácia) a kvantitatívnu analýzu predovšetkým organických látok v súlade s potrebami profilových disciplín farmaceutického štúdia.

Autori



1. SEPARAČNÉ METÓDY

Vo farmaceutickej a biochemickej analytike sa bežne stretávame s analýzou vzoriek, ktoré sú jednoduchšie alebo zložitejšie zmesi. Väčšinou je preto nutné zložky zo zmesi pred analýzou oddeliť vhodnými separačnými postupmi.

Z fyzikálneho hľadiska spoločným znakom separačných metód je distribúcia látky, resp. viacerých látok medzi dve rôzne fázy, ktoré sú v tesnom kontakte. Niektoré separačné postupy sa používajú ako metódy na čistenie látok (kryštalizácia, zrážanie, filtrácia, destilácia, extrakcia, sublimácia). V analytickej chémii našli široké uplatnenie účinnejšie a citlivejšie metódy, súborne označené ako chromatografické metódy a metódy elektromigračné.

Chromatografický proces prebieha v prostredí tvorenom sústavou dvoch nemiešajúcich sa fáz. Nepohyblivá (stacionárna, zakotvená) fáza môže byť kvapalná alebo tuhá, a býva usporiadaná ako stĺpec (kolóna), alebo plošná vrstva (papier, tenká vrstva sorbentu). Pohyblivá (mobilná) fáza pretekajúca nepohyblivou fázou býva kvapalná alebo plyná. Zložky delenej zmesi sa musia líšiť v afinitách k týmto dvom fázam. K ich rozdeleniu dochádza tak, že zložka s väčšou afinitou k mobilnej fáze je unášaná jej prúdom, zatiaľ čo zložka s väčšou afinitou k stacionárnej fáze zostáva na mieste alebo sa pohybuje pomalšie. Ak sú rozdiely v pohyblivostiach zložiek delenej zmesi dostatočne veľké, po určitom čase sa zložky od seba úplne oddelia a vytvoria samostatné zóny. Ak sú farebné, ich polohu na tuhom nosiči (papier, tenká vrstva, stĺpec) môžeme vidieť priamo, v opačnom prípade ich musíme vhodnou fyzikálnou alebo chemickou reakciou zvýrazniť, čiže detegovať.

Podľa povahy afinitných síl, ktoré sa uplatňujú pri separácii, rozdeľujeme chromatografiu na:

- a) adsorpčnú: stacionárna fáza je adsorbent, ktorý viaže delené látky. Príčinou rozdelenia sú ich rozdielne adsorpčné koeficienty;
- b) rozdeľovaciu: stacionárna fáza je kvapalina zakotvená na tuhom nosiči. K rozdeľovaniu dochádza na základe rozdielov v rozdeľovacích koeficientoch delených zložiek;
- c) iónovovýmennú chromatografiu: stacionárna fáza je menič iónov, brzdou silou je rovnováha vratnej výmennej reakcie iónov medzi meničom iónov a roztokom. Je použiteľná iba pre látky schopné existencie v iónovej forme;
- d) chromatografiu na molekulových sitách: stacionárna fáza je lyofilný gél, ktorého dutiny sú vyplnené kvapalnou fázou. Separácia je založená na rozdielnej difúzii látok s rôznou veľkosťou molekúl stĺpcom zrníčok molekulového sita s určitým sieťovaním.

Toto rozdelenie je do istej miery schematické, pretože pri každom chromatografickom delení sa uplatňuje viac mechanizmov, napr. pri iónovovýmennej chromatografii sa okrem výmeny iónov môže uplatňovať i adsorpcia.

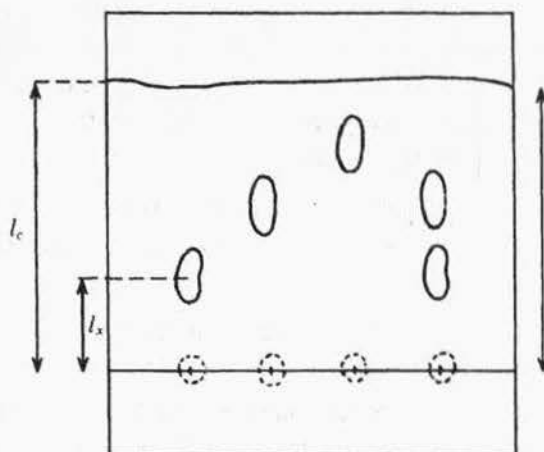
Podľa usporiadania stacionárnej a mobilnej fázy delíme chromatografiu na papierovú, tenkovrstvovú a kolónovú (kvapalinová alebo plyná).

1.1. CHROMATOGRAFIA NA TENKEJ VRSTVE

Z hľadiska deliaceho princípu je to adsorpčná chromatografia. Stacionárnou fázou je adsorbent (najčastejšie sa používa silikagél alebo Al_2O_3), ktorý je nanosený vo forme tenkej vrstvičky na tuhej podložke (sklo, hliníková fólia). V praxi sa často používajú komerčne vyrábané silikagélové vrstvy. Pripravujú sa nanosením kašovitej suspenzie silikagélu so spojivom (sadra, škrob) na hliníkovú fóliu. Po vysušení v sušiarňi vznikne dostatočne pevná vrstva, ktorá je pripravená na použitie.

Roztok chromatografovanej vzorky sa nanáša mikropipetou vo forme bodky na označené miesto (štart) blízko dolného okraja dosky. Po zaschnutí nanosených škvŕn sa doska umiestni do uzavretej chromatografickej komory, v ktorej je na dne naliata pohyblivá fáza v takom množstve, aby nesiahala po štart chromatografovaných vzoriek. Aby sa zaistilo dokonalé nasýtenie atmosféry komory parami kvapalnej fázy, sú jej steny vyložené filtračným papierom namočeným v tomto roztoku. Vzostupným vztlíčaním kvapalnej fázy vo vrstve sa uskutoční chromatografické delenie (vyvíjanie chromatogramu). Po vyvinutí chromatogramu sa označí línia rozpúšťadla (čelo), chromatogram sa vysuší a poloha škvŕn rozdelených látok sa zistí detekciou. Najbežnejší spôsob detekcie je postriekanie chromatogramu roztokom vhodného skúmadla. Škvŕny analyzovaných látok sa vyhodnotia kvalitatívne, resp. i kvantitatívne.

Kvalitatívne vyhodnotenie. Kvalitu látky v danej chromatografickej sústave charakterizuje hodnota R_F , čo je pomer vzdialenosti stredu škvŕny od štartu ku vzdialenosti čela mobilnej fázy od štartu (obr. 1). R_F hodnoty sú však reprodukovateľné len pri absolútnom dodržaní všetkých experimentálnych podmienok (zloženie fáz, druh sorbentu, hrúbka vrstvy, atmosféra komory, teplota atď.), čo je veľmi obťažné. V praxi sa preto škvŕny analyzovanej vzorky porovnávajú so škvŕnami známych látok (štandardov), ktoré sa chromatografujú súčasne s analyzovanou vzorkou na tej istej doske.



Obr. 1 Určovanie hodnôt R_F
 $R_F = l_x / l_c$

Úloha 1. Delenie a identifikácia aminov na Silufole

Delenie voľných aminov je založené na rozdielnej adsorptivite na adsorbente, ktorá súvisí s bázičitou delených aminov. Dobré možnosti delenia sa dosahujú na vrstvách silikagélu, ktoré sa u nás priemyselne vyrábajú pod názvom Silufol.

Chemikálie a roztoky. Neznáma vzorka – zmes aminov; etanolové roztoky štandardov: p-fenyléndiamín, m-fenyléndiamín, o-fenyléndiamín, p-toluidín, α -naftylamín, 2-etylanilín, difenylamín, fenyl-2-

naftyl-amín, všetky $w(\text{štandard}) = 0,5 \%$; pohyblivá fáza : dioxán : xylén = 1 : 3; detekčné skúmadlo: roztok kyseliny pikrovej $w(\text{k. pikr.}) = 0,5 \%$; etanol na premývanie pipety.

Pracovný postup. Do suchej chromatografickej komory, ktorej bočné steny sú vyložené filtračným papierom, nalejeme 100 ml pohyblivej fázy tak, aby sa celý papier navlhčil (aby sa zaistilo nasýtenie atmosféry komory parami pohyblivej fázy). Komoru zakryjeme sklenenou doskou a zaťažíme. Na doske Silufolu si vo vzdialenosti 1,5 cm od okraja označíme obyčajnou ceruzkou bodkami v 1,5 cm odstupoch miesta na nanášanie vzoriek (štart) a očísľujeme ich 1 – 9. Na bodky 1 – 8 nanesieme asi 2 μl etanolových roztokov štandardov aminorov a na posledné miesto rovnaký objem roztoku neznámej vzorky.

Nanášame mikropipetou tak, že priložením kapiláry k povrchu roztoku necháme roztok nasasť do výšky asi 0,5 cm (ak je stĺpec v kapiláre vyšší, prebytočný roztok odsajeme do filtračného papiera). Pipetu potom priložíme kolmo na štart, pričom sa roztok vsaje do vrstvy (škvrna nemá mať priemer väčší ako 3 mm). Pipetu 3-krát premyjeme nasatím a odsatím etanolu a nanášame ďalšiu vzorku. Vymytú mikropipetu po skončení nanášania uchováваме v skúmavke. Po vysušení škvŕn vložíme dosku šikmo do chromatografickej komory tak, aby štart nebol pod hladinou pohyblivej fázy. Komoru prikryjeme sklenenou doskou a zaťažíme. Chromatografiu necháme prebiehať tak dlho, až pohyblivá fáza vystúpi asi 1,5 cm pod okraj dosky. Potom chromatogram vyberieme, čiarou označíme polohu čela a necháme voľne vysušiť. Zvyšok pohyblivej fázy vrátime späť do fľaše a komoru vymyjeme.

Vysušený chromatogram detegujeme postriekaním roztokom kyseliny pikrovej. Aminy po vysušení poskytujú rôzne zafarbené škvŕny na žltom pozadí (státím sa škvŕny stávajú výraznejšie). Zvyšok detekčného skúmadla vrátime do fľaše a vymyjeme rozprašovač.

Vyhodnotenie. Po kvalitatívnej stránke je látka charakterizovaná R_F hodnotou, čo je pomer vzdialenosti stredu škvŕny od štartu l_x a čela pohyblivej fázy od štartu l_c (obr. 1). Podľa hodnôt R_F a porovnaním so škvŕnami štandardov určíme zloženie a identifikujeme jednotlivé zložky neznámej vzorky. Do protokolu napíšeme princíp metódy a stručný pracovný postup. Ďalej uvedieme výpočet R_F hodnôt štandardov a zložiek analyzovanej vzorky. K protokolu priložíme chromatogram.

Úloha 2. Delenie a identifikácia fenolov na Silufole

Zmes fenolov možno rozdeliť na základe rozdielnej adsorpcie na silikagéle. Na báze silikagélu sa priemyselne vyrábajú tenké vrstvy pod názvom Silufol. Adsorbent je nanosený na tenkú hliníkovú fóliu, ktorú je možné ľubovoľne strihať.

Chemikálie a roztoky. Vzorka: zmes fenolov; etanolové roztoky štandardov fenolov: p-amínofenol, m-amínofenol, pyrogallol, pyrokatechin, α -naftol, všetky $w(\text{fenol}) = 0,5 \%$; rezorcín, α -nitrozo- β -naftol, o-anizol všetky $w(\text{fenol}) = 1,0 \%$; pohyblivá fáza: dioxán : kyselina octová : benzén = 25 : 4 : 90; detekčné skúmadlo: roztok chloridu železitého $w(\text{FeCl}_3) = 5,0 \%$; etanol na premývanie pipety.

Pracovný postup. Do suchej chromatografickej komory, ktorej bočné steny sú vyložené filtračným papierom, nalejeme 100 ml pohyblivej fázy tak, aby sa celý papier navlhčil (aby sa zaistilo nasýtenie atmosféry komory parami pohyblivej fázy). Komoru zakryjeme sklenenou doskou a zaťažíme. Na doske Silufolu si vo vzdialenosti 1,5 cm od okraja označíme obyčajnou ceruzkou bodkami v 1,5 cm odstupoch miesta na nanášanie vzoriek (štart) a očísľujeme ich 1 – 9. Na bodky 1 – 8 nanesieme asi 2 μl etanolových roztokov štandardov fenolov a na posledné miesto rovnaký objem roztoku neznámej vzorky.

Nanášame mikropipetou tak, že priložením kapiláry k povrchu roztoku necháme roztok nasasť do výšky asi 0,5 cm (ak je stĺpec v kapiláre vyšší, prebytočný roztok odsajeme do filtračného papiera). Pipetu potom priložíme kolmo na štart, pričom sa roztok vsaje do vrstvy (škvrna nemá mať priemer väčší ako 3 mm). Pipetu 3-krát premyjeme nasatím a odsatím etanolu a nanášame ďalšiu vzorku. Vymytú mikro-

pipetu po skončení nanášania uchováваме v skúmavke. Po vysušení škvŕn vložíme dosku šikmo do chromatografickej komory tak, aby štart nebol pod hladinou pohyblivej fázy. Komoru prikryjeme sklenenou doskou a zaťažíme. Chromatografiu necháme prebiehať tak dlho, až pohyblivá fáza vystúpi asi 1,5 cm pod okraj dosky. Potom chromatogram vyberieme, čiarou označíme polohu čela a necháme voľne vysušiť. Zvyšok pohyblivej fázy vrátime späť do fľaše a komoru vymyjeme.

Vysušený chromatogram detegujeme postriekaním roztokom FeCl_3 , ktorý dáva s fenolmi komplexy rôzneho sfarbenia.

Vyhodnotenie. Po stránke kvalitatívnej je látka charakterizovaná R_F hodnotou, čo je pomer vzdialenosti stredu škvŕny od štartu I_s a čela pohyblivej fázy od štartu I_c (obr. 1). Podľa hodnôt R_F a porovnaním so škvŕnami štandardov určíme zloženie a identifikujeme jednotlivé zložky neznámej vzorky. Do protokolu napíšeme princíp metódy a stručný pracovný postup. Ďalej uvedieme výpočet R_F hodnôt štandardov a zložiek analyzovanej vzorky. K protokolu priložíme chromatogram.

1.2. IÓNOVOVÝMENNÁ CHROMATOGRÁFIA

Výmena iónov je reverzibilný proces, ktorý prebieha medzi stacionárnou fázou iónomeniča a fázou roztoku. Meniče iónov (iónomeniče, ionexy) sú makromolekulárne zlúčeniny s mriežkovou štruktúrou, ktoré majú na základnom skelete viazané ionizovateľné funkčné skupiny. Vo vode a v roztokoch elektrolytov sú nerozpustné, ale napučiavaním vytvárajú mikroporéznu maticu. V napučanom stave sú ióny, ktoré boli viazané na funkčnú skupinu voľne pohyblivé a môžu difundovať do roztoku a na ich miesto vstupujú ióny z roztoku. Táto výmena iónov sa deje v stechiometrickom pomere a prebieha až do rovnovážneho stavu. Veličina, ktorá sa používa na vyjadrenie rovnováhy výmeny iónov, je distribučný (rozdeľovací) koeficient D . Je to pomer koncentrácií iónu vo fáze iónomeniča a v roztoku.

Iónomeniče, ktoré majú viazané kyslé funkčné skupiny ($-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$), sú schopné vymieňať katióny, označujú sa ako katiónoimeniče (katexy). Aniónomeniče (anexy) majú funkčné skupiny bázičné (primárne, sekundárne alebo terciárne amíny). Podľa druhu iónu, ktorý je viazaný na funkčnú skupinu iónomeniča, hovoríme o cykle iónomeniča (napr. katex v H^+ -cykle; anex v Cl^- -cykle).

Úloha 3. Nepriame alkalimetrické stanovenie medi

Princíp neutralizačného stanovenia katiónov spočíva v tom, že pri prechode roztoku soli iónu kovu cez stĺpec katexu v H^+ -cykle dochádza k výmennej reakcii a uvoľňuje sa ekvivalentné množstvo kyseliny, ktorú stanovujeme alkalimetrickou titráciou. Priebeh a stechiometriu výmennej reakcie vystihuje rovnica



Stanovením kyseliny v eluáte nepriamo stanovíme sledovaný ión. Na rovnakom princípe možno stanoviť aj anióny, ak použijeme aniónomenič v OH^- -cykle, pričom sa pri výmennej reakcii uvoľňuje ekvivalentné množstvo hydroxidu



Chemikálie a roztoky. Chromatografická kolóna s Katexom S X-8; roztok kyseliny chlorovodíkovej $c(\text{HCl}) = 2 \text{ mol/l}$; roztok hydroxidu sodného $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$; roztok kyseliny dusičnej $c(\text{HNO}_3) = 2 \text{ mol/l}$; roztok dusičnanu strieborného $c(\text{AgNO}_3) = 0,1 \text{ mol/l}$; roztok hexakynoželeznanu tetradraselného s koncentráciou $c(\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]) = 0,1 \text{ mol/l}$.

Pracovný postup. Príprava kolóny sa robí len pri výmene náplne. Silne kyslý iónomenič Katex S X-8 rozomelieme a preosiatím oddelíme častice veľkosti 0,3 – 0,5 mm, ktoré necháme v kadičke napučiavať 1 – 2 dni asi v 10-násobnom množstve vody. Potom niekoľkonásobnou dekantáciou odstránime menšie častice a na naplnenie kolóny použijeme len frakciu, ktorá sa rýchlo usadzuje.



Obr. 2. Chromatografická kolóna naplnená iónomeničom

Chromatografickú kolónu (obr. 2) upevníme na stojan a uzavrieme kohút. Kolónu naplníme asi do polovice vodou. K výtoku zasunieme tyčinkou chumáčik sklenenej vaty a nalievame suspenziu iónomeniča až po horný okraj. Pootvorením kohútika necháme odtekať prebytočnú vodu rýchlosťou 1 – 2 kvapky za sekundu, pričom dávame pozor, aby voda neklesla pod okraj stĺpca a aby sa v stĺpci nevytvorila vzduchová bublina. Suspenziu dolievame, až kým stĺpec nedosiahne výšku asi 15 cm.

Aby sa zabránilo vireniu iónomeniča, ukončíme stĺpec chumáčikom sklenenej vaty. Takto pripravený iónomenič prevedieme do H^+ -cyklu tým, že cez neho necháme pretiecť 200 ml roztoku HCl s $c(HCl) = 2 \text{ mol/l}$ rýchlosťou asi 1 – 2 kvapky za sekundu. Prebytočnú kyselinu vymývame rovnakým spôsobom vodou až do negatívnej reakcie na Cl^- .

Postup pri stanovení medi. Kohút kolóny pootvoríme tak, že rýchlosť prietoku je asi 1 – 2 kvapky za sekundu a kolónu premývame vodou, pričom dbáme na to, aby voda neklesla pod okraj stĺpca. Časť eluátu zachytíme do skúmavky a urobíme skúšku na Cl^- : roztok okyslíme pár kvapkami zriedenej HNO_3 a pridáme pár kvapiek roztoku $AgNO_3$. V prípade negatívnej reakcie kohút uzavrieme a kolóna je pripravená na analýzu. V opačnom prípade premývame vodou až do negatívnej reakcie na chloridy.

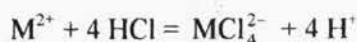
Roztok vzorky, ktorý obsahuje Cu^{2+} kvantitatívne preniesieme do kadičky a zriedime vodou asi na 50 ml. Zriedený roztok po častiach kvantitatívne preniesieme do kolóny. Od naliatia vzorky do kolóny zachytávame eluát do 250 ml odmernej banky a kolónu premývame vodou, až kým nevytečie objem asi 220 ml. Potom koniec kolóny a banku nad značkou opláchneme vodou. Po vysušení hrdla banky nad značkou doplníme objem vodou z pipety po značku odmernej banky. Potom roztok v odmernej banke premiešame a odpipetujeme z neho do titračnej banky 25 ml a po pridaní indikátora fenolftaleínu titrujeme odmerným roztokom $NaOH$ do ružového sfarbenia. Urobíme tri paralelné stanovenia.

Cu^{2+} ióny zachytené na stĺpci musíme vymyť a katex opäť previesť do H^+ -cyklu. Robíme to tak, že kolónu premývame roztokom HCl až do negatívnej reakcie na Cu^{2+} (odtekajúci eluát zachytený do skúmavky nesmie po pridaní roztoku $K_4[Fe(CN)_6]$ dávať hnedý zákal alebo zafarbenie). Kolónu premývame vodou až do negatívnej reakcie na Cl^- , výpustný kohút zatvoríme a kolónu uzavrieme zátkou, aby nemohlo dôjsť k odpareniu vody nad stĺpcom ionexu.

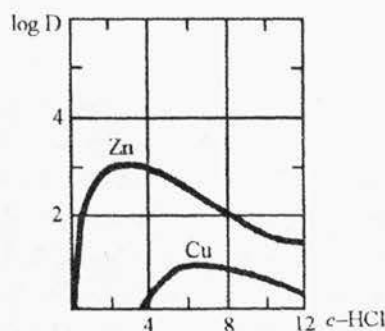
Vyhodnotenie analýzy. Z troch paralelných stanovení vypočítame priemernú spotrebu odmerného roztoku, z ktorej vypočítame hmotnosť Cu^{2+} v g v danej vzorke. Z rovnice stanovenia vyplýva, že Cu^{2+} vymieňa 2H^+ , preto $n\text{Cu}^{2+} = 1/2 n\text{H}^+$.

Úloha 4. Oddelovanie a stanovenie medi a zinku

Princíp stanovenia. Pri delení iónov kovov na aniónomeniči (anexe) využívame schopnosť niektorých kationtov tvoriť aniónové komplexy, ktoré sa viažu na iónomenič



Tvorba komplexu závisí od jeho stability a od koncentrácie HCl v roztoku. Napr. zinočnatý kation je v prostredí HCl s koncentráciou $c(\text{HCl}) = 2 \text{ mol/l}$ úplne viazaný do komplexu a kvantitatívne sa sorbuje na anex, zatiaľ čo za týchto podmienok meďnatý ión komplex netvorí a prechádza stĺpcom ionexu bez toho, aby došlo k jeho väzbe. Jeho koncentráciu možno stanoviť v eluáte vhodnou analytickou metódou. Názorne to ukazuje obr. 3, na ktorom je graf závislosti rozdeľovacieho koeficientu D od koncentrácie HCl. Ak po vymytí Cu^{2+} zo stĺpca necháme pretiecť kolónou veľmi zriedenú HCl, dochádza k rozkladu zinočnatého chlórkomplexu a uvoľnený Zn^{2+} prechádza kvantitatívne do eluátu, kde ho možno stanoviť.



Obr. 3. Závislosť logaritmu rozdeľovacích koeficientov D medi a zinku od koncentrácie HCl na silne bázičkom anexe

Chemikálie a roztoky. Chromatografická kolóna so silne bázičným Anexom S X-8; roztoky kyseliny chlorovodíkovej s koncentraciami $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol/l}$, 2 mol/l a $0,005 \text{ mol/l}$; roztok tiosíranu disodného s $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,01 \text{ mol/l}$; roztok chelátónu 3 $c(\text{chelátón 3}) = 0,01 \text{ mol/l}$; indikátor eriochromová čierna T (zmes s NaCl 1:100); tuhý jodid draselný, škrobový roztok; tlmivý roztok (54 g NH_4Cl a 350 ml koncentrovaného roztoku NH_3 doplniť vodou na 1000 ml).

Pracovný postup. Príprava stĺpca iónomeniča: na delenie a stanovenie zmesi Zn^{2+} a Cu^{2+} používame silne zásaditý Anex S X-8, rozomletý a preosiaty na veľkosť zrna $0,2 - 0,25 \text{ mm}$. Aniónomenič pred analýzou necháme 1 – 2 dni napučiavať v kadičke v 10-násobnom množstve vody. Potom ho opakovanou dekantáciou zbavíme jemných častíc a na naplnenie chromatografickej kolóny použijeme len rýchlo sedimentujúcu frakciu. Pripraveným iónomeničom naplníme kolónu postupom, ako je uvedený v úlohe 3. Ak ide o novú náplň kolóny, prevedieme iónomenič najskôr do OH^- -cyklu preliatím 100 ml roztoku NaOH s $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$, potom premyjeme vodou a preliatím 100 ml HCl s $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$ prevedieme anex do Cl^- -cyklu (precyklovanie aniónomeniča). Prietokovú rýchlosť pri všetkých operáciách volíme asi 1 – 2 kvapky za sekundu.

Postup stanovenia. Kolónou necháme pretiecť 25 ml HCl s koncentráciou $c(\text{HCl}) = 2 \text{ mol/l}$ pri prietokovej rýchlosti 1 – 2 kvapky za sekundu. Počas celej práce **dávame pozor**, aby hladina v kolóne bola vždy nad stĺpcom, v opačnom prípade by do stĺpca vnikli vzduchové bubliny a bolo by potrebné kolónu znovu naplniť. Eluát zachytíme do kadičky a vylejeme.

K roztoku vzorky pridáme 10 ml HCl s koncentráciou $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol/l}$. Vzorku potom kvantitatívne prelejeme do kolóny, pričom na vyplachovanie použijeme HCl s $c(\text{HCl}) = 2 \text{ mol/l}$. Z kolóny vyteká Cu^{2+} , ktorý netvorí komplex, preto eluát zachytávame do 100 ml odmernej banky a kolónu premývame roztokom HCl s koncentráciou $c(\text{HCl}) = 2 \text{ mol/l}$, až kým nevytečie objem asi 90 ml. Potom koniec kolóny a banku nad značkou opláchneme vodou. Po vysušení hrdla banky nad značkou doplníme objem vodou z pipety po značku. Zinočnatý chlórkomplex rozložíme a uvoľnený Zn^{2+} vymyjeme z kolóny tak, že stĺpcom necháme pretiecť HCl s koncentráciou $c(\text{HCl}) = 0,005 \text{ mol/l}$. Eluát zachytávame do 200 ml odmernej banky. Elúciu ukončíme podobne ako pri stanovení medi.

Po skončení kolónu premyjeme 30 ml HCl s koncentráciou $c(\text{HCl}) = 2 \text{ mol/l}$, čím prevedieme iónomnič do H^+ cyklu. Potom kohút zatvoríme a kolónu dobre uzavrieme zátkou, aby nedošlo k odpareniu kvapaliny nad iónomničom a vysušeniu stĺpca a aby pary HCl neunikali do ovzdušia.

Jodometrické stanovenie Cu^{2+} . Zo 100 ml odmernej banky, obsahujúcej Cu^{2+} odpipetujeme 25 ml roztoku do titračnej banky, zriedime vodou na 50 ml, pridáme asi 2 g KI, premiešame a ihneď titrujeme vylúčený elementárny jód odmerným roztokom $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ až do slabo žltého zafarbenia. Potom pridáme 5 ml roztoku škrobu a titrujeme do odfarbenia. Titráciu robíme trikrát.

Chelátometrické stanovenie Zn^{2+} . Roztok v 200 ml odmernej banke premiešame a odpipetujeme z neho do troch titračných baniek po 50 ml. K roztoku pridáme indikátor eriochrómovú čiernu T, po kvapkách zriedený amoniak až sa roztok zafarbí vínovočerveno a 2 ml tlmivého roztoku. Potom titrujeme odmerným roztokom chelátónu 3 do čisto modrej farby.

Vyhodnotenie stanovenia. Z priemerných spotrieb pri titracii vypočítame obsah Cu^{2+} a Zn^{2+} v mg. Výsledok prepočítame na obsah kationu v celej vzorke.

1.3. EXTRAKČNÉ METÓDY

1.3.1. Základné pojmy

Extrakčnými metódami môžeme previesť zložky z tuhej fázy do kvapaliny, z kvapaliny do kvapaliny alebo z kvapaliny do tuhej fázy.

Rozhodujúce faktory, ktoré určujú priebeh extrakcie z tuhej fázy do extrahovadla sú rozpustnosť zložky v extrahovadle a rýchlosť jej prechodu z tuhej fázy do roztoku. Rozpustnosť možno ovplyvniť výberom extrahovadla a teplotou. Rýchlosť prechodu zložky z tuhej fázy do roztoku závisí najmä od veľkosti častíc tuhej fázy, jej pórovitosti, ako aj od rýchlosti prenikania extrahovadla do tuhej fázy a rozpustnosti látky v extrahovadle.

Pretože extrakcia látky z kvapaliny do kvapaliny sa používa v analytickej chémii podstatne častejšie ako extrakcia tuhej fázy kvapalinou, ďalší text tejto kapitoly sa bude venovať výhradne tejto metóde.

Základnou podmienkou extrakcie zložky z kvapaliny do kvapaliny je, aby sa roztok s extrahovadlom nemiešal. Okrem oddelenia sa dá súčasne dosiahnuť aj skoncentrovanie extrahovanej látky, čo je analyticky významné. Pri extrakcii látka rozpustená v jednej z fáz prechádza cez fázové rozhranie do fázy druhej (za predpokladu, že je v nej taktiež rozpustná) až do dosiahnutia termodynamickej rovnováhy.

Tento dej sa označuje ako **rozdeľovanie (distribúcia) látky medzi dvomi kvapalnými fázami**. Pretože rýchlosť dosiahnutia rovnováhy závisí aj od plochy rozhrania, ktorým látka prestupuje, dá sa potrebný čas skrátiť pretrepávaním zmesi (dočasne sa tým plocha rozhrania zväčšuje).

Vo väčšine prípadov ide o extrakciu elektroneutrálnych látok látky z polárnejších vodných roztokov do menej polárnych organických rozpúšťadiel (napr. kvapalné uhľovodíky, ich halogénderiváty, éter, estery, ketóny, vyššie alkoholy a i.). Pre extrakciu zložky z vodnej fázy do organickej fázy je nevyhnutné použiť rozpúšťadlo, ktoré je nemiešateľné s vodou. Druhou podmienkou je, aby sa na fázovom rozhraní netvorila emulzia. Väčšina organických zlúčenín sú elektroneutrálne látky, ktoré môžu pri extrakcii prenikať cez fázové rozhranie. Pri ich extrakcii možno vhodnou voľbou extrahovadla dosiahnuť veľké výťažky. Ak organická látka obsahuje hydrofilné skupiny (napr. $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$ a pod.), rozpúšťa sa dobre vo vode a výťažky extrakcie sú veľmi malé. Ióny anorganických zlúčenín možno extrahovať len po eliminácii náboja ako iónové asociáty alebo cheláty.

Pomer koncentrácie látky v oboch fázach je po dosiahnutí rovnováhy závislý len od teploty a možno ho vyjadriť **rozdeľovacou konštantou** K_D

$$K_D = \frac{[A]_{\text{org}}}{[A]_{\text{aq}}}$$

kde $[A]_{\text{org}}$ je koncentrácia zložky A v organickom rozpúšťadle a $[A]_{\text{aq}}$ koncentrácia zložky A vo vodnej fáze. Koncentrácia v organickej fáze je teda lineárnou funkciou koncentrácie vo vodnej fáze.

V prípade, ak sa daná látka môže vyskytovať v roztokoch vo viacerých formách (môže hydrolyzovať, disociovať, asociovať, tvoriť komplexné zlúčeniny a pod.), jej rozdelenie medzi dve nemiešajúce sa kvapaliny je výhodné vyjadriť **rozdeľovacím pomerom** D

$$D = \frac{c(A)_{\text{org}}}{c(A)_{\text{aq}}}$$

kde $c(A)$ je celková analytická koncentrácia látky A v príslušnom rozpúšťadle po ustálení rovnováhy.

Ak sa rozdeľovací pomer výraznejšie odlišuje od jednotky, nastáva obohatenie jednej fázy látkou. Praktický význam majú predovšetkým systémy, v ktorých $D > 1$; umožňujú extrahovať a skoncentrovať látku zo zriedeného vodného roztoku do menšieho objemu organickej fázy.

Stupeň prechodu látky do jednej z fáz sa označuje ako **výtazok extrakcie** R . Výťažok extrakcie závisí okrem rozdeľovacieho pomeru ešte od dvoch ďalších faktorov: od pomeru objemov fáz $V_{\text{org}}/V_{\text{aq}}$, od počtu n extrakcií. Po vytrepaní a oddelení „výtrepu“ sa zostatok látky vo vodnej fáze znovu extrahuje čerstvým podielom organického rozpúšťadla a to sa opakuje n -krát. Výťažok extrakcie sa vyjadruje ako pomer extrahovaného a celkového množstva látky v analyzovanej vzorke. Pri kvantitatívnej extrakcii by mal hodnotu 1. V skutočnosti je menší o nevyextrahovaný zvyšok

$$R = 1 - \frac{1}{(rD + 1)^n}$$

Pri danom rozdeľovacom pomere možno zvýšiť výťažok zväčšením objemu organickej fázy alebo opakovanými extrakciami. Pretože (n) je v exponente, účinnejšie a ekonomickejšie je niekoľkonásobné vytrepávanie menšími ako jednorázové vytrepávanie veľkým objemom organického rozpúšťadla; pritom sa extrakt zbytočne nezrieduje. Výťažok extrakcie sa často vyjadruje v percentách

$$R\% = 100 \cdot R = \frac{100}{(rD + 1)^n}$$

Úplná extrakcia látky je teda daná hodnotou 100 %.

1.3.2. Laboratórna technika a aplikácia

Extrakcia zložiek z kvapaliny do kvapaliny je jednoduchá. Na kvalitatívne účely sa obe fázy pretrepávajú v skúmavke uzatvorenej zátkou. Na extrakciu na kvantitatívne účely sa najčastejšie používajú oddeľovacie lieviky kónického tvaru s kratšou stopkou, pretože v dlhej stopke sa zadržiava extrakt a stopka sa ťažko čistí. Veľkosť oddeľovacieho lievika sa volí podľa objemov kvapalných fáz tak, aby objem obidvoch kvapalín nepresahoval 70 % objemu lievika. Vzhľadom na prácu s organickými rozpúšťadlami zátky a kohúty sa nemažu vazelinou, výhodnejšie je preto používať lieviky s teflonovými kohútmi a zátkami ako so sklenenými.

Zmes oboch fáz sa intenzívne pretrepáva počas udanej alebo empiricky určenej doby (niekedy i niekoľko minút). Počas extrakcie je výhodné držať pravou rukou hrdlo lievika so zátkou, aby zúženie kónusu smerovalo do dlane a prstami bolo možné otáčať kohútom. Týmto spôsobom držania lievika sa zabráňuje ohrievaniu lievika a zvyšovaniu tlaku prchavých rozpúšťadiel. Pretlak, ktorý napriek tomu v lieviku vzniká, sa uvoľní kohútom po otočení lievika hore stopkou. Intenzívne pretrepávanie s uvoľnením pretlaku sa zopakuje niekoľkokrát. Po zavesení lievika do kruhu zachyteného na stojane sa uvoľní zátka a počká sa, kým sa neoddelia fázy. Spodná fáza sa vypúšťa z nezazátkovaného lievika. Organická fáza býva niekedy mierne zakalená stopami emulgovanej vody, čo sa dá odstrániť (vyčistiť) filtráciou suchým filtračným papierom alebo pridaním malého množstva tuhého nerozpustného vysušovadla (napr. tzv. molekulové sito, bezvodý síran sodný).

Pri oddelení organickej fázy, v ktorej je prítomná extrahovaná zložka, je potrebné dbať na hustotu použitého organického rozpúšťadla. Ak jeho hustota je vyššia ako hustota vody (napr. chloroform), odoberá sa na analýzu spodná vrstva, ak je jeho hustota nižšia (napr. hexán) ako hustota vody, odoberá sa na analýzu horná vrstva.

Na kontinuálnu extrakciu v systéme kvapalina-kvapalina sa používajú extraktory, ktoré pozostávajú z varnej banky, extraktora a chladiča. Ich konštrukcia závisí od toho, akú hustotu má rozpúšťadlo, ktorým sa extrahuje vodný roztok zmesi analyzovaných zložiek. Pri extrakcii treba zabezpečiť, aby extrahovadlo prenikalo po kvapkách extrahovaným roztokom.

Extrakčné metódy našli široké uplatnenie vo farmaceutickej praxi, biochemických laboratóriách, v laboratóriách analyzujúcich zložky životného prostredia a pod.

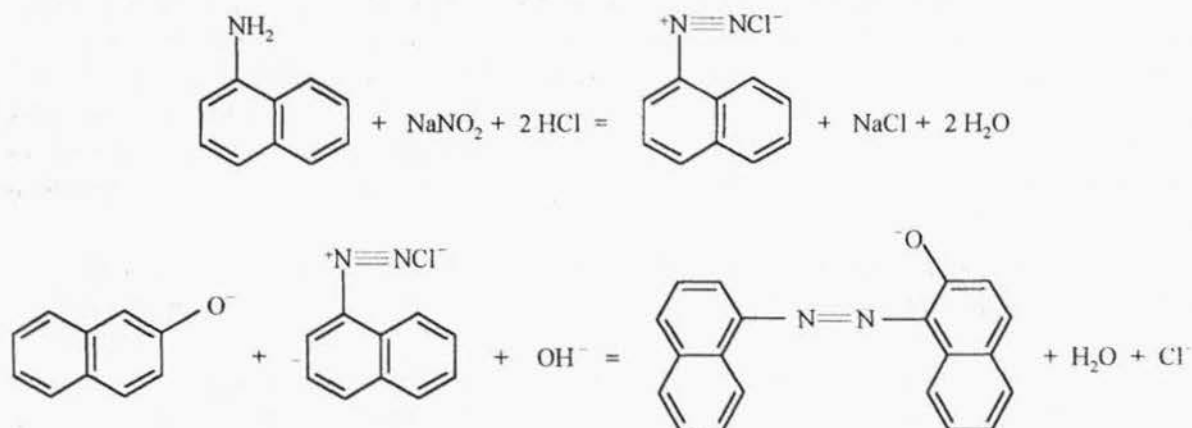
Príkladom extrakcie kyslého liečiva je stanovenie obsahu derivátov kyseliny barbitúrovej v ich sodných soliach. Vodný roztok sodnej soli sa okyslí zriedenou kyselinou chlorovodíkovou a postupne vytrepáva voľná kyselina barbitúrová niekoľkými dávkami chloroformu. Podobne sa postupuje aj pri extrakcii bázičných liečiv (napr. lokálne anestetikum prokain), pri extrakcii neutrálnych látok (napr. vitamín A) alebo pri extrakcii iónového asociátu (napr. metabolit antiarytmika propranololu).

Po skončení extrakcie odparok spojených výtrepkov organickej fázy sa buď stanoví priamo vážením (vážkové stanovenie), alebo sa odparok extraktu rozpustí (prípadne sa analyzuje priamo extrakt zachytávaný do odmernej banky) a analyzuje kvapalinovou alebo plynovou chromatografiou, spektrofotometricky, titráciou v bezvodom prostredí a pod.

1.3.3. Extrakčno-spektrofotometrické stanovenia

Úloha 5. Identifikácia a stanovenie primárnych aromatických aminov

Dusitany reagujú s primárnymi aromatickými aminmi v kyslom prostredí za vzniku diazóniových solí, ktoré sa následne kopulujú v alkalickom prostredí s fenolmi na intenzívne sfarbené azofarbivá. Priebeh reakcie možno znázorniť rovnicami



Vzniknuté azofarbivo možno vyextrahovať z vodného roztoku do chloroformu, amin identifikovať technikou TLC a stanoviť spektrofotometricky.

Zadanie. Identifikujte primárny aromatický amin technikou TLC a stanovte jeho obsah v mg/1000 ml v roztoku vzorky extrakčno-spektrofotometrickou metódou.

Chemikálie a roztoky. Štandardný roztok 1-naftylaminu a p-toluidínu (oba s koncentráciou $\rho(\text{amin}) = 0,025 \text{ g/l}$ v roztoku HCl, $c(\text{HCl}) = 0,01 \text{ mol/l}$), roztok HCl $c(\text{HCl}) = 0,01 \text{ mol/l}$, roztok 2-naftolu $w(2\text{-naftol}) = 2 \%$ v roztoku NaOH, $w(\text{NaOH}) = 10 \%$, NaNO_2 p.a., chloroform p.a.

Pracovný postup. Do oddeľovacieho lievika sa odpipetuje 10 ml vzorky, pridá sa 5 ml roztoku HCl $c(\text{HCl}) = 0,01 \text{ mol/l}$ a 0,2 ml čerstvo pripraveného vodného roztoku NaNO_2 $w(\text{NaNO}_2) = 10 \%$. Roztok sa premieša a nechá 2 minúty stáť. Potom sa pridá 2 ml roztoku 2-naftolu, roztok sa premieša a po 2 minútach sa pridá 10 ml chloroformu. Oddeľovací lievik sa zazátkuje a obsah sa intenzívne pretrepe. Spodná chloroformová vrstva sa vypustí do 50 ml suchej odmernej banky. Vodná vrstva sa extrahuje ešte $2 \times 10 \text{ ml}$ chloroformu. Banka so spojenými extraktmi sa doplní chloroformom po značku.

Absorbancia pripraveného roztoku sa zmeria v 1 cm sklenej kyvete oproti porovnávaciemu roztoku (voda) v rozsahu vlnových dĺžok 400 – 600 nm. Z nameraných hodnôt sa zostrojí absorpčná krivka $A = f(\lambda)$. Hodnota absorbancie A nameraná pri λ_{max} sa použije na výpočet obsahu aminu vo vzorke.

Zostrojenie kalibračného grafu. Do piatich oddeľovacích lievikov pomocou byrety sa postupne odmeria 2,5; 5; 7,5; 10 a 12,5 ml štandardného roztoku 1-naftylaminu alebo p-toluidínu (podľa výsledku identifikácie). Do každej banky sa pridajú postupne skúmadlá v poradí a v časovom slede, ako je uvedené v pracovnom návode na stanovenie obsahu aminu vo vzorke. Extrakcia azofarbiva a meranie sa realizuje za rovnakých podmienok ako pri vzorke. Z nameraných hodnôt absorbancie pri vlnovej dĺžke λ_{max} zostrojíme kalibračný graf, vypočítame hodnotu F ($F = \rho/A$, pozri kap. 2.1.3.) a parametre pre rovnicu priamky (smernicu a úsek). Obsah aminu vo vzorke vypočítame pomocou hodnoty F a z rovnice priamky.

Identifikácia aminu chromatografiou na Silufole. Na identifikáciu aminu sa použije roztok azofarbiva vzorky pripravený na spektrofotometrické stanovenie. Asi 3 ml tohto roztoku sa v tégliku zahustí

na vodnom kúpeli na 1/10. Zahustený roztok sa naniesie na tenkú vrstvu silikagélu spolu s roztokmi azofarbív o-toluidínu, p-toluidínu a 1-naftylamínu. Doska sa vyvíja v sústave benzén : acetón = (97 : 3 obj.), až kým čelo mobilnej fázy dosiahne asi 2 cm od horného okraja dosky. Po vybratí dosky z komory sa označí poloha čela a poloha jednotlivých škvŕn. Porovnaním R_F hodnôt azofarbiva vzorky a štandardov sa identifikuje analyzovaný aмин.

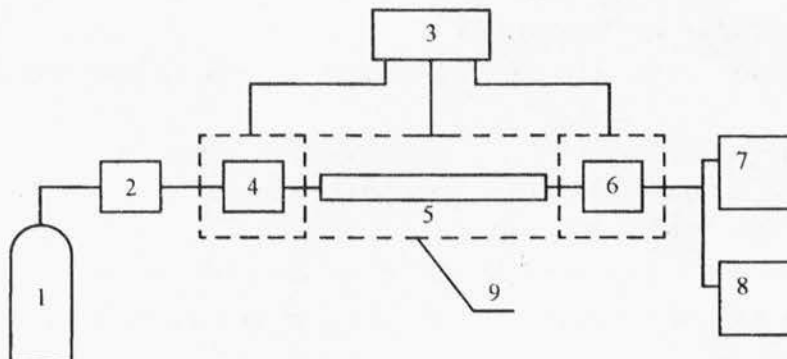
1.4. PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIA

1.4.1. Základné pojmy

Plynová chromatografia (GC) je moderná analytická metóda, ktorá umožňuje separáciu, identifikáciu a stanovenie veľkého počtu látok v jednej analýze. Metódou GC možno analyzovať plyny, kvapaliny aj tuhé látky.

Chromatografický dej prebieha v systéme, ktorý tvorí sústava dvoch nemiešajúcich sa fáz. Nepohyblivá (stacionárna) fáza môže byť tuhý adsorbent (typ chromatografie GSC) alebo kvapalina zakotvená na inertnom nosiči (GLC). Pohyblivá fáza, ktorá prúdi nepohyblivou fázou je plyn.

Základný princíp metódy GC je daný nerovnomerným rozdeľovaním zložiek analyzovanej zmesi medzi stacionárnu a pohyblivú fázu. Predpokladom nerovnomernosti rozdeľovania je rôzna afinita zložiek analyzovanej zmesi na obidve fázy alebo ich rôzna schopnosť do nich difundovať. Dochádza ku vzájomnej interakcii molekúl nepohyblivej fázy s chromatografovanými látkami, ktorá je ovplyvnená fyzikálno-chemickými vlastnosťami všetkých zložiek zúčastnených pri tomto procese.



Obr. 4. Bloková schéma plynového chromatografu. 1 – tlaková fľaša s nosným plynom, 2 – čistenie a regulácia toku nosného plynu, 3 – riadiaca a programovacia jednotka teploty, 4 – dávkovač, 5 – kolóna, 6 – detektor, 7 – zapisovač, 8 – integrátor, 9 – termostat

1.4.2. Meracie zariadenia a postupy

Prístrojová technika. Bloková schéma plynového chromatografu je na obr. 4. Nosný plyn z tlakovej fľaše (1) prechádza cez sušičku plynov do bloku na reguláciu tlaku a prietoku plynov (2). Vzorka sa dávkuje do prúdu nosného plynu v nástrekovom bloku (4). V nástrekovom bloku sa vzorka splyní a spolu s nosným plynom vstupuje do chromatografickej kolóny (5), kde sa rozdelí na jednotlivé zložky, ktoré sú unášané nosným plynom ďalej do detektora (6). Signál z detektora prechádza cez zosilňovacie

zariadenie na zapisovač (7). Zapisovač je spojený s integrátorom (8), ktorý slúži ako vyhodnocovacie zariadenie. Dávkovač, kolóna a detektor sú umiestnené v samostatných termostatoch (9), ktorých teplota je udržiavaná na požadovanej hodnote riadiacou a programovateľnou jednotkou teploty (3).

Nosný plyn. Mobilná fáza v plynovej chromatografii je plyná a spôsobuje prenos látok chromatografickou kolónou. Ako nosný plyn sa používa žiarovkový dusík, elektrolytický vodík, hélium a argón. Jedným z faktorov, ktorý výrazne vplýva na kvalitu GC analýzy je reprodukovateľnosť prietoku nosného plynu chromatografickou kolónou.

Dávkovanie vzorky. Dávkovanie vzorky predstavuje jeden z najkritickejších krokov pri analýze vzoriek metódou GC. V praxi sa používajú štyri základné typy dávkovacích systémov:

- dávkovanie s delením vzorky (split injection),
- dávkovanie bez delenia vzorky (splitless injection),
- dávkovanie do kolóny (on-column injection),
- dávkovanie s teplotným vyparovaním vzorky.

Vzorky dávkuje injekčnými striekačkami, dávkovaný objem vzorky sa pohybuje od 0,05 – 1,0 µl. Pri tomto spôsobe dávkovania vzorky sa chyba pohybuje okolo 5 %. Vzorky možno dávkovať aj pomocou automatického dávkovača alebo obtokovými dávkovacími kohútmi.

Chromatografické kolóny. Chromatografická kolóna je najdôležitejšou časťou plynového chromatografu, v ktorej dochádza k deleniu vzorky na jednotlivé zložky. Používajú sa dva základné typy kolón:

- náplňové (dĺžka 30 cm – 4 m, priemer 2 – 4 mm),
- kapilárne (dĺžka 10 – 200 m, priemer 0,1 – 0,8 mm).

Materiálom je nehrdzavejúca oceľ, sklo, teflón, tavený kremeň.

Náplňové chromatografické kolóny sú plnené:

- adsorbentom (adsorpčná chromatografia – GSC),
- tuhým inertným nosičom, na ktorom je zakotvená kvapalná, stacionárna fáza (rozdeľovacia chromatografia – GLC).

Kapilárne chromatografické kolóny WCOT sú v súčasnosti najkvalitnejšie kolóny so širokým použitím v praxi. Stacionárna fáza je v kvapalnom stave priamo nanosená na vnútorný povrch kapilárnej kolóny vo forme tenkého filmu (0,1 – 0,5 µm).

Kolóny WCOT sa delia podľa spôsobu fixácie stacionárnej fázy na dve skupiny:

- kolóny s klasicky nanosenou stacionárnou fázou, ktorá je na vnútorný povrch kolóny viazaná fyzikálnymi silami,
- kolóny so stacionárnou fázou, ktorá je chemicky viazaná na povrch kolóny a zosieťovaná.

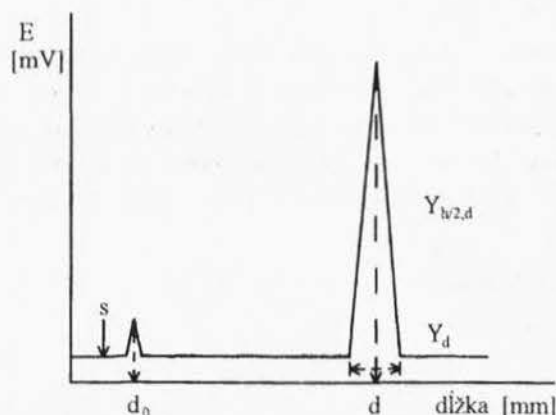
Kvalitu chromatografickej kolóny charakterizuje jej účinnosť, ktorá sa označuje bezrozmernou veličinou n a nazýva sa počet teoretických priehradiek (poschodí). Počet teoretických priehradiek (obr. 5) vypočítame zo vzťahu

$$n = 16 \left[\frac{d}{Y_d} \right]^2 = 5,54 \left[\frac{d}{Y_{h/2,d}} \right]^2$$

Ak sa počet teoretických priehradiek nahradí hodnotou výškového ekvivalentu teoretickej priehradky H , účinnosť chromatografických kolón je možné porovnávať bez ohľadu na ich dĺžku. Hodnotu H (nazývanú dĺžka priehradky) vypočítame zo vzťahu

$$H = \frac{L}{n}$$

kde L – dĺžka kolóny, n – počet teoretických priehradiek.



Obr. 5. Chromatogram analýzy jednej zložky d_0 – vzdialenosť maxima elučnej vlny zložky od štartu, ktorá nie je zadržaná kolónou [mm], d – vzdialenosť maxima elučnej vlny zložky od štartu [mm], Y_d – šírka, ktorú vytínajú dotyčnice k ramenám elučnej vlny pri základni [mm], $Y_{lv2,d}$ – šírka elučnej vlny v jej polovičnej výške [mm]

Výškový ekvivalent teoretickej priehradky má dĺžkový rozmer a môžeme ho definovať ako dĺžku kolóny prislúchajúcu na jednu priehradku.

Iným spôsobom hodnotenia kvality chromatografickej kolóny je počet teoretických priehradiek na 1 m dĺžky kolóny.

Teplota v chromatografickej kolóne. Pri analýze viaczložkových zmesí okrem typu a kvality chromatografickej kolóny, citlivosti detektora, prietoku nosného plynu má na kvalitu analýzy významný vplyv teplota termostatu, v ktorom je uložená chromatografická kolóna. Na analýzu jednoduchých vzoriek, ktorých stanovované zložky majú podobné fyzikálno-chemické vlastnosti a ich teplota varu sa pohybuje v rozpätí malého teplotného intervalu je možné použiť izotermickú teplotu v kolóne.

Mnohozložkové zmesi sa musia analyzovať pri programovanej teplote v kolóne. Teplotný program v kolóne sa volí s prihliadnutím na fyzikálno-chemické vlastnosti zložiek analyzovanej zmesi a experimentálne skúsenosti pracovníka s cieľom optimálne rozdeliť multizložkovú zmes.

Detektory. Detektor je zariadenie, ktorého úlohou je zaznamenať v prúde nosného plynu látku, ktorá vychádza z chromatografickej kolóny. Detektory môžu byť nedeštruktívne (látka prechádza detektorom bez toho, aby došlo k jej chemickej zmene) a deštruktívne. Ak je citlivosť detektora pre všetky zložky vo vzorke nenulová, môžeme ho označiť za detektor univerzálny, keď je citlivosť detektora pre niektorú skupinu zložiek významne vyššia ako pre ostatné zložky, detektor je zložkovo selektívny. Citlivosť prvkovo-selektívneho detektora je závislá od toho, či sú v molekule prítomné atómy určitých prvkov.

Pri laboratórnom cvičení používame plameňovoionizačný detektor (FID). Je to univerzálny, deštruktívny detektor.

Podstata činnosti FID spočíva v tom, že pri prechode látky detektorom dochádza k fyzikálnej alebo chemickej zmene, ktorú možno premeniť na elektrický signál. Pri práci FID dochádza v plazme vodíkového plameňa k ionizácii molekúl vymytých z kolóny. Plameň horí medzi dvoma elektródami, na ktoré je vložené jednosmerné napätie. V čistom vodíkovom plameni je málo iónov. Tepelnou energiou, ktorá

sa uvoľňuje pri horení organickej látky, sa štiepia chemické väzby organických látok za vzniku radikálov, ktoré reagujú s vodíkom v redukčnej zóne plameňa za vzniku radikálov CH. Tieto radikály sa v oxidačnej zóne plameňa oxidujú, vznikajú CHO⁺ ióny a elektróny. Odozva detektora (FID) je závislá od počtu uhlíkových atómov v molekule analyzovanej látky, ktoré pri podmienkach detekcie poskytujú CHO⁺ ióny (tzv. efektívne uhlíkové atómy).

Vyhodnotenie chromatogramu. Zmena zloženia eluátu, ktorý opustí chromatografickú kolónu, sa v detektore transformuje na elektrickú veličinu. Táto je registrovaná zapisovačom ako zmena signálu. Grafický záznam odozvy detektora (chromatogram) slúži v diferenciálnom tvare na kvalitatívne a kvantitatívne vyhodnotenie analýzy. Identifikácia zložiek vzorky je spojená s niektorými problémami, ktorých úspešné riešenie je závislé od zložitosti zadanej úlohy, dostupnosti prístrojovej techniky a skúsenosti pracovníka.

Kvalitatívna analýza. Pri kvalitatívnej analýze možno použiť:

- elučné údaje,
- selektívne detektory,
- kombinovať metódu GC s inými fyzikálnymi alebo chemickými metódami (najčastejšie sa používa spojenie metód GC – MS).

Pri identifikácii zložiek v zmesi pri izotermných podmienkach sa najčastejšie vychádza z elučných charakteristík (elučný čas, redukovaný elučný čas, elučný objem, elučný pomer).

Elučný pomer r je daný vzťahom

$$r = \frac{t'_{R,i}}{t'_{R,s}}$$

kde $t'_{R,i}$ je redukovaný elučný čas zložky i

$t'_{R,s}$ je redukovaný elučný čas štandardu s

V praktickom cvičení sa na identifikáciu zložiek používa elučný čas (obr. 6). Princíp spočíva v tom, že sa porovnávajú elučné časy analyzovaných zložiek a referenčných látok (štandardov) pri rovnakých podmienkach analýzy. Spoľahlivosť identifikácie je závislá od reprodukovateľnosti elučných údajov. Ak sú hodnoty elučných časov zložiek vo vzorke blízke, identifikácia každej zložky sa robí metódou prídavku autentickej látky (štandardu) priamo k analyzovanej vzorke. Pri analýze takto upravenej vzorky sa na chromatograme výrazne zväčší elučná vlna sledovanej zložky.

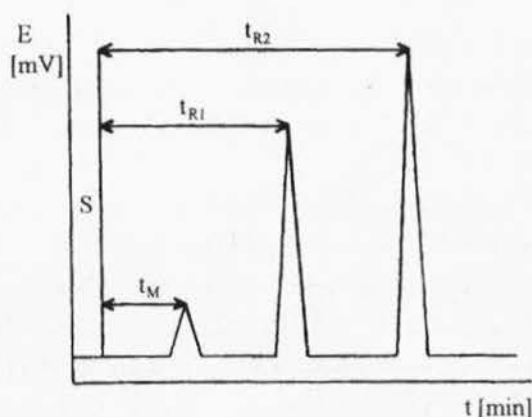
Pri analýze mnohozložkovej zmesi treba použiť viac štandardov. Najvýhodnejšie štandardy poskytuje rad n -alkánov.

Ak sa za základ elučných údajov zvolí homologický rad n -alkánov, získa sa systém elučných indexov, ktoré sú v plynovej chromatografii známe ako Kovátsove indexy a možno ich vypočítať zo vzťahu

$$I_i = 100n + 100 \frac{\log(t'_{R,i} / t'_{R,n})}{\log(t'_{R,n+1} / t'_{R,n})}$$

kde n je počet uhlíkových atómov skôr eluujúceho n -alkánu s redukovaným elučným časom $t'_{R,n}$ a $n + 1$ je počet uhlíkových atómov neskôr eluujúceho n -alkánu s redukovaným elučným časom $t'_{R,n+1}$; redukované elučné časy klesajú v poradí $t'_{R,n+1} > t'_{R,i} > t'_{R,n}$.

Kvantitatívna analýza. Pri kvantitatívnom hodnotení analyzovaných zložiek sa vychádza z chromatogramu, z výšky alebo z plochy elučnej vlny (obr. 6).



Obr. 6. Chromatogram separácie dvojzložkovej zmesi t_{R1} -elučný čas zložky 1, t_{R2} -elučný čas zložky 2, t_M -mŕtvy elučný čas je elučný čas zložky, ktorá nie je zadržiavaná chromatografickou kolónou, pohybuje sa rovnakou rýchlosťou ako mobilná fáza), $t'_{R,i}$ – redukovaný elučný čas zložky i ($t'_{R,i} = t_{R,i} - t_M$)

Plocha elučnej vlny sa vyhodnocuje:

- integrátorom,
- planimetrom,
- ako plocha rovnoramenného trojuholníka,
- vystrihovaním a vážením.

Keď poznáme plochu alebo výšku elučnej vlny, na stanovenie analyzovanej zložky použijeme niektorú z metód stanovenia:

- a) metóda vnútornej normalizácie (udáva percentuálne zastúpenie zložiek vo vzorke)
- b) metóda kalibračnej krivky,
- c) metóda vnútorného štandardu,
- d) metóda vonkajšieho štandardu (absolútnej kalibrácie).

Úloha 6. Identifikácia a stanovenie *n*-dekánu v benzéne

Zadanie. a) Identifikujte *n*-dekán v benzéne; b) stanovte obsah *n*-dekánu v objemových percentách vo vzorke benzénu metódou kalibračnej krivky.

Chemikálie. Benzén p. a., *n*-dekán p. a.

Prístrojová technika. Plynový chromatograf CHROM 4 s regulačným systémom (dual gas flow system), zosilňovačom (dual FID amplifier) a riadiacou jednotkou (control unit), dvojliniový zapisovač, plameňoionizačný detektor (FID), antikorová kolóna náplňová (3 700 × 3,5 mm) so stacionárnou fázou 5 % Carbowax 20 M zakotvenou na nosiči Chromosorb W HP, zrnitosť 60 – 80 mesh.

Podmienky merania. Prietok dusíka 1,0 kp/cm², prietok vzduchu 0,5 l/min, prietok vodíka 40 ml/min, teplota chromatografickej kolóny 90 °C, teplota nástrekového bloku 150 °C, teplota detektora 150 °C, rýchlosť posunu papiera na zapisovači 1,15 cm/min, citlivosť zapisovača 1 : 5000, dávko- vaný objem vzorky 1,0 µl.

Pracovný postup

a) Identifikácia *n*-dekánu v benzéne. Do nástrekového bloku plynového chromatografu dávkuje injekčnou striekačkou separátne 0,05 µl *n*-dekánu a benzénu. Po analýze určíme elučný čas (t_R) oboch zložiek.

Ak na určenie elučného času zložiek použijeme integrátor, elučné časy každej analyzovanej zložky odčítame zo zápisu z integrátora (v minútach, resp. stotínach minúty).

Keď musíme elučný čas pre danú zložku určiť z chromatografického záznamu, vyjadríme ho ako vzdialenosť od začiatku analýzy (štartu) po kolmicu spustenú z vrcholu elučnej vlny na základnú líniu (vzdialenosť odčítame v milimetroch, resp. desatinách milimetra pomocou pravítka).

Na základe nameraných elučných časov *n*-dekánu a benzénu identifikujeme na chromatograme elučnú vlnu *n*-dekánu.

b) Stanovenie *n*-dekánu v benzéne. Do 50 ml odmerných baniek pripravíme sériu štandardných roztokov s obsahom 5, 10, 15, 20, 25 objemových percent *n*-dekánu. Do nástrekového bloku dávkuje injekčnou striekačkou vždy 1,0 µl štandardného roztoku v poradi stúpajúcej koncentrácie *n*-dekánu v benzéne. Robíme minimálne dve paralelné stanovenia každého roztoku.

Pomocou pravítka zmeriame výšky elučných vln *n*-dekánu v každom analyzovanom roztoku a zostrojíme kalibračný graf ako závislosť výšky elučnej vlny na objemových percentách *n*-dekánu v štandardných roztokoch.

Pri rovnakých experimentálnych podmienkach analyzujeme 1 µl vzorky s neznámym obsahom *n*-dekánu v benzéne. Robíme tri paralelné stanovenia. Následne odmeriame výšku elučnej vlny zodpovedajúcu koncentrácii *n*-dekánu v neznámej vzorke a extrapoláciou z kalibračného grafu odčítame koncentráciu *n*-dekánu vo vzorke benzénu v objemových percentách.

Obsah *n*-dekánu v objemových percentách môžeme vypočítať aj zo vzťahu

$$\%c_i = \frac{h_i \cdot V_s \cdot c_s}{h_s \cdot V_i}$$

kde $\%c_i$ je koncentrácia *n*-dekánu v benzéne,

c_s – koncentrácia *n*-dekánu vo vzorke s jeho známym obsahom (štandard),

h_s, h_i – výšky elučných vln *n*-dekánu vo vzorkách so známym a neznámym obsahom *n*-dekánu,

V_s, V_i – definované objemy štandardnej a analyzovanej vzorky.

Úloha 7. Identifikácia hlavných obsahových látok v silici izolovanej z liečivej rastliny *Melissa officinalis* L.

Zadanie. Identifikácia aldehydov (citronelalu, neralu a geranialu) v silici medovky lekárskej.

Chemikálie. Štandardy – citronelal, neral a geranial (fy Merck, BRD).

Prístrojová technika. Plynový chromatograf CHROM 61, dvojliniový zapisovač TZ 4620, integrátor CI 100, plameňovoionizačný detektor (FID), kapilárna kolóna z taveného kremeňa s chemicky viazanou stacionárnou fázou Carbowax 20 M (15 m × 0,53 mm I. D., $d_f = 1 \mu\text{m}$) fy Quadrex.

Podmienky merania. Prietok dusika 4 ml/min, prietok vodíka 18 ml/min, prietok vzduchu 400 ml/min, teplota programovaná 50 °C – 1 min, potom ohrev kolóny s gradientom 5 °C/min do 200 °C, pri 200 °C – 10 min, teplota nástrekového bloku 200 °C, teplota detektora 240 °C, objem vzorky 0,05 µl, citlivosť R-100, A-2, posun papiera v zapisovači 0,3 cm/min.

Pracovný postup. Do nástrekového bloku dávkuje separátne mikrostriekačkou 0,03 µl štandardov citronelalu, neralu a geranialu. Po každej analýze vytlačíme zápis z integrátora, na ktorom odčítame elučný čas analyzovaného štandardu v stotínach minúty.

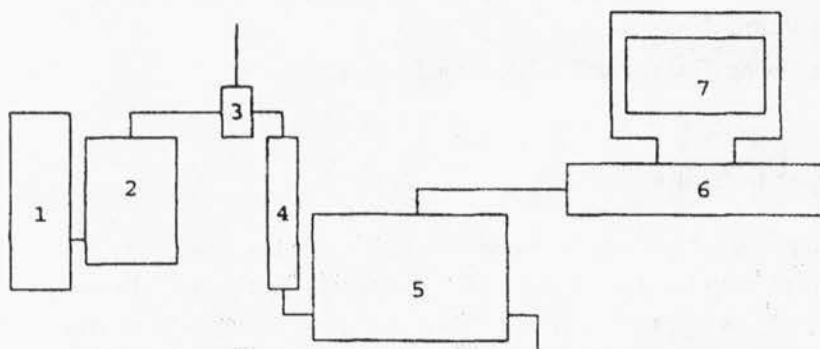
Pri rovnakých experimentálnych podmienkach analyzujeme 0,05 µl silice izolovanej z medovky lekárskej. Po skončení analýzy (cca 30 min) vytlačíme záznam z integrátora.

Porovnaním nameraných hodnôt elučných časov štandardov s elučnými časmi hlavných obsahových látok v silici medovky lekárskej identifikujeme vo vzorke citronelal, neral a geranial.

Upozornenie. Po každej analýze treba vyčistiť mikrostriekačku vhodným organickým rozpúšťadlom podľa uvedeného postupu: do skúmaviek č. 1 – 6 nalejeme cca 5 ml organického rozpúšťadla. Striekačku vždy preplachujeme od skúmavky č. 1 po skúmavku č. 6. Obsah striekačky vyprázdňime do nádoby na odpad. Odkladáme vždy čistú mikrostriekačku.

1.5. VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ KOLÓNOVÁ CHROMATOGRAFIA

Vysokoučinná (vysokotlaková) kvapalinová chromatografia - HPLC (High Performance (Pressure) Liquid Chromatography), je moderná efektívna inštrumentálna metóda na analýzu zmesí. Vysokej účinnosti a rýchlosti sa pri tejto metóde dosahuje použitím kolón naplnených časticami o veľkosti 5 – 15 µm pri prietoku mobilnej fázy 0,1 – 10 ml.min⁻¹. Na zabezpečenie tohto prietoku je potrebný pracovný tlak 20 – 60 MPa. Rozvoj HPLC umožnili poznatky z teórie plynovej chromatografie (GC), ktoré objasňujú podstatu dejov na kolóne a ich súvislosti s účinnosťou chromatografického procesu. Prístroje HPLC taktiež nadviazali na vývoj prístrojovej techniky GC. HPLC má univerzálnejšie použitie ako GC, lebo umožňuje aj analýzu tepelne nestálych a neprchavých látok (aj polymérov), ktoré nemožno priamo analyzovať plynovou chromatografiou. Bloková schéma prístroja HPLC je zobrazená na obr. 7.



Obr. 7. Bloková schéma prístroja HPLC 1 – zásobník mobilnej fázy, 2 – čerpadlo, 3 – dávkovač, 4 – kolóna v termostate, 5 – detektor, 6 – spracovanie analytického signálu (integrátor, zapisovač, tlačiareň), 7 – obrazovka

1.5.1. Základné pojmy a terminológia

Elučný objem

$$V_R = t_R \cdot F_m$$

$$F_m = \text{prietok mobilnej fázy [ml.min}^{-1}\text{]}$$

Kapacitný faktor

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

kde t_0 je mŕtvy čas (čas, za ktorý prejde kolónou látka, ktorá neinteraguje s jej náplňou).

Účinnosť kolóny sa vyjadruje podobne ako pri plynovej chromatografii počtom „teoretických prepážok“ n a „výškovým ekvivalentom teoretickej prepážky“ H .

Rozlíšenie $R_{i,j}$ je

$$R_{i,j} = \frac{t_n - t_j}{0,5(W_i - W_j)}$$

miera relatívnej separácie dvoch susedných chromatografických vln. Na dokonalé rozdelenie zložiek má platiť $R_{i,j} > 1,5$.

Význam jednotlivých veličín je podrobne vysvetlený v študijnej literatúre.

Izokratická elúcia znamená, že zloženie mobilnej fázy sa v priebehu analýzy nemení.

Gradientová elúcia znamená, že počas analýzy sa spojito a plynulo zvyšuje obsah zložky s väčšou elučnou silou v mobilnej fáze.

Medza detekcie (detekčný limit) je minimálne množstvo analyzovanej látky, ktoré je schopný detektor zaznamenať. Obyčajne to býva také množstvo látky, na ktoré je signál detektora rovný najmenej dvojnásobku hodnoty šumu.

Citlivosť detektora charakterizuje veľkosť zmeny odozvy na jednotkovú zmenu koncentrácie sledovanej látky.

Šum je zmena odozvy detektora zaznamenávaná na zapisovači spôsobená periodickými zmenami v systéme (najmä elektronickom).

Drift je dlhodobá zmena, čiže nestabilita polohy nulovej línie.

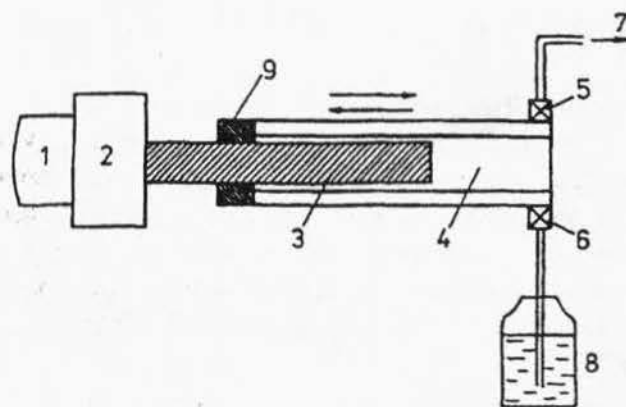
1.5.2. Prístrojová technika

Nízkotlaková časť – zásobník mobilnej fázy. Pokiaľ sa používa izokratická elúcia, je pred čerpadlom zaradený zásobník mobilnej fázy, ktorá musí byť dokonale odplynená (ultrazvuk + vákuum, alebo prebublávanie héliom). Ak sa používa gradientová elúcia, je tu zaradené zariadenie na programovanie gradientu, ktoré zabezpečuje plynulé pridávanie rastúceho množstva rozpúšťadla s vyšším elučným účinkom. Mobilná fáza sa do čerpadla nasáva cez filtre z pórovitého kovu.

Čerpadlá. V súčasnosti sa používajú dva typy čerpadiel:

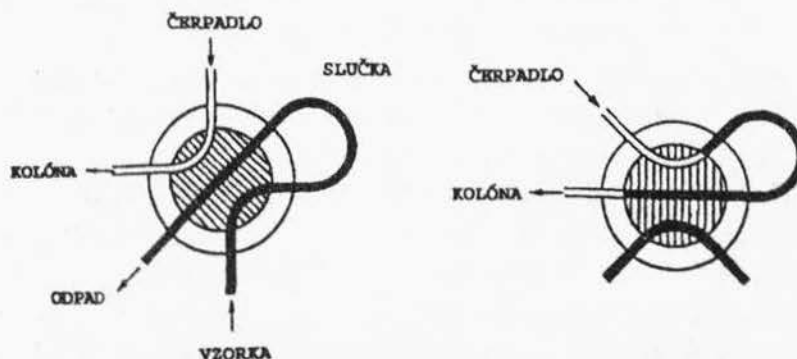
a) Lineárny dávkovač typu veľkoobjemovej injekčnej striekačky. Výhody – bezpulzový prietok, nevýhody – nutnosť prerušenia práce po vyčerpaní kvapaliny, zdĺhavá výmena mobilnej fázy, konštantný prietok sa nastavuje pomaly.

b) Čerpadlá s periodickým pohybom piestu (obr. 8). Používajú sa v oveľa väčšej miere ako lineárne dávkovače najmä preto, že umožňujú neobmedzene dlho dávkovať mobilnú fázu bez prerušenia a veľmi rýchlo meniť jej zloženie.



Obr. 8. Čerpadlo s periodickým pohybom piestu

Dávkovacie zariadenie. V súčasnosti sa takmer výlučne používajú slučkové dávkovače (funkciu dokumentuje obr. 9). Kvalitnejšie prístroje bývajú vybavené autosamplerom, do ktorého sa vkladajú špeciálne nádoby so vzorkou a zariadenie reprodukovateľne nasaje a nadávať automaticky určený objem vzorky na kolónu.



Obr. 9. Schéma slučkového dávkovacieho zariadenia

Kolóny. Na bežné analýzy sa najčastejšie používajú nerezové alebo sklené kolóny s vnútorným priemerom 2 – 8 mm, dlhé 100 – 250 mm, naplnené časticami o priemere 5 – 10 mm. Sklené kolóny bývajú chránené kovovým puzdrom.

V HPLC sa zvyčajne pracuje pri laboratórnej teplote. V niektorých prípadoch je výhodné pracovať pri zvýšenej teplote (napr. pri mobilných fázach s vyššou viskozitou), preto je kolóna umiestnená v termostate. Kvalita analýzy, účinnosť a životnosť kolóny závisí od maximálnej čistoty dokonale odplynenej mobilnej fázy, preto je do systému zaradený už v nízkotlakovej časti špeciálny filter z inertného materiálu s veľkosťou pórov 2 μm , za čerpadlo malá kolóna s náplňou zhodnou, akú má analytická kolóna. Za dávkovacím ventilom je ďalší filter a ochranná kolóna, na zachytávanie látok, ktoré by kontaminovali náplň analytickej kolóny.

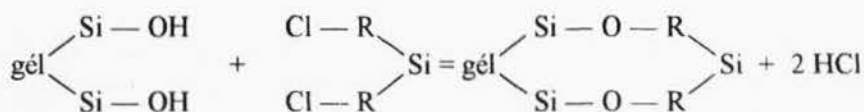
Náplne kolón. Podobne ako v kvapalinovej chromatografii v planárnom usporiadaní (PC, TLC) možno aj v HPLC na delenie elutropného radu zmesi využiť všetky vratné dvojfázové separačné mechanizmy (adsorpcia, rozdeľovacia chromatografia, iónová výmena, sieťový efekt gélu).

Adsorpcia. Ako náplň sa najčastejšie používa silikagél, alebo oxid hlinitý, veľkosť častíc 5 – 10 μm . Mobilné fázy sú zmesi rozpúšťadiel zoradených podľa rastúcej elučnej sily do elutropného radu

(heptán < cyklohexán < tetrachlórmetán < toluén < éter < chloroform < acetón < acetonitril < etanol < metanol < kyselina octová).

Rozdeľovacia chromatografia. Stacionárna i mobilná fáza je kvapalná. Delenie zmesi závisí od relatívnej rozpustnosti látok v týchto dvoch vzájomne sa nemiešajúcich fázach. V systémoch s **normálnou fázou** je stacionárna fáza polárnejšia ako mobilná, v chromatografii s **obrátanou (reverznou) fázou** je polárnejšia mobilná fáza. Na účely HPLC sú stacionárne fázy najčastejšie chemicky viazané na nosiči (silikagél). Typickými príkladmi **normálnych fáz** sú látky obsahujúce skupiny $-\text{CN}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-\text{OH}$ v štruktúre zakotvenej fázy. Mobilné fázy sú napr. hexán, cyklohexán, chlorid uhličitý, chloroform, benzén a toluén, prípadne ich zmesi. HPLC s **normálnou fázou** sa používa pre silne polárne organické látky.

V súčasnosti je veľmi populárna chromatografia na **reverzných fázach** najmä v analýze liečiv. Osvedčili sa chemicky modifikované stacionárne fázy na báze silikagélu



Najčastejšie sa používajú fázy, kde $\text{R} = \text{C}_{18}\text{H}_{37}$ (označuje sa C_{18} , RP (reversed phase), ODS (oktadecylsilan), $\text{R} = \text{C}_8\text{H}_{17}$, $\text{R} = \text{C}_2\text{H}_5$. Ako mobilné fázy sa používajú zmesi vody alebo tlmivých roztokov s nízkomolekulovými alkoholmi, acetonitrilom, tetrahydrofuránom a pod.

Iónová výmena. Iónovovýmenná stacionárna fáza pozostáva zo živcových častíc, ktoré majú na svojom povrchu väzbové miesta s kladným alebo záporným nábojom, kde dochádza k výmene iónov. Používajú sa hlavne na separáciu iónových organických zlúčenín.

Gélová permeačná chromatografia. V kolónach GPC (Gel Permeation CHromatography) sa rozdeľujú zložky zmesi na základe interakcie molekúl s rôzne veľkými pórmami na povrchu poréznych častíc polyméru. Používajú sa na delenie zmesí látok s vysokou mólovou hmotnosťou.

Detektory. Štandardné typy: refraktometrické, elektrochemické, spektrofotometrické. V súčasnosti sú najrozšírenejšie rôzne varianty spektrofotometrických detektorov napr. Diode Array Detektor (DAD).

Spracovanie chromatografického signálu. Základom je PC s tlačiarňou v súčinnosti s integrátorom, ktorý umožňuje najrôznejšie úpravy chromatogramu ešte pred jeho vytlačením. Tieto zariadenia bývajú vybavené aj programom na ovládanie jednotlivých častí chromatografického systému.

Úloha 8. Analytické hodnotenie viaczložkovej zmesi metódou HPLC

Optimalizácia zloženia mobilnej fázy. Cieľom HPLC je optimálne rozdelenie analyzovanej zmesi na zložky. Znamená to, že chromatografické vlny na zázname sú rozdelené „na základnú liniu“, t. j. neprekývajú sa, ale sú čo najbližšie vedľa seba (rozlíšenie $R_{ij} > 1,5$). Elučné zóny jednotlivých látok musia prejsť kolónou čo najrýchlejšie, aby sa zabránilo ich rozmývaniu, ale všetky musia interagovať s povrchom stacionárnej fázy (ich $t_r > t_m$). Optimálny rozsah elučných časov je taký, aby platilo $k' > 1$ pre prvú zložku (to znamená, že jej $t_r > 2 t_m$) a $k' < 10$ pre poslednú. Proces delenia (separácie) priaznivo ovplyvňuje správy výber stacionárnej fázy, zloženie mobilnej fázy a určenie optimálneho pomeru jej zložiek. Dôležitý je aj prietok mobilnej fázy, teplota a z hľadiska interpretácie výsledkov výber detektora podľa charakteru zložiek zmesi.

Postup. Podľa manuálu nastavíme nasledovné parametre: kolóna DuPont C18, prietok 1 ml/min, nástrek 20 μl , detektor – DAD (Diode Array Detektor), citlivosť 0,5; mobilná fáza metanol-voda, vzorka – zmes aromatických uhlíkovodíkov.

Najprv určíme mŕtvý čas pre danú kolónu. Pre kolóny s vnútorným priemerom 4 – 6 mm približne platí, že mŕtvý objem je 1 ml na každých 10 cm kolóny. Napr. pre kolónu dlhú 25 cm s priemerom 5 mm pri prietoku 2 ml/min. je mŕtvý objem 2,5 ml, čiže $t_m = 1,25$ min. Aby sme mohli odhadnúť oblasť, v ktorej je optimálne delenie zložiek našej zmesi, na analýzu použijeme najprv mobilnú fázu s menšou elučnou silou, v ktorej bude k' poslednej zložky jednoznačne väčšie ako 10. Postup opakujeme, pričom zvyšujeme obsah metanolu podľa manuálu dovedy, kým elučná sila mobilnej fázy nie je taká, aby všetky zložky mali $k' < 1$. Jednotlivé záznamy ukladáme do pamäti. Zaznamenáme elučné časy. Pre všetky zložky vypočítame kapacitné faktory a ich logaritmy. Vynesieme závislosť $\log k'$ od obsahu metanolu v mobilnej fáze pre každú zložku. Graficky určíme hranice optimálnej oblasti ($1 < k' < 10$). Určíme optimálne zloženie mobilnej fázy. Nadávujeme vzorku, presvedčíme sa, či prvá zložka má $k' > 1$ a či sú všetky píky rozdelené na nulovú líniu ($R_{ij} > 1,5$). Skúsime, či by sa čas analýzy nedal skrátiť použitím mobilnej fázy s obsahom rozpúšťadla s väčšou elučnou silou (acetonitril, tetrahydrofurán) pri dodržaní uvedených obmedzení.

Identifikácia zložiek. Nastavíme si optimálne zloženie mobilnej fázy a dávujeme vzorku. Záznam integrujeme a zaznačíme si elučné časy. Záznam uložíme do pamäti ako vz. opt. Prístroj nastavíme na Options, Plot UV spectrum for Specific Time. Hrot šípky nastavíme do stredu základne prvého píku a stlačíme ľavé tlačidlo myši. V ľavom rohu sa objaví spektrum prvej zložky. Spustíme Compare with reference spectrum a prístroj nastavíme na prvý štandard. Jeho UV spektrum sa objaví v pravom hornom rohu. Porovnávame spektrá. Takto postupujeme dovedy, kým spektrá prvej zložky vzorky a štandardu nie sú rovnaké. Prístroj nastavíme cez continue znova na Plot UV spectrum for specific Time a šípkou na stred píku ďalšej zložky. Rovnakým spôsobom identifikujeme všetky štyri píky.

Správnosť identifikácie si overíme takto: napr. zložku sme porovnaním so spektrom identifikovali ako benzén. Prístroj nastavíme do základnej zostavy na časť Samples a na Empties. Napíšeme: benz + číselná hodnota koncentrácie v [mg/l] (napr. benz 30) a stlačíme Enter a nastavíme na Standards. V tabuľke kurzor nastavíme na Benzene a zvolíme koncentráciu. Kurzorom zídeme až na koniec zoznamu a stlačíme Y. Zatlačením EXIT prejdeme do Computer Data System a spustíme analýzu. Integrujeme a zaznačíme elučný čas. Chromatogram uložíme do pamäti ako benz. st. Porovnáme elučný čas štandardu a zložky vo vz. opt.

Stanovenie obsahu jednotlivých zložiek v zmesi metódou vonkajšieho štandardu. Z pamäti vyvoláme záznam analýzy vzorky, integrujeme a opíšeme plochy zodpovedajúce jednotlivým identifikovaným zložkám zmesi. Naším cieľom je zistiť zodpovedajúce koncentrácie. Vyvoláme záznam analýzy látky autentickej so stanovovanou zložkou (naš príklad benz 30). Jej koncentráciu poznáme. Integrujeme a zistíme plochu, ktorá tejto koncentrácii zodpovedá. Porovnáme ju s plochou nameranou pre zložku v zmesi. Predpokladáme lineárnu závislosť plochy od koncentrácie. Podľa toho odhadneme koncentráciu ďalšieho štandardu tak, aby hodnota plochy zodpovedajúcej koncentrácii zložky v zmesi bola medzi hodnotami použitých štandardov. Podľa toho odhadneme koncentráciu ďalších troch štandardov, potrebných na zostrojenie kalibračnej krivky. Zostrojíme kalibračný graf, skontrolujeme, či je lineárny a odčítame koncentráciu zložky v zmesi. O správnosti výsledku sa presvedčíme tak, že pripravíme a odmeriame štandard, ktorý má práve takúto koncentráciu. Výsledky uvedieme v protokole. Vzor protokolu je na pracovisku v cvičení.

Kontrolné otázky z problematiky HPLC:

1. Uved'te a charakterizujte základné elučné parametre pri kolónovej chromatografii (elučný čas, elučný objem, mŕtvý čas, účinnosť kolóny, kapacitný faktor, rozlíšenie).
2. Ako sa identifikujú látky v HPLC?
3. Opíšte základné metódy kvantitatívnej analýzy HPLC.

4. Čo je to „chromatografia na normálnych a obrátených“ fázach. Princíp, stacionárne a mobilné fázy, aplikácia.
5. Metódy detekcie v HPLC.
6. Uveďte princípy separácie zložiek v adsorpčnej, rozdeľovacej, iónomeničovej a gélovej chromatografii.
7. Izokratická a gradientová elúcia.
8. Uveďte a vysvetlite základné princípy chromatografie.
9. Vysvetlite pojmy šum, drift, citlivosť, medza detekcie.
10. Charakterizujte základné typy stacionárnych fáz v kolónovej chromatografii.

1.6. ELEKTROMIGRAČNÉ METÓDY

1.6.1. Základné pojmy

Elektromigračné techniky môžeme z analytického hľadiska obecné charakterizovať ako separačné metódy zahrňujúce separáciu iónogénnych analytov na základe ich rozdielnej pohyblivosti v jednosmernom elektrickom poli na jednotlivé zložky, ktoré môžu byť detegované a vyhodnotené z hľadiska kvalitatívneho a kvantitatívneho.

Hybnou silou pohybu nabitých častíc je intenzita elektrického poľa E , ktorá je vyjadrená spádom (gradientom) napätia ($V \cdot m^{-1}$). Proti pohybu častíc pôsobí trecia sila podmienená viskozitou kvapalného prostredia.

Rýchlosť migrácie daného druhu iónov v závislosti od intenzity elektrického poľa je daná vzťahom

$$v = uE$$

kde v je rýchlosť migrácie ($m \cdot s^{-1}$), u je efektívna pohyblivosť a E je intenzita elektrického poľa.

Pohyblivosť iónu v danom prostredí je konštantná a pre daný druh iónov charakteristická. V nekonečne zriedených roztokoch ju označujeme ako absolútnu pohyblivosť u_0 , ktorá je definovaná ako stredná rýchlosť pohybu iónov v jednotkovom elektrickom poli v danom rozpúšťadle za medzného zriedenia. Absolútna pohyblivosť je podmienená najmä solvataciou, nábojom iónu a viskozitou rozpúšťadla. Reálna pohyblivosť príslušnej iónovej formy v danom prostredí v jednotkovom elektrickom poli je označovaná ako aktuálna (iónová) pohyblivosť. Aktuálnu pohyblivosť môžeme definovať ako rýchlosť migrácie danej iónovej formy v jednotkovom elektrickom poli za definovaných pracovných podmienok.

Ak je ión v roztoku prítomný vo viacerých acidobázických a komplexných formách, ktorým prislúchajú rozdielne aktuálne pohyblivosti a ak tieto rovnováhy sú kineticky labilné (rýchlo sa ušľachťujú), vtedy látka ako celok migruje v jedinej zóne s výslednou pohyblivosťou, ktorá zodpovedá aktuálnym pohyblivostiam jednotlivých iónových foriem prítomných v roztoku. Pohyblivosť látky ako celku meraná v jednotkovom elektrickom poli sa nazýva efektívna pohyblivosť.

Pre elektroforetickú separáciu má zásadný význam voľba takých podmienok, ktoré umožnia rozdelenie analyzovaných zmesí. Na optimalizáciu separačných podmienok sa využívajú hlavne protolytické a komplexotvorné rovnováhy, náboj protiiónu a prostredie.

Separčný proces je sprevádzaný rôznymi efektami (napr. teplotný gradient, difúzia, elektroosmóza), ktoré majú tendenciu viesť k rozmyvaniu rozseparovaných zón. Tento jav je pre separáciu nepriaznivý. Medzi najúčinnšie spôsoby stabilizácie zón je obmedzenie možností difúzie. Separčný proces je

umiestnený na nosiči (papier, rôzne gély) a v kapilárach. Z tohto hľadiska potom elektroforetické metódy klasifikujeme na techniky v plošnom a v kapilárnom usporiadaní.

Podľa experimentálneho usporiadania môžeme elektroforetické metódy rozdeliť do štyroch základných typov:

- zónová elektroforéza,
- elektroforéza s pohyblivým rozhraním,
- izotachoforéza,
- izoelektrická fokusácia.

Zónová elektroforéza. Celý systém (katódový a anódový priestor, ako aj separačná časť) je vyplnený jedným tzv. základným elektrolytom, ktorého zloženie je v celom migračnom prostredí rovnaké a nemení sa ani v priebehu separácie. Po zapojení elektrického prúdu nastáva účinkom gradientu elektrického poľa pohyb častíc podľa ich efektívnych pohyblivostí k príslušnej elektróde. Hodnota pH a gradientu napätia je v celom systéme konštantná. Zónová elektroforéza je najčastejšie realizovaná na papieri alebo vrstve gélu. V poslednom čase sa intenzívne rozvíja zónová elektroforéza v kapiláre s fyzikálnymi metódami detekcie.

Elektroforéza s pohyblivým rozhraním. Pre túto metódu je charakteristické takéto usporiadanie experimentu (uvažujeme o delení aniónov):

- anódová a separačná časť sú vyplnené roztokom vodiaceho elektrolytu, ktorého anión má väčšiu pohyblivosť ako ktorýkoľvek z aniónov vo vzorke,
- vzorka sa vkladá do katódovej časti.

Po určitom čase od vloženia elektrického poľa na systém sa dosiahne čiastočného rozdelenia zmesi do diskretných zón. Čistú zložku obsahuje len zóna, ktorá nasleduje za zónou vodiacich aniónov. Každá ďalšia zóna je už zmesnou. Počet zložiek prítomných v jednotlivých zónach rastie v smere od zóny vodiaceho elektrolytu k zóne obsahujúcej všetky zložky zmesi. Táto metóda nenašla uplatnenia v analytickej praxi.

Izotachoforéza. Separácia prebieha v diskontinuálnej sústave dvoch základných elektrolytov, vodiaceho a zakončujúceho, pričom vzorka sa injektuje do rozhrania týchto elektrolytov.

Izoelektrická fokusácia. Separácia prebieha v systéme, kde zloženie základného elektrolytu je konštantné, jeho pH sa plynulo mení od jedného elektródového priestoru ku druhému, je vytvorený gradient pH. Metóda nachádza uplatnenie na separáciu amfolytov, ktoré vykazujú izoelektrický bod. Po vložení elektrického poľa na systém sa začnú amfolyty pohybovať k príslušnej elektróde, kým neprídu do oblasti pH, ktoré sa rovná ich izoelektrickému bodu (pI). V tomto bode sa stanú elektricky neutrálne, ich efektívna pohyblivosť je nulová. Vytvorené zóny sú ostré.

1.6.2. Izotachoforéza

Kapilárna izotachoforéza (ITF) je jednou z elektroforetických metód, u ktorých separácia je založená na rozdielnej pohyblivosti iónov rovnakého znamienka v jednosmernom elektrickom poli.

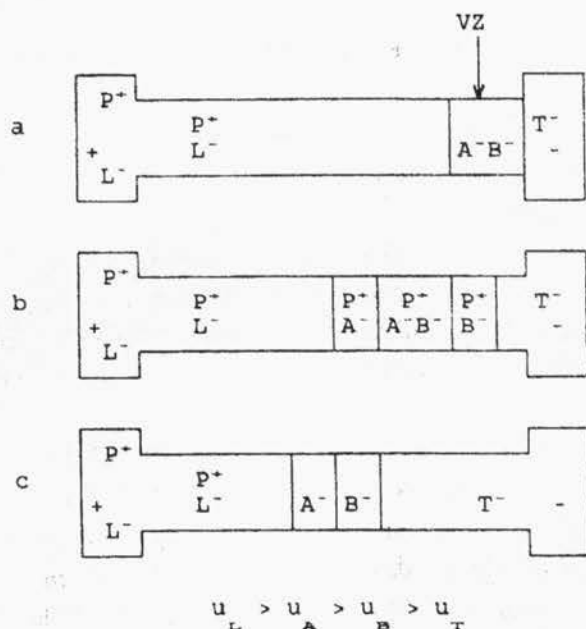
Kapilárna izotachoforéza umožňuje separáciu, identifikáciu a stanovenie tak anorganických ako aj organických (nízkomolekulárnych ako aj vysokomolekulárnych) zlúčenín, ktoré sú schopné existovať v roztoku v iónogénnej forme.

Definované množstvo vzorky vkladáme do rozhrania medzi dva základné elektrolyty – operačný systém. Jeden elektrolyt je vodiaci a je zvolený tak, aby obsahoval jediný druh iónov s najvyššou efektívnou pohyblivosťou oproti zložkám vzorky a aby jeho protiión tvoril súčasť tlmivého páru. Druhý elektrolyt

je zakončujúci a obsahuje naopak jediný druh iónov s najmenšou efektívnou pohyblivosťou. Po vložení jednosmerného elektrického poľa na systém sa začnú ióny pohybovať, pričom polarita zdroja konštantného prúdu určuje, ktoré ióny sa budú pohybovať smerom k detektoru. Po určitom čase sa v systéme dosiahne ustálený stav, odkedy všetky ióny migrujú rovnakou rýchlosťou $v = uE = \text{konšt.}$ (izotachoforetická podmienka). Za zónou vodiaceho iónu tesne za sebou migrujú zóny podľa klesajúcej efektívnej pohyblivosti zložiek vzorky a nakoniec zóna zakončujúceho elektrolytu (obr. 10).

Ustálený stav môžeme charakterizovať takto:

- každá zo zón obsahuje len jeden druh aniónov (katiónov) za predpokladu, že bolo dosiahnuté úplné rozdelenie zmesi,
- vo všetkých zónach je ten istý druh protiiónov (zhodný s protiónmi vo vodiacom elektrolyte),
- zóny separovaných zložiek sú usporiadané v poradí klesajúcej efektívnej pohyblivosti od zóny vodiacich k zóne zakončujúcich iónov,
- fyzikálne vlastnosti systému sa od zóny k zóne na hranici zón menia skokom, čo dovoľuje použiť fyzikálne metódy detekcie na analytické vyhodnotenie separovaných látok.



Obr. 10. Základné fázy v izotachoforetickej separácii aniónov
a) počiatočné usporiadanie pokusu, b) separačný proces – rýchlosť pohybu jednotlivých zložiek v zmesných zónach je rôzna, c) izotachoforeticky ustálený stav – jednotlivé zložky sú od seba oddelené a pohybujú sa všetky rovnakou rýchlosťou, L^- – vodiaci elektrolyt, T^- – zakončujúci elektrolyt, P^+ – protiión, A^- , B^- – anióny separovanej zmesi, VZ – priestor na dávkovanie vzorky, u – efektívna pohyblivosť.

Koncentrácia vodiaceho elektrolytu určuje koncentračné pomery v migrujúcich zónach za sebou na základe Kohlrauschovej regulačnej funkcie. Pre situáciu na obr. 10c môžeme písať

$$\frac{c_L}{c_A} = \frac{u_L}{u_L + u_P} \cdot \frac{u_A + u_P}{u_A} \cdot \frac{z_A}{z_L}$$

kde c_L , c_A sú koncentrácie vodiaceho iónu, resp. iónov A migrujúcich v príslušnej zóne; u_L , u_A , u_P sú efektívne pohyblivosti vodiaceho iónu, protiiónu a iónu A ; z_L a z_A sú náboje vodiacich iónov A migrujúcich v prvej zóne. Analogickou rovnicou sú viazané koncentrácie v druhej, tretej ... zóne.

Praktickým dôsledkom tejto rovnice je zakoncentrovávací, resp. zriedňovací efekt, vzhľadom na východiskové koncentrácie vo vzorke. V prípade nainjektovania koncentrovanej vzorky ($C_L < C_A$) sa jej koncentrácia podľa Kohlrauschovej regulačnej rovnice upraví (zníži) a naopak pri veľmi zriedených vzorkách ($C_L > C_A$) sa táto zakoncentrováva, čo má význam pri stopovej analýze.

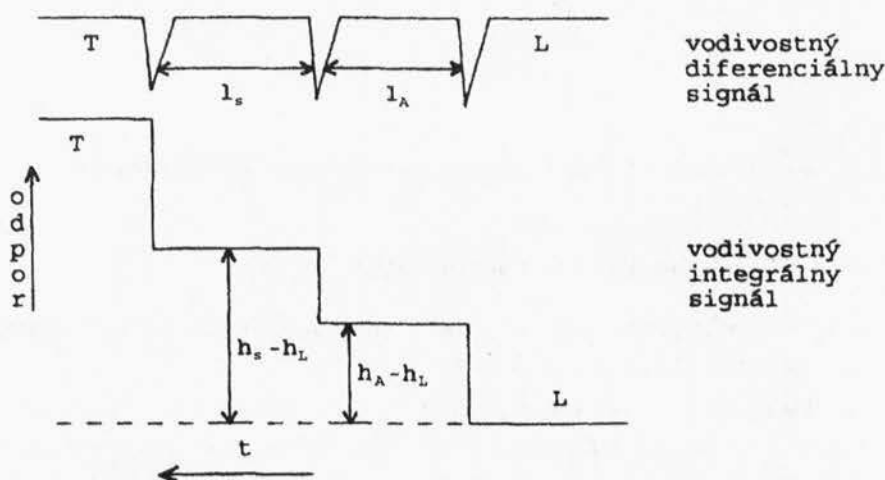
Rozhranie medzi jednotlivými zónami sa udržiava ostré pomocou zaostrujúceho efektu, ktorý je dôsledkom nespojitosti hodnoty intenzity elektrického poľa. Táto je v zóne konštantná a je nepriamoúmerná efektívnej pohyblivosti. Pretože pohyblivosti iónov od vodiaceho smerom k zakončujúcejmu iónu klesajú, intenzita poľa v zónach v rovnakom poradí stúpa. Ak sa ión, ktorému prináleží určitá efektívna pohyblivosť dostane do predchádzajúcej zóny, klesne rýchlosť jeho pohybu (v dôsledku nižšej hodnoty intenzity elektrického poľa) a vráti sa späť do svojej zóny. Ak sa rýchlejší ión dostane do menej pohyblivej zóny, elektrické pole (vyššia hodnota intenzity) ho urýchli a opäť sa vráti do svojej zóny.

Detekcia spočíva v určení rozhrania medzi zónami na základe niektorých fyzikálnych vlastností (vývoj tepla, elektrická vodivosť, absorpcia UV žiarenia a iné), ktoré sa od zóny k zóne menia skokom. Táto zmena je registrovaná príslušným detektorom a záznam signálu v prípade univerzálnych detektorov je schodovitá krivka. Výška schodu na tejto krivke je určená efektívnou pohyblivosťou látky, čo hovorí o kvalite. Dĺžka zóny udáva kvantitatívnu informáciu o látke (obr. 11).

Kvalitatívna analýza. Možnosť identifikácie iónu prítomného v neznámej zmesi sa uskutočňuje na základe potvrdenia identity súboru faktorov podmienených efektívnou pohyblivosťou určovaného iónu a jeho štandardu pomocou vodivostného detektora. Ako kritérium identity sa používa zhoda relatívnej výšky skoku (RSH) vo viacerých operačných systémoch

$$RSH_A = \frac{h_A - h_L}{h_S - h_L}$$

Pre daný vodiaci ión L , štandard S a identifikovanú zložku A sa vypočíta pomer výšky skoku analyzovanej zložky h_A ku výške skoku štandardu h_S . Obidve sú merané vzhľadom na výšku vodiaceho iónu h_L , ktorá sa obvykle považuje za nulovú.



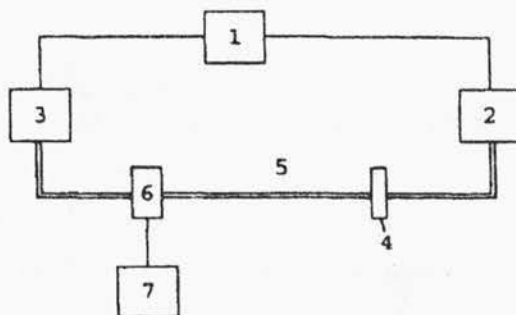
Obr. 11. Príklad izotachforeogramu a jeho hodnotenie l – dĺžka zóny, h – výška skoku, t – čas, T – zakončujúci elektrolyt, L – vodiaci elektrolyt, S – štandard, A – identifikovaná zložka.

Kvantitatívna analýza. Dĺžka zón sa po dosiahnutí ustáleného stavu už s časom ďalej nemení a je za daných podmienok úmerná množstvu látky v analyzovanej vzorke. Dĺžke zóny je úmerný čas, za ktorý prejde zóna detektorom. Množstvo iónu v neznámej vzorke stanovíme teda porovnaním dĺžky jeho zóny za daných podmienok s dĺžkou zóny štandardného roztoku iónu za rovnakých podmienok.

Najjednoduchší je postup, pri ktorom sa získa grafická závislosť dĺžky zóny od nadávkovaného množstva látky – kalibračný graf. Množstvo látky prítomnej v analyzovanom materiáli sa určí grafickou interpoláciou. Pri súčasnom stanovení niekoľkých komponentov je potrebné získať príslušný počet kalibračných čiar.

Výber operačného systému. Vhodnou voľbou operačného systému sa snažíme dosiahnuť dostatočných rozdielov v efektívnych pohyblivostiach separovaných iónov. Efektívnu pohyblivosť je možné ovplyvňovať prostredníctvom niektorých parametrov ako sú pH, komplexotvorné rovnováhy, náboj protiiónu, teplota, rozpúšťadlo a pod. Najčastejšie používaným optimalizačným faktorom je zmena pH vodiaceho elektrolytu. Ióny sú delené v prípade slabých elektrolytov na základe rozdielnych pK hodnôt. Preto má zásadný význam výber vhodného protiiónu, ktorý určuje pH v priebehu separácie. Protiión môže vhodne ovplyvniť separačný proces taktiež na základe komplexotvorných vlastností. Látky, ktoré sú vo vode málo rozpustné, resp. poskytujú malé rozdiely v efektívnych pohyblivostiach, je možné analyzovať v zmesnom alebo nevodnom prostredí (metanol, etanol, dimetylsulfoxid).

Prístrojová technika. Izotachoforetická separácia je najčastejšie realizovaná v kapilárach. Základné usporiadanie izotachoforetického analyzátoru je na obr. 12. Vysokonapäťový zdroj (1) slúži na generáciu konštantného jednosmerného prúdu. Je pripojený k rezervoáru roztoku vodiaceho (2) a zakončujúceho (3) elektrolytu, ktoré sú spojené kapilárou (5). Do rozhrania týchto elektrolytov sa roztok vzorky dávkuje buď dávkovacím zariadením alebo mikrostriekačkou (4). Po vložení elektrického poľa ióny migrujú v kapiláre smerom k detektoru (6), ku ktorému je pripojené vyhodnocovacie zariadenie so zapisovačom (7). V jednom pokuse je možné deliť len anióny alebo len kationy.



Obr. 12. Bloková schéma kapilárneho izotachoforetického analyzátoru

Úloha 9. Stanovenie dusičnanov a síranov vo vodách

Z aspektu kontroly životného prostredia je potrebné vo vodách okrem zlúčenín neiónogénneho charakteru sledovať obsah chloridov, dusičnanov a síranov.

Obsahy anorganických aniónov v pitných, povrchových, odpadových a minerálnych vodách sa pohybujú v rozmedzí desiatín až desiatok miligramov v litri. Napr. v povrchových a minerálnych vodách sa popri malých množstvách dusitanov, fluoridov a fosforečnanov vyskytujú až v tisícnásobnom prebytku najmä chloridy, dusičnany a sírany. Vo väčšine reálnych vzoriek sa požaduje stanovenie dusičnanov a síranov, resp. i chloridov. Pohyblivosti týchto iónov pri izotachoforetickej separácii sú si veľmi blízke.

a preto je vhodné znížiť efektívnu pohyblivosť síranov zvýšením náboja protiónu vo vodiacom elektrolyte.

Zadanie. Identifikujte na izotachforeograme zónu dusičnanov a síranov a stanovte ich hmotnostnú koncentráciu (mg/l) v roztoku metódou kalibračného grafu.

Chemikálie a roztoky. Štandardný roztok dusičnanu draselného $\rho(\text{KNO}_3) = 100 \text{ mg/l}$; štandardný roztok síranu draselného $\rho(\text{K}_2\text{SO}_4) = 100 \text{ mg/l}$; vodiaci elektrolyt (LE): kyselina chlorovodíková $c(\text{HCl}) = 8 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$; β -alanín $c(\beta\text{-alanin}) = 3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$; BISTRIS-propán (BTP) $c(\text{BTP}) = 3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ a metylhydroxyetyl celulóza (MHEC) $w(\text{MHEC}) = 0,1 \%$ s pH 3,55; zakončujúci elektrolyt (TE): roztok kyseliny citrónovej $c(\text{kys. citrónová}) = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$; demineralizovaná voda.

Pracovný postup. Do piatich 50 ml odmerných baniek odmeriame byretou postupne 5, 10, 20, 30 a 40 ml štandardného roztoku KNO_3 a doplníme demineralizovanou vodou po značku. Obdobne pripravíme roztoky zo štandardného roztoku K_2SO_4 .

Kalibračnými roztokmi postupne plníme dávkovací kohút izotachforetického analyzátoru a necháme prebehnúť analýzu.

Vzorky pitnej vody analyzujeme neriedené, povrchové, odpadové a minerálne vody definovane riedime. Vzorkou naplníme dávkovací kohút a urobíme stanovenie za rovnakých podmienok ako pri kalibrácii.

Vyhodnotenie merania. Zmeriame dĺžky zón štandardných roztokov a zostrojíme kalibračný graf ako závislosť dĺžky zóny (v mm) od koncentrácie (mg/l) pre obidve zložky – dusičnany a sírany.

Zmeriame dĺžky zón na izotachforeograme analyzovanej vzorky a z príslušnej kalibračnej krivky odčítame obsah dusičnanov, resp. síranov v mg/l.

1.6.3. Aplikácia kapilárnej izotachofórey v klinickej praxi

V klinickej praxi sa najčastejšie stretávame s analýzou telesných tekutín. Pozornosť sa sústreďuje hlavne na analýzu krvi, krvnej plazmy, krvného séra a moču, menej často sú analyzované tkáňové extrakty a homogenáty, mozgovomiechový mok, sliny, žlč a očný mok.

Telesné tekutiny sú z hľadiska svojho zloženia mimoriadne komplexným analytickým materiálom. Metódy používané na ich analýzu sú v podstate obmedzené na separačné metódy, v menšej miere na špecifické metódy, najmä na metódy imunologické a enzýmové.

Analýzy telesných tekutín sú zamerané na látky endogénneho pôvodu, ktoré sú fyziologickou zložkou telesných tekutín, ale ich zvýšená, prípadne znížená hladina indikuje metabolickú poruchu organizmu. Ďalej sú tieto analýzy zamerané na látky exogénneho pôvodu, ako sú napr. liečivá a ich metabolity, látky objavujúce sa v telesných tekutinách ľudí pracujúcich v zdraví škodlivom prostredí alebo po rôznych intoxikáciách organizmu.

Úloha 10. Stanovenie hladiny alkálií v ľudskej krvi

Stanovenie hladiny alkalických kovov a kovov alkalických zemin je dôležitým ukazovateľom pri štúdiu mechanizmov, ktoré podmieňujú fyziologickú funkciu srdcovo-cievneho systému. Zároveň prispieva k objasneniu pôsobenia liečiv, ktoré sa používajú pri liečbe vysokého krvného tlaku a iných srdcovo-cievnych ochoreniach.

Zadanie. Metódou kapilárnej izotachofórey po predchádzajúcej úprave vzorky identifikujte a stanovte kationy Na^+ , K^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+} .

Chemikálie a roztoky. Polyetylén glykol (PEG); štandardné roztoky chloridu sodného, chloridu draselného, chloridu vápenatého a dusičnanu horečnatého všetky s rovnakou koncentráciou $c(\text{štandard}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$; vodiaci elektrolyt (LE) zloženia: roztok amoniaku $c(\text{NH}_3) = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$, polyetylén glykol $w(\text{PEG}) = 30 \%$ a metylhydroxyetyl celulóza $w(\text{MHEC}) = 0,1 \%$, kyselina octová na úpravu pH do hodnoty 5,4; zakončujúci elektrolyt (TE): chloristan tetraetylámónia $c(\text{C}_8\text{H}_{20}\text{NClO}_4) = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$; demineralizovaná voda.

Pracovný postup. Do centrifugačnej skúmavky navážime 0,1 g lyofilizovanej ľudskej krvi (1 g lyofilizovanej krvi odpovedá 9 ml čerstvej krvi). K návažku napipetujeme 9 ml deionizovanej vody a 1 ml polyetylén glykolu (za účelom vyvráždania krvných bielkovín). Skúmavku so vzorkou dáme na 10 min do ultrazvukovej vane. Potom skúmavku vložíme do centrifúgy a 10 min centrifugujeme (pozor na vyváženie centrifúgy!). Supernatant použijeme na analýzu.

Takto upravenou vzorkou plníme dávkovací kohút izotachoforetického analyzátora a uskutočnime analýzu. Potom postupne plníme dávkovací kohút štandardnými roztokmi NaCl, KCl, CaCl_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ a urobíme analýzy.

Vyhodnotenie merania. Porovnaním výšky skoku (RSH) štandardov Na, K, Ca, Mg s výškami skokov na izotachforeograme vzorky ľudskej krvi identifikujeme zóny jednotlivých kationov. Zmeriame dĺžku zón sledovaných kationov na izotachforeograme vzorky krvi a zo zadáných parametrov regresných priamok ($y = a + bx$) pre jednotlivé kationy a zmeraných dĺžok príslušných zón vypočítame látkové koncentrácie Na, K, Ca a Mg vo vzorke.

UPOZORNENIE! Pri práci so vzorkami krvi používame vždy gumové rukavice!

Úloha 11. Stanovenie hladiny lítia v ľudskom sére po terapii lítiovými preparátmi

Lítiové soli sú indikované pri rôznych psychických poruchách. Pri terapii lítiovými preparátmi je potrebné udržiavať stálu koncentráciu lítia v séru (0,6 – 1,2 mmol/l). Stanovenie lítia je dôležité ako kontrola dodržiavania liečebného režimu, ale aj ako kontrola toxikologická vzhľadom na nežiaduce účinky a možnosti intoxikácie, ktoré terapiu sprevádzajú.

Zadanie. Metódou kapilárnej izotachofórey stanovte látkovú koncentráciu lítia vo vzorke krvného séra.

Chemikálie a roztoky. Štandardný roztok chloridu lítneho $c(\text{LiCl}) = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$; vodiaci elektrolyt (LE) zloženia: roztok amoniaku $c(\text{NH}_3) = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$; polyetylén glykol $w(\text{PEG}) = 30 \%$; metylhydroxyetyl celulóza $w(\text{MHEC}) = 0,1 \%$; kyselina octová na úpravu pH do hodnoty 5,4; zakončujúci elektrolyt (TE): chloristan tetraetylámónia $c(\text{C}_8\text{H}_{20}\text{NClO}_4) = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$; demineralizovaná voda.

Pracovný postup. Do piatich 100 ml odmerných baniek odmeriame byretou postupne 2; 2,5; 3; 3,5 a 4 ml štandardného roztoku LiCl a doplníme demineralizovanou vodou po značku. S takto pripravenými kalibračnými roztokmi postupne plníme dávkovací kohút izotachoforetického analyzátora a necháme prebehnúť analýzu.

Zo vzorky krvného séra odoberieme mikropipetou 0,5 ml, preniesieme ich do 10 ml odmernej banky a doplníme demineralizovanou vodou po značku. Analýzu urobíme obdobným spôsobom ako v prípade kalibračných roztokov.

Vyhodnotenie merania. Zmeriame dĺžky zón štandardných roztokov a zostrojíme kalibračný graf ako závislosť dĺžky zóny (v mm) od látkovej koncentrácie (mol/l, resp. mmol/l). Zmeriame dĺžku zóny Li na izotachforeograme vzorky krvného séra a z kalibračného grafu interpoláciou zistíme látkovú koncentráciu Li (mol/l, resp. mmol/l).

2. SPEKTRÁLNE METÓDY

2.1. ABSORPČNÁ SPEKTRÁLNA ANALÝZA VO VIDITEĽNEJ A ULTRAFIALOVEJ OBLASTI ŽIARENIA

2.1.1. Základné pojmy

Väčšina molekúl alebo iónov v roztoku absorbuje žiarivú energiu. Absorpciou ultrafialového (UF) a viditeľného (VID) žiarenia sa excituje elektrónový systém atómu alebo molekuly. Táto oblasť žiarenia sa preto nazýva aj oblasťou elektrónových spektier. Látky neabsorbujúce toto žiarenie možno často vhodnými chemickými reakciami previesť na zlúčeniny, ktoré už intenzívne absorbujú.

Oblasť od 400 do 800 nm ($\nu = 25000 - 12500 \text{ cm}^{-1}$) je viditeľná oblasť žiarenia. Pre organické látky je najviac používaná ultrafialová oblasť žiarenia od 200 do 400 nm ($\nu = 50000 - 25000 \text{ cm}^{-1}$). Ďaleká UF oblasť ($\lambda < 200 \text{ nm}$) sa používa zriedka v dôsledku silnej absorpcie vzdušného kyslíka (musí sa pracovať v inertnej atmosfére, spektrofotometre si vyžadujú špeciálne konštrukcie).

Roztoky látok, ktoré absorbujú len ultrafialové žiarenie, sa javia ľudskému oku ako bezfarebné, ktoré pohlcujú žiarenie viditeľné, javia sa ako farebné. Napr. roztok látky sa javí ako modrý, ak pohlcuje z bieleho slnečného svetla žiarenie vlnových dĺžok 435 – 480 nm, teda žiarenie žlté. Hovoríme, že farba modrá má doplnkovú, čiže komplementárnu farbu žltú.

V absorpčnej spektrofotometrii sa úbytok toku vstupujúceho monochromatického žiarenia Φ_0 po prechode absorbujúcim prostredím Φ udáva najčastejšie v hodnotách **transmitancie** T , čo je pomer prepusteného žiarivého toku k dopadajúcemu. Transmitancia môže nadobúdať hodnoty 0 až 1

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0} \quad 0 \leq T \leq 1$$

pričom sa spravidla udáva v percentách

$$\%T = \frac{\Phi}{\Phi_0} 100 \quad 0 \leq \%T \leq 100$$

V praxi sa častejšie používa iná veličina, **absorbancia** A , ktorá je bezrozmerným číslom a je definovaná vzťahom

$$A = \log \frac{1}{T} 100 \quad \infty \geq A \geq 0$$

Pre neabsorbujúce roztoky platí: $A = 0$ a $\%T = 100$, pre úplne absorbujúce roztoky platí: $A = \infty$ a $\%T = 0$.

Transmitancia, resp. absorbancia vzorky sa mení s vlnovou dĺžkou žiarenia a závisí aj od koncentrácie absorbujúcich častíc a hrúbke vrstvy, ktorou lúč prechádza. Závislosť T , resp. A na vlnovej dĺžke pri konštantnej koncentrácii látky a hrúbke vrstvy predstavuje absorpčné spektrum látky (absorpčná krivka), ktoré je charakteristické pre túto látku. Na zistenie koncentrácie je dôležitý vzťah medzi ňou, hrúbkou vrstvy a hodnotou absorbancie (transmitancie) meranej pri definovanej vlnovej dĺžke. Tento vzťah matematicky opisuje Lambertov-Beerov zákon, z ktorého pre absorbanciu prísne monochromatického žiarenia a zriedené roztoky vyplýva, že absorbancia A je lineárnou funkciou koncentrácie c

$$A = c \cdot b \cdot \varepsilon$$

kde c – koncentrácia absorbujúcej látky (mol/l)

b – hrúbka absorbujúcej vrstvy (šírka kyvety)

ε – molový dekadický absorpčný koeficient pri vlnovej dĺžke $\lambda_{\max}$

Jednotkou ε v sústave SI je $\text{mol}^{-1}\text{m}^2$. V analytickej chémii roztokov sa molový absorpčný koeficient vyjadruje skôr v jednotkách $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, ktoré vyplývajú z vyjadrovania látkovej koncentrácie v $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a hrúbke vrstvy roztoku látky v kyvete v cm. Hodnota ε v SI sústave je preto desaťkrát menšia než hodnoty v jednotkách $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Použiteľné hodnoty $\varepsilon_{\max}$ absorpčných pásov látok v oblasti UF a VID bývajú 10^2 až $10^5 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

2.1.2. Meracie zariadenia a postupy

Zariadenia na spektrofotometrické merania v UF a VID oblasti majú tieto hlavné časti:

a) **Zdroj spojeného žiarenia** v sledovanej oblasti vlnových dĺžok (wolfrámová alebo halogénová žiarovka; ortuťová, deutériová alebo vodíková výbojka).

b) **Monochromátor**, ktorého jednotka sa skladá z vlastného disperzného zariadenia (hranol, mriežka), zo vstupnej a výstupnej štrbiny a z pomocných častí (šošovky, kolimátor).

c) **Kyvety** na vzorky z materiálu, ktorý umožňuje prechod použitého žiarenia (sklenené kyvety sú použiteľné v oblasti vlnových dĺžok 350 až 2500 nm, kremenné už od 200 nm).

Kyvety sú chýlostivé a drahé časti zariadenia, preto treba s nimi zaobchádzať opatrne a udržiavať ich čisté (umývajú sa v chromsírovej zmesi). Pri manipulácii s nimi dbáme na to, aby sa chytali do rúk len na matnej strane. Plnia sa tak, že po vybratí z chromsíroveho roztoku sa dôkladne opláchnu destilovanou vodou, opláchnu trikrát roztokom, ktorý chceme merať a až potom nalejeme do kyvety meraný roztok do výšky 3 – 5 mm od vrchu. Nakoniec sa kyvety opatrne otrú filtračným papierom do sucha a vložia do držiaka v kyvetovom priestore. Po skončení merania kyvety z prístroja vyberieme, opláchneme vodou a ponoríme do nádoby s kyselinou chromsírovou.

Dvojice kyviet (pre blank a roztok látky), použité na meranie, majú byť rovnakej hrúbky – spárené kyvety. Pred meraním je preto potrebné ich hrúbku skontrolovať (údaj o ich šírke je vyrytý pri ústí kyvety v mm). Hrúbka kyviet sa volí podľa koncentrácie a hodnoty molového absorpčného koeficientu tak, aby hodnota absorbancie bola medzi 0,1 a 1.

d) **Detektory žiarenia a spôsoby odčítania transmitancie**. Ako detektory pre UF a VID oblasť žiarenia sa najviac používajú fotodiódy a fotoelektrické násobiče. Sú citlivé a ich výstupný signál je v širokom rozsahu lineárnou funkciou vstupného signálu. Fotoelektrický prúd z detektora sa zosilňuje špeciálnymi elektronickými zosilňovačmi. Na odčítanie optických signálov, t. j. transmitancie alebo absorbancie, sa používajú spravidla analógové (výhylkové) alebo číslicové meracie prístroje. Pri jednolúčových spektrofotometroch sa meria T alebo A buď potenciometricky kompenzačným spôsobom,

alebo výchylkovým ampérmetrom. Registračné spektrofotometre umožňujú automatické získanie záznamu absorpčného spektra, čo však vyžaduje synchronizáciu registrácie s činnosťou monochromátora a s ovládaním zoslabovacích zariadení. Sú vybavené jednak líniovým zapisovačom pre záznam absorpčných kriviek, jednak digitálnym voltmetrom pre odčítanie absorbancií.

Väčšina bežne používaných prístrojov je konštruovaná tak, že v spojení s vymeniteľnými nadstavcami možno prístroj adaptovať na meranie fluorescencie, zákalu, remisie atď. Najnovšie konštrukcie prístrojov umožňujú ich napojenie na automatický podávač kyviet (až 300 za hodinu), samočinný počítač a tlačiareň údajov, čím sa analýza automatizuje a značne urýchľuje.

c) **Rozpúšťadlá.** Najpoužívanejším rozpúšťadlom je voda. Jej výhoda je v tom, že neabsorbuje v celom rozsahu merania od 200 do 1000 nm. Jej použiteľnosť je ale obmedzená rozpustnosťou látok. Pre nepolárne organické látky treba použiť organické rozpúšťadlá. Pre oblasť VID sú vhodné prakticky všetky bezfarebné rozpúšťadlá. Pre oblasť UF pod 350 nm je už výber obmedzený. Až do 210 nm sú použiteľné nasýtené uhľovodíky, nižšie alkoholy a étery.

2.1.3. Aplikácia

Kvalitatívna analýza. Absorpčné spektrum UF/VID čistej látky (resp. jej roztoku), najmä organickej, je kvalitatívnu charakteristikou pre danú zlúčeninu a závisí od elektrónovej štruktúry látky. Poloha a intenzita pásov je typická pre určitú časť molekuly (chromofornú), a preto spektrá veľkých, štruktúrne si podobných molekúl sa od seba líšia len veľmi málo. Vyhodnocujeme najčastejšie prítomnosť maxim a minim ($\lambda_{\max}$, $\lambda_{\min}$) absorpčných pásov pri porovnaní so spektrom štandardného roztoku identifikovanej látky, alebo porovnáme jej spektrum s atlasom spektier UF/VID. Tieto atlasy spektier obsahujú niekoľko desiatok tisíc elektrónových spektier rôznych molekúl. Nové vydanie slovenského liekopisu uvádza ako jednu z metód potvrdenia totožnosti liečiv a stanovenia ich obsahu absorpčnú spektrometriu UF/VID v celom rade článkov.

Mierou intenzity absorpčného pásu je hodnota molového absorpčného koeficienta, čo je vlastne absorbancia roztoku látky pri vlnovej dĺžke $\lambda_{\max}$, hrúbke kvety $b = 1$ cm a koncentrácii $c = 1$ mol/l.

Tvar absorpčnej krivky a poloha maxima (resp. minima) sú ovplyvňované rozpúšťadlom, teplotou, iónovou silou roztoku, chemickými rovnováhami (pH) a iným. Nastáva hypsochrómny alebo bathochrómny posun absorpčného maxima (minima) pásu v smere ku kratším alebo dlhším vlnovým dĺžkam a zmena absorpčného molového koeficienta.

Na identifikáciu možno uplatniť aj niektoré všeobecné pravidlá. Ak látka napr. nejaví merateľnú absorpciu medzi 200 a 800 nm, ide pravdepodobne o nasýtený uhľovodík, alkohol, éter, kyselinu alebo ester. Slabé, štruktúrne nevýrazné pásy okolo 280 nm sú typické pre aldehydy a ketóny. Výrazné pásy medzi 220 až 300 nm poukazujú na konjugáciu dvojitych väzieb.

Cenné informácie poskytuje spektrometria UF/VID pri identifikácii a štúdiu biochemicky významných látok, najmä sterolov, farbív, vitamínov atď. Spektrá UF/VID sa bežne uplatňujú pri identifikácii farmák, pesticídov, syntetických farieb a rady karcinogénnych látok, ktoré znečisťujú životné prostredie.

Kvantitatívna analýza. Spektrofotometrické stanovenie neznámej koncentrácie roztoku látky sa robí pri hodnotách vlnových dĺžok zodpovedajúcich maximu absorpčného pásu, pretože molový absorpčný koeficient pri $\lambda_{\max}$ je najmenej závislý od spektrálnej šírky štrbiny a jeho hodnota tu býva značne vysoká, čo umožňuje citlivé stanovenie (často mikrogramy látky v mililitri roztoku).

Základným predpokladom týchto kvantitatívnych stanovení je platnosť Lambertovho-Beerovho zákona. Podmienkou priamej úmernosti medzi absorbanciou a koncentráciou je hodnota molového absorpčného koeficientu. Jeho hodnota závisí nielen od vlnovej dĺžky, ale aj od druhu rozpúšťadla a od prítomnosti

d'alších látok. V koncentračnej oblasti platnosti zákona má uvedený vzťah priamkový priebeh a ak sa v skúmanom roztoku nenachádza iná absorbujúca látka, priamka má prechádzať začiatkom súradníc. Pri vyšších hodnotách koncentrácie sa závislosť $A = f(c)$ často ohýba k osi koncentrácií.

Rozlišujeme **priame** a **titračné** spektrofotometrické stanovenia. Pri priamych stanoveniach sa pracuje metódou kalibračnej krivky, t.j. zisťuje sa závislosť absorbancie od koncentrácie v štandardných roztokoch. Ak je kalibračná krivka priamková a prechádza počiatkom, možno na vyhodnotenie použiť aj metódu štandardného prídavku.

Fotometrickou titráciou sa rozumie použitie fotometrickej indikácie bodu ekvivalencie. Titračná krivka je v tomto prípade závislosťou absorbancie roztoku od objemu titračného skúmadla. Absorbancia sa sleduje pri takej konštantnej vlnovej dĺžke, pri ktorej má jedna z reagujúcich zložiek charakteristickú absorpciu. Bod ekvivalencie je potom určený priesečníkom dvoch priamkových vetví titračnej krivky s rôznymi smernicami, prípadne sa môže použiť vhodný indikátor (v prípade, že systém nejavi sám absorpciu), ktorý je sám absorbujúcou časticou.

Absorpčná spektrofotometria našla široké uplatnenie v analytickej praxi pre svoju univerzálnosť, citlivosť, presnosť, rýchlosť a dostupnosť prístrojovej techniky. Uplatňuje sa nielen pri identifikácii a stanovení obsahu anorganických a organických látok, ale je použiteľná aj na štúdium acidobázických rovnováh, na sledovanie kinetiky chemických a biochemických procesov, stability, metabolizmu atď.

Metodicky sa k spektrofotometrickému systému pristupuje dvojako:

a) z **praktického** hľadiska (neurčujú sa rovnováhy v roztoku, zloženie, stabilita, štruktúra absorbujúceho produktu atď.), kde sa postupuje podľa známeho, vopred experimentálne odskúšaného postupu. V tomto prípade je nutné striktné dodržať podmienky stanovenia a eliminovať tak systematickú chybu metódy na minimum,

b) z **exaktného** hľadiska, ktorému predchádza podrobné štúdium systému.

Vyhodnotenie výsledkov

Identifikácia. Z nameraných absorpčných kriviek látok, ktoré sme dostali na potvrdenie ich totožnosti, určíme polohu maxim $\lambda_{\max}$ a $\lambda_{\min}$ absorpčných pásov a porovnáme ich s hodnotami, ktoré sme zistili z absorpčných kriviek roztokov ich štandardov, prípadne porovnáme ich absorpčné spektrá so spektrami uvedenými v atlase spektier. Na základe tohto porovnania rozhodneme o totožnosti látok.

Stanovenie koncentrácie

a) Výpočtom pomocou molového absorpčného koeficientu ε (ε môžeme experimentálne stanoviť alebo vyhľadať v chemicko-fyzikálnych tabuľkách) z Lambertovho-Beerovho zákona, pričom $c = A/(\varepsilon \cdot b)$.

b) Graficky interpoláciou z kalibračnej krivky. Kalibračný graf možno zostrojiť na počítači pomocou grafických programov (napr. SLIDE, PIKFIT, GRAFFER), ktoré umožňujú preloženie kalibračnej priamky cez namerané hodnoty metódou najmenších štvorcov a štatistické vyhodnotenie presnosti merania.

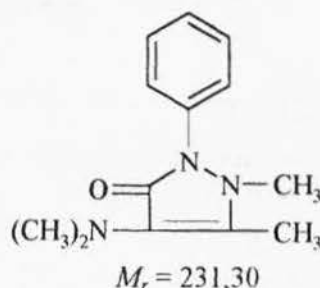
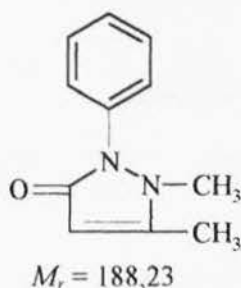
c) Výpočtom pomocou fotometrického faktora prepočítania koncentrácie F ($F = c/A$, resp. $F = \rho/A$). Hodnota tohto faktora sa vypočíta z experimentálnych hodnôt kalibračného grafu, môže sa vložiť do pamäte spektrofotometra a koncentráciu vzoriek odčítame potom priamo na displeji prístroja.

d) Z funkcie priamky ($y = ax + b$). V prípade zostrojenia kalibračného grafu pomocou programu SLIDE po štatistickom vyhodnotení jednotlivé symboly znamenajú: $y = A$ (absorbancia), $b = a_0$ (výseč na osi y), $a = a_1$ (smernica priamky), $x = c$. Z uvedených vzťahov vyplýva, že koncentrácia $c = (A - a_0)/a_1$.

2.1.4. Spektrofotometrické stanovenia a identifikácia

Úloha 12. Overenie totožnosti liečiv skupiny pyrazolónu a stanovenie ich čistoty

Fenazón (I) a aminofenazón (II) patria medzi liečivá skupiny derivátov pyrazolónu:

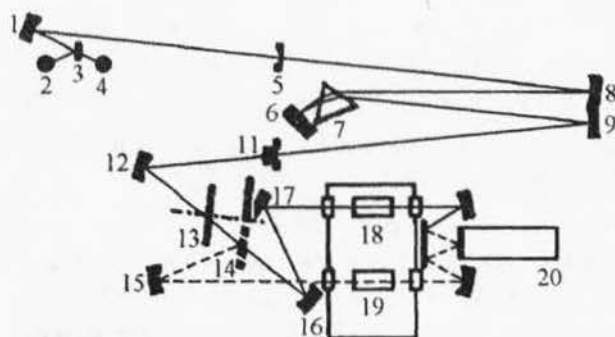


Zaradujú sa do farmakologickej skupiny medzi antipyretiká s analgetickým účinkom. Ich roztoky v metanole, resp. v zriedených minerálnych kyselinách poskytujú v UF oblasti charakteristické absorpčné spektrá.

Zadanie. Overte totožnosť vzorky liečiva skupiny pyrazolónu na základe porovnania jeho absorpčného spektra s absorpčným spektrom jeho štandardu. Vypočítajte molový absorpčný koeficient fenazónu, resp. aminofenazónu a stanovte čistotu substancie vzorky vyjadrenú hmotnostným zlomkom w v %.

Chemikálie a roztoky. Štandard fenazónu a aminofenazónu; vzorky fenazónu a aminofenazónu; roztok kyseliny chlorovodíkovej $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

Podmienky merania. Absorpčné spektrá roztokov štandardov a vzorky meriame na registračnom spektrofotometri (SPECORD UV VIS, obr. 13) v kremenných kyvetách s hrúbkou 10 mm. Ako porovnávací roztok použijeme roztok HCl. Počiatočnú hodnotu vlnopočtu nastavíme na $48\,000 \text{ cm}^{-1}$. Ostatné parametre nastavíme podľa návodu na obsluhu. Na registráciu použijeme registračný papier s hodnotami $-0,1$ až $1,4 \text{ A}$ na osi súradníc.



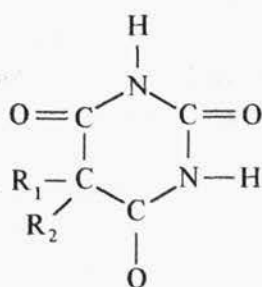
Obr. 13. Optická schéma spektrofotometra SPECORD UV VIS (Zeiss, SRN) 1 – tórické zrkadlo, 2 – deutériová výbojka, 3 – rovinné zrkadlo, 4 – žiarovka, 5 – vstupná štrbina monochromátora, 6 – Littrovovo zrkadlo, 7 – hranol monochromátora, 8, 9 – duté zrkadlá, 10 – výstupná štrbina monochromátora, 11 – valcová šošovka, 12 – tórické zrkadlo, 13 – kotúč modulátora, 14 – otočné zrkadlo, 15 – 17 – odrazové zrkadlá, 18 – porovnávací roztok, 19 – roztok vzorky, 20 – fotónásobič

Pracovný postup. Na analytických váhach navážime do troch 25 ml kadičiek presne asi po 50 mg štandardu fenazónu, aminofenazónu a vzorky. Návažky rozpustíme v roztoku HCl, kvantitatívne prelejeme do troch 250 ml odmerných baniek, doplníme roztokom HCl po značku a premiešame. Na vlastné spektrofotometrické merania z týchto základných roztokov odpipetujeme po 10 ml do troch 100 ml odmerných baniek, doplníme po značku roztokom HCl. Po premiešaní zmeriame absorpčné spektrá všetkých pripravených roztokov.

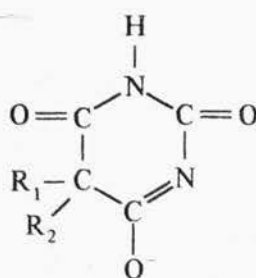
Získané absorpčné krivky vyhodnotíme po kvalitatívnej a kvantitatívnej stránke podľa zadania.

Úloha 13. Overenie totožnosti barbiturátov a stanovenie ich čistoty

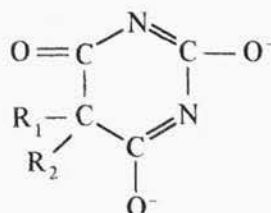
Barbituráty sú liečivá, ktoré na základe ich terapeutického účinku zaraďujeme do farmakologickej skupiny medzi hypnotiká. Po chemickej stránke sú derivátmi kyseliny barbitúrovej, ktorá v závislosti od pH roztoku môže existovať v troch tautomérnych formách



pH 2



pH 10



pH 13

V uvedených vzorcoch pre R_1 a R_2 platí:

- kyselina barbitúrová $R_1, R_2 = -H$;
- alobarbitál $R_1, R_2 = -CH_2-CH=CH_2$; $M_r = 208,22$;
- fenobarbitál $R_1 = -C_2H_5$, $R_2 = -C_6H_5$; $M_r = 232,20$.

V alkalickej prostredí vykazujú roztoky barbiturátov v UV oblasti žiarenia silnú absorpciu s charakteristickými absorpčnými spektrami.

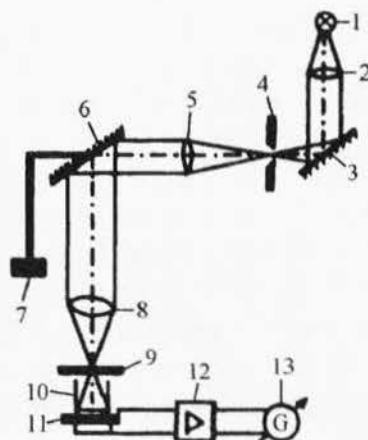
Zadanie. Overte totožnosť vzorky barbiturátu na základe porovnania jeho absorpčného spektra s absorpčným spektrom jeho štandardu. Vypočítajte molový absorpčný koeficient alobarbitálu resp. fenobarbitálu a stanovte čistotu substancie vzorky vyjadrenú hmotnostným zlomkom w v %.

Chemikálie a roztoky. Štandard alobarbitálu a fenobarbitálu; vzorky alobarbitálu a fenobarbitálu; roztok hydroxidu sodného $c(NaOH) = 0,1 \text{ mol/l}$.

Podmienky merania. Absorpčné spektrá roztokov štandardov a vzorky meriame na registračnom spektrofotometri (SPECORD UV VIS, obr. 13) v kremenných kyvetách s hrúbkou 10 mm. Ako porovnávací roztok použijeme roztok NaOH. Počiatočnú hodnotu vlnopočtu nastavíme na $44\,000 \text{ cm}^{-1}$. Ostatné parametre nastavíme podľa návodu na obsluhu. Na registráciu použijeme registračný papier s hodnotami $-0,1$ až $1,4 \text{ A}$ na osi súradníc.

Pracovný postup. Na analytických váhach navážime do troch 25 ml kadičiek presne asi po 80 mg štandardu alobarbitálu, fenobarbitálu a vzorky. Návažky rozpustíme v roztoku NaOH, kvantitatívne prelejeme do troch 250 ml odmerných baniek, doplníme roztokom NaOH po značku a premiešame. Na vlastné spektrofotometrické merania z týchto roztokov odpipetujeme po 10 ml do troch 100 ml odmerných baniek, doplníme po značku roztokom NaOH a po premiešaní zmeriame absorpčné spektrá všetkých pripravených roztokov.

Získané absorpčné krivky vyhodnotíme po kvalitatívnej a kvantitatívnej stránke podľa zadania.



Obr. 14. Optická schéma spektrofotometra SPEKOL 11 (Zeiss, SRN)
 1 – zdroj žiarenia, 2 – kondenzor, 3 – zrkadlo, 4 – vstupná štrbina,
 5 – objektív, 6 – mriežka monochromátora, 7 – otočný bubon pre
 nastavenie vlnovej dĺžky, 8 – objektív, 9 – výstupná štrbina, 10 – ky-
 veta, 11 – fotočlánok, 12 – zosilňovač, 13 – galvanometer

Úloha 14. Sledovanie podmienok spektrofotometrického stanovenia Cu^{2+} s chelatónom 3

Ióny ťažkých kovov tvoria s komplexotvorným skúmadlom chelatónom 3 (dvojsodná soľ kyseliny etyléndiamin-N,N,N',N'-tetraoctovej) veľmi pevne cheláty. Niektoré sú farebné, čo možno využiť na spektrofotometrické stanovenie príslušného iónu kovu, napr. Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} a Co^{2+} .

Pred vlastným stanovením iónu kovu zistíme optimálne podmienky pre toto stanovenie. Je to predovšetkým zistenie absorpčného maxima (λ_{max}), zistenie vhodnej oblasti pH tvorby chelátu, ako aj množstvo skúmadla, potrebného na kvantitatívne naviazanie iónu kovu do chelátu.

Zadanie. Stanovte hmotnostnú koncentráciu (mg/ml) medi v roztoku vzorky s chelatónom 3.

Chemikálie a roztoky. Roztok síranu meďnatého $c(\text{CuSO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$; roztok chelátónu 3 $c(\text{chel. 3}) = 0,05 \text{ mol/l}$; tlmivé roztoky s pH 3,0; 4,6; 6,0; 9,2; 10,2.

Podmienky merania. Absorbanciu roztokov meriame na spektrofotometri v sklenených kyvetách s hrúbkou vrstvy 10 mm oproti vode ako porovnávaciemu roztoku pri vlnovej dĺžke zisteného absorpčného maxima vzniknutého komplexu. Spektrofotometer (SPEKOL s nadstavcom EK1, obr. 14) sa pripraví na meranie podľa návodu na obsluhu.

Pracovný postup. Na zistenie absorpčného maxima odpipetujeme do 50 ml odmernej banky 5 ml štandardného roztoku CuSO_4 , 10 ml roztoku chelátónu 3 a banku doplníme tlmivým roztokom s pH 6,0. Absorbanciu pripraveného roztoku zmeriame v oblasti 600 – 800 nm v intervaloch po 20 nm. Namerané hodnoty závislosti $A = f(\lambda[\text{nm}])$ vyhodnotíme graficky. Vlnová dĺžka, pri ktorej sa nachádza vrchol absorpčnej krivky, udáva absorpčné maximum λ_{max} vytvoreného chelátu. Ostatné merania robíme už pri tejto fixne nastavenej vlnovej dĺžke.

Na zistenie vhodnej oblasti pH na tvorbu chelátu odpipetujeme do piatich 50 ml odmerných baniek po 5 ml štandardného roztoku CuSO_4 a do každej z nich pridáme odmerným valcom 10 ml roztoku chelátónu 3. Odmerné banky doplníme po značku jednotlivými tlmivými roztokmi. Absorbanciu všetkých piatich roztokov zmeriame, vyhodnotíme graficky a vyberieme na ďalšie merania vhodný tlmivý roztok.

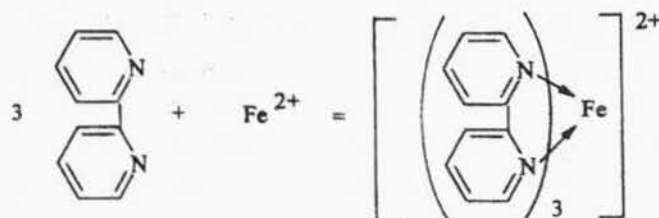
Ďalej zistíme potrebný prebytok roztoku chelátónu 3 na stanovenie Cu^{2+} . Do 50 ml odmerných baniek napipetujeme po 5 ml štandardného roztoku CuSO_4 . Do prvej banky pridáme pomocou byrety 2 ml roztoku skúmadla chelátónu 3, do druhej 3,5 ml, do tretej 5 ml, do štvrtej 7 ml a do piatej 10 ml. Všetky odmerné banky doplníme po značku a zmeriame absorbanciu pripravených roztokov. Z nameraných hodnôt zostrojíme graf závislosti absorbancie od pridaného objemu skúmadla, z ktorého zistíme najmenšie množstvo skúmadla, ktoré zaručuje, že chemická reakcia medzi Cu^{2+} a chelátónom 3 prebehla v stechiometrickom pomere. Do roztokov na zostrojenie kalibračného grafu a stanovenie vzorky pridáme potom dvojnásobok minimálne potrebného objemu skúmadla, aby bol zaručený jeho prebytok.

Na zostrojenie kalibračného grafu odmeriame z byrety do piatich 50 ml odmerných baniek 1, 2, 3, 4 a 5 ml štandardného roztoku CuSO_4 , pridáme potrebné množstvo chelátónu 3 a doplníme vybraným tlmivým roztokom po značku. Po premiešaní roztokov zmeriame ich absorbanciu. Z nameraných hodnôt zostrojíme kalibračný graf závislosti $A = f(\rho)$.

Nakoniec stanovíme koncentráciu medi v roztoku vzorky tak, že zo vzorky odpipetujeme 5 ml do 50 ml odmernej banky, pridáme potrebné množstvo chelátónu 3 a banku doplníme tlmivým roztokom po značku. Po premiešaní zmeriame absorbanciu roztoku vzorky medi a vypočítame jej hmotnostnú koncentráciu.

Úloha 15. Spektrofotometrické stanovenie Fe^{2+} a Fe^{3+} vedľa seba s 2,2'-bipyridínom

Železnaté ióny vytvárajú s 2,2'-bipyridínom v slabokyslom prostredí v rozmedzí pH 4 – 6 červeno sfarbený, veľmi stabilný komplex podľa reakcie



Uvedený poznatok možno využiť na spektrofotometrické stanovenie Fe^{2+} , ako aj Fe^{3+} po jeho redukcii s chloridom hydroxylamínia na Fe^{2+} .

Zadanie. Stanovte hmotnostnú koncentráciu ($\mu\text{g/ml}$) Fe^{2+} a Fe^{3+} v roztoku vzorky s 2,2'-bipyridínom.

Chemikálie a roztoky. Štandardný roztok siranu železnatého $c(\text{FeSO}_4) = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ v kyseline chlorovodíkovej ($c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$); roztok 2,2'-bipyridínu v kyseline chlorovodíkovej ($c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$) $w(\text{bipyridín}) = 0,1 \%$; roztok chloridu hydroxylamínia $w(\text{NH}_4\text{OCl}) = 10 \%$; roztok octanu sodného $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 2 \text{ mol/l}$.

Podmienky stanovenia. Absorbancie roztokov meriame na spektrofotometri v 10 mm sklenených kyvetách oproti vode ako porovnávaciemu roztoku pri vlnovej dĺžke zisteného absorpčného maxima vzniknutého komplexu. Spektrofotometer (SPEKOL s nadstavcom EK1, obr. 14) sa pripraví na meranie podľa návodu na obsluhu.

Pracovný postup. Zo štandardného roztoku FeSO_4 odpipetujeme 5 ml roztoku do 50 ml odmernej banky. K roztoku pridáme 5 ml roztoku skúmadla a 10 ml roztoku octanu sodného a banku doplníme vodou po značku. Po premiešaní absorbanciu roztoku zmeriame v oblasti 400 – 600 nm v intervaloch po 20 nm. Namerané hodnoty závislosti $A = f(\lambda[\text{nm}])$ vyhodnotíme graficky. Vlnová dĺžka, pri ktorej sa nachádza vrchol absorpčnej krivky, udáva absorpčné maximum λ_{max} vytvoreného chelátu. Ostatné merania robíme už pri tejto fixne nastavenej vlnovej dĺžke.

Na zostrojenie kalibračného grafu odmeriame z byrety do piatich 50 ml odmerných baniek 2, 4, 6, 8 a 10 ml štandardného roztoku FeSO_4 . Do baniek potom pridáme 5 ml roztoku skúmadla a 10 ml roztoku octanu sodného. Banky doplníme vodou po značku, premiešame a absorbanciu pripravených roztokov zmeriame. Z nameraných hodnôt zostrojíme kalibračný graf závislosti $A = f(\rho)$.

Nakoniec stanovíme hmotnostnú koncentráciu Fe^{2+} a Fe^{3+} vo vzorkách. Z roztoku vzorky odpipetujeme po 10 ml do dvoch 50 ml odmerných baniek. Do jednej banky pridáme 5 ml roztoku skúmadla, 2 ml roztoku hydroxylamínia a 10 ml roztoku octanu sodného. Banku doplníme po značku vodou, premiešame, necháme 30 min stáť a potom absorbanciu roztoku zmeriame. Do druhej banky pridáme skúmadlá v tom istom množstve a poradiť ako do prvej banky s tým rozdielom, že do nej nepridáme roztok hydroxylamínia. Po doplnení banky vodou po značku a premiešaní zmeriame ihneď absorbanciu roztoku.

Hmotnostnú koncentráciu Fe^{2+} a celkového železa (po redukcii s chloridom hydroxylamínia) vyhodnotíme a z ich rozdielu zistíme hmotnostnú koncentráciu Fe^{3+} .

2.2. FLUORIMETRIA

2.2.1. Základné pojmy a aplikácia

Fluorescencia je jedným z javov, s ktorými sa stretávame pri vzájomnom pôsobení žiarenia a analyzovaného prostredia. Časť žiarenia (excitačné žiarenie) je absorbovaná atómami a molekulami, ktoré sa dostávajú do vyšších excitovaných stavov. Obyčajne sa podstatná časť absorbovanej energie mení nevratne na teplo a len malá časť je vyžiarená ako fluorescencné žiarenie (emitované) s krátkym do-
svitom ($10^{-8} - 10^{-5}$ s).

Fluorimetria je spektrofotometrická metóda založená na využití emisných spektier atómov a molekúl v oblasti ultrafialového a najmä viditeľného žiarenia. Z analytického hľadiska významnejšie sú aplikácie kvantitatívne než kvalitatívne pre značnú citlivosť stanovenia nízkych koncentrácií organických a anorganických látok v roztokoch po ich eventuálnej separácii zo zmesí. V porovnaní s absorpčnou spektrofotometriou je fluorimetria v priemere citlivejšia o dva až štyri poriadky. Je to spôsobené predovšetkým tým, že koncentrácia je tu priamoúmerná meranému signálu, zatiaľ čo pri absorpcii je meraný rozdiel dvoch veľkých signálov. Veľmi malá koncentrácia a neprítomnosť cudzích častíc je na rozdiel od absorpčných metód podstatná, aby sa čo najviac obmedzilo rušivé „zhášanie“ fluorescencie nežiarivými prechodmi molekúl medzi jednotlivými energetickými stavmi. Ďalšou výhodou fluorimetrie je jej značná selektivita.

Určitou nevýhodou fluorimetrických stanovení je skutočnosť, že meraný emisný signál je závislý nielen od typu prístroja, ale i od teploty, od druhu rozpúšťadla a od prítomnosti vedľajších látok v roztoku. Nie je preto ľahké porovnávať signály získané v rôznych experimentálnych podmienkach. Pri stanovení postupujeme preto metódou individuálnej kalibračnej krivky alebo ešte lepšie metódou štandardných prídavkov. Tento postup však predpokladá dostupnosť potrebných presných štandardov.

Z metodického hľadiska fluorimetrické stanovenia môžu byť priame a nepriame. Pri priamej fluorimetrii fluoreskuje samotná analyzovaná látka. Táto situácia je bežná v organickej analýze, kde počet stanoviteľných látok ide do tisícok. Najviac je aplikovaná v biochemickej a klinickej analýze (stanovenie vitamínov, porfyrínov, adrenalínu, estrogénu, urobilínu a i.).

Nepriame metódy predpokladajú premenu látok na fluoreskujúcu zlúčeninu. Táto metodika má veľký význam zvlášť v stopovej analýze kationov kovov, ktoré sa prevádzajú na fluoreskujúce cheláty.

Významnou charakteristickou vlastnosťou molekuly je kvantový výťažok fluorescence F , definovaný ako pomer fluorescenčného žiarivého toku k absorbovanému žiarivému toku

$$F = \frac{\Phi_F}{\Phi_A}$$

kde Φ_F je fluorescenčný žiarivý tok,

Φ_A je pohltенý (absorbovaný) žiarivý tok.

Kvantový výťažok môže nadobudnúť maximálnu hodnotu 1.

Matematicko-fyzikálne vyjadrenie vzťahu pre závislosť intenzity fluorescence od koncentrácie fluoreskujúcej látky je pomerne zložitá, lebo vzťah opisuje nelineárny tvar kalibračnej krivky. V najjednoduchšom prípade fluorimetrického stanovenia je v roztoku prítomný jediný druh absorbujúcich a fluoreskujúcich molekúl. Ak je potom fluorescenčný žiarivý tok Φ_F úmerný absorbovanému Φ_A a ak platí pre absorpciu Lambertov-Beerov zákon, vzťah medzi Φ_F a koncentráciou c fluoreskujúcej látky vystihuje rovnica

$$\Phi_F = kF\Phi_0 \cdot 2,3 \cdot \varepsilon bc$$

kde ε je molový absorpčný koeficient,

b – hrúbka vrstvy roztoku tejto látky,

c – koncentrácia,

k – prístrojová konštanta.

Rovnica platí, ak $\varepsilon bc \leq 0,02$. Pre veľmi zriedené roztoky, s ktorými vo fluorimetrii však často pracujeme, je fluorescenčný žiarivý tok priamoúmerný koncentrácii látky v roztoku ($\Phi_F = f[c]$) a rovnica nadobúda lineárny priebeh, kalibračné krivky sú priamkové. Pri vyšších koncentráciách a v prítomnosti niektorých cudzích látok (organických látok s konjugovanými väzbami p-systémov alebo iónov) rovnica neplatí, pretože vysoká frekvencia zrážok a iných interakcií spôsobuje „zhášanie“ fluorescence, kalibračné krivky sa ohýbajú k osi koncentrácií. Tieto okolnosti najviac prekážajú pri analytických aplikáciách fluorimetrie.

Súhrnom možno povedať, že fluorimetria sa významne podieľa na analytickom stanovení stopových prvkov, polymérov, v petrochémii, vo farmácii, pri analýze potravín, vôd i ovzdušia.

2.2.2. Fluorimetrické stanovenia

Úloha 16. Stanovenie síranu chinína

Roztoky chinínu vykazujú pôsobením UV žiarenia časovo stálu modrú fluorescenciu, ktorá má najvyššiu intenzitu v prostredí kyseliny sírovej. Tento poznatok možno využiť na fluorimetrické stanovenie chinínu.

Vzhľadom na terapeutický účinok zaraďuje sa chinín do farmakologickej skupiny medzi antimalariká a antipyretiká.

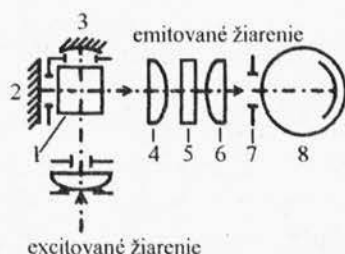
Zadanie. Stanovte hmotnostnú koncentráciu ($\mu\text{g/ml}$) roztoku vzorky síranu chinína metódou kalibračného grafu.

Chemikálie a roztoky. Štandardný roztok síranu chinína $\rho(\text{C}_{40}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_8\text{S} \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ g/l}$; roztok kyseliny sírovej s koncentráciou $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$.

Podmienky merania. Intenzitu fluorescencie všetkých roztokov siranu chininia meriame na spektrofotometri (SPEKOL, opatrený fluorescenčným nadstavcom FK, obr. 15) pri vlnovej dĺžke excitačného žiarenia 370 nm v kremenných fluorimetrických kyvetách (všetky strany kyvety sú priesvitné) s hrúbkou vrstvy 10 mm oproti porovnávaciemu roztoku, ktorým je roztok kyseliny sírovej.

Pracovný postup. Zo štandardného roztoku siranu chininia odmeriame byretou do piatich 25 ml odmerných baniek 1, 2, 3, 4 a 5 ml roztoku. Odmerné banky doplníme po značku roztokom kyseliny sírovej, premiešame a zmeriame intenzitu ich fluorescencie. Z nameraných hodnôt zostrojíme kalibračný graf závislosti $\%F = f(\rho)$.

Koncentráciu roztoku vzorky siranu chininia stanovíme tak, že zmeriame najskôr priamo nezriedený roztok vzorky. Ak hodnota intenzity fluorescencie bude väčšia, ako je najväčšia hodnota intenzity fluorescencie na kalibračnom grafe, treba vzorku zriediť. Postupujeme tak, že odpipetujeme 5, resp. 10 ml roztoku vzorky do 25 ml odmernej banky, doplníme po značku roztokom kyseliny sírovej a po premiešaní zmeriame. Ak intenzita fluorescencie roztoku vzorky sa bude pohybovať v rozmedzí rozsahu kalibračnej krivky, vyhodnotíme výsledok analýzy po stránke kvantitatívnej.



Obr. 15. Schéma fluorescenčného nadstavca FK pre SPEKOL 11
1 – kyveta, 2 – zrkadlo, 3 – duté zrkadlo, 4, 6 – šošovky, 5 – absorpčný alebo interferenčný filter, 7 – clona, 8 – fotónka alebo fotonásobič

Úloha 17. Stanovenie hliníka s morínom

Morín dáva s hlinitými soľami v slabokyslom prostredí (pH 3 – 4,5) intenzívne zeleno fluoreskujúce roztoky. Fluorescencia je pripisovaná hlinitej soli $\text{Al}(\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_7)_3$.

Zadanie. Stanovte hmotnostnú koncentráciu ($\mu\text{g/ml}$) roztoku vzorky hliníka metódou kalibračného grafu.

Chemikálie a roztoky. Roztok dusičnanu hlinitého $\rho(\text{Al}(\text{NO}_3)_3) = 1,0 \text{ mg/l}$; kyselina octová zriedená 1:10; roztok morínu v etanole $w(\text{morín}) = 0,35 \%$; etanol $w = 96 \%$

Podmienky merania. Intenzitu fluorescencie roztokov hlinitej soli meriame pri vlnovej dĺžke excitačného žiarenia 410 nm oproti porovnávaciemu roztoku, ktorý obsahuje všetky skúmadlá v rovnakom množstve ako skúmaný roztok vzorky okrem roztoku hlinitej soli. Ostatné podmienky merania sú zhodné s podmienkami, ktoré sú uvedené v úlohe č. 15.

Pracovný postup. Zo štandardného roztoku hlinitej soli sa pomocou byrety odmeria postupne 1, 2, 3, 4 a 5 ml roztoku do 50 ml odmerných baniek. Do jednotlivých baniek sa potom pridá po 10 ml zriedenej kyseliny octovej, 3 ml roztoku morínu a 25 ml etanolu. Odmerné banky sa doplnia vodou po značku, premiešajú sa a nechajú 10 min temperovať pri teplote 25°C v ultratermostate. Ako porovnávací roztok použijeme roztok, ktorý bude obsahovať všetky zložky meraného systému okrem hlinitej soli. Intenzita fluorescencie roztokov sa zmeria a z nameraných hodnôt zostrojíme kalibračný graf závislosti $\%F = f(\rho)$.

Koncentráciu hliníka vo vzorke stanovíme tak, že 5 ml roztoku vzorky odpipetujeme do 50 ml odmernej banky, pridáme 3 ml roztoku morínu, 10 ml zriedenej kyseliny octovej a 25 ml etanolu. Banku

doplníme vodou po značku, premiešame a necháme 10 min temperovať pri teplote 25 °C v ultratermostate. Intenzitu fluorescence roztoku vzorky potom zmeriame a vyhodnotíme po stránke kvantitatívnej.

2.3. INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIA

2.3.1. Základné pojmy

Infračervená absorpčná spektrometria je založená na interakcii látky so žiarením, pričom dochádza k zmene dipólového momentu väzieb v molekulách a vzniku vibračno-rotáčného spektra.

Infračervené spektrum je dôležitou charakteristikou najmä organických látok. Ukázalo sa, že doposiaľ neboli nájdené dve látky, ktoré by mali do všetkých podrobností rovnaké spektrá. Z týchto dôvodov sa metóda využíva najviac na identifikáciu látok, poskytuje však i dobré informácie o štruktúre a geometrii sledovaných zlúčenín. Na kvantitatívne účely sa môže využiť len roztoková spektrometria, využíva sa však len výnimočne.

Infračervené spektrum sa rozdeľuje na tri oblasti: blízka od 4 000 do 12 000 cm⁻¹, stredná od 400 do 4 000 cm⁻¹, ďaleká od 10 do 400 cm⁻¹.

V analytickej chémii sa využívajú najmä vibračné, resp. vibračno-rotáčné spektrá, ktorých základné – dovolené prechody patria do strednej oblasti a vyššie harmonické do oblasti blízkej infračervenej. Ďaleká infračervená oblasť sa využíva menej pre pomerne veľkú inštrumentálnu náročnosť.

Absorpcia fotónu z infračervenej oblasti spektra molekulou spôsobuje prechod molekuly na vyššiu vibračnú hladinu. Atómy viazané v molekulách chemickými väzbami sa nachádzajú v ustavičnom pohybe. Tento pohyb si možno zjednodušene predstaviť pre jednoduchú dvojatómovú molekulu ako harmonické vibrácie dvoch guľôčok spojených pružinou. Hmotnosť každej guľôčky reprezentuje hmotnosť atómu m_1 , resp. m_2 , tuhosť pružiny predstavuje **silovú konštantu väzby** k . Tento model sa nazýva lineárny harmonický oscilátor. Pre vlnopočet vibrácie takéhoto harmonického oscilátora vyplýva

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

kde μ je redukovaná hmotnosť vibrujúcich atómov určená ako harmonický priemer obidvoch hmotností $(m_1 m_2)/(m_1 + m_2)$. Vlnopočet väzby rastie so vzrastajúcou silou väzby a klesá so zväčšujúcou sa hmotnosťou atómov. To znamená, že čím je väzba silnejšia a hmotnosť atómov menšia, tým viac je oblasť výskytu absorpčných pásov posunutá k vyšším vlnopočtom, na vyvolanie vibrácie je potrebná väčšia energia. Kvantová mechanika však určuje, že energia vibračného pohybu molekuly E_v sa nemôže meniť kontinuálne, ale je určená vzťahom

$$E_v = h\nu_0 \left(v + \frac{1}{2} \right)$$

kde vibračné kvantové číslo v môže nadobúdať iba celočíselné hodnoty 0, 1, 2, ... Absorbuje sa kvantum, ktorého energia sa rovná rozdielu energií vibračných hladín

$$\Delta E = E_1 - E_0 = \frac{3}{2} h\nu_0 - \frac{1}{2} h\nu_0 = h\nu_0$$

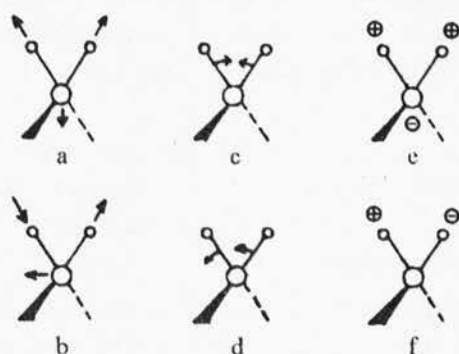
Pritom molekula prejde napr. zo základnej vibračnej hladiny $v = 0$ do vzбудenej vibračnej hladiny $v = 1$.

Aj v polyatómovej molekule atómy vykonávajú vibračný pohyb, navyše sa môže meniť aj uhol väzieb medzi atómami. Rôznym druhom chemickej väzby v molekule prislúchajú rôzne hodnoty silových konštánt aj redukovaných hmotností, absorpcia infračerveného žiarenia nastáva v širokom rozsahu frekvencií (vlnopôčtov). Počet základných druhov vibrácií je daný počtom stupňov voľnosti, ktorý je určený ako trojnásobok počtu atómov n (každý atóm má tri stupne voľnosti). V n -atómovej nelineárnej molekule je $3n - 6$, lineárna molekula má $3n - 5$ základných vibrácií. Napríklad trojatómová nelineárna molekula H_2O má tri typy vibrácií, trojatómová lineárna molekula CO_2 4 typy.

Základné druhy vibrácií sa zásadne rozdeľujú na valenčné označované ν a deformačné δ .

Valenčné vibrácie sú spojené s predlžovaním a skracovaním väzby. Dvoatómové skupiny napr. O–H majú jednu valenčnú vibráciu, viacatómové skupiny majú symetrickú valenčnú vibráciu ν_s a asymetrickú valenčnú vibráciu ν_{as} (obr. 16).

Deformačné vibrácie súvisia so zmenou uhla medzi väzbami. Rozdeľujú sa na rovinné a mimorovinné (obr. 16).



Obr. 16. Základné druhy vibrácie CH_2 skupiny Valenčné vibrácie ν : a – symetrická ν_s , b – asymetrická ν_{as} . Rovinné deformačné vibrácie δ : c – nožničková (scissoring), d – kyvadlová (rocking); mimorovinné deformačné vibrácie: e – vejárová (waging), f – torzná (twisting).

Skeletové a kruhové vibrácie sú vibrácie, ktorých sa zúčastňujú celé reťazce v uhlíkovom skelete, alebo viac väzieb v cyklických zlúčeninách. Príkladom sú skeletové vibrácie skupín $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $=\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ alebo kruhové vibrácie furánového, pyrolového, pyridínového kruhu a i.

2.3.2. Interpretácia infračervených spektier

Infračervené spektrum znázorňuje závislosť absorpcie A alebo priepustnosti T od vlnopôčtu $\tilde{\nu}$ alebo vlnovej dĺžky λ .

Pre správnu interpretáciu IČ spektier treba dodržiavať niektoré základné požiadavky:

- Spektrum musí vykazovať primeranú intenzitu pásov a polohy absorpčných pásov – maxim, musia byť určené s dostatočnou presnosťou.
- Musí to byť spektrum chemicky čistej látky.
- Pristroj, na ktorom bolo spektrum merané, musí byť vopred kalibrovaný na vhodný štandard (napr. polystyrén).
- Pri interpretácii je potrebné brať do úvahy aj metódu prípravy vzorky.

Meranie IČ spektier sa môže uskutočniť v závislosti od skupenstva látky v zásade týmito spôsobmi:

a) Meranie v plynnom skupenstve (parách). Táto technika poskytuje najobjektívnejší obraz o vzorke, no možno ju použiť len obmedzene.

b) Meranie v kvapalnom skupenstve a v roztokoch sa používa najčastejšie. Látka sa rozpustí vo vhodnom rozpúšťadle a naleje do mernej kvety, do porovnávacej sa naleje rozpúšťadlo. Ak sa meria priamo kvapalina, do cesty porovnávacieho lúča sa dá len okienko z príslušného materiálu.

c) Meranie KBr technikou v tuhom skupenstve. Technika sa uplatňuje pri organických látkach, ktoré nie sú rozpustné v bežných rozpúšťadlách používaných v IČ spektroskopii. Postupuje sa tak, že malé množstvo látky (1 – 5 mg) sa vo vibračnom mlynčeku zhomogenizuje s 300 až 1 000 mg KBr a celé množstvo alebo len jeho časť sa zlisuje v hydraulickom lise do priehľadnej tabletky, ktorá sa v špeciálnom držiaku vkladá do merného lúča a registruje sa spektrum oproti blanku, ktorý tvorí tabletká z čistého KBr alebo sa použije clonka.

d) Meranie spektier emulzie látky s vhodným emulgátorom (napr. parafínovým olejom – nujolom). V tomto prípade sa malé množstvo látky (3 – 10 mg) rozotrie tyčinkou v achátovej miske s 1 – 2 kvapkami nujolu na hustú emulziu, ktorá sa naniesie tyčinkou na NaCl, resp. KBr okienko rozoberateľnej kvety a pritlačí okienkom z toho istého materiálu. Ako blank sa použije okienko z rovnakého materiálu alebo clonka.

Pri interpretácii IČ spektier určujeme polohu absorpčného pásu v jeho maxime, ktorá sa vyjadruje v jednotkách vlnopočtu alebo vlnovej dĺžky. Poloha absorpčného pásu závisí jednak od povahy jednotlivých väzieb, ako aj od ich tzv. okolia. Napriek tomu väčšina väzieb v molekule má charakteristické vlnopočty, čo sa využíva pri určovaní štruktúry látok.

Zatiaľ čo **vlnopôčet absorpčného pásu** závisí predovšetkým od „mechanických“ vlastností väzby, intenzita pásu je mierou pravdepodobnosti prechodu medzi príslušnými vibračnými stavmi a závisí od zmeny dipólového momentu pri vibrácii. Intenzita pásu sa pri interpretácii IČ spektra charakterizuje ako **pás silný (s), stredný (str), slabý (sl)**. V tomto prípade sa za základ berie najintenzívnejší pás na spektre a intenzity ostatných sa určujú relatívne k tomuto pásu. Intenzita absorpcie sa vyjadruje objektívnejšie ako integrovaná absorpčná intenzita, ktorá vyjadruje plochu absorpčného pásu. Veľkosť absorpcie žiarenia možno vyjadriť aj Lambertovým-Beerovým zákonom (molový absorpčný koeficient).

Najcennejšie informácie poskytujú spektrá v rozsahu vlnopočtov strednej infračervenej oblasti v rozmedzí 4 000 – 400 cm^{-1} , ktorá sa v praxi aj najviac používa. Táto oblasť sa ďalej delí. Oblasť 3 800 – 1 300 cm^{-1} označujeme ako oblasť **charakteristických frekvencií**. Za charakteristický infračervený pás určitej **funkčnej skupiny** označujeme taký, ktorej vlnopôčet má približne vždy rovnakú hodnotu bez ohľadu na jej okolie. Dá sa povedať, že v tejto oblasti nachádzame pri vyšších vlnopôčtoch absorpčné pásy, ktoré zodpovedajú **valenčným vibráciám**. V oblasti od 1 600 cm^{-1} sa objavujú už **pásy deformačných vibrácií**. V oblasti vlnopočtov nižších ako 1 300 cm^{-1} sa nachádzajú popri pásoch vibrácií niektorých väzieb aj absorpčné pásy väčších systémov (napr. uhlíkovodíkového reťazca). Vzhľad tejto časti spektra je charakteristický pre jedinú látku, a preto táto oblasť **skeletárnych vibrácií** býva označovaná ako oblasť „**odtlačku palca**“.

Pri interpretácii IČ spektier a následnej identifikácii látky môžeme postupovať viacerými spôsobmi:

a) Pre interpretáciu IČ spektier majú veľký význam katalógy obsiahlych zbierok IČ spektier látok (štandardov). Na kartách týchto katalógov sú vedľa spektra príslušnej látky aj údaje o jej fyzikálnych konštantách, podmienkach registrácie a literárny odkaz na pôvodnú publikáciu. Experimentálne namerané spektrum látky sa porovnáva so spektrom jej štandardu, ktoré je uvedené v katalógu. Najnovšie porovnanie experimentálneho spektra so štandardným sa realizuje pomocou počítača, ktorý je prepojený priamo na IČ spektrofotometer. Po zmeraní experimentálneho spektra je počítač schopný v priebehu

niekoľkých sekúnd zo štandardných spektier uložených v jeho pamäti vybrať totožné spektrum s experimentálnym a potvrdiť tým identitu sledovanej látky.

b) Pri ďalšom spôsobe sa porovnáva experimentálne namerané IČ spektrum vzorky a jej štandardu. Tento spôsob vyžaduje mať k dispozícii overený štandard látky, ktorej totožnosť chceme potvrdiť. Totožnosť látky sa považuje za potvrdenú, ak experimentálne namerané IČ spektrum vzorky a jej overeného štandardu sú po kvalitatívnej stránke zhodné. Tento spôsob identifikácie predpisuje slovenský, ako aj európsky liekopis vo svojich článkoch pre skúšky na totožnosť značného počtu liečiv.

c) Najnáročnejší spôsob interpretácie IČ spektra je v tom prípade, ak ide o novosyntetizovanú látku, resp. látku, ktorej spektrum štandardu nemáme k dispozícii. V tomto prípade však musíme mať k dispozícii niektoré základné informácie o látke (molekulovú hmotnosť, sumárny vzorec, teplotu topenia a pod.). Zisteným vlnopočtom priradíme potom jednotlivé štruktúrne prvky študovanej látky (funkčné skupiny, časti uhl'ovodíkového skeletu atď.). Na tieto účely nám slúžia tabuľky, ktoré zahrňujú údaje vlnopočtov charakteristických vibrácií väzieb, ktoré sa vyskytujú pri organických látkach. Pri ich použití treba však pripomenúť, že na polohu absorpčného pásu má vplyv predovšetkým okolie tejto väzby a celý rad ďalších faktorov. Z tohto dôvodu je potrebné vlnopočty alebo intervaly vlnopočtov považovať za približné a nie univerzálne pre ktorúkoľvek zlúčeninu.

Nasýtené uhl'ovodíky. Na spektrách nasýtených uhl'ovodíkov možno očakávať valenčné a deformačné vibrácie väzieb C–H a C–C. Valenčné vibrácie väzieb C–C sú slabé a objavujú sa v širokej oblasti vlnopočtov $1\,200 - 800\text{ cm}^{-1}$, deformačné vibrácie väzieb C–C v oblasti vlnopočtov menších ako 500 cm^{-1} . Pri interpretácii spektier sú oveľa významnejšie valenčné a deformačné vibrácie väzieb C–H. Metylénové skupiny nasýtených uhl'ovodíkov sa prejavujú asymetrickou a symetrickou vibráciou väzieb C–H v oblasti $2\,926\text{ cm}^{-1}$. V prípade rôznych uhl'ovodíkov poloha týchto pásov sa nemení viac než v rozmedzí $\pm 10\text{ cm}^{-1}$.

Deformačná vibrácia väzby C–H metylénovej skupiny má takmer konštantnú polohu pri $1\,465\text{ cm}^{-1}$. Menej významné sú pásy ďalších deformačných vibrácií vyskytujúcich sa v oblasti $1\,250 - 1\,150\text{ cm}^{-1}$.

Metylénová skupina nasýtených uhl'ovodíkov vykazuje dva pásy valenčných vibrácií. Pás asymetrickej vibrácie pri $2\,960\text{ cm}^{-1}$ a symetrickej valenčnej vibrácie pri $2\,870\text{ cm}^{-1}$.

Prítomnosť dvojitej väzby v blízkosti CH_3- alebo $-\text{CH}_2-$ skupiny spôsobuje posun maxima absorpčného pásu k nižším vlnopočtom a spravidla aj jeho rozštiepenie.

Nenasýtené uhl'ovodíky. Na identifikáciu týchto zlúčenín sú dôležité pásy vibrácií väzieb C–H a C=C. Pás valenčnej vibrácie väzby C–H sa objavuje v oblasti vyššej ako $3\,000\text{ cm}^{-1}$. Výskyt pásu v oblasti $3\,100 - 3\,000\text{ cm}^{-1}$ môže znamenať prítomnosť nielen nenasýtených uhl'ovodíkov, ale aj heteroaromatických a aromatických uhl'ovodíkov. Valenčná vibrácia C=C nekonjugovaných nenasýtaných uhl'ovodíkov sa prejavuje pásom v oblasti $1\,660 - 1\,640\text{ cm}^{-1}$. Konjugované nesymetrické systémy dvojitych väzieb (1,3-pentadien) sa prejavujú dvoma pásmi v oblasti $1\,650\text{ cm}^{-1}$ a $1\,600\text{ cm}^{-1}$. Symetrické molekuly (1,3-butadien) vykazujú len jeden pás v oblasti $1\,600\text{ cm}^{-1}$.

Aromatické uhl'ovodíky. Aromatický charakter zlúčeniny možno na IČ spektre poznať podľa pásov valenčnej vibrácie väzby C–H v oblasti $3\,100 - 3\,000\text{ cm}^{-1}$, ktoré boli už spomínané v súvislosti s nenasýtenými uhl'ovodíkmi a ďalej podľa pásov v oblasti $1\,600 - 1\,480\text{ cm}^{-1}$, ktoré sú typické pre valenčné vibrácie benzenového kruhu. Diagnosticky významné sú pásy v oblasti $900 - 675\text{ cm}^{-1}$, ktoré zodpovedajú mimorovinným deformačným vibráciám väzieb C–H. Poloha týchto pásov sa mení najmä podľa spôsobu substitúcie benzenového jadra, čo sa využíva na určenie polohy substituenta. Treba zdôrazniť, že určenie typu substitúcie týmto spôsobom je najvýhodnejšie v prípade, ak substituentmi sú alkyly alebo halogény. Substitúcia elektronegatívnymi skupinami (napr. nitroskupinou) spôsobuje posun maxim týchto pásov k vyšším vlnopočtom až o 30 cm^{-1} .

Alkoholy a fenoly. Na spektrách týchto látok nachádzame charakteristické pásy valenčných a deformačných vibrácií väzieb O–H a valenčných vibrácií väzieb C–O. Pre tieto látky je charakteristická tendencia vytvárať vodíkové väzby, čo výrazne ovplyvňuje polohy maxim týchto pásov. Valenčná vibrácia O–H voľnej hydroxylovej skupiny vykazuje ostrý pás v oblasti $3\,700 - 3\,500\text{ cm}^{-1}$. Jeho výskyt možno očakávať však len pri meraní v plynnom stave alebo pri meraní veľmi zriedených roztokov látky v nepolárnom rozpúšťadle. Zvyšovaním koncentrácie látky sa vytvárajú podmienky na vznik intermolekulárnej vodíkovej väzby, čo sa na spektre prejaví značne širokým pásom v oblasti $3\,500 - 3\,200\text{ cm}^{-1}$. Intenzita tohto pásu narastá na úkor pásu voľnej skupiny –OH so zvyšujúcou sa koncentráciou. Naopak, zriedením dochádza k rozpadu týchto väzieb. Týmto spôsobom možno spektrálne rozlíšiť tento spôsob asociácie od intermolekulových vodíkových väzieb, ktoré nie je možné zmenou koncentrácie ovplyvňovať. Treba pripomenúť, že absorpciu v uvedenej oblasti môže popri alkohole alebo fenole spôsobiť aj voda prítomná vo vzorke napr. ako vlhkosť. Absorpčné pásy, ktoré zodpovedajú ostatným vibráciám väzieb C–O alebo O–H, sú nízkej intenzity, ich poloha sa mení v širokej oblasti vlnopočtov, a preto sú z hľadiska identifikácie málo významné.

Aldehydy a ketóny. Patria spoločne s karboxylovými kyselinami a ich derivátmi do skupiny zlúčenín, ktoré majú vo svojej molekule karbonylovú skupinu. Valenčná vibrácia tejto skupiny sa na spektre prejavuje veľmi intenzívnym, ľahko zistiteľným pásom, ktorého poloha je pomerne stála. Pri alifatických ketónoch sa nachádza v oblasti $1\,725 - 1\,705\text{ cm}^{-1}$. Existuje celý rad faktorov (skupenstvo, vplyv substituenta), ktorý spôsobuje posun tohto pásu k vyšším aj nižším vlnopočtom. Alifatické aldehydy absorbujú v oblasti pri vyšších vlnopočtoch v rozmedzí $1\,740 - 1\,720\text{ cm}^{-1}$. Prítomnosť dvojitych väzieb v blízkosti tejto skupiny spôsobuje posun k nižším vlnopočtom. Aromatické aldehydy vykazujú pás vibrácie väzby C=O v oblasti $1\,715 - 1\,695\text{ cm}^{-1}$.

Karboxylové kyseliny. V kvapalnom a tuhom skupenstve existujú karboxylové kyseliny len vo forme diméru v dôsledku silnej tendencie karboxylovej funkčnej skupiny vytvárať vodíkové väzby. Táto funkčná skupina obsahuje väzby C=O a O–H. Valenčná vibrácia O–H viazaná vodíkovou väzbou spôsobuje veľmi intenzívnu absorpciu v oblasti $3\,300 - 2\,500\text{ cm}^{-1}$. V tejto oblasti sa vyskytuje obvykle široký pás s maximom okolo $3\,000\text{ cm}^{-1}$ a niekoľko pásov menšej intenzity v oblasti $2\,700 - 2\,500\text{ cm}^{-1}$. Pás valenčnej vibrácie väzby C=O dimérov nasýtených alifatických kyselín sa nachádza v oblasti $1\,720 - 1\,700\text{ cm}^{-1}$. Okolie tejto väzby má značný vplyv na polohu pásov. Dvojité väzby v blízkosti karboxylu znižujú vlnopôčet pásov, substitúcia elektronegatívnym substituentom (α -halogénkyseliny) spôsobuje posun k vyšším vlnopočtom. Značné zníženie vlnopočtu spôsobuje vznik intermolekulárnej vodíkovej väzby, napr. pás $\nu(\text{C=O})$ kyseliny salicylovej je pri $1\,665\text{ cm}^{-1}$. Karboxylová funkčná skupina vykazuje ešte valenčné vibrácie C–O a deformačné vibrácie C–O–H. Tieto spriahnuté vibrácie sa na spektre prejavujú pásmi v oblasti $1\,440 - 1\,390\text{ cm}^{-1}$, resp. $1\,320 - 1\,280\text{ cm}^{-1}$. Ďalší charakteristický pás v oblasti 930 cm^{-1} zodpovedá mimorovinovej deformačnej vibrácii väzbového uhlu v skupine –C–O–H. Karboxylová skupina v ionizovanej forme vykazuje dva nové pásy, intenzívny pás asymetrickej valenčnej vibrácie v oblasti $1\,650 - 1\,550\text{ cm}^{-1}$ a menej intenzívny pás symetrickej valenčnej vibrácie v oblasti $1\,420 - 1\,350\text{ cm}^{-1}$, ktoré sú pripisované vibráciám dvoch rovnocenných väzieb C–O v skupine –COO–.

Estery. Estery vykazujú dva charakteristické pásy zodpovedajúce valenčným vibráciám väzieb C=O a C–O. Z obidvoch je diagnosticky významnejší pás valenčnej vibrácie väzby C=O, ktorý sa objavuje pri vyšších vlnopočtoch ako pri normálnych ketónoch. Pri nasýtených alifatických esteroch leží v oblasti $1\,750 - 1\,735\text{ cm}^{-1}$. Pri α -, β -nenasýtených esteroch a arylesteroch je tento pás posunutý do oblasti $1\,730 - 1\,710\text{ cm}^{-1}$, substitúcia esteru v α polohe halogénom spôsobuje naopak posun do vyšších vlnopočtov.

Amidy. Pre amidy sú charakteristické absorpčné pásy vibrácií väzieb C=O a N–H. Pásy sa často označujú rímskymi číslicami. Primárne amidy (s výnimkou acetamidu, ktorý absorbuje pri $1\,694\text{ cm}^{-1}$) vykazujú pás valenčnej vibrácie C=O (amid I) pri $1\,650\text{ cm}^{-1}$ pri meraní v tuhom skupenstve, v roztoku

pri 1690 cm^{-1} . Sekundárne amidy absorbujú okolo 1640 cm^{-1} , pričom poloha pásu opäť závisí od skupenstva. Pri terciárnych amidoch sa ten istý pás nachádza v oblasti $1690 - 1630\text{ cm}^{-1}$ a nie je od skupenstva závislý. Z hľadiska identifikácie amidov sú dôležité aj pásy deformačných vibrácií N-H (amid II). Pri primárnych amidoch je tento pás úzky, menej intenzívny ako pás valenčnej vibrácie C=O a objavuje sa obyčajne ako dvojica pásov v oblasti $1655 - 1620\text{ cm}^{-1}$ pri tuhých vzorkách. Sekundárne amidy v tuhom skupenstve vykazujú tento pás v oblasti $1750 - 1525\text{ cm}^{-1}$. Vlnopočet týchto pásov pri vzorkách v kvapalnom skupenstve je nižší. Pásky sa pripisujú vibráciám N-H a valenčnej C-N v skupine C-N-H. Ďalší, menej intenzívny pás, ktorý zodpovedá interakcii tých istých vibrácií, leží v oblasti 1250 cm^{-1} a označuje sa ako pás amidu III.

Aminokyseliny. Aminokyseliny môžu v neutrálnom prostredí existovať vo forme bez náboja, obyčajne ako $\text{NH}_3^+\text{CH(R)COO}^-$, v kyslom prostredí môžu tvoriť kationy $\text{NH}_3^+\text{CH(R)COOH}$, v alkalickom anióny $\text{NH}_2\text{CH(R)COO}^-$. Pri identifikácii aminokyselín možno na spektrách očakávať absorpčné pásy vibrácie skupín COOH , COO^- , NH_2 , NH_3^+ . Absorpčný pás valenčnej vibrácie skupiny NH_3^+ tvorí v dôsledku silných vodíkových väzieb s karboxylovou skupinou ďalšej molekuly širokú oblasť absorpcie v rozmedzí $3200 - 2400\text{ cm}^{-1}$. NH_3^+ skupina vykazuje ešte aj ďalšie pásy. Diagnosticky je významný napr. kombinálny pás v oblasti $2200 - 2000\text{ cm}^{-1}$ pre asymetrickú vibráciu a v oblasti $1550 - 1480\text{ cm}^{-1}$ pre symetrickú vibráciu. Pásky asymetrickej a symetrickej valenčnej vibrácie skupiny -COO^- sa nachádzajú v oblasti $1630 - 1570\text{ cm}^{-1}$ a v oblasti $1430 - 1380\text{ cm}^{-1}$.

Amíny. IČ spektrá amínov sú charakterizované hlavne vibráciami aminoskupín. Primárne amíny vykazujú v oblasti $3500 - 3150\text{ cm}^{-1}$ dva pásy rozdielnej intenzity, ktoré pripisujeme asymetrickej a symetrickej valenčnej vibrácii väzby N-H. Sekundárne amíny majú v tejto oblasti len jeden pás, terciárne v tejto oblasti absorpciu nevykazujú. Deformačné vibrácie väzieb N-H sa pri primárnych amínoch objavujú v oblasti $1650 - 1560\text{ cm}^{-1}$. Tento pás strednej intenzity sa posúva vplyvom vodíkových väzieb k vyšším vlnopočtom. Ešte slabší je tento absorpčný pás v prípade sekundárnych amínov. Aromatické amíny pás deformačnej vibrácie N-H vykazujú v oblasti 1515 cm^{-1} . Pásky valenčnej vibrácie väzby C-N v oblasti $1360 - 1200\text{ cm}^{-1}$ sú pre identifikáciu amínov málo významné.

Dokumentácia IČ spektier. Na účely praktických cvičení uvádzame niektoré vlnopočty základných vibrácií väzieb, ktoré sa najčastejšie vyskytujú pri organických látkach v tab. 1.

Tab. 1
Charakteristické vibrácie niektorých väzieb

Skupina	Druh vibrácie	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	Intenz.	Poznámka
Nasýtené alifatické uhl'ovodíky				
C-H	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$	2960 ± 10	s	R-CH ₃
	$\nu_s(\text{CH}_3)$	2872 ± 10	s	R-CH ₃
	ν_{as}	2926 ± 10	s	R-CH ₂ -R
	$\nu_s(\text{CH}_2)$	2853 ± 10	s	R-CH ₂ -R
R-CH ₃	$\delta(\text{CH}_3)$	1475 – 1450	str	
	$\delta(\text{CH}_3)$	1383 – 1377	str	
R-CH ₂ -R	$\delta(\text{CH}_2)$	1480 – 1450	str	
	$\delta(\text{CH}_2)$	1250	str	
	$\nu(\text{CH}_2)$	2955 – 2922	s	
-CH ₂ -CO-	$\nu(\text{CH}_2)$	3000 – 2900	str, sl	
CH ₂ -CO-	$\delta(\text{CH}_2)$	1445 – 1405	str, sl	
Nenasýtené alifatické uhl'ovodíky				
=CH-	$\nu(\text{CH})$	3020 ± 30	str	olefiny
≡CH	$\nu(\text{CH})$	3300 ± 30	str, sl	acetylény
R-CH ₂ =CH ₂	$\nu(\text{CC})$	1648 – 1638	str	
H ₂ C=CH-CH=CH ₂	$\nu(\text{C}=\text{C})$	1650	s	konj. systémy
		1600	str	
Aromatické zlúčeniny				
=CH-	$\nu(\text{CH})$	3050 ± 50	str, sl	multiplet
-C=C-	$\nu(\text{CC})$	1630 – 1600		vibr. arom. kruhu
		1590 – 1570		vibr. arom. kruhu
		1520 – 1460		vibr. arom. kruhu
		1460 – 1400		vibr. arom. kruhu
C-H	$\delta(\text{CH})$ v rovine	1177 ± 6		monosubst.
		1156 ± 5		monosubst.
		1073 ± 4		monosubst.
		1027 ± 3		monosubst.
		1269 ± 17		1,2-disubst.
		1160 ± 4		1,2-disubst.
		1125 ± 14		1,2-disubst.
		1033 ± 11		1,2-disubst.
		1278 ± 12		1,3-disubst.
		1157 ± 5		1,3-disubst.
		1096 ± 7		1,3-disubst.
		1076 ± 7		1,3-disubst.
		1258 ± 11		1,4-disubst.
		1175 ± 6		1,4-disubst.
C-H	$\delta(\text{CH})$ mimo rov.	1117 ± 7	s	1,4-disubst.
		1013 ± 5		1,4-disubst.
		751 ± 15		monosubst.

Pokračovanie tab. 1

Skupina	Druh vibrácie	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	Intenz.	Poznámka
C-H	δ (CH) mimo rov.	697 ± 11	s	monosubst.
		751 ± 7	s	1,2-disubst.
		900 – 860	str	1,3-disubst.
		782 ± 10	s	1,3-disubst.
		725 – 680	str	1,3-disubst.
		817 ± 15	s	1,4-disubst
Alkoholy a fenoly				
O-H	ν (OH) vol.	3670 – 3610	s – str	alkohol
O-H	ν (OH) vol.	3617 – 3593	s – str	fenol
O-H	ν (OH) viaz.	3550 – 3450	s – str	dimér
O-H	ν (OH) viaz.	3400 – 3230	s – str, š	polymér
O-H ...	ν (OH) viaz.	3600 – 3450	s – str	vodik. väzba
O-H	ν (OH) viaz.	3200 – 1700	str – š	intramol. väzba
C-O-H	ν (C-O)	1075 – 1000	s	R-CH ₂ -OH
	ν (CO)	1125 – 1030	s	R ₂ CH-OH
	ν (CO)	1170 – 1100	s	R ₃ C-OH
Aldehydy a ketóny				
H-C=O	ν_{as} (CH)	2880 – 2650	str – sl	
CH ₃ -CO-	δ (CH ₃)	1440 – 1405	str	
-CH ₂ -CO-	δ (CH ₂)	1435 – 1405	str	
R-CH=O	ν (CO)	1740 – 1720	s	
Ar-CH=O	ν (CO)	1715 – 1685	s	
R-CO-R	ν (CO)	1725 – 1705	s	
=CH-CO-R	ν (CO)	1700 – 1670	s	
Ar-CO-Ar	ν (CO)	1680 – 1640	s	
Karboxylové kyseliny a ich deriváty				
O-H	ν (OH) vol.	3350 – 3500	str	nickol'ko
O-H	ν (OH) viaz.	3300 – 2500	š	
O-H + C-O	ν (CO) + δ (OH)	1440 – 1395	sl	
		1320 – 1210	s	
O-H	ν (OH)	955 – 810	str – š	dimér estery solí solí amid I. amid II.
C=O	ν (C=O)	1730 – 1680	s	
C=O	ν (C=O)	1780 – 1710	s	
O-C-O	ν_{as} (COO-)	1610 – 1550	s	
O-C-O	ν_s (COO-)	1420 – 1350	str	
C=O	ν (CO)	1690 – 1630	s	
N-H	δ (NH)	1650 – 1515	str	
Amíny a aminokyseliny				
N-H	ν_{as}, ν_s (NH ₂)	3400 – 3320	str	prim. amíny alifat.
		3330 – 3150	str	prim. amíny alifat.
N-H	ν_{as} (NH ₂)	3520 – 3390	str	prim. amíny arom.
N-H		3420 – 3300	str	prim. amíny arom.

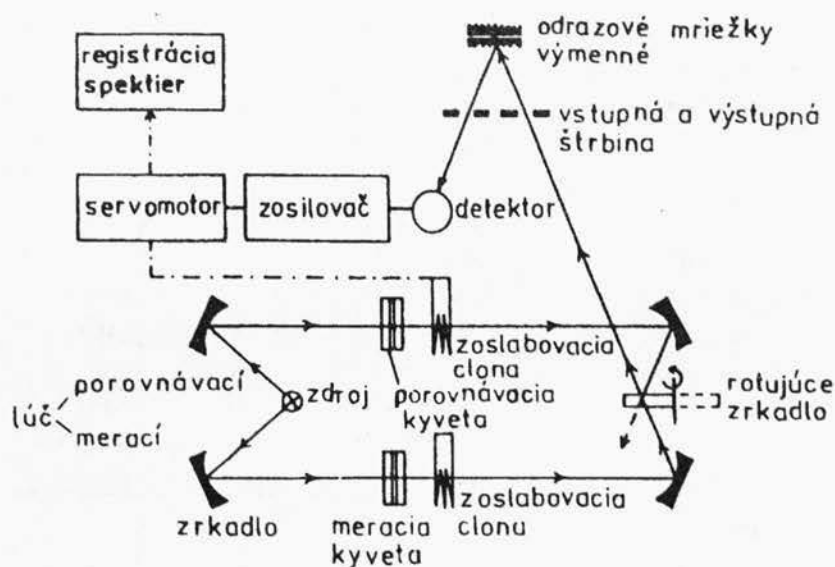
Skupina	Druh vibrácie	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	Intenz.	Poznámka
N-H	ν (NH)	3350 – 3310	str	sek. aminy
N-H	ν_{as}, ν_s (NH ₃ ⁺)	3125 – 3000	s, š	aminokyseliny
N-H	ν_{as}, ν_s (NH ₂ ⁺), ν (NH ⁺)	2700 – 2500	str – š	aminokyseliny
N-H	ν (NH ₂) viaz.	3200 – 3050	str	amidy prim.
N-H	ν (NH) viaz.	3330 – 3070	str – sl	amidy sek.
H-N-H	δ (NH ₂)	1640 – 1560	s – str	aminy prim.
-NH-	δ (NH)	1580 – 1490	sl	aminy sek.
-NH ₃ ⁺ -	δ (NH ₃ ⁺)	1660 – 1575	s	aminokyseliny
		1550 – 1480	s	aminokyseliny
-NH ₂ ⁺ -	δ (NH ₂ ⁺)	1600 – 1575	str	aminokyseliny

Použité skratky: R = alkyl, Ar = aryl, str = stredný, s = silný, sl = slabý, š = široký

Úloha 18. Identifikácia organickej látky na základe interpretácie jej IČ spektra

Úloha pozostáva z kalibrácie prístroja na polystyrénovú fóliu (hodnoty vlnopočtov v cm⁻¹: 3027, 2850, 1944, 1801, 1601, 1583, 1154 1028 a 906), z úpravy vzorky (resp. jej overeného štandardu) do formy KBr tabliet a zmerania jej spektra na IČ spektrofotometri, ktorý pripravíme na meranie podľa návodu na obsluhu. Optická schéma dvojlúčového infračerveného spektrofotometra je na obr. 17.

Návod na prípravu KBr tabliet. Na technických váhach navážime do 25 ml kadičky asi 400 mg KBr čistoty pre IČ spektroskopiu. K tomuto návažku potom na analytických váhach navážime asi 1,5 – 2 mg vzorky (resp. jej štandardu). Zmes zhomogenizujeme a zlisujeme do tablety podľa návodu, ktorý je priložený pri ručnom hydraulickom lise (Perkin-Elmer).



Obr. 17. Optická schéma dvojlúčového registračného infračerveného spektrofotometra

Identifikáciu organickej látky urobíme pomocou interpretácie IČ spektier v zásade dvojakým spôsobom podľa toho, či máme k dispozícii overený štandard študovanej látky [postup a)], alebo štandard k dispozícii nemáme [postup b)]:

a) Na základe porovnania nameraných spektier vzorky a štandardu rozhodneme o totožnosti neznámej vzorky. IČ spektrum vzorky musí byť po kvalitatívnej stránke zhodné so spektrom jej overeného štandardu. Z absorpčného spektra vzorky určíme vlnopočty maxim vybraných absorpčných pásov, zoradíme ich do tabuľky a pomocou tab. 1 priradíme ich k jednotlivým druhom charakteristických vibrácií.

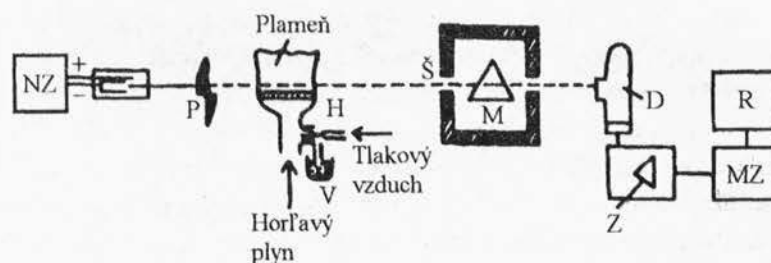
b) Určíme vlnopočty absorpčných pásov vzorky, charakterizovanej sumárnym vzorcom, prípadne ďalšími fyzikálnymi konštantami. Absorpčné pásy podľa ich vlnopočtov priradíme pomocou tab. 1 k jednotlivým druhom charakteristických vibrácií a identifikujeme neznámu látku. Údaje vlnopočtov charakteristických vibrácií usporiadame do tabuľky.

2.4. ATÓMOVÁ ABSORPČNÁ SPEKTROMETRIA

2.4.1. Princíp metódy

Atómová absorpčná spektrometria (AAS) je založená na platnosti Kirchhoffovho zákona, podľa ktorého atómy každého prvku absorbujú žiarenie tej vlnovej dĺžky, ktoré sami v excitovanom stave emitujú. Žiarenie tejto vlnovej dĺžky sa označuje ako rezonančná (analytická) čiara.

Princípom metódy je meranie úbytku žiarenia, ktorý je spôsobený absorpciou voľnými nevzbudenými atómami stanovovaného prvku a je úmerný jeho koncentrácii. Pre absorpciu rezonančnej čiary voľnými atómami platia tie isté kvantitatívne zákonitosti ako pre spektrofotometriu v ultrafialovej alebo viditeľnej oblasti, t. j. Lambertov-Beerov zákon (pozri kapitolu 2.1.1). Základná bloková schéma prístroja pre atómovú absorpčnú spektrometriu je znázornená na obr. 18.



Obr. 18. Bloková schéma atómového absorpčného spektrofotometra
 NZ – napájací zdroj, K – výbojka s dutou katódou, P – prerušovač,
 H – horák, V – vzorka, Š – štrbina, M – monochromátor, D – detektor
 žiarenia, Z – zosilňovač, MZ – meracie zariadenie, R – registračné
 zariadenie

Zdroj žiarenia. Zdroje monochromatického žiarenia musia spĺňať pomerne náročné požiadavky: musia vyžarovať žiarenie dostatočnej intenzity, dokonalej stability, pričom rezonančná čiara má byť čo najužšia, bez ďalších čiar a pozadia (najčastejšie sa šírka čiar pohybuje poriadkovo okolo 0,001 mm). Takýmto požiadavkám vyhovujú zdroje, ktoré vyžarujú atómové spektrá pri nízkom tlaku – výbojky s dutou katódou. Výbojku tvorí evakuovaná banka naplnená vzácnym plynom, do ktorej sú zatavené elektródy. Katóda tvaru valčeka je zhotovená z kovu, na analýzu ktorého sa používa a je umiestnená

oproti výstupnému okienku. Anóda môže mať ľubovoľný tvar (najčastejšie tvar tyčinky). Žiarenie, ktoré vzniká excitáciou atómov kovu, z ktorého je zhotovená katóda, prechádza cez výstupné kremenné okienko do absorpčného prostredia (plameň), kde je absorbovaná atómami stanovovaného prvku.

Absorpčné prostredie. Pri plameňových typoch prístrojov je absorpčným prostredím plameň, do ktorého sa vháňa vzorka vo forme jemného aerosólu. Pri teplote plameňa dochádza k okamžitému vypareniu rozpúšťadla a tepelnej disociácii soli

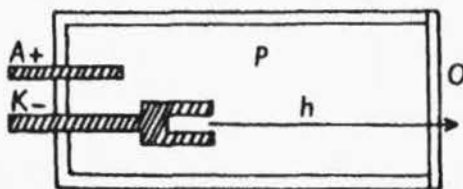


Na analýzu treba voliť takú teplotu, aby dochádzalo k maximálnej disociácii, pričom ale nedochádza k excitácii atómov. Všeobecne platí, že pre prvky s nízkym ionizačným potenciálom sa používajú chladnejšie plamene; pre prvky, ktoré ľahko tvoria ťažko disociovatelné oxidy, sa volia plamene s vyššou teplotou (napr. acetylén/ N_2O 2955 °C). Horáky sú zväčša štrbinové s dĺžkou štrbiny 5 – 12 cm. Na tvorbu aerosólu sa najčastejšie používajú pneumatické rozprašovače s hmlovou komôrkou, do ktorej je roztok vzorky nasávaný cez úzku dýzu prúdom plynu, ktorý súčasne slúži ako okysličovadlo (napr. vzduch). Prúd roztoku naráža v komôrke na rozprašovaciu guľku, kde sa triešti na jemné kvapôčky, ktoré sa zmiešané so spaľovacím plynom vedú do horáka. Väčšie kvapky odtekajú cez hadicu.

Monochromátor. Zo žiarenia, ktoré prešlo absorpčným prostredím, sa izoluje pomocou monochromátora meraná analytická čiara a jej žiarivý tok sa meria detektorom. Ako monochromátor sa používa mriežka alebo hranol, ktorý musí byť umiestnený až za absorpčným prostredím. Tým sa vylúči vplyv žiarenia plameňa, prípadne prítomných iných zložiek vzorky. Monochromátor musí mať vysokú rozlišovaciu schopnosť, aby sa dala izolovať rezonančná čiara od ostatných čiar vyžarovaných výbojkou. Ak rezonančná čiara leží vo viditeľnej oblasti spektra, vkladá sa medzi plameň a monochromátor filter.

Detekcia a meranie žiarenia. V atómovej absorpčnej spektroskopii sa ako detektory používajú výhradne fotonásobiče. Elektrický signál z detektora sa po zosilnení meria vhodným meracím zariadením, ktoré je kalibrované priamo v hodnotách transmitancie (%T) a súčasne absorbancie A .

Aj keď na stanovenie prvkov v atómovej absorpčnej spektroskopii volíme takú teplotu plameňa, aby atómy stanovovaného prvku boli v základnom stave, predsa vždy malá časť atómov je excitovaná, to znamená, že emituje žiarenie tej istej vlnovej dĺžky, ako má meraná rezonančná čiara. Ak by sme teda elektrickým meracím systémom merali intenzitu celkového žiarenia dopadajúceho na detektor, bola by hodnota elektrického prúdu vyššia o túto vlastnú emisiu stanovovaného prvku v plameni. Preto sa v novších prístrojoch používajú modulované meracie systémy. Ich podstata spočíva v tom, že sa moduluje žiarenie svetelného zdroje buď prerušovačom, alebo v moderných prístrojoch sa využíva elektrická modulácia, ktorá sa realizuje tak, že sa výbojka s dutou katódou napája pulzujúcim prúdom (obr. 19). Elektrický merací systém je potom upravený tak, že reaguje len na striedavú zložku signálu z detektora. Jednosmerný signál spôsobený emisiou sa nezosilňuje, ani nemeria.



Obr. 19. Výbojka s dutou katódou A – anóda, K – katóda, P – inertný plyn, h – žiarenie, O – výstupné okienko

Registračné zariadenie. K prístroju môže byť pripojený zapisovač na grafickú registráciu meraných údajov alebo zariadenie s digitálnym údajom absorbancie či priamo koncentrácie, doplnené prípadne tlačiarňou výsledkov.

Vyhodnotenie merania. Atómová absorpčná spektrometria nie je metóda absolútna, preto sa hodnota absorbancie vzorky zrovnáva s hodnotami štandardov. Vyhodnotenie analýzy sa robí najčastejšie metódou kalibračnej krivky alebo metódou štandardného prídavku.

Metóda štandardného prídavku je vhodná na analýzu takých vzoriek, ktoré okrem stanovovaného prvku obsahujú rušivé zložky, ktoré by bolo potrebné určiť a pridať do štandardov pre zostrojenie kalibračnej krivky. Predpokladom na použitie tejto metódy je, že kalibračná krivka je lineárna a prechádza počiatkom súradnicového systému a rušiace prímеси ovplyvňujú stanovovaný prvok v celom koncentračnom rozsahu rovnako. Potom stačí pripraviť jeden roztok vzorky so známym prídavkom stanovovaného prvku a koncentrácia vzorky sa určí výpočtom.

Presnejšie výsledky sa dosiahnu pri použití viacerých prídavkov. Z analyzovanej vzorky sa pripraví niekoľko roztokov so stúpajúcim známym prídavkom prvku a všetky sa doplnia na rovnaký objem. Zmeraná absorbancia sa vynesie do grafu, kde na osi x sú vynesené prídavky prvku. Obsah prvku vo vzorke je určený úsekom, ktorý vytína priamka preložená nameranými hodnotami A na zápornej časti osi x .

Úloha 19. Stanovenie vápnika vedľa Mg, Fe, resp. Zn

Princíp úlohy. Stanovenie Ca za prítomnosti iných kovov, pri použití klasických metód vyžaduje zväčša jeho predbežné oddelenie. Naproti tomu stanovenie metódou AAS je celkom jednoduché a nevyžaduje predbežné delenie.

Náplňou úlohy je:

- zistenie podmienok pre analýzu (pomer oxidovadla a spaľovaného plynu v plameni, oblasť plameňa vhodná pre absorpciu),
- zistenie vplyvu ostatných iónov vo vzorke na stanovenie Ca,
- stanovenie koncentračného rozsahu, v ktorom je krivka závislosti $A = f(c)$ lineárna,
- stanovenie Ca v neznámej vzorke.

Ako porovnávací („slepý“) roztok sa používa pri všetkých uvedených meraniach destilovaná voda.

Pracovný postup. Zriedením štandardného roztoku vápenatej soli s koncentráciou $c(\text{Ca}^{2+}) = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l si pripravíme na meranie 100 ml roztoku s koncentráciou 8 mg/l Ca. Tento roztok použijeme na:

a) **Zistenie najvhodnejšieho množstva acetylénu v plameni:** prietok vzduchu nastavíme na 450 l/hod a prietok acetylénu zvyšujeme po 4 l/hod v intervale prietoku 88 – 112 l/hod. Výsledky absorbancie zaznamenávame vo forme tabuľky. V ďalšej práci používame taký prietok acetylénu, pri ktorom nameriame maximálnu hodnotu A , pričom sa ale nezvyšuje hodnota nameraná pri porovnávacom („slepom“) roztoku a plameň je ešte bez zákalu.

b) **Zistenie optimálnej oblasti plameňa.** Uvedený roztok premeriame pri rôznej výške horáka, ktorú meníme v rozmedzí hodnôt 0 – 20 (diely na prístroji) vždy po 4 dieloch. Z nameraných hodnôt A zostrojíme graf $A = f(\text{diely na prístroji})$, z ktorého zistíme najvhodnejšiu oblasť plameňa, ktorú potom dodržiavame v celej ďalšej práci.

c) **Zistenie vplyvu Mg, Fe a Zn na stanovenie vápnika.** Na tento účel si pripravíme pre každý ión prítomný vo vzorke vedľa Ca^{2+} dva roztoky a to s rovnakým a desaťnásobne menším molárnym množstvom voči Ca^{2+} . Do 100 ml odmerných baniek napipetujeme 20 ml $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l Ca^{2+} , pričom do

prvej pridáme 2 ml a do druhej 20 ml $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l roztoku sprievodného iónu. Banky doplníme po značku vodou a zmeriame A .

d) **Overenie linearity kalibračného (analytického) grafu.** Pripravíme sériu roztokov so stúpajúcou koncentráciou Ca^{2+} tak, že do šiestich 100 ml odmerných baniek odmeriame postupne 2, 5, 10, 15, 20, a 25 ml roztoku s koncentráciou Ca^{2+} $c(\text{Ca}^{2+}) = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l a doplníme po značku vodou. Namerané hodnoty A vyhodnotíme graficky ako závislosť A od ppm Ca^{2+} .

e) **Stanovenie Ca^{2+} vo vzorke.** Ak vzorka obsahuje okrem Ca^{2+} ióny, ktoré neznižujú jeho absorbanciu, analýzu urobíme metódou kalibračnej krivky. Vzorku zmeriame priamo. Ak je nameraná A vyššia ako hodnoty v kalibračnej krivke, musíme vzorku na analýzu vhodne riediť.

Ak je A vzorky príliš nízka, použijeme metódu štandardného prídavku s grafickým vyhodnotením výsledku. Postupujeme nasledovne: do štyroch 50 ml odmerných baniek napipetujeme po 25 ml vzorky, pridáme do nich postupne 2, 5, 10 a 15 ml roztoku s $c(\text{Ca}^{2+}) = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l a doplníme po značku vodou. Namerané hodnoty A vynesíme do grafu, kde na os x nanášame prídavky Ca^{2+} . Obsah Ca^{2+} vo vzorke určíme graficky.

Výsledky analýzy udávame v mg Ca^{2+} v 1000 ml vzorky. Do protokolu uvedieme výsledky meraní spracované v tabuľkách, ako aj príslušné grafy.

3. ELEKTROCHEMICKÉ METÓDY

3.1. POTENCIOMETRIA

3.1.1. Základné pojmy a aplikácia

PRINCIP:
Potenciometria využíva meranie rovnovážneho potenciálu elektród na stanovenie koncentrácie analyzovaného iónu v roztoku. Môže sa určovať priamo aktivita, resp. koncentrácia iónu, alebo sa využíva potenciometrická indikácia bodu ekvivalencie pri titráciách.

Elektródu predstavuje napr. dvojfázový systém kov/roztok iónov kovu, v ktorom môžu ióny alebo elektróny čiastočne prechádzať z jednej fázy do druhej. V rovnovážnom stave vzniká na fázovom rozhraní elektrická dvojvrstva, ktorá je podstatou potenciálového rozdielu, označovaného ako rovnovážny elektródový potenciál.

Pre kovovú elektródu s reverzibilným potenciálom, ponorenú do roztoku, ktorý obsahuje ióny kovu, platí základný Nernstov vzťah

$$E_M = E_M^0 + \frac{RT}{zF} \ln a_M z^+$$

v ktorom: E_M = potenciál kovovej elektródy; E_M^0 = štandardný potenciál elektródy (potenciál pri jednotkovej aktivite iónov M^{z+} v roztoku); R = plynová konštanta; F = Faradayova konštanta; z = nábojové číslo iónu (počet vymieňaných elektrónov pri reakcii $M^{z+} + ze^- = M$); $a_M z^+$ = aktivita iónu M^{z+} v roztoku.

Po vyčíslení konštánt R , F , teploty a vyjadrení v dekadickom logaritme má rovnica pre teplotu 25 °C tvar (E merané vo voltoch)

$$E_M = E_M^0 + \frac{0,0591}{z} \ln a_M z^+$$

z ktorého vyplýva, že potenciál kovovej elektródy je logaritmickou funkciou aktivity jej iónov v roztoku. Pri desaťnásobnej zmene aktivity iónu s nábojovým číslom $z = 1$ zmení sa potenciál elektródy o 59,2 mV. Pre zriedené roztoky nameraná aktivita iónu sa môže stotožniť s jeho koncentráciou.

Elektrochemický článok, elektródy, prístroje. Absolútna hodnota potenciálu elektródy je nemerateľná, meria sa relatívna hodnota z rozdielu potenciálov dvoch elektród ako napätie elektrochemického článku, zloženého z referenčnej (porovnávacej) elektródy s konštantným potenciálom a z druhej elektródy, ktorej potenciál sa meria. Táto elektróda sa nazýva merná (alebo indikačná) a volí sa podľa povahy meranej sústavy taká, aby jej potenciál bol funkciou aktivity meraného iónu v roztoku.

Porovnávacím základom je štandardná vodíková elektróda, ktorej štandardný potenciál pri všetkých teplotách sa zvolil ako nulový.

V praxi ako porovnávacie elektródy sa používajú elektródy druhého druhu.

Kalomelová elektróda (obr. 20a) je najbežnejšia porovnávacia elektróda. Tvoria ju ortuť, pokrytá vrstvou kalomelu, v roztoku KCl. V tomto poločlánku $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}$ je aktivita iónu Hg_2^{2+} na základe súčinu rozpustnosti Hg_2Cl_2 konštantná a potenciál elektródy závisí len od koncentrácie Cl^- iónov v elektrolyte, ktorým je elektróda plnená. Podľa koncentrácie roztoku KCl je niekoľko typov kalomelových elektród. Najčastejšie sa používa nasýtená kalomelová elektróda, v ktorej koncentrácia nasýteného roztoku KCl sa ľahko udržuje pridaním niekoľkých kryštálov KCl.

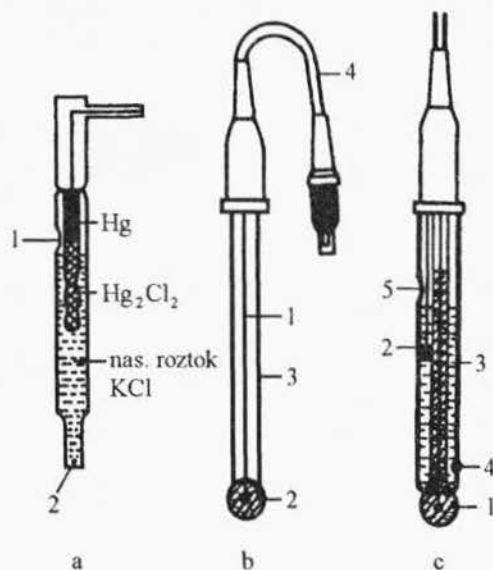
Chloridostrieborná elektróda je zo strieborného drôtku, na ktorom je elektrolyticky nanosená tenká vrstva AgCl a jej potenciál závisí od koncentrácie Cl^- iónov v roztoku.

Ako merné elektródy sa z kovových elektród najviac používajú:

Strieborná elektróda, jej potenciál je funkciou aktivity Ag^+ iónov.

Platinová elektróda. Tvoria ju lesklý platinový pliešok alebo drôtik. Používa sa najmä ako elektróda z inertného kovu na meranie redukčného potenciálu E_{OxRed} redoxových sústav. E_{OxRed} je daný Petersovým vzťahom.

Antimónová elektróda patrí k oxidovým elektródam. Jej potenciál je funkciou aktivity H_3O^+ iónov v roztoku.



Obr. 20. a) Kalomelová elektróda: 1 – otvor pre naplnenie nasýteným roztokom KCl, 2 – azbestové vlákno, ktoré tvorí vodivý spoj; b) Sklená elektróda: 1 – vnútorná elektróda, 2 – merná časť elektródy naplnená vnútorným tlmivým roztokom, 3 – obal s tieniacou kovovou fóliou, 4 – koaxiálny káblik; c) Kombinovaná elektróda: 1 – sklená elektróda tvoriaca vnútorný plášť, 2 – referenčná elektróda Ag/AgCl, 3 – vonkajší plášť naplnený roztokom KCl, 4 – vodivý spoj referenčnej elektródy, 5 – otvor pre plnenie roztokom KCl

Membránový potenciál. Okrem kovových elektród I. a II. druhu, u ktorých podstatou potenciálu je elektrochemická, v širšom zmysle oxidačno-redukčná rovnováha na fázovom rozhraní, ďalšiu významnú skupinu elektród tvoria **elektrody membránového typu**. Ich rovnovážny potenciál je určený membránovým potenciálom, ktorý vzniká na rozhraní medzi dvoma roztokmi elektrolytov oddelenými

membránou, ktorá je nerovnako priepustná pre rôzne ióny (elektrochemická membrána). Podstatou membránového potenciálu je iónovovýmenná rovnováha na fázovom rozhraní.

Pri membránových elektródach všeobecne oddeľuje membrána z vhodného materiálu meraný roztok (1) od roztoku porovnávacieho (2). Meriame napätie článku

$$\begin{array}{ccccccc} \text{ref. el. 1} & | & \text{roztok 1} & | & \text{membrána} & | & \text{roztok 2} & | & \text{ref. el. 2} \\ E_1 & & \varphi_1 & & \varphi_2 & & E_2 \end{array}$$

$$E_m = \varphi_1 - \varphi_2$$

Vlastná membránová elektróda sa skladá z vnútornej referenčnej elektródy (2), vnútorného roztoku (2) a z membrány, ktorá sa ponorí do meraného roztoku (1) s vonkajšou referenčnou elektródou (1). Potenciály referenčných elektród E_1 , E_2 sú konštantné a pre membránový potenciál E_m , ktorý je rozdielom potenciálov na fázovom rozhraní oboch strán membrány, platí obdobný vzťah ako pre koncentračný článok

$$E_m = \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_J(1)}{a_J(2)}$$

v ktorom a_J je aktivita iónu J v roztoku 1 a 2.

Pretože zloženie roztoku na vnútornej strane membrány sa nemení ($a_J(2) = \text{konšt.}$), je E_m Nernstovou funkciou aktivity meraného iónu J v roztoku.

Potenciál membránovej elektródy môže byť ovplyvnený prítomnosťou ďalšieho (interferujúceho) iónu v roztoku. Tento vplyv vyjadruje Nikolského vzťah v tvare

$$E_m = 2,3 \frac{RT}{zF} \log \left[a_J + k_{J,I}^{\text{pot}} \cdot (a_I)^{z_J/z_I} \right]$$

v ktorom $k_{J,I}^{\text{pot}}$ je koeficient selektivity elektródy pre interferujúci ión I vzhľadom na stanovovaný ión J . Z uvedeného vyplýva, že elektróda bude dostatočne selektívna pre ión J , ak $k_{J,I}^{\text{pot}} \cdot a_I \ll a_J$.

Medzi membránové elektródy sa zaraďuje sklená elektróda a iónovoselektívne elektródy (ISE).

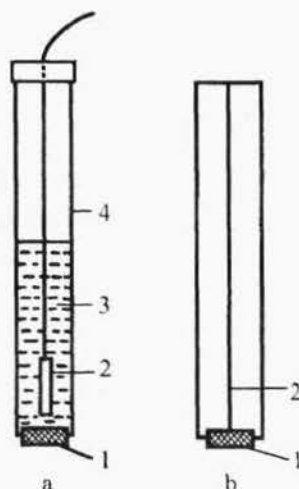
Sklená elektróda je najdôležitejšou a najselektívnejšou elektródou pre H_3O^+ ióny. Zloženie sklenej elektródy je na obr. 20b, kombinované elektródy (obr. 20c) majú sklenú aj referenčnú elektródu v jednom telese. Podmienkou pre správnu funkciu elektródy je vytvorenie hydratovanej vrstvy gélu kyseliny kremičitej, v ktorej prebieha iónovovýmenná reakcia medzi iónmi Na^+ , K^+ v skle a H_3O^+ iónmi v roztoku. Preto treba elektródu pred meraním máčať niekoľko dní v H_2O a po meraní ju uchovávať vo vode alebo tlmivom roztoku podľa odporúčania výrobcu. Kalibráciu elektródy na štandardné tlmivé roztoky treba po určitom čase overovať.

Iónovoselektívne elektródy pre rôzne kationy, anióny aj organické látky znamenajú značné rozšírenie možnosti analytického využitia potenciometrických meraní.

Podľa skupenstva látok, ktoré tvoria membránu a sprostredkujú výmenu iónov, delia sa na dve skupiny:

a) Elektródy s tuhou membránou, niektoré typy majú odvodnú kovovú elektródu spojenú priamo s membránou (obr. 21). V tuhých membránach sú elektroaktívnou látkou málo rozpustné soli ako napr. AgCl , AgI , Ag_2S , PbS , LaF_3 a tieto sú selektívne pre jeden alebo oba ióny, ktoré membránu tvoria. Membránu tvorí monokryštál soli alebo lisovaná látka, resp. zabudovaná do plastov. Vyrábajú sa elektródy na stanovenie Cl^- , Br^- , I^- , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ag^+ , F^- , CN^- , S^{2-} .

b) Elektrody s kvapalnou membránou, ktorú tvorí vrstva vo vode nerozpustného rozpúšťadla s rozpustným iónomeničom iónového alebo elektroneutrálneho typu. Iónomenič selektívne reaguje s rôznymi iónmi. Rozhranie medzi meraným roztokom a iónomeničom sa realizuje pórovitým skeletom, ktorý je napustený rozpúšťadlom s iónomeničom. Novšie typy majú membránu z PVC, ktorý je roztokom iónomeniča mäkkčený. Elektrody tohto typu sú napr. na stanovenie Ca^{2+} , K^+ , NO_3^- , ClO_4^- .



Obr. 21. Konštrukčné typy iónovoselektívnych elektród s tuhú membránou 1 – membrána, 2 – odvodná elektróda, 3 – vnútorný roztok elektrolytu, 4 – elektródový plášť

Prístroje. Svorkové napätie elektrochemického článku, ktoré sa meria, predstavuje za bezprúdového stavu elektromotorické napätie článku, t. j. rozdiel potenciálov kladnej a zápornej elektródy. Preto meranie napätia musí prebiehať za takých podmienok, aby sústavou neprechádzal takmer žiadny prúd, ktorý by mohol spôsobiť polarizáciu elektród. Túto podmienku veľmi dobre spĺňajú v rôznych typoch vyrábané elektronické milivoltmetre. Majú vysoký vstupný odpor, preto možno nimi merať aj články s vysokým vnútorným odporom, ako sú napr. články so sklenou elektródou, iónovoselektívnymi elektródami alebo merania v bezvodých prostrediach. Musí byť však dokonale tienený prívod k elektróde. Tieto prístroje sa nazývajú pH metre, sú ciachované v jednotkách mV a pH. Predtým sa konštruovali ako výchylkové, teraz sa vyrábajú digitálne, ktoré sa vyznačujú veľkou presnosťou nameranej hodnoty. Prevodom hodnoty na digitálny signál môže byť tento zakódovaný pre ďalšie, napr. matematické spracovanie počítačom.

Pretože merané hodnoty pH podľa Nernstovho vzťahu závisia aj od teploty, sú pH metre vybavené potenciometrom na nastavenie teploty meraných roztokov alebo automatickou teplotnou kompenzáciou pomocou odporového teplomeru.

Návod na obsluhu prístrojov, ktoré sa budú používať pri potenciometrických meraniach, je priložený pri jednotlivých prístrojoch.

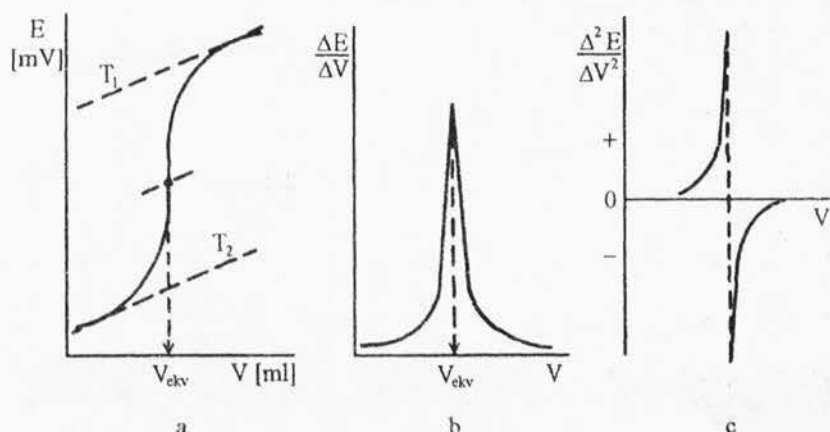
3.1.2. Titrácie s potenciometrickou indikáciou

Pri potenciometrických titráciach sa bod ekvivalencie určuje na základe potenciálu vhodnej indikačnej elektródy, ktorej potenciál závisí od aktivity meraného iónu alebo iónu v odmernom roztoku. Výhodou potenciometrickej indikácie je väčšia presnosť a širšia použiteľnosť najmä v prípadoch, keď vizuálna

indikácia nie je možná. Vhodné elektródy sú prakticky pre všetky odmerné metódy. Pre acidobázické titrácie je to najmä sklená elektróda, pre oxidačno-redukčné titrácie je univerzálna platínová elektróda, pre zrážacie titrácie má význam najmä strieborná elektróda pre argentometrické stanovenia a iónovo-selektívne elektródy, ktoré sa uplatňujú aj pri komplexotvorných reakciách.

Zmena potenciálu indikačnej elektródy na objemovú jednotku odmerného roztoku je v priebehu titrácie čoraz väčšia a dosiahne maximálnu hodnotu v bode ekvivalencie. Graficky znázornená závislosť hodnôt nameraného napätia od objemu pridaného odmerného roztoku predstavuje potenciometrickú titračnú krivku (obr. 22a), ktorá sa skladá z dvoch častí, predstavujúcich logaritmickú funkciu závislosti potenciálu od koncentrácie pred a po bode ekvivalencie. Inflexný bod pri symetrických krivkách sa stotožňuje s bodom ekvivalencie. Symetria potenciometrickej krivky a jej strmosť, ktorá je daná hodnotou smernice $\Delta E/\Delta V$ v bode ekvivalencie, závisí od vlastností reagujúcich látok, od ich koncentrácie a od rovnovážnej konštanty príslušnej chemickej reakcie.

Čím je potenciálový skok väčší, tým presnejšie sa môže vyhodnotiť bod ekvivalencie.



Obr. 22. Grafické znázornenie spôsobov vyhodnotenia bodu ekvivalencie pri potenciometrickej titracii

Postup pri potenciometrickej titracii. Potenciometrické titrácie, ktoré nevyžadujú inertnú atmosféru, môžeme vykonať v kadičke primeranej veľkosti (naplnená roztokom má byť najviac do 1/2 objemu). Na dno kadičky dáme miešacie teliesko a príslušné množstvo vzorky. Kadičku dáme na stred miešačky, do roztoku ponoríme vodou opláchnuté elektródy, ktoré umiestnime tak, aby merné konce elektród boli pod hladinou, ale ďalej od dna, aby nemohli byť poškodené pohybom miešadla.

Pripravíme byretu s odmerným roztokom a umiestnime ju tak, aby sme mali dobrý prístup ku kohútiku byrety. Je výhodné predĺžiť koniec byrety tenkou kapilárou, ktorá zasahuje pod hladinu titrovaného roztoku a umožňuje pridávať roztok po zvolených objemoch.

Po pripojení elektród zapneme miešanie (nenastavujeme na veľkú rýchlosť, aby roztok nevystrekoval), prístroj nastavíme podľa príslušného návodu a urobíme titráciu tým spôsobom, že odmerný roztok pridávame po určitých objemoch, napr. po 1 – 2 ml. Po každom pridaní počkáme niekoľko sekúnd, až sa roztok dôkladne premieša a hodnota E ustáli. Do tabuľky zaznamenávame stav objemu na byrete (ml) a namerané hodnoty E [mV]. Vypočítame aj hodnotu $\Delta E/\Delta \text{ml}$, čo je rozdiel dvoch susedných hodnôt mV delený rozdielom im zodpovedajúcich pridaných objemov. Pred dosiahnutím bodu ekvivalencie, keď sa hodnoty $\Delta \text{mV}/\Delta \text{ml}$ zväčšujú, začneme roztok pridávať po menších objemoch, najlepšie rovnakých. Najväčšia hodnota ΔmV , resp. $\Delta \text{mV}/\Delta \text{ml}$ indikuje bod ekvivalencie. Titráciu môžeme skončiť, ak zaznamenáme niekoľko hodnôt aj za bodom ekvivalencie.

Keď titrujeme roztok úplne neznámej koncentrácie, prvú titráciu môžeme urobiť len orientačnú, t. j. odmerný roztok pridávame po väčších objemoch (1 – 2 ml) a zistíme len približné rozmedzie ml, v ktorom sa nachádza bod ekvivalencie. Potom titráciu urobíme ešte raz, ale v okolí bodu ekvivalencie (asi 1 ml pred bodom ekvivalencie) pridávame odmerný roztok už po menších objemoch (pre uvedené práce po 0,2 alebo 0,1 ml), aby sme čo najpresnejšie zistili bod ekvivalencie. Po titracii nezabudneme opláchnuť elektródy destilovanou vodou. Stanovenie vykonáme najmenej dvakrát a zo získaných výsledkov berieme priemernú hodnotu.

Vyhodnotenie potenciometrickej titrácie. Z tabuľky nameraných hodnôt E a im zodpovedajúcich objemov odmerného roztoku môžeme bod ekvivalencie vyhodnotiť výpočtom alebo z grafu.

Výpočtom najjednoduchšie určíme bod ekvivalencie z maximálnej hodnoty prvých diferencií ako strednú hodnotu z dvoch za sebou pridaných objemov, medzi ktorými je maximálna hodnota $\Delta E/\Delta V$ (tab. 2).

Tab. 2

V [ml]	E [mV]	$\Delta E/\Delta V$	$\Delta^2 E$	
6	160	13		Výsledok titrácie: $\frac{8,9 + 9,0}{2} = 8,95 \text{ ml}$
8	186	24		
8,5	198	70		
8,6	205	110		
8,7	216	140		
8,8	230	280		Výsledok titrácie podľa interpoláčného vzorca: $V_{ekv} = 8,9 + 0,1 \cdot \frac{80}{210} = 8,94 \text{ ml}$
8,9	258	360	80 = a	
9,0	294	230	-130 = b	
9,1	317	100		
9,2	327			

Presnejšie vyhodnotenie bodu ekvivalencie v prípade pridávania odmerného roztoku po väčších objemoch môžeme urobiť výpočtom druhých diferencií $\Delta^2 E$. Tento spôsob vychádza z toho, že v inflexnom bode má druhá derivácia funkcie $E = f(V)$ nulovú hodnotu (obr. 22c). Nulová hodnota, ktorá zodpovedá bodu ekvivalencie, sa nachádza medzi poslednou kladnou hodnotou $\Delta^2 E$ a prvou zápornou hodnotou $\Delta^2 E$.

$$\begin{array}{ccccc}
 \Delta^2 E(+) & & 0 & & \Delta^2 E(-) \\
 | & & | & & | \\
 V_1(\text{ml}) & & V_{ekv} & & V_2(\text{ml})
 \end{array}$$

Bod ekvivalencie vypočítame podľa interpoláčného vzorca

$$V_{ekv} = V_1 + k \frac{a}{a - b}$$

V_1 je objem pridaného odmerného roztoku pred najväčšou hodnotou ΔE ,

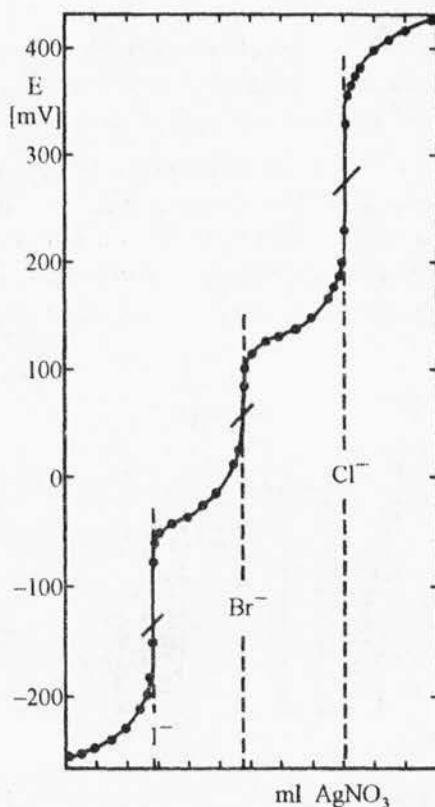
k je $V_1 - V_2 = \text{konštantný rozdiel objemov medzi dvoma prídavkami odmerného roztoku}$,

a je posledná kladná hodnota $\Delta^2 E$, prislúchajúca objemu V_1 ,

b je prvá záporná hodnota $\Delta^2 E$, prislúchajúca objemu V_2 .

Príklad vyhodnotenia sa uvádza v tab. 2.

Okrem uvedených postupov vyhodnotenia potenciometrických titrácií za použitia jednoduchých prístrojov sa stále viac používajú automatické titračné aparatury, kde bod ekvivalencie je indikovaný priamo údajom meracieho prístroja, alebo priebeh titrácie a bod ekvivalencie je riadený priamo počítačom.



Obr. 23. Potenciometrická titrácia I^- , Br^- , Cl^- vedľa seba

Úloha 20. Stanovenie halogenidov vedľa seba

Možnosť potenciometrického stanovenia I^- , Br^- , Cl^- vedľa seba sa zakladá na rozdielnej rozpustnosti ich strieborných solí. Pri titrácii roztokom AgNO_3 sa najprv zráža najmenej rozpustný AgI ($K_s = 10^{-16}$), potom AgBr ($K_s = 10^{-13}$) a nakoniec AgCl ($K_s = 10^{-10}$), takže pri potenciometrickej titrácii dostávame tri potenciálové skoky (obr. 23). Objem odmerného roztoku po prvý potenciálový skok zodpovedá množstvu I^- , rozdiel objemov medzi druhým a prvým skokom zodpovedá množstvu Br^- a ďalší rozdiel množstvu Cl^- . Rozdiel v rozpustnosti umožňuje za určitých podmienok dosiahnuť dostatočne presné výsledky aj v prípade všetkých troch halogenidov. Stanovenie I^- vedľa Cl^- nerobí ťažkosti. Titrácie sa robia za prídania dusičnanu barnatého, ktorý ako silný elektrolyt zabraňuje tvorbe koloidných roztokov halogenidov strieborných, ktoré by spôsobovali neostrosť potenciálových skokov.

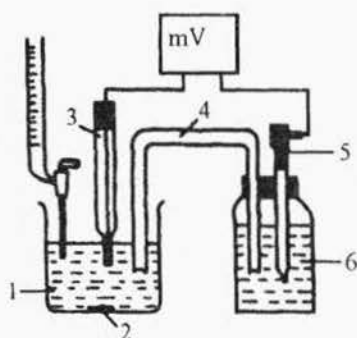
Strieborná elektróda je indikačná, porovnávacou elektródou je nasýtená kalomelová elektróda, ktorú nekladáme priamo do roztoku, ale cez soľný mostík (obr. 24) naplnený 10 % roztokom KNO_3 , aby sa KCl z kalomelovej elektródy nedostal do titrovaného roztoku. Zapojenie: strieborná – pól, kalomelová + pól.

Chemikálie a roztoky. Roztok dusičnanu strieborného $c(\text{AgNO}_3) = 0,03 \text{ mol/l}$; roztok dusičnanu barnatého $w(\text{Ba}(\text{NO}_3)_2) = 1 \%$ (POZOR PRUDKÝ JED!); roztok dusičnanu draselného $w(\text{KNO}_3) = 10 \%$; roztok KCl na štandardizáciu odmerného roztoku AgNO_3 .

Pracovný postup. Zo vzorky, ktorá obsahuje I^- a Cl^- , odpipetujeme na titráciu 10 ml do 150 ml kadičky, odmerným valcom pridáme 10 ml roztoku $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ a zriedime s destilovanou vodou približne na objem 70 ml. Titrujeme roztokom AgNO_3 podľa bežného pracovného postupu pri potenciometrickej titrácii. V okolí bodov ekvivalencie titrujeme po 0,1 ml, dbáme na ustálenie meraných hodnôt a dostatočné miešanie roztoku.

Pracovný postup pri štandardizácii odmerného roztoku AgNO_3 . Z roztoku KCl s presnou koncentráciou odpipetujeme 25 ml do 150 ml kadičky, pridáme 5 ml roztoku $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, zriedime s H_2O na objem asi 70 ml a titrujeme roztokom AgNO_3 obdobným spôsobom.

Soľný mostík tvorí sklená ohnutá rúrka, naplnená horúcim rozvareným agarom v roztoku KNO_3 . Zmes po vychladnutí stuhne, ale zostáva elektricky vodivá. Konce mostíka uchováваме ponorené do roztoku KNO_3 . Pri titrácii spojíme mostíkom meraný roztok s kalomelovou elektródou (obr. 24). Aby nedošlo k prípadnému znečisteniu vzorky, je vhodné pri ďalších titráciách vkladať do roztoku to isté rameno mostíka (označené). Po skončení práce mostík vytiahneme, opláchneme vodou a uložíme späť do roztoku KNO_3 .

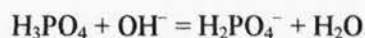


Obr. 24. Elektrochemický článok so soľným mostíkom 1 – titrovaný roztok, 2 – miešacie teliesko, 3 – indikačná elektróda, 4 – soľný mostík, 5 – kalomelová elektróda, 6 – roztok KNO_3

Vyhodnotenie stanovenia. V protokole uvedieme tabuľku nameraných hodnôt ml, mV, pripojíme graf závislosti mV od objemu odmerného roztoku (pozn.: najvhodnejšie meritko 1 cm = 1 ml). Body ekvivalencie určíme z tabuľky nameraných hodnôt ako maximálne hodnoty $\Delta mV/\Delta ml$ resp. aj podľa interpolačného vzorca a porovnáme s grafickým vyhodnotením. Vypočítame hmotnosť I^- a Cl^- (v mg) v 100 ml vzorky.

Úloha 21. Stanovenie kyseliny trihydrogénfosforečnej

Pri viacsýtnych kyselinách alebo zásadách sa ionizácia do jednotlivých stupňov prejaví postupnými potenciálovými skokmi v prípade, ak sú jednotlivé disociačné konštanty navzájom dostatočne rozdielne. Pri H_3PO_4 dostávame dva potenciálové skoky, ktoré zodpovedajú postupným reakciám



Potenciálny skok pri neutralizácii do tretieho stupňa sa neprejaví, pretože tretia disociačná konštanta H_3PO_4 má veľmi malú hodnotu.

Ako indikačnú elektródu použijeme antimónovú alebo sklenú, ako porovnávaciu kalomelovú (zapojenie: antimónová – pól, kalomelová + pól).

Chemikálie a roztoky. Roztok hydroxidu sodného (bez uhličitanov) $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$; tlmivý roztok (I); tlmivý roztok (II).

Pracovný postup. Vzorka H_3PO_4 má približnú koncentráciu $c(\text{H}_3\text{PO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$. Odpipetujeme z nej 10 ml do 100 ml kadičky, zriedime s vodou na objem asi 40 ml a titráciu odmerným roztokom NaOH vykonáme podľa bežného postupu pri potenciometrickej titrácii, pričom zaznamenávame oba potenciálové skoky. V okolí bodov ekvivalencie titrujeme po 0,2 ml.

Ak meriame so sklenou elektródou, môžeme použiť pH stupnicu prístroja a pred prvým meraním nastavíme sklenú elektródu na tlmivé roztoky, ako je uvedené pri kalibrácii prístroja.

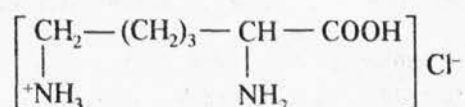
Vyhodnotenie stanovenia. Bod ekvivalencie vyhodnotíme podľa interpolačného vzorca (vhodnejšie z prvého inflexného bodu) a výsledok vyjadríme koncentráciou H_3PO_4 (mol/l) vo vzorke.

Úloha 22. Stanovenie aminokyselín v bezvodom prostredí

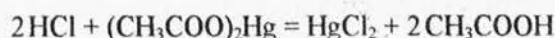
Potenciometrickú indikáciu možno použiť prakticky vo všetkých rozpúšťadlách. Elektródy sa používajú rovnaké ako vo vodnom prostredí, pre protolytické titrácie najmä sklená. Porovnávacou elektródou môže byť kalomelová, v niektorých prostrediach však dochádza k vyzrážaniu KCl v kvapalinovom spoji. V takých prípadoch sa nahrádza vodný roztok KCl iným rozpúšťadlom alebo sa použije iná elektróda, napr. z grafitu.

Aminokyseliny sú v prostredí bezvodej kyseliny octovej dostatočne silnými zásadami, ktoré sa môžu titrovať roztokom HClO_4 .

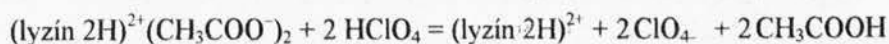
Ako príklad stanovenia aminokyselín sa uvádza postup pre stanovenie chloridu L-lyzínia



Ióny Cl^- rušia titráciu s HClO_4 v bezvodej kyseline octovej uvoľnením HCl, preto sa viažu s octanom ortuťnatým na nedisociovaný HgCl_2



V bezvodej CH_3COOH vzniká dioctan lýzínia, ktorý reaguje ako zásada



Potenciometrickou titráciou možno sledovať aj vhodnosť farebného prechodu vizuálnych indikátorov.

Chemikálie a roztoky. Roztok kyseliny chloristej v bezvodéj CH_3COOH $c(\text{HClO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$; roztok octanu ortuťnatého v bezvodéj CH_3COOH $c((\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}) = 0,1 \text{ mol/l}$, roztok kryštálovej violete $w = 0,2 \%$ v bezvodéj CH_3COOH ; bezvodá kyselina octová; kyselina mravčia $w(\text{HCOOH}) = 99 \%$; hydrogénftalan draselný p. a. $M_r(\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_4\text{K}) = 204,23$.

Rozpúšťadlá na acidobázické titrácie majú byť bezvodé a zbavené nečistôt, aby pri slepom pokuse bola spotreba odmerného roztoku zanedbateľná. Protogénne rozpúšťadlá sa skúšajú na obsah zásaditých látok a prípadne sa použijú vopred zneutralizované.

Bezvodá kyselina octová má značnú objemovú rozťažnosť, preto štandardizácia a stanovenie sa majú robiť pri rovnakej teplote.

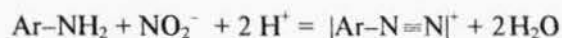
Pracovný postup. Zo vzorky chloridu L-lyzínia ($M_r = 182,65$) navážime diferenčne hmotnosť zodpovedajúcu približne 7 ml spotreby roztoku HClO_4 . K návažku v 50 ml suchej kadičke pridáme 1 ml HCOOH . Po rozpustení pridáme približne 3 ml roztoku octanu ortuťnatého (nepipetovať, jed!) a zriedime asi s 20 ml bezvodéj kyseliny octovej. Pripravíme elektródy – sklenú a kalomelovú, po opláchnutí s vodou ich otrieme filtračným papierom a sklenú elektródu opláchneme ešte bezvodou kyselinou octovou. Elektródy ponoríme do meraného roztoku, do ktorého sme pridali aj jednu kvapku indikátora – kryštálovej violete, pre pozorovanie a vyhodnotenie farebného prechodu v bode ekvivalencie. Potenciometrickú titráciu odmerným roztokom HClO_4 vykonáme podľa bežného postupu. Meriame na mV-stupnici a v okolí bodu ekvivalencie pridávame odmerný roztok po 0,1 ml. Zaznamenávame aj zmeny farebného odtieňa indikátora. Po skončení titrácie elektródy opláchneme kyselinou octovou a potom s vodou. Sklenú elektródu necháme ponorenú vo vode.

Pracovný postup pri štandardizácii odmerného roztoku. Presnú koncentráciu HClO_4 stanovíme na návažok hydrogénftalanu draselného. Do 50 ml suchej kadičky navážime diferenčne také množstvo hydrogénftalanu draselného, aby spotreba HClO_4 bola asi 10 ml. Po pridani 20 ml bezvodéj kyseliny octovej necháme návažok rozpustiť a titrujeme odmerným roztokom HClO_4 obdobne ako pri titrácii vzorky.

Vyhodnotenie stanovenia. Titráciu graficky znázorníme funkciou $E = f(\text{ml})$, určíme bod ekvivalencie a porovnáme s ním farebný prechod indikátora. Vypočítame obsah chloridu L-lyzínia vo vzorke ako hmotnostný zlomok v percentách.

Úloha 23. Stanovenie primárnych aromatických amínov diazotačnou reakciou

Odmerným roztokom dusitanu sodného sa môžu stanoviť látky s primárnou aminoskupinou viazanou na aromatickom jadre (napr. sulfónamidy), na základe ľahko prebiehajúcej diazotačnej reakcie



Okrem bežnej potenciometrickej titrácie s platínovou elektródou ako indikačnou a kalomelovou elektródou, môžu sa tieto stanovenia robiť ako biampérometrické (ako zvláštny prípad – bez vkladného napätia) s dvojicou elektród – platínovou (+ pól) a grafitovou (– pól), ktoré zapojíme priamo na citlivý mikroampérmetr (rozsah 20 – 50 μA). Ako grafitová elektróda sa osvedčila mäkká, vyžihaná ceruzková tuha. V bode ekvivalencie nadbytok NaNO_2 spôsobuje zmenu redoxového potenciálu sústavy, vzniká potenciálový rozdiel medzi elektródami, ktorý sa prejaví výchylkou na mikroampérmetri.

Chemikálie a roztoky. Štandard sulfanilamidu; roztok dusitanu sodného $c(\text{NaNO}_2) = 0,1 \text{ mol/l}$; koncentrovaná kyselina chlorovodíková $w(\text{HCl}) = 36 \%$.

Pracovný postup. Zo vzorky sulfónamidu navážime diferenčne do suchej 50 ml kadičky hmotnosť, ktorá zodpovedá spotrebe asi 10 ml roztoku NaNO_2 . K návažku pridáme 15 ml konc. HCl , za miešania

necháme rozpustiť a zriedime s 15 ml vody (ak treba roztok upraviť na väčší objem, dodržíme vždy pomer HCl a H₂O). Po rozpustení ponoríme elektródy do roztoku, zapojíme a pomaly po kvapkách titrujeme odmerným roztokom NaNO₂. Mikroampérmeter sa spočiatku nevychýľuje alebo sa stále vracia do nulovej polohy. Prvá kvapka NaNO₂, ktorá spôsobí, že sa ručička mikroampérmetra nevráti do pôvodnej polohy, indikuje bod ekvivalencie a spotrebu odčítame priamo na byrete.

Rovnakým postupom stanovíme aj presnú koncentráciu roztoku NaNO₂ na návažok štandardu sulfa-
nilamidu.

Výsledok vyjadríme ako hmotnostný zlomok v percentách daného sulfónamidu.

3.1.3. Priame stanovenie iónov s ISE

Zatiaľ čo požiadavky na reprodukovateľnosť potenciálu elektród pri potenciometrických titráciách sú nižšie, pretože sa vyhodnocujú len zmeny napätia, pri priamom meraní aktivity iónov, akým je napr. meranie pH, treba vždy elektródový systém kalibrovať meraním štandardných roztokov definovaného zloženia.

Okrem merania pH sklenou elektródou umožňujú iónovoselektívne elektródy (ISE) priame meranie aktivity aj iných iónov. Priame stanovenia (za použitia kalibračných grafov sledujúcich závislosť $E = f(c)$, resp. lineárnu závislosť $E = f(-\log c)$) alebo metódy štandardných prídavkov) umožňujú stanoviť ióny v rozmedzí koncentrácií 10^{-1} až 10^{-6} mol/l. Na dosiahnutie čo najsprávnejších výsledkov, treba merať s presnosťou $\pm 0,1$ mV, vzorka a štandardné roztoky sa majú čo najmenej líšiť v zložení, v iónovej sile, v pH a v teplote. Aby sa dosiahla rovnaká iónová sila, ktorá udržiava aktivitné koeficienty zložiek na konštantnej hodnote, pridáva sa napr. do štandardných roztokov a do vzorky vhodný elektrolyt určitej koncentrácie v nadbytku alebo opačne možno vzorku upraviť zriedením na nízku iónovú silu.

Pri metóde štandardného prídavku koncentrácia iónu vo vzorke sa vypočíta z rozdielu potenciálu ISE pred (E_1) a po prídavku roztoku definovanej koncentrácie iónu (E_2). Prídavok štandardného roztoku volíme taký, aby sa dosiahla vhodná zmena E okolo 15 až 30 mV. Ak označíme koncentráciu vzorky c_x , štandardného roztoku c_{st} , objem meraného roztoku vzorky V_0 a objem pridaného štandardného roztoku V_{st} , platia pre namerané hodnoty E_1 , E_2 vzťahy

$$E_1 = E_0 + S \cdot \log c_x$$

$$E_2 = E_0 + S \cdot \log \frac{c_x V_0 + c_{st} V_{st}}{V_0 + V_{st}}$$

Z rozdielu $E_2 - E_1 = \Delta E$ vypočítame c_x

$$c_x = \frac{c_{st} V_{st}}{V_0 + V_{st}} \cdot \left[10^{\Delta E/S} - \frac{V_0}{V_0 + V_{st}} \right]^{-1}$$

Smernicu $S = \Delta E / \Delta \log c$ určíme experimentálne zo závislosti $E = f(-\log c)$ štandardných roztokov alebo zriedením vzorky podľa vzťahu $S = \Delta E_{dil} / \log(V_2 \cdot V_1^{-1})$, v ktorom ΔE_{dil} je rozdiel nameraného potenciálu pred a po zriedení vzorky z objemu V_1 na objem V_2 .

Pre merania s ISE platia tieto zásady. Odporúča sa miešať merané roztoky, odozva elektródy sa tým urýchľuje. Pri roztokoch s veľmi nízkou koncentráciou môže dôjsť ku adsorpcii iónov na steny nádob. Preto sa používajú čerstvo pripravené roztoky a na meranie sa berie väčší objem. Pred meraniami má byť ISE nejaký čas v roztoku s koncentráciou stanovovaného iónu asi 10^{-3} mol/l. Medzi meraniami jed-

notlivých roztokov (lepšie začať od nižších koncentrácií k vyšším) treba elektródu dôkladne opláchnuť ponorením do destilovanej vody, vodu niekoľkokrát vymeniť a osušiť bočné steny kúskom filtračného papiera. Nakoniec sa elektródy raz opláchnu časťou meraného roztoku tak, že ich do roztoku ponoríme a krúživým pohybom kadičky roztok miešame. Nedotýkame sa mernej časti elektródy, ktorá sa nachádza na spodnej strane, aby nedošlo k jej poškodeniu. Z tohto dôvodu je vhodné, aby kalomelová elektróda siahala trocha nižšie do roztoku ako ISE. Pri sérii meraní sa odporúča nemeniť vzdialenosť oboch elektród a na meranie používať približne rovnaký objem roztokov. Ak pri meraní dochádza ku kolísaniu meraného napätia, môže byť chybou prítomnosť vzduchovej bubliny na membráne, ktorú odstránime napr. vytiahnutím a novým ponorením elektródy.

Úloha 24. Stanovenie iónov I^-

Ako indikačnú elektródu použijeme ISE pre jodidy. Elektróda CRYTUR typ 53 – 17 má tuhú membránu z lisovaného AgI. Dá sa použiť pre teploty 0 – 80 °C v rozmedzí pH 1 – 13, oblasť merateľných koncentrácií 10^{-1} – 10^{-7} mol/l I^- . Stanovenie je možné aj za prítomnosti Cl^- a menších množstiev Br^- , pretože výrobca udáva koeficienty selektivity elektródy $k_{I,Cl}^{pot} = 10^{-5}$, $k_{I,Br}^{pot} = 10^{-2}$. Vzorka však nesmie obsahovať CN^- , Ag^+ , Hg_2^{2+} , Pb^{2+} , Tl^+ , ktoré reagujú s membránou.

Chemikálie a roztoky. Štandardný roztok jodidu draselného $c(KI) = 0,2$ mol/l; roztok hydrogenuhličitanu sodného $c(NaHCO_3) = 0,1$ mol/l.

Pracovný postup. Štandardné roztoky 10^{-2} – 10^{-6} mol/l KI (upravené roztokom $NaHCO_3$ na približne rovnakú iónovú silu a pH) pripravíme do 100 ml odmerných baniek. Postupujeme tak, že zo základného roztoku KI pripravíme $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l KI, ktorý obsahuje aj 1 ml roztoku $NaHCO_3$ (na úpravu pH). Ďalšie roztoky s klesajúcou koncentráciou pripravíme postupným presným zriedovaním (vždy 10 ml na 100 ml) a do každej odmernej banky pridáme aj 10 ml roztoku $NaHCO_3$. Analogicky pripravíme aj vzorku I^- ; 10 ml vzorky pipetujeme do 100 ml odmernej banky (do ktorej sme pridali 11 ml 0,1 mol/l $NaHCO_3$) a doplníme s H_2O po značku. Pri všetkých roztokoch zmeriame napätie článku zloženého z iónovoselektívnej elektródy a kalomelovej elektródy spojenej s roztokom agarovým mostíkom s KNO_3 . Jodidová ISE sa uchováva v suchom stave. Po ponorení elektródy do roztoku je ustálenie hodnoty E prakticky okamžité, ale pri nižších koncentráciách I^- sa odporúča premiešanie meraného roztoku elektromagnetickou miešačkou.

Z nameraných hodnôt E zostrojíme kalibračný graf závislosti mV od záporného logaritmu koncentrácie I^- , z ktorého vyhodnotíme koncentráciu I^- prepočítaním na látkovú koncentráciu (mol/l) I^- v pôvodnej vzorke.

Úlohu môžeme preskúšať aj metódou štandardného prídavku. Postupujeme tak, že z pripravenej vzorky v 100 ml odmernej banke odpipetujeme 50 ml do suchej 100 ml kadičky s miešacím telieskom, pipetou pridáme aj 10 ml pripraveného štandardného roztoku KI s koncentráciou $c(KI) = 0,01$ mol/l a necháme dobre premiešať. Po opláchnutí elektród s vodou ich otrieme filtračným papierom. Najprv zmeriame samotnú vzorku (hodnota E_1), potom pripravený roztok (vzorka + štandard) a zmeriame napätie (E_2). Koncentráciu I^- vo vzorke vypočítame podľa vzorca uvedeného v kapitole 3.1.3. Hodnotu smernice S vypočítame z nameraných údajov kalibračnej priamky.

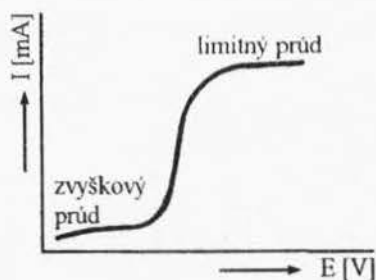
3.2. POLAROGRAFIA

3.2.1. Základné pojmy

Polarografia je elektrochemická analytická metóda, založená na sledovaní reprodukovateľných kriviek závislosti prúdu od vkladaného napätia pri mikroelektrolýze s kvapkovou ortuťovou elektródou. Vonkajšie napätie sa vkladá medzi dve elektródy: indikačnú – kvapkovú ortuťovú elektródu, ktorá je dokonale polarizovateľná, to znamená, že so zvyšovaním vkladaného napätia sa bude úmerne meniť jej potenciál; referenčnú – najčastejšie nasýtenú kalomelovú elektródu alebo niektorú inú oddelenú elektródu druhého druhu, ktorá je nepolarizovateľná. Pri tomto usporiadaní zmena vonkajšieho napätia spôsobí len zmenu potenciálu kvapkovej ortuťovej elektródy, a preto polarografická krivka vyjadruje nielen závislosť intenzity prúdu od vloženého napätia, ale aj závislosť prúdu od potenciálu kvapkovej ortuťovej elektródy.

Pri postupnom zväčšovaní napätia spoiatku neprechádza roztokom žiadny prúd (až na kapacitný prúd, ktorý je potrebný na nabíjanie kondenzátora elektródovej dvojvrstvy – jeho hodnoty sú veľmi malé). V tom okamžiku, keď kvapková elektróda dosiahne potenciál, pri ktorom dochádza k elektrolýze niektorej z látok nachádzajúcich sa v analyzovanom roztoku, dochádza k rastu prúdu. Látky, ktoré sú schopné oxidácie alebo redukcie na kvapkovej ortuťovej elektróde, nazývame depolarizátory. Elektrolýzou sa depolarizátor vo vrstvičke v okolí elektródy vyčerpá, takže intenzita prúdu je riadená rýchlosťou difúzie depolarizátora k povrchu elektródy. Po dosiahnutí určitého potenciálu kvapkovej ortuťovej elektródy intenzita prúdu ďalším zvyšovaním napätia nevzrastá – je dosiahnutá hodnota **limitného prúdu** – pokiaľ analyzovaný roztok nie je viacložkový a pri vyššej hodnote napätia nedochádza k oxidácii, resp. redukcii ďalších látok.

Limitný prúd sa v tom prípade, keď nastáva prisun depolarizátora ku kvapkovej ortuťovej elektróde (v dôsledku konc. spádu) difúziou, nazýva **difúznym prúdom** a tá časť polarografickej krivky, ktorá zaznamenáva vzrast prúdu z kapacitného až na difúzny, sa nazýva **polarografická vlna**. Typický priebeh polarografickej vlny je uvedený na obr. 25.



Obr. 25. Polarografická krivka

Prísun iónov ku kvapkovej ortuťovej elektróde môže nastať okrem difúzie aj **migráciou**, t. j. pohybom iónov medzi elektródami vplyvom potenciálneho spádu $I.R$. K eliminácii migračného prúdu je potrebné pridať k analyzovanému roztoku nadbytok indiferentného (základného) elektrolytu, ktorý jednak zvyšuje vodivosť roztoku, ako aj udržiava pH roztoku na požadovanej hodnote. O_2 sa redukuje na Hg-elektrode v dvoch vlnách



Táto redukcia pôsobí rušivo na polarografickú analýzu väčšiny depolarizátorov, a preto je nutné O_2 z analyzovaného roztoku pred registráciou odstrániť. Najčastejšie sa O_2 z roztoku odstraňuje prúdom plynného dusíka alebo iného inertného plynu.

Polarografickú analýzu môžu rušiť aj **polarografické maximá**. Maximá tvaru ostrých pík, ktoré sa objavujú pred dosiahnutím limitnej hodnoty prúdu, sa označujú ako maximá prvého druhu a vznikajú spravidla v zriedených roztokoch. Maximá druhého druhu sú oblé, tvoria sa v oblasti potenciálu limitného prúdu a vznikajú vo veľmi koncentrovaných roztokoch elektrolytov. Maximá možno odstrániť pridaním malého množstva povrchovoaktívnych látok (napr. želatíny, fuchsínu).

Pre strednú hodnotu limitného difúzneho prúdu platí Ilkovičova rovnica

$$\bar{I}_d = \frac{k_1 z F D^{1/2} m_r^{2/3} t_1^{1/6}}{\text{konšt.}} \cdot c$$

v ktorej z je počet elektrónov vymenených pri oxidácii resp. redukcii jednej častice,

F – Faradayova konštanta v $C \cdot mol^{-1}$,

D – difúzny koeficient $cm^2 \cdot s^{-1}$,

m_r – prietoková rýchlosť ortuti $g \cdot s^{-1}$,

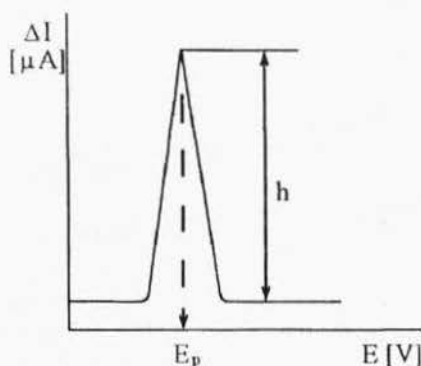
c – koncentrácia elektroaktívnej látky v roztoku mol/l ,

k_1 – konštanta s hodnotou $0,627 \text{ cm}^2 \cdot g^{-2/3}$.

Z Ilkovičovej rovnice vyplýva, že pri použití rovnakej Hg-elektrody (kapiláry) a pri konštantnej výške ortuťového stĺpca je difúzny prúd určitej látky pri konštantnom zložení analyzovaného roztoku úmerný jej koncentrácii.

3.2.2. Diferenčná pulzová polarografia (DPP)

Medza stanoviteľnosti klasickej polarografickej metódy je $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$. Zníženie medze stanoviteľnosti polarografickej metódy je umožnené zistením, že polarografický kapacitný prúd je na začiatku narastania kvapky najvyšší (dvojvrstva sa nabíja) a v posledných fázach rastu kvapky klesá na minimum, naopak, difúzny prúd sa zvyšuje úmerne s rastom kvapky až do jej odtrhnutia a je teda pred jej odtrhnutím najvyšší.



Obr. 26. Záznam pri diferenčnej pulzovej polarografii

Princíp metódy. Na lineárne rastúce polarizačné napätie sa superponuje pravouhlý potenciálový pulz štandardnej výšky (veľkosti niekoľko desiatok mV). Pulzy sú vkladane na ortuťovú kvapku v pravidelných intervaloch a sú synchronizované s posledným štádiom rastu kvapky. Vzorkovanie prúdu sa vyko-

náva dvakrát na každej kvapke – v čase tesne pred začatím pulzu (I_1) a tesne pred jeho ukončením (I_2). Dĺžka trvania napäťového pulzu a tiež čas medzi začatím impulzu a vzorkovaním I_2 sa volí tak, aby sa čo najviac obmedzil kapacitný prúd. Zaznamenaný signál bude rozdielom $I_2 - I_1$. Závislosť rozdielu $I_2 - I_1$ od potenciálu má charakter maxima (obr. 26), ktorého výška je priamoúmerná koncentrácii

$$(\Delta I)_{\max} = \frac{z^2 F^2}{4RT} A_c \Delta E \frac{D}{\pi t_m}$$

kde ΔE je amplitúda pravouhlého potenciálového pulzu,

A_c – plocha elektródy,

t_m – čas medzi začatím impulzu a vzorkovaním I_2 .

Medza stanoviteľnosti diferenčnej pulzovej polarografie je 10^{-7} až 10^{-8} mol/l. Metódu možno s úspechom použiť na stanovenie nízkych, ako i stopových koncentrácií anorganických a organických látok.

3.2.3. Analytická aplikácia polarografie

Polarografia sa používa na kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu látok, ktoré sa redukujú na kvapkovej ortuťovej elektróde (väčšina kationov, aniónov, organické látky, ktoré majú oxidovateľné alebo redukovateľné skupiny).

Totožnosť depolarizátora udáva poloha vlny na osi potenciálov a je definovaná **polvlnovým potenciálom**, ktorý sa označuje symbolom $E_{1/2}$. Je to potenciál, pri ktorom difúzny prúd dosahuje polovičnú hodnotu limitného difúzneho prúdu.

Pri DPP potenciál vrcholu píku je daný vzorcom $E_{1/2} = \Delta E/2$, kde ΔE je veľkosť vloženého napäťového pulzu.

$E_{1/2}$ je konštanta, ktorá nezávisí od koncentrácie elektroaktívnej látky ani od charakteristík použitej kvapkovej ortuťovej elektródy (m_r , t_1). $E_{1/2}$ je konštanta závislá od povahy látky, ktorá sa zúčastňuje elektródovej reakcie, od zloženia základného elektrolytu, od teploty a pri organických látkach od pH, ak sa ich redukcie zúčastňujú vodíkové ióny. Pri dodržaní konštantných podmienok je $E_{1/2}$ **identifikačnou konštantou**, ktorá závisí len od povahy elektroaktívnej látky.

Hodnoty $E_{1/2}$ sa v polarografii udávajú vzhľadom na potenciál nasýtenej kalomelovej elektródy (SKE).

Rýchle, orientačné určenie $E_{1/2}$ sa pri starších typoch polarografov uskutočňovalo metódou vzťažnej vlny, pri ktorej sa porovnávali $E_{1/2}$ meranej látky s $E_{1/2}$ iónu Tl^+ ($E_{1/2}Tl^+$ je vo väčšine základných elektrolytov konšt. = -450 mV oproti SKE). Postupuje sa tak, že za rovnakých podmienok sa zaznamenávajú vlny analyzovanej látky a Tl^+ a z nich sa určia hodnoty $E_{1/2}$ oboch elektroaktívnych látok. Zistená hodnota $E_{1/2}$ analyzovanej látky sa potom koriguje rozdielom medzi tabelovanou hodnotou a zistenou hodnotou $E_{1/2}Tl^+$.

V súčasnosti dávame pri presných meraniach hodnoty $E_{1/2}$ prednosť trojelektrodovému zapojeniu:

- indikačná – kvapková ortuťová elektróda,
- referenčná – nasýtená kalomelová elektróda (SKE),
- tretia – platínová elektróda.

Zo záznamu polarografickej vlny možno priamo odčítať hodnotu $E_{1/2}$ vzhľadom na potenciál SKE a porovnať ju s tabelovanými hodnotami. Zloženie základného elektrolytu sa však musí zhodovať s literárnymi údajmi.

Kvantitatívna polarografická analýza využíva lineárnosť vzťahu medzi limitným difúznym prúdom a koncentráciou depolarizátora ($I_{dl} = k \cdot c$), a tým aj lineárnu závislosť medzi koncentráciou a výškou polarografickej vlny, resp. píku. Používajú sa relatívne metódy. Najdôležitejšie z nich sú:

a) Metóda analytickej krivky

Analytická krivka v polarografii vyjadruje závislosť výšky vlny od koncentrácie látky v štandardných roztokoch, pripravených vo vhodne odstupňovaných koncentráciách. Krivka má väčšinou priamkový priebeh, ako to zodpovedá Ilkovičovej rovnici. Po získaní krivky sa analyzuje neznámy roztok, zmeria sa výška vlny analyzovanej látky a z analytickej krivky sa priamo odčíta koncentrácia. Pri tejto metóde sa musia bezpodmienečne dodržať rovnaké experimentálne podmienky, aké boli použité pri kalibrácii.

b) Metóda štandardného prídavku v jednom roztoku

K analyzovanému roztoku s neznámou koncentráciou pridáme tzv. štandardný prídavok, t. j. určitý objem roztoku, ktorého koncentrácia je známa. Týmto štandardným prídavkom sa zvýši príslušná vlna. Koncentrácia látky v roztoku sa vypočíta podľa vzťahu

$$x = \frac{c_{st} h_1}{h_2 + (h_2 - h_1) V / v}$$

kde h_1 je výška vlny roztoku neznámej koncentrácie,

h_2 – výška vlny po pridaní štandardného prídavku,

V – pôvodný objem,

v – objem štandardného roztoku s koncentráciou c_{st} .

c) Metóda štandardného prídavku v dvoch roztokoch

Dva rovnaké objemy analyzovaného roztoku neznámej koncentrácie napipetujeme do dvoch rovnakých odmerných baniek. Do druhej banky pridáme známe množstvo štandardného roztoku. Po doplnení odmerných baniek zaregistrujeme polarografické krivky. Výška vlny (h_1), ktorú sme dostali pri registrácii roztoku z prvej banky, zodpovedá obsahu samotnej látky, výška vlny (h_2), ktorá vznikla pri registrácii roztoku z druhej banky, je vyššia v dôsledku štandardného prídavku. Na výpočet neznámej hmotnosti x v mg použijeme vzťah

$$x = a \frac{h_1}{h_2 - h_1}$$

kde a je hmotnosť látky v štandardnom prídavku (v mg). Ak vydáme uvedený vzťah 1/100 návažku, dostaneme výsledok vyjadrený hmotnostným zlomkom $w(\%)$.

d) Metóda štandardného roztoku

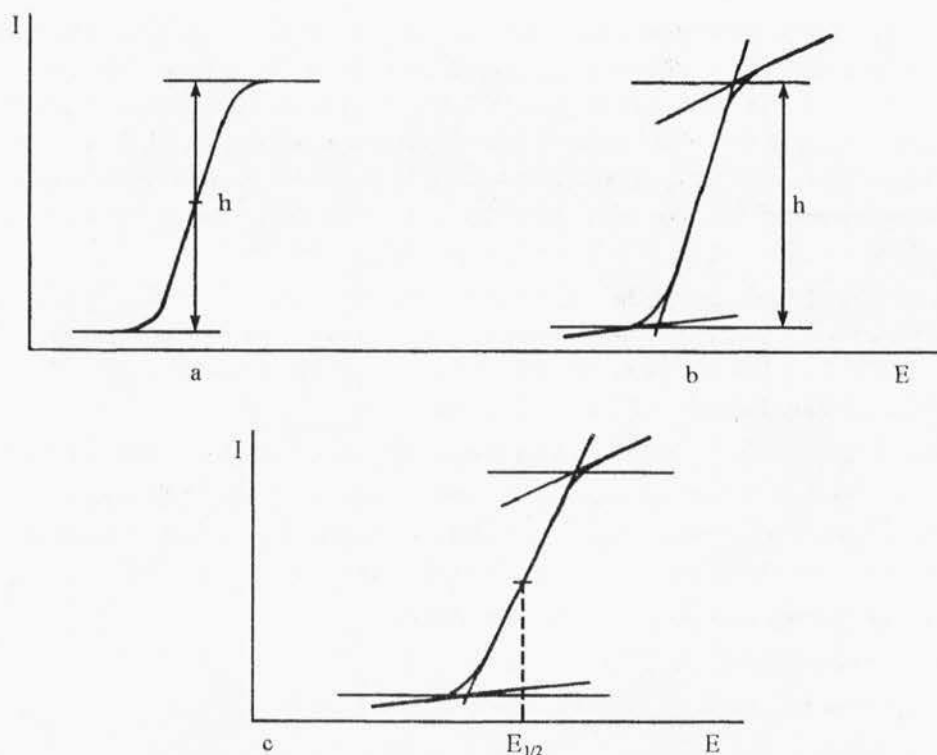
Na analýzu sa pripraví roztok vzorky a štandardu približne rovnakej koncentrácie a pri oboch sa za rovnakých podmienok zaznamenáva polarografická krivka. Pomer výšok vln $h_x : h_{st}$ je v pomere koncentrácie $c_x : c_{st}$ stanovovanej látky. Koncentrácia c_x sa vypočíta zo vzťahu

$$c_x = \frac{h_x}{h_{st}} c_{st}$$

kde c_x, c_{st} sú koncentrácie stanovovanej látky v analyzovanej vzorke a v štandardnom roztoku

h_x, h_{st} im zodpovedajúce výšky polarografických vln.

Meranie výšky polarografickej vlny. Spôsoby vyhodnotenia výšky polarografickej vlny rôznych tvarov sú znázornené na obr. 27. V každom prípade sa výška meria kolmo na os napätia rovnakým spôsobom pri analyzovanej vzorke, ako aj pri štandardnom roztoku.



Obr. 27. Meranie limitných prúdov a $E_{1/2}$ a, b – spôsoby určenia výšky polarografickej krivky (h); c – spôsob určenia $E_{1/2}$

3.2.4. Prístrojová technika

V súčasnosti sú klasické polarografy nahradzované modernými polarografickými analyzátormi (PA-2, PA-3, PA-4). Sú to polyfunkčné prístroje, ktoré umožňujú realizáciu týchto polarografických techník:

1. klasickej polarografickej metódy (DC POLAROGRAPHY),
2. vzorkovacej – TAST (TAST POLAROGRAPHY),
3. diferenčnej pulzovej polarografie (DIFERENTIAL PULSE POLAROGRAPHY),
4. diferenčnej pulzovej rozpúšťacej voltametrie (DIFERENTIAL PULSE STRIPPING VOLTAMETRY).

Príslušenstvo k polarografickým analyzátorom je: XY-zapisovač na registráciu polarogramov, statická ortuťová elektróda, ktorá nahradila klasickú kvapkovú ortuťovú elektródu.

Prístroje majú zabudovaný trojelektrodový systém, čo umožňuje hodnotu $E_{1/2}$ odčítať priamo z krivky na polarograme.

Perspektívne sú polarografické analyzátory vybavené mikroprocesorom, ktorý ovláda nielen vlastnú funkciu prístroja, ale vyhodnocuje záznamy, a tak spoločne so zápisom krivky vypisuje potrebné údaje (hodnoty $E_{1/2}$, výšky polarografických kriviek a pod.).

3.2.5. Kvalitatívna a kvantitatívna analýza anorganických a organických látok

Úloha 25. Separácia splývajúcich polarografických kriviek

Výhodou polarografie je, že sa dajú analyzovať viaczložkové vzorky a niekedy aj viac látok po sebe v jednej analýze za podmienky, že ich polvlnové potenciály sa dostatočne líšia. Pri klasickej polarografii $\Delta E_{1/2}$ dvoch zložiek musí byť 200 – 250 mV, pri DPP 50 – 60 mV. Ak sú v roztoku dva depolarizátory s veľmi blízkym $E_{1/2}$, ich vlny splývajú a nedajú sa jednotlivito vyhodnotiť. Jednou z metód úplne eliminujúcu túto (z hľadiska polarografického kvalitatívneho a najmä kvantitatívneho hodnotenia) nevýhodnú situáciu je chemická separácia polarografických kriviek oboch zložiek viazaním jednej z nich do komplexu, ktorý má $E_{1/2}$ dostatočne posunutý k negatívnejším hodnotám.

Princíp uvedenej metódy si experimentálne objasníme na sústave iónov Pb^{2+} a Tl^+ , ktorých polarografické vlny v kyslom a neutrálnom prostredí značne splývajú. Separáciu ich vln dosiahneme zalkalizovaním vzorky s KOH, pôsobením ktorého sa Pb^{2+} viaže do hydroxokomplexu a jeho $E_{1/2}$ sa posunie k negatívnejším hodnotám, kým $E_{1/2}$ Tl^+ zostáva bez zmeny.

Zadanie. Určite hodnoty $E_{1/2}$ Tl^+ a Pb^{2+} vo vzorke po predchádzajúcej separácii ich splývajúcich vln.

Chemikálie a roztoky. Roztok dusičnanu olovnatého s koncentráciou $c[Pb(NO_3)_2] = 0,01$ mol/l; roztok dusičnanu tálneho $c(TlNO_3) = 0,01$ mol/l; základný elektrolyt – roztok dusičnanu draselného $c(KNO_3) = 0,1$ mol/l; roztok želatíny $w(\text{žel.}) = 0,5$ %; tuhý KOH p. a.

Použité prístroje a podmienky polarografického merania

Polarografický analyzátor PA-4 s XY-zapisovačom:

- prepínač funkcií v polohe DC,
- riadený čas kvapky 4 s,
- amplitúda pulzu 0,
- rýchlosť nárastu polarizačného napätia 20 mV/s,
- rozsah napätia 0 – 4 V,
- krivky registrujeme od –0,2 V s nárastom polarizačného napätia smerom k negatívnym hodnotám.

Elektrodový systém: indikačná – statická ortuťová elektróda v trojelektrodovom zapojení s nasýtenou kalomelovou a platinovou elektródou.

Pracovný postup. Do polarografickej nádoby dáme 10 ml základného elektrolytu (dusičnan draselný), pridáme 6 kvapiek roztoku $Pb(NO_3)_2$ a 2 kvapky želatíny. Roztok založíme k polarografovaniu a po vytesnení kyslíka dusíkom (5 min) pri vhodnej citlivosti zaznamenáme polarografickú vlnu podľa hore uvedených polarografických podmienok merania. Ďalšiu vlnu registrujeme za nezmenených podmienok po pridani 6 kvapiek roztoku $TlNO_3$ k pôvodnému roztoku a po 5 min zavádzania dusíka (vlny Pb^{2+} a Tl^+ na zázname splývajú). Analogicky zaznamenávame poslednú vlnu po pridani 3 – 4 zrníček tuhého KOH a opätovnom prebublani dusíkom. Na polarograme dostaneme dvojvlnu – prvá zodpovedá redukcii Tl^+ a druhá $[Pb(OH)_3]^-$.

Vyhodnotenie merania. Spôsob odčítania výšky polarografických vln a zistenie $E_{1/2}$ je naznačený na obr. 27.

Úloha 26. Stanovenie kyseliny barbitúrovej a jej derivátov klasickou polarografickou metódou

Roztoky kyseliny barbitúrovej, resp. jej derivátov (ich chemické zloženie pozri kap. 2.1.4., úloha 12), ktoré nemajú substituovaný vodík v skupine $=\text{NH}$, poskytujú v prostredí $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ anodické krivky prislúchajúce tvorbe nerozpustných zlúčenín s ortuťou. Limitujúcim dejom je adsorpcia nerozpustnej ortutnatej soli na ortuťovej elektróde. Výška vlny je priamoúmerná koncentrácii kyseliny barbitúrovej, resp. jej derivátov v koncentračnom rozmedzí $1 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$.

Zadanie. Klasickou polarografickou metódou stanovte hmotnostnú koncentráciu (g/l) kyseliny barbitúrovej v roztoku vzorky metódou štandardného prídavku v dvoch roztokoch.

Chemikálie a roztoky. Štandardný roztok kyseliny barbitúrovej $c(\text{kys. barbitúr.}) = 0,001 \text{ mol/l}$; základný elektrolyt roztok tetraboritanu disodného $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}) = 0,05 \text{ mol/l}$; roztok želatíny $w(\text{želatína}) = 0,5 \%$.

Použité prístroje a podmienky polarografického merania.

Polarografický analyzátor PA-4 s XY-zapisovačom:

- prepínač funkcií v polohe DC,
- riadený čas kvapky 4 s,
- amplitúda pulzu 0,
- rýchlosť nárastu polarizačného napätia 20 mV/s,
- rozsah napätia 0 – 4 V,
- krivky registrujeme od $-0,4 \text{ V}$ s nárastom polarizačného napätia smerom k pozitívnejším hodnotám.

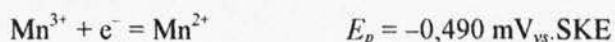
Elektródový systém: indikačná – statická ortuťová elektróda, referenčná – nasýtená kalomelová elektróda.

Pracovný postup. Do dvoch 100 ml odmerných baniek kvantitatívne preniesieme vzorku, pridáme 10 ml roztoku základného elektrolytu $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ a 10 kvapiek roztoku želatíny. Do druhej banky okrem uvedených komponentov odmeriame pipetou ešte 5 ml štandardného roztoku kyseliny barbitúrovej. Obidve banky doplníme vodou po značku. Druhý roztok obsahujúci vzorku a štandard založíme k polarografovaniu. Po vytesnení kyslíka dusíkom zaznamenáme polarografickú vlnu za uvedených podmienok merania pri vhodnej citlivosti. Za rovnakých podmienok zaregistrujeme vlnu roztoku obsahujúcu len vzorku.

Vyhodnotenie merania. Zistíme výšku vlny vzorky (h_1) ako aj výšku vlny vzorky s prídavkom štandardu (h_2). Podľa vzťahu uvedeného v kap. 3.2.3., ods. c vypočítame obsah kyseliny barbitúrovej vo vzorke.

Úloha 27. Stanovenie manganatých iónov metódou diferenčnej pulzovej polarografie

Redukcia manganatých iónov na kvapkovej ortuťovej elektróde sa prejaví na DPP zázname dobre vyvinutým pikom, ktorého výška je lineárnou funkciou koncentrácie mangánu



Zadanie. Stanovte hmotnostnú koncentráciu mangánu (g/l) vo vzorke metódou štandardného roztoku. Vyhodnoťte získané piky aj po stránke kvalitatívnej.

Chemikálie a roztoky. Štandardný roztok síranu manganatého $c(\text{MnSO}_4) = 0,001 \text{ mol/l}$; roztok trietanolamínu $c(\text{trietanolamín}) = 0,5 \text{ mol/l}$; roztok hydroxidu sodného $c(\text{NaOH}) = 0,5 \text{ mol/l}$.

Použité prístroje a podmienky polarografického merania.

Polarografický analyzátor PA-4 s XY-zapisovačom:

- prepínač funkcií v polohe DPP,
- riadený čas kvapky FS DPP,
- amplitúda superponovaného pulzu 50 mV,
- rýchlosť nárastu polarizačného napätia 20 mV/s.

Elektrodový systém: indikačná – statická ortuťová elektróda v trojelektrodovom zapojení s nasýtenou kalomelovou a platinovou elektródou.

Pracovný postup. Do jednej 100 ml odmernej banky odmeriame 5 ml štandardného roztoku MnSO_4 a do druhej 100 ml odmernej banky kvantitatívne prelejeme roztok vzorky obsahujúci Mn^{2+} . Do oboch baniek potom pridáme 10 ml trietanolaminu a 10 ml roztoku NaOH. Roztoky pretrepávame asi 1 min. V tejto fáze nastane oxidácia Mn^{2+} viazaného do komplexu s trietanolaminom na Mn^{3+} vzdušným kyslíkom. Odmerné banky doplníme destilovanou vodou na predpísaný objem a premiešame. Po nastavení hore uvedených polarografických parametrov merania a po odstránení kyslíka z roztoku dusíkom registrujeme DPP polarogram štandardného roztoku a roztoku vzorky.

Vyhodnotenie merania. Hodnotu potenciálu vrcholu píku určíme spôsobom naznačeným na obr. 26. Obsah mangánu v analyzovanej vzorke vypočítame tak, že do vzťahu platného pre metódu štandardného roztoku (kap. 3.2.3., ods. d) dosadíme výšku píku Mn^{2+} v štandardnom roztoku a vo vzorke, ako aj obsah mangánu v štandardnom roztoku. Spôsob určenia výšky pikov je naznačený na obr. 26.

Úloha 28. Stanovenie olovnatých a kademnatých iónov vedľa seba metódou diferenčnej pulzovej polarografie

Olovnaté, ako aj kademnaté ióny sa v prostredí octanového tlmivého roztoku ($\text{pH} = 4,7$) redukujú na kvapkovej ortuťovej elektróde podľa rovnice



pričom poskytujú dobre vyvinuté píky, ktoré majú difúzny charakter, čo znamená, že výška píku je priamoúmerná koncentrácii iónu v analyzovanom roztoku.

Zadanie. Technikou diferenčnej pulzovej polarografie stanovte hmotnostnú koncentráciu olova a kadmia v roztoku vzorky (g/l) metódou analytickej krivky.

Chemikálie a roztoky. Štandardný roztok dusičnanu olovnatého $c[\text{Pb}(\text{NO}_3)_2] = 0,001 \text{ mol/l}$; štandardný roztok dusičnanu kademnatého $c[\text{Cd}(\text{NO}_3)_2] = 0,001 \text{ mol/l}$; základný elektrolyt octanový tlmivý roztok s $\text{pH} = 4,7$.

Použité prístroje a podmienky polarografického merania.

Polarografický analyzátor PA-4 s XY-zapisovačom:

- prepínač funkcií v polohe DPP,
- riadený čas kvapky FS DPP,
- amplitúda superponovaného pulzu 50 mV,
- rýchlosť nárastu polarizačného napätia 20 mV/s.

Elektrodový systém: indikačná – statická ortuťová elektróda, referenčná nasýtená kalomelová elektróda.

Pracovný postup. Do piatich 100 ml odmerných baniek odmeriame postupne 4, 5, 6, 7, 8 ml štandardného roztoku dusičnanu olovnateho, ako aj rovnaký objem štandardného roztoku dusičnanu kademnatého. Do ďalšej 100 ml odmernej banky prenosieme kvantitatívne vzorku. Potom do všetkých šiestich odmerných baniek pridáme 10 ml octanového tlmivého roztoku a doplníme vodou po značku. Po odstránení kyslíka dusikom registrujeme DPP polarogramy podľa uvedených podmienok.

Vyhodnotenie merania. Zmeriame výšky pík štandardných roztokov a zostrojíme graf závislosti výšky píku od koncentrácie stanovenej látky. Zmeriame výšku píku stanovovanej látky a z analytickej krivky priamo odčítame koncentráciu.

4. NUKLEÁRNE ANALYTICKÉ METÓDY

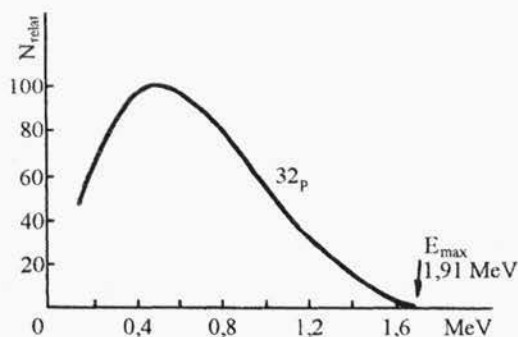
4.1. IDENTIFIKÁCIA RÁDIONUKLIDOV MERANÍM SPEKTRA BETA ŽIARENIA

4.1.1. Všeobecná časť

Beta rozpadom nazývame také premeny jadra, pri ktorých vzniká vzájomná premena nukleónov tvoriacich jadro. Ide o negatrónovú premenu, pozitronovú premenu, resp. o elektrónový záchyt. Negatrónová a pozitronová premena je sprevádzaná vysielaním negatrónu, resp. pozitronu z jadra. Pri každej z týchto premien sa vždy uvoľňuje konštantné množstvo energie, ktorú si odnášajú častice vysielané z jadra vo forme ich kinetickej energie. No na rozdiel od alfa žiarenia, ktoré je monoenergetické, pozorujeme pri beta žiarení polyenergetické spektrum, pretože súčasne s beta časticou sa z jadra vysieľa častica neutrino (ν) a uvoľnená energia sa rozdeľuje medzi tieto vyžarované častice. Sumárnu energiu týchto častíc (napr. e^- a ν), vyžiarovaných pri jednom rozpade, nazývame maximálnou energiou

$$E_{max} = E_{e^-} + E_{\nu}$$

a zodpovedá energii uvoľnenej pri danej jadrovej premene. Táto energia je charakteristická pre ten-ktorý typ premeny daného rádionuklidu. Na základe stanovenej hodnoty E_{max} môžeme (ak stanovíme aj polčas rozpadu) zisťovať, resp. dokazovať prítomnosť alebo čistotu rádionuklidu v skúmanej vzorke.



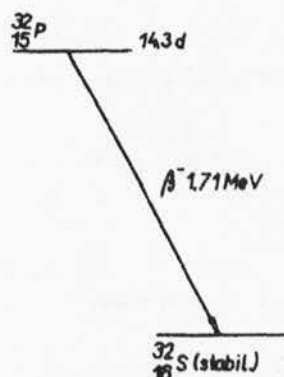
Obr. 28. Energetické spektrum žiarenia ^{32}P
N – relatívny počet impulzov, MeV – energia beta častíc

Energetické spektrum vysielaných negatrónov má spojitý charakter a vyskytujú sa tu s rôznou pravdepodobnosťou negatróny od nulovej energie až po maximálnu energiu. Na obr. 28 je uvedený príklad energetického spektra negatrónov vznikajúcich pri rozpade $^{32}_{15}\text{P} \xrightarrow{\beta^-} ^{32}_{16}\text{S}$, ktorého rozpadová schéma je znázornená na obr. 29. Počet negatrónov s minimálnou (nulovou) a maximálnou energiou ($E_{max} = 1,72 \text{ MeV}$) sa bude blížiť k nule. Maximum na krivke (pri energii $E \sim 0,5 \text{ MeV}$) zodpovedá

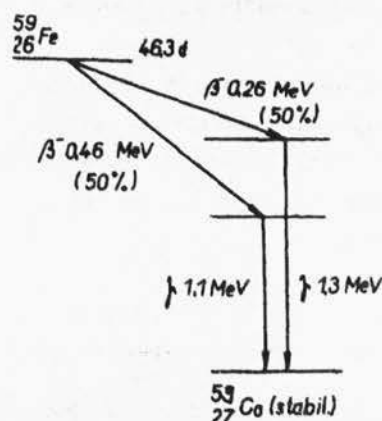
najväčšej pravdepodobnosti, že negatrón z jadra bude mať túto energiu. Priemernú energiu uvoľnených negatrónov nazývame strednou energiou a rovná sa približne jednej tretine maximálnej energie

$$\bar{E} = \frac{E_{\max}}{3}$$

Pri negatrónovom rozpade môžeme niekedy pozorovať aj viac skupín beta častíc s rôznou maximálnou energiou. Ako príklad spomenieme beta premenu ^{59}Fe (obr. 30). Vznikajú tu dve skupiny beta častíc s $E_{\max} = 0,26$, resp. $0,46$ MeV. Keďže výsledný nuklid ^{59}Co je v rôzne excitovanom stave, prebytočnej energie sa potom zbavuje vyžiarovaním gama kvánt s rôznou energiou ($1,3$, resp. $1,1$ MeV). Celkové energetické spektrum beta častíc uvoľnených pri beta premene ^{59}Fe je uvedené na obr. 31. Sumárnu krivku možno rozdeliť na dve skupiny s rôznou hodnotou $E_{\max}$.

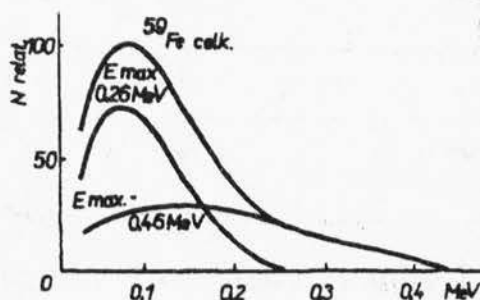


Obr. 29. Rozpadová schéma ^{32}P



Obr. 30. Rozpadová schéma ^{59}Fe

Pomocou nukleárných spektrometrov možno maximálnu energiu beta žiarenia a celkový priebeh spektra určiť s vysokou presnosťou. Preto by táto metóda bola veľmi vhodná aj na identifikáciu rádionuklidov. Potrebné zariadenia sú však pomerne komplikované a vo väčšine laboratórií nie sú k dispozícii; na meranie sa vyžaduje – vzhľadom na malý podiel detegovaných častíc – použiť vzorky s vysokou aktivitou.



Obr. 31. Energetické spektrum beta častíc ^{59}Fe

Metódy sú založené na úplnom pohltení energie beta častíc v kryštáli scintilátora (najčastejšie antracénovom), resp. v plynnej náplni proporcionálneho počítacza. Výhodou týchto metód je možnosť merania aj pomerne nízko aktívnych preparátov. V prípade scintilačnej metódy je možné – zavedením meranej vzorky priamo do oscilátora – odstrániť aj vplyv absorpcie, samoabsorpcie a spätného rozptylu. Táto

metóda je vhodnejšia na určenie vyšších hodnôt E_{max} , zatiaľ čo proporcionálna metóda je zasa vhodná na určenie E_{max} do hodnôt 0,1 – 0,25 MeV. Aj tieto dve metódy sú pomerne náročné na prístrojovú techniku.

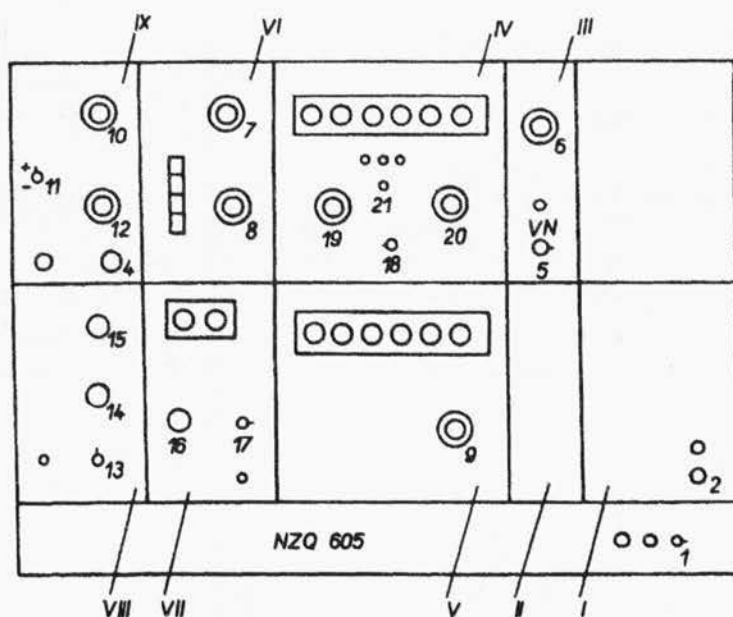
Úloha 29. Identifikácia spektra ^{59}Fe , ^{32}P

Opis prístroja. Spektrá meriame na laboratórnej meracej súprave NZQ 605 (obr. 32), ktorá pozostáva z blokových častí: stabilizovaných zdrojov nízkeho napätia (I a II), zdroja vysokého napätia (III), merača počtosti impulzov (IV), elektronických stopiek (V), analyzátora impulzov (VI), riadiacej jednotky (VII), riadenia tlače (VIII), lineárneho zosilňovača (IX).

Zapneme meraciu súpravu, štandard umiestnime do vymedzeného priestoru a za daný čas (60 s) zmeriame energetické spektrum posunom kanálov analyzátora od 1 do 99. Rovnakým spôsobom meriame zadanú vzorku.

Postup pri meraní. Po prepojení meracej súpravy na sieť zapneme vypínač (1), tlačidlom „štart“ (2) v časti (I) zapneme stabilizovaný zdroj nízkeho napätia, čím sa rozsvietia dekatróny čítača a stopiek. Scintilačná sonda je káblom pripojená na konektor (4) v časti (IX).

Zapne sa zdroj vysokého napätia vypínačom (5) a nastaví sa pracovné napätie na detektor prepínačom (6) v časti (III).



Obr. 32. Laboratórna meracia súprava NZQ 605

Na meranie spektier rádioaktívneho žiarenia zapneme v časti (VI) druhé tlačidlo — (režim jednokanálový analyzátor) a prepínačom (7) nastavíme hodnotu 02 (šírka okna). Prepínačom (8) prepínáme postupne od 0 do 99 na merací čas, ktorý si nastavíme prepínačom (9) v časti (V). V časti (IX) – lineárny zosilňovač – prepínačom (10) nastavíme derivačnú konštantu 1 a integračnú konštantu na minimum. Prepínač polarity (11) na znamienko (-). Zosilnenie signálu z detektora sa upraví prepínačom (12) podľa energie rádioaktívneho žiarenia (najčastejšie na hodnotu 0,2 dB, prípadne väčšiu). V časti (VIII) prepínač (13) prepne do polohy MAN, prepínač (14) a (15) do polohy 1. Prepínače riadiacej jednotky (VII) zostávajú pri spektrometrii v predom nastavenej polohe, prepínač (16) v polohe 1, prepínač (17)

v polohe NE. Čítač (IV) nastavíme prepínačom (18) do polohy RUČNE, prepínač (19) a (20) do polohy VYPNUTO. V priebehu celého merania prístroj ovládame tlačidlom (21) štart, nula. Pred vypnutím prístroja najskôr znížime vysoké napätie na minimálnu hodnotu pomocou prepínača (6), prepínač (5) dáme do polohy 0 a vypneme sieťový vypínač (1).

Spracovanie výsledkov. Namerané výsledky zaznamenávame do tabuľky a znázorníme graficky (na os y nanášame nameranú početnosť, na os x čísla kanálov analyzátora).

Na záver porovnávame priebehy oboch spektier z hľadiska maximálnej a strednej energie.

Údaje na zostrojenie beta spektier		
	Nameraná početnosť (imp/t)	
	Štandard	Neznáma vzorka
1		
2		
3		
...		
99		

Pracovné napätie:

Zosilnenie:

4.2. IDENTIFIKÁCIA RÁDIONUKLIDOV MERANÍM SPEKTRA GAMA ŽIARENIA

4.2.1. Všeobecná časť

Žiarenie gama má čiarové spektrum. Pre identifikáciu gama zdroja je dôležité určiť počet a energiu jednotlivých čiar – pikov, nachádzajúcich sa v meranom spektre.

Zmeraním spektra gama žiarenia neznámeho rádionuklidu môžeme stanoviť energiu jeho žiarenia, čo umožňuje jeho identifikáciu. V prípade zmesného žiarenia viacerých rádionuklidov zmeranie spektra umožňuje stanoviť energie a aktivity jednotlivých zložiek gama žiarenia.

Energetické spektrum gama žiarenia sa zmeria pomocou scintilačného detektora a amplitúdového gama spektrometra. Scintilačný detektor pozostáva z gama scintilátora (obyčajne kryštál NaI/Tl), spektrometrického fotonásobiča a predzosilňovača. Amplitúdový spektrometer pozostáva zo zosilňovača impulzov, jedno- alebo viac kanálového amplitúdového analyzátora a počítača početnosti impulzov, prípadne zapisovača spektra.

Scintilačná spektrometria je založená na úmernosti medzi veľkosťou záblesku v scintilátore a energiou žiarenia, ktorá tento záblesk vyvolala. Záblesk je fotonásobičom lineárne zosilnený a preto výška alebo veľkosť impulzu na výstupe fotonásobiča odpovedá energii dopadajúcej častice.

Pri interpretácii gama spektra treba vziať do úvahy jeho štruktúru v niektorých podrobnostiach. Na vzniku gama spektra sa zúčastňujú všetky druhy interakcie gama kvánt so scintilátorom (fotoelektrický jav, Comptonov rozptyl a vznik elektrónového páru).

Pri fotoelektrickom jave fotón strati celú svoju energiu v scintilátore a výsledkom bude scintilačný záblesk úmerný energii fotónu.

Na krivke zobrazujúcej spektrum vzniká viac-menej výrazné maximum – **fotopík**, ktorý má v podstate tvar Gaussovej krivky. Poloha a veľkosť píku sú zdrojom informácie o energii a intenzite fotónov. Fotopíky sú dominantnou zložkou gama spektra. Pri Comptonovom rozptyle sa len časť energie fotónu odovzdá elektrónu. Comptonov elektrón je zabrzdený v scintilátore a rozptýlené gama žiarenie môže byť absorbované fotoelektrickým javom, alebo môže opustiť kryštál. Ak nastane prvý prípad, fotoelektrickým javom prejde celá energia fotónu na elektrón, čím prispieva k tvorbe spektra vo forme fotopíku. Keď nedochádza k ďalšej interakcii, na tvorbe spektra sa zúčastňujú len Comptonove elektróny, ktorých energia sa pohybuje od nuly po určitú maximálnu hodnotu danú vzťahom

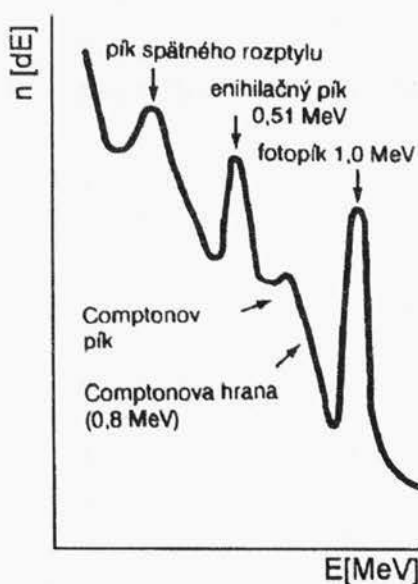
$$E_C = \frac{4E^2}{4E + 1}$$

kde E_C je energia Comptonových elektrónov, E – energia pôvodného gama žiarenia.

Výsledkom bude široké **Comptonove kontinuum** v gama spektre, energeticky nižšie ako fotopík. Comptonove kontinuum sa končí pred fotopíkom **Comptonovou hranou**, ktorá zodpovedá energii danej uvedeným vzťahom.

Podobne i vznik elektrónového páru, ktorý sa s určitou pravdepodobnosťou uplatňuje pri $E > 1,02$ MeV, môže sa zúčastňovať na tvorbe spektra dvoma spôsobmi:

- energiou vzniknutého negatrónu,
- energiou fotoelektrónu vytvoreného z fotónu, ktorý vznikol spätnou anihiláciou.



Obr. 33. Znázornenie interakčných dejov vysokoenergetického gama žiarenia pri meraní scintilačným detektorom

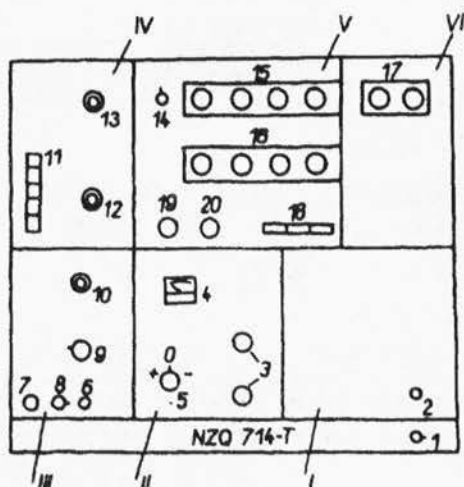
Takto vzniká **pík tvorby párov**. Ak daný rádionuklid emituje röntgenové žiarenie, prislúcha jeho energii fotopík, podobne ako v prípade gama kvánt. Všetky tieto efekty sú znázornené na obr. 33.

Aktivita skúmaného rádionuklidu sa môže vyhodnotiť na základe niektorého z jeho fotopíkov. Možno merať plochu fotopíkov alebo presne vymedzenej časti fotopíkov. Pretože spektrá skúmaných vzoriek sú súčtom spektier rôznych rádionuklidov, úloha kvantitatívneho a kvalitatívneho vyhodnotenia sa komplikuje.

Určenie energie žiarenia spolu s polčasom rozpadu rádionuklidu umožňuje presnú identifikáciu rádionuklidu.

Úloha 30. Identifikácia spektra ^{59}Fe

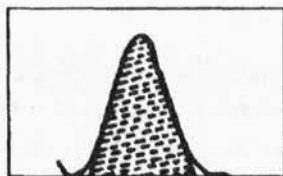
Opis prístroja. Spektrá zmeriame na scintilačnom amplitúdovom spektrometri NZQ 714 T (schéma obr. 34), ktorý pozostáva z blokových častí: stabilizovaného zdroja napätia (I), zdroja vysokého napätia (II), lineárneho zosilňovača (III), analyzátora impulzov (IV), merača počtosti impulzov a časového spínača (V), dekád merača počtosti impulzov (VI).



Obr. 34. Laboratórna meracia súprava NZQ 714 T

Zapneme meraciu súpravu, štandard umiestnime do vymedzeného priestoru a za daný čas zmeriame energetické spektrum posunom kanálov analyzátora od 1 do 99. Rovnakým spôsobom meriame zadanú vzorku.

Postup pri meraní. Zapneme sieťový spínač (1), stlačíme tlačidlo štart (2), prepínač (5) nastavíme do polohy + a pomocou prepínačov (3) nastavíme požadovanú hodnotu vysokého napätia, ktoré sa kontroluje na meracom prístroji (4). Na vstup (7) je pripojená meracia sonda. Derivačnú konštantu (8) nastavíme na hodnotu 20 μs , útlm (9) na 40 dB a diskriminačnú úroveň (10) na hodnotu 1. Na paneli (IV) zatlačíme druhé tlačidlo (11), na regulátore (12) nastavíme úroveň 02 a regulátor (13) postupne posunujeme od 1 do 99. Prepínač (14) dáme do polohy meranie. Tlačidlami stop a nula (18) pripravíme prístroj na hodnotu vyp a na prepínači (20) nastavíme vyžadovanú dobu merania. Po stlačení tlačidla štart (18) prístroj automaticky meria početnosť prislúchajúcu skúmanej vzorke a nastavenému kanálu. Pred vypnutím prístroja najprv znížime vysoké napätie na minimálnu hodnotu a potom vypneme sieťový vypínač (1).



Obr. 35. Vyhodnotenie plochy píku

Spracovanie výsledkov. Namerané výsledky zapisujeme do príslušných tabuliek. Fotopik ^{59}Fe má energiu 1,2 MeV.

Údaje na zostrojenie gama spektier		
Kanál č.	Štandard ^{59}Fe	Neznáma vzorka
	Počet impulzov za čas t	Počet impulzov za čas t
1		
2		
3		
...		
99		

Pracovné napätie:

Zosilnenie:

Plocha fotopíku štandardu ^{59}Fe : $P_1 = \text{cm}^2$; $K_1 =$

Plocha fotopíku neznámej vzorky: $P_2 = \text{cm}^2$;

Aktivita štandardu ^{59}Fe : $A_s = \text{Bq}$

Aktivita neznámej vzorky: $A_x = A_s \cdot K_1 = \text{Bq}$

1. V spektre ^{59}Fe a vzorky posledný fotopík extrapolujeme k osi úsečiek podľa obr. 35. Určíme spočítaním vyčiarkované plochy. Určíme pomer plochy fotopíku štandardu (P_1) a vzorky (P_2)

$$\frac{P_2}{P_1} = K_1, \text{ z čoho } P_2 = K_1 \cdot P_1$$

2. Hodnotou K_1 vynásobíme všetky hodnoty spektra štandardu ^{59}Fe a získané hodnoty odpočítame od hodnôt spektra vzorky.

3. Vypočítame aktivitu z hodnoty štandardu podľa vzťahu

$$A_x = A_s \cdot K_1$$

kde A_s je aktivita štandardu v Bq.

Na základe výsledku urobíme záver o identite spektier.

4.3. RÁDIONUKLIDOVÁ RÖNTGENOVOFLUORESCENČNÁ ANALÝZA

4.3.1. Princíp metódy

Röntgenovofluorescenčná analýza sa zakladá na interakcii žiarenia s analyzovanou látkou a na meraní intenzity žiarenia vysielaného stanovovanou zložkou. Tento postup patrí medzi moderné metódy inštrumentálnej analýzy. Vyznačuje sa rýchlosťou a presnosťou pri analýze látok s rôznym zložením a rozličnou fyzikálnou štruktúrou. Je to metóda prvkovej analýzy.

V dôsledku interakcie vhodného žiarenia s analyzovanou vzorkou jej stanovovaná zložka vysiela röntgenovofluorescenčné žiarenie. Energia žiarenia je charakteristická pre emitujúci (v tomto prípade stanovovaný prvok) a hustota toku častíc je úmerná množstvu stanovovanej zložky v analyzovanej vzorke.

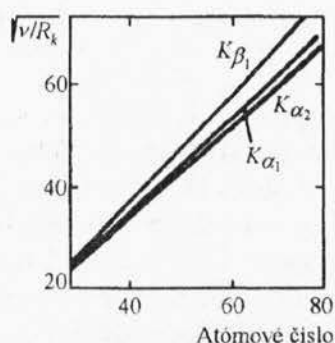
Interakcia nízkoenergetického elektromagnetického žiarenia ($< 100 \text{ keV}$) s látkou, ktorou žiarenie prechádza, má prevažne povahu fotoelektrického javu.

Za predpokladu, že fotón má dostatočnú energiu, vyraža z atómu absorbujúcej látky elektrón, spravidla z K-hladiny. Pravdepodobnosť interakcie s K-elektrónom je relatívne veľká pre tie fotóny, ktorých energia presahuje väzbovú energiu na K-vrstve. Zvyšok interakcie sa týka L-elektrónov. Uprázdnené miesto na K-vrstve, prípadne L-vrstve sa zaplní elektrónom z niektorej vyššej kvantovanej hladiny. Preskok elektrónu zo vzdialenejšej hladiny na niektorú vnútornú hladinu je spätý s vyslaním charakteristického röntgenového žiarenia – fluorescenčného žiarenia.

Medzi energiou emitovaného röntgenového žiarenia K_α -série s protónovým číslom vyžarujúceho prvku (Z) platí vzťah, ktorý odvodil Moseley

$$\sqrt{\frac{\nu}{R_k}} = 0,874 (Z - 1,13)$$

kde ν je kmitopočet fluorescenčného žiarenia a R_k je Rydbergova konštanta.



Obr. 36. Grafické vyjadrenie Moseleyovho vzťahu

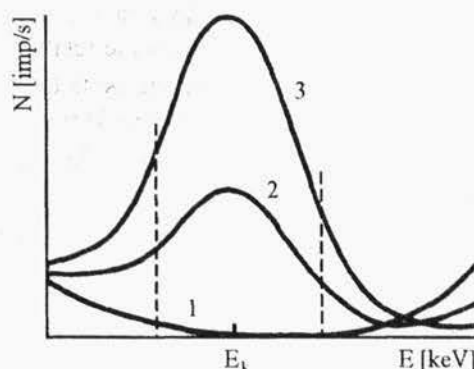
Grafické vyjadrenie Moseleyovho vzťahu je na obr. 36. Podľa energie emitovaného röntgenového fluorescenčného žiarenia sa môže určiť prvok, z ktorého atómu príslušné energetické kvantum pochádza. Charakteristické röntgenové spektrum skúmanej vzorky obsahuje jednotlivé čiary röntgenového spektra prvkov prítomných vo vzorke. Intenzita čiar je podmienená koncentráciou príslušných prvkov vo vzorke.

Ionizácia na K-vrstve môže nastať napríklad ožiarení prvku gama žiarením vhodnej energie. Pri ožarovaní látky opísaný proces bude nepretržite prebiehať a prvok bude stále vysielat' röntgenovo-fluorescenčné žiarenie o energii, ktorá mu príslúcha podľa Moseleyho zákona. Intenzita tohto žiarenia bude tým väčšia, čím väčšia je koncentrácia vybudeneho prvku v ožarovanej látke. Zmeraním intenzity tohto žiarenia teda môžeme prvok stanoviť.

Na obr. 37 vidíme röntgenovo-fluorescenčné spektrá látky obsahujúcej zinok v rôznych koncentráciách. Vysielané žiarenie má energiu E_k a so stúpajúcimi koncentraciami Zn stúpa jeho intenzita, meraná vo vyznačenej časti spektra.

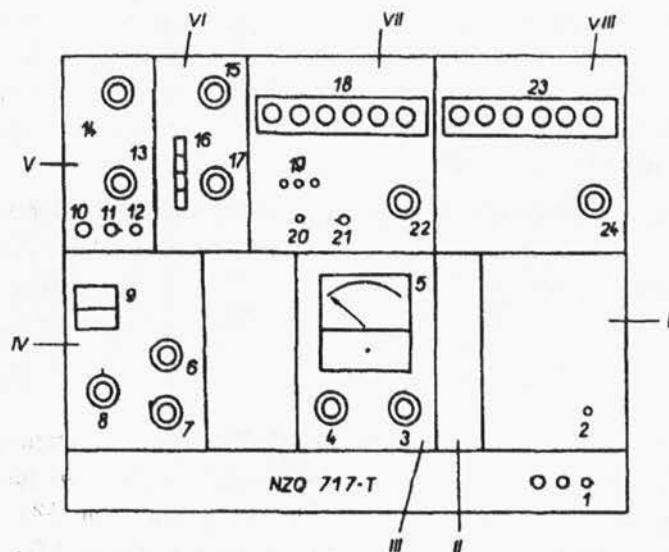
Úloha 31. Stanovenie účinných zložiek liečiv

Opis prístroja. Laboratórna meracia súprava NZQ 717 T s počítačom impulzov je určená na meranie jednotlivých vzoriek rádioaktívnych látok. Môže sa použiť v spojení so scintilačnou sondou, GM trubicou alebo prietokovým počítačom. Pozostáva z blokových častí (obr. 38): stabilizovaného zdroja napätia (I), stabilizovaného zdroja napätia (II), merača počtosti impulzov (III), stabilizovaného zdroja vysokého napätia (IV), lineárneho zosilňovača (V), amplitúdového analyzátoru impulzov (VI), počítača impulzov (VII), merača času (VIII).



Obr. 37. Röntgenovo fluorescenčné spektrá látok obsahujúcich zinok, vybudené pomocou rádionuklidového zdroja ^{238}Pu . Kolmicami sú vyznačené hranice vyhodnocovanej časti spektra. 1 – vzorka neobsahujúca Zn, 2 – vzorka s obsahom 1 % Zn, 3 – vzorka s obsahom 2 % Zn, E_K – energia fluorescenčného žiarenia Zn

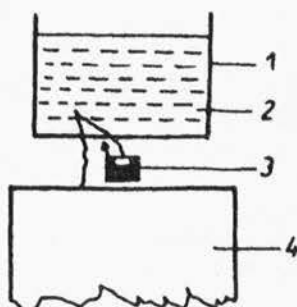
Postup pri meraní. Zapneme sieťový vypínač (1), stlačíme tlačidlo štart (2) – správnu činnosť signalizujú rozsvietené tlejivky, prepínač VN (8) nastavíme do polohy + a pomocou prepínačov (6) a (7) nastavíme požadované vysoké napätie, hodnota ktorého sa ukáže na meracom prístroji (9). Na vstup (10) je pripojená meracia sonda. Derivačnú konštantu (11) nastavíme na hodnotu 20 μs , útlm (13) na 10 dB, diskriminačnú úroveň (14) na hodnotu Z 9. Na paneli (VI) zatlačíme druhé tlačidlo (16), úroveň 1 pomocou prepínača (17) na hodnotu 02 a úroveň 2 prepínačom (15) postupne od hodnoty 0 po 99. Prepínač (21) dáme do polohy ručne, predvoľbu impulzov (22) do polohy vypnuto. Funkciu stop, štart, nula signalizujú tlejivky (19), ktoré ovládame tlačidlom (20). Po stlačení tlačidla (20) prístroj automaticky zaznamenáva početnosť prislúchajúcu skúmanej vzorke na dekatránoch (18). Uvedené tlačidlo slúži aj na prípadné zastavenie prístroja a vynulovanie merača (18). Pomocou prepínača (25) nastavíme potrebný čas meraní, ktorý postupne po zapnutí prístroja narastá na dekatránoch (23). Pred vypnutím prístroja najskôr znížime vysoké napätie na minimálnu hodnotu pomocou prepínačov (6) a (7), prepínač (8) dáme do polohy 0 a vypneme sieťový vypínač (1).



Obr. 38. Laboratórna meracia súprava NZQ 717 T

Pracovný postup. V usporiadaní podľa obr. 39 na analyzovanú látku (2), umiestnenú vo vzorkovnici (1) dopadá žiarenie z rádionuklidového zdroja (3). Vzniklé röntgenovo fluorescenčné žiarenie je detegované scintilačným detektorom (4). Použitý rádionuklidový zdroj je tienený Pb-krytom, ktorý zabráňuje ožiareniu detektora. Detektor je pripojený na gama spektrometer.

Do vzorkovnice dáme látku, ktorá obsahuje analyzovaný prvok v najvyššej koncentrácii. Zmeriame spektrum fluorescenčného žiarenia tejto vzorky. Kanál spektrometra nastavíme trvalo do polohy zodpovedajúcej energii röntgenovo fluorescenčného píku stanovovaného prvku. Zvolíme maximálnu šírku kanála spektrometra. Tým sme nastavili spektrometer na meranie intenzity žiarenia v celej energetickej oblasti vyznačenej kolmicami na obr. 37, t. j. na meranie temer všetkých kvánt röntgenovo fluorescenčného žiarenia.



Obr. 39. Geometrické usporiadanie pri rádionuklidovej röntgenovo-fluorescenčnej analýze

1 – vzorkovnica, 2 – meraná vzorka, 3 – rádionuklidový zdroj, 4 – detektor charakteristického žiarenia (scintilačná sonda)

Pri takto nastavenom spektrometri meriame postupne intenzitu röntgenovo fluorescenčného žiarenia štandardných i neznámych vzoriek. Vzorkovnice pritom naplníme tak, aby meraná látka tvorila vrstvu hrubú aspoň 2 cm. Fluorescenčné žiarenie totiž vzniká hlavne na povrchu vzorky obrátenom k žiariciu, pretože do hlbších častí budiace žiarenie neprenikne. Dobu merania volíme tak, aby počty impulzov boli väčšie než 100 000. Pre každé meranie vypočítame štatistickú chybu.

Z nameraných hodnôt zostrojíme analytickú krivku (obr. 40) a z nej odčítame koncentráciu neznámych vzoriek.

Spracovanie výsledkov. Namerané spektrum vyhodnotíme podľa obr. 40. Výsledky merania vzoriek zostavíme do tabuľky:

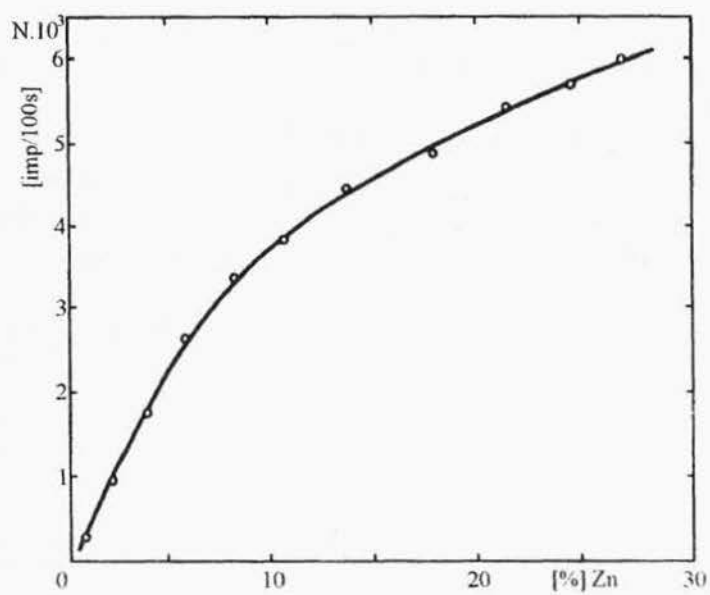
Analyzovaná látka:

Stanovovaný prvok:

Použitý žiarič:

w % stanovovaného prvku	Čas merania $t(s)$	Počet impulzov za čas (t)	Štatistická chyba merania

Z tabuľkových hodnôt zostrojíme analytickú krivku. Odčítame koncentrácie neznámych vzoriek. Zo štatistickej chyby merania a zo strmosti analytickej krivky určíme chybu analýzy.



Obr. 40. Analytická krivka vyjadrujúca závislosť nameranej počtosti impulzov od obsahu Zn vo vzorke

Literatúra

1. GARAJ, J. a kol.: Fyzikálne a fyzikálnochemické analytické metódy. Bratislava, ALFA 1977.
2. ZÝKA, J. a kol.: Analytická příručka 1. Praha, SNTL/ALFA 1979.
3. ZÝKA, J. a kol.: Analytická příručka 2. Praha, SNTL/ALFA 1980.
4. KORYTA, J., – ŠTULÍK, K.: Iontově-selektivní elektrody. Praha, ACADEMIA 1986.
5. VLÁČIL, F. a kol.: Příklady z chemické a instrumentální analyzy. Praha, SNTL/ALFA 1983.
6. ČAKRT, M. a kol.: Praktikum z analytické chemie. Bratislava, ALFA 1989.
7. SILVERSTEIN, R. M., – BASSLER, G. C.: Spectrometric identification of organic compounds. N. Y., JOHN WILEY & SONS 1967.
8. HORÁK, M. – PAPOUŠEK, D.: Infračervená spektra a struktura molekul. Praha, ACADEMIA 1976.
9. ČŮTA, F. a kol.: Instrumentální analýza. Praha, SNTL/ALFA 1986.
10. MAJER, J. a kol.: Analytická chemia. Učebnica pre farmaceutické fakulty. Martin, OSVETA/AVICENUM 1989.

Obsah

Úvod	3
1. SEPARAČNÉ METÓDY	5
1.1. Chromatografia na tenkej vrstve	6
Úloha 1. Delenie a identifikácia aminor na Silufole	6
Úloha 2. Delenie a identifikácia fenolov na Silufole	7
1.2. Iónovovýmenná chromatografia	8
Úloha 3. Nepriame alkalimetrické stanovenie medi	8
Úloha 4. Oddelovanie a stanovenie medi a zinku	10
1.3. Extrakčné metódy	11
1.3.1. Základné pojmy	11
1.3.2. Laboratórna technika a aplikácia	13
1.3.3. Extrakčno-spektrofotometrické stanovenia	14
Úloha 5. Identifikácia a stanovenie primárnych aromatických aminor	14
1.4. Plynová chromatografia	15
1.4.1. Základné pojmy	15
1.4.2. Meracie zariadenia a postupy	15
Úloha 6. Identifikácia a stanovenie <i>n</i> -dekánu v benzéne	19
Úloha 7. Identifikácia hlavných obsahových látok v silici izolovanej z liečivej rastliny <i>Melissa officinalis</i> L.	20
1.5. Vysokoučinná kvapalinová kolónová chromatografia	21
1.5.1. Základné pojmy a terminológia	21
1.5.2. Prístrojová technika	22
Úloha 8. Analytické hodnotenie viacložkovej zmesi metódou HPLC	24
1.6. Elektromigračné metódy	26
1.6.1. Základné pojmy	26
1.6.2. Izotachoforéza	27
Úloha 9. Stanovenie dusičnanov a síranov vo vodách	30
1.6.3. Aplikácia kapilárnej izotachoforézy v klinickej praxi	31
Úloha 10. Stanovenie hladiny alkálií v ľudskej krvi	31
Úloha 11. Stanovenie hladiny lítia v ľudskom sére po terapii lítiovými preparátmi	32
2. SPEKTRÁLNE METÓDY	33
2.1. Absorpčná spektrálna analýza vo viditeľnej a ultrafialovej oblasti žiarenia	33
2.1.1. Základné pojmy	33
2.1.2. Meracie zariadenia a postupy	34
2.1.3. Aplikácia	35
2.1.4. Spektrofotometrické stanovenia a identifikácia	37
Úloha 12. Overenie totožnosti liečiv skupiny pyrazolónu a stanovenie ich čistoty	37
Úloha 13. Overenie totožnosti barbiturátov a stanovenie ich čistoty	38
Úloha 14. Sledovanie podmienok spektrofotometrického stanovenia Cu^{2+} s chelatónom 3	39
Úloha 15. Spektrofotometrické stanovenie Fe^{2+} a Fe^{3+} vedľa seba s 2,2'-bipyridínom	40

2.2. Fluorimetria	41
2.2.1. Základné pojmy a aplikácia	41
2.2.2. Fluorimetrické stanovenia	42
Úloha 16. Stanovenie síranu chinínia	42
Úloha 17. Stanovenie hliníka s morínom	43
2.3. Infračervená spektrometria	44
2.3.1. Základné pojmy	44
2.3.2. Interpretácia infračervených spektier	45
Úloha 18. Identifikácia organickej látky na základe interpretácie jej IČ spektra	52
2.4. Atómová absorpčná spektrometria	53
2.4.1. Princíp metódy	53
Úloha 19. Stanovenie vápnika vedľa Mg, Fe resp. Zn	55
3. ELEKTROCHEMICKÉ METÓDY	57
3.1. Potenciometria	57
3.1.1. Základné pojmy a aplikácia	57
3.1.2. Titrácie s potenciometrickou indikáciou	60
Úloha 20. Stanovenie halogenidov vedľa seba	63
Úloha 21. Stanovenie kyseliny trihydrogénfosforečnej	64
Úloha 22. Stanovenie aminokyselín v bezvodom prostredí	65
Úloha 23. Stanovenie primárnych aromatických aminov diazotačnou reakciou	66
3.1.3. Priame stanovenie iónov s ISE	67
Úloha 24. Stanovenie iónov F^-	68
3.2. Polarografia	69
3.2.1. Základné pojmy	69
3.2.2. Diferenčná pulzová polarografia (DPP)	70
3.2.3. Analytická aplikácia polarografie	71
3.2.4. Prístrojová technika	73
3.2.5. Kvalitatívna a kvantitatívna analýza anorganických a organických látok	74
Úloha 25. Separácia splývajúcich polarografických kriviek	74
Úloha 26. Stanovenie kyseliny barbitúrovej a jej derivátov klasickou polarografickou metódou	75
Úloha 27. Stanovenie manganatých iónov metódou diferenčnej pulzovej polarografie	75
Úloha 28. Stanovenie olovnatých a kadmennatých iónov vedľa seba metódou diferenčnej pulzovej polarografie	76
4. NUKLEÁRNE ANALYTICKÉ METÓDY	78
4.1. Identifikácia rádionuklidov meraním spektra beta žiarenia	78
4.1.1. Všeobecná časť	78
Úloha 29. Identifikácia spektra ^{59}Fe , ^{32}P	80
4.2. Identifikácia rádionuklidov meraním spektra gama žiarenia	81
4.2.1. Všeobecná časť	81
Úloha 30. Identifikácia spektra ^{59}Fe	83
4.3. Rádionuklidová röntgenofluorescenčná analýza	84
4.3.1. Princíp metódy	84
Úloha 31. Stanovenie účinných zložiek liečiv	85
Literatúra	89

prof. RNDr. Emil Havránek, CSc. a kolektív

LABORATÓRNE CVIČENIA Z ANALYTICKEJ CHÉMIE III
Fyzikálno-chemické metódy

Vedúci katedry: prof. RNDr. Emil Havránek, CSc.

Vydala Univerzita Komenského v Bratislave vo Vydavateľstve UK
Technická redaktorka: Darina Földešová
Korigovali autori

Rozsah 92 strán, 7,78 AH, 8,18 VH, prvé vydanie, náklad 250 výtlačkov, v roku 1998 vytlačilo Polygrafické stredisko UK v Bratislave

ISBN 80-223-1323-8

U5004

ISBN 80-223-1323-8

U5004

Farmaceutická fakulta UKOFAUK



380301030009467